



DOI:10.22144/ctujos.2024.377

## TINH SẠCH PHYTASE CỦA VI KHUẨN ĐƯỢC PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN TỪ DẠ CỎ CỪU

Võ Văn Song Toàn<sup>1\*</sup>, Tào Việt Hà<sup>2</sup>, Nguyễn Việt Hào<sup>1</sup>, Thạch Thùy Ánh Nhi<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Xuân Huỳnh<sup>1</sup>, Đỗ Thị Xuân<sup>1</sup>, Trần Thị Giang<sup>1</sup> và Cao Ngọc Diệp<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Trường Đại học Tây Đô

\*Tác giả liên hệ (Corresponding author): vvstoan@ctu.edu.vn

### Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 14/06/2024

Sửa bài (Revised): 13/07/2024

Duyệt đăng (Accepted): 13/08/2024

**Title:** Studying phytase purification of bacteria isolated from the rumen of sheep

**Author(s):** Vo Van Song Toan<sup>1\*</sup>, Tao Viet Ha<sup>2</sup>, Nguyen Viet Hao<sup>1</sup>, Thạch Thùy Ánh Nhi<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Xuân Huỳnh<sup>1</sup>, Đỗ Thị Xuân<sup>1</sup>, Trần Thị Giang<sup>1</sup> and Cao Ngọc Diệp<sup>1</sup>

**Affiliation(s):** <sup>1</sup>Can Tho University;  
<sup>2</sup>Tay Do University

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện để phân lập, tuyển chọn vi khuẩn từ dạ cỏ cừu có khả năng tổng hợp phytase và tinh sạch phytase bao gồm phương pháp kết tủa protein bằng muối ammonium sulphate 80% và kết hợp sắc ký trao đổi ion trên gel DEAE-cellulose. Khối lượng phân tử protein được đánh giá bằng phương pháp điện di SDS-PAGE. Trong 16 chủng vi khuẩn dạ cỏ cừu có khả năng phân giải phytate, dòng vi khuẩn C8 được xác định có hàm lượng protein và phosphate cao nhất lần lượt là 0,320 mg/mL, 11,76 mg/mL. Kết quả giải trình tự vùng 16S rDNA của dòng vi khuẩn C8 khi so sánh với ngân hàng gen NCBI và đặc điểm vi khuẩn phân lập được từ dạ cỏ cừu cho thấy dòng vi khuẩn C8 xác định được mức tương đồng với dòng vi khuẩn *Bacillus rugosus* strain SPB7 ở mức tương đồng 93,16%. Phân đoạn phytase F1 thu được đạt hiệu suất thu hồi là 13,2 %, độ tinh sạch gấp 3,04 lần, hoạt tính tổng 8.733 U, hoạt tính đặc hiệu là 280 U/mg protein và khối lượng phân tử 34,9 kDa.

**Từ khóa:** *Bacillus rugosus*, phytate, sắc ký trao đổi ion, SDS-PAGE, vi khuẩn dạ cỏ cừu

### ABSTRACT

The research was conducted to isolate, and select bacteria from sheep rumen which were capable of producing and purifying phytase including methods of protein precipitation by ammonium sulfate salt 80% and ion exchange chromatography on DEAE-cellulose gel. The molecular weight of the protein was assessed by SDS-PAGE electrophoresis. Among 16 isolates of bacteria from sheep rumen which were capable for degrading phytate, the strain C8 was determined to create the highest protein and phosphate content of 0.320 mg/mL, 11.76 mg/mL, respectively. The nucleotide sequence of 16S rDNA region between the bacterial strain C8 isolated from the sheep rumen and others on the NCBI genbank were compared. The results showed that the C8 bacterial strain was similar 93.16% with the *Bacillus rugosus* strain SPB7. Phytase fraction F1 was obtained with recovery efficiency of 13.2%, purity 3.04 times, total activity of 8,733 U, specific activity of 280 U/mg protein and molecular weight 34.9 kDa.

**Keywords:** *Bacillus rugosus*, ion exchange chromatography, phytate, SDS-PAGE, rumen bacteria

## 1. GIỚI THIỆU

Phospho (P) là một nguyên tố thiết yếu cho sự sống, khoảng 80% phospho trong cơ thể ở dạng hợp chất canxi phosphate (hình thành xương và răng). Thiếu phospho ở động vật gây mềm xương, thịt nhão, chán ăn, rối loạn tâm thần, giảm sản lượng sữa, giảm tỉ lệ thụ thai, sinh trưởng chậm,... vì vậy, phospho vô cơ cũng như các loại thực vật giàu phospho được bổ sung vào thức ăn gia súc, gia cầm để đảm bảo quá trình sinh trưởng và phát triển tốt cho động vật. Muốn chuyển hóa được các hợp chất phospho này phải nhờ hệ enzyme phytase có ở một số động thực vật và vi sinh vật.

Phytase là enzyme có khả năng phá vỡ các liên kết của phức hệ phytate không tiêu hóa được giải phóng photpho, canxi và các chất dinh dưỡng khác (Debnath et al., 2005; Cao et al., 2007). Đối với động vật có cấu tạo dạ dày đơn giản như lợn, gia cầm, thỏ, ngựa, cá,... khả năng hấp thu phospho từ phytate rất thấp vì chúng thiếu phytase trong hệ tiêu hóa. Kết quả là một lượng lớn phospho dư thừa trong thức ăn có nguồn gốc từ thực vật được thải ra trong phân có thể dẫn đến hiện tượng phú dưỡng làm ô nhiễm nguồn nước, đặc biệt là tầng nước mặt. Đồng thời lượng phospho này sẽ là nguồn dinh dưỡng cho vi khuẩn gây bệnh sống trong đất và phát tán trong nước gây ra hiện tượng phú dưỡng hóa (Mullaney et al., 2000).

Ở nước ta, tình trạng này có phần nghiêm trọng, vấn đề này có thể giải quyết bằng cách bổ sung phytase vào thức ăn gia súc, gia cầm và cả thức ăn thủy sản để thủy phân các hợp chất phytate, tăng khả năng hấp thu phospho và một số chất dinh dưỡng. Việc bổ sung phytase còn góp phần làm giảm lượng phospho vô cơ bổ sung vào thức ăn nhằm tiết kiệm các chi phí trong quá trình chăn nuôi (Rao et al., 2009). Hiện nay, ngành chăn nuôi Việt Nam đang tăng trưởng nên nhu cầu về thức ăn gia súc, gia cầm cũng ngày càng tăng cao, do vậy, việc nghiên cứu sản xuất phytase để bổ sung vào thức ăn gia súc, gia cầm là hết sức cần thiết. Phytase từ vi sinh vật có nhiều ưu điểm hơn so với phytase từ thực vật và động vật. Động vật nhai lại tiêu hóa phytic axit bằng sự trợ giúp của các phytase được tạo ra bởi hệ vi sinh vật kỵ khí trong dạ cỏ (Mittal et al., 2011). Dạ cỏ cừu là một trong những nguồn tiềm năng và phong phú cho các dòng vi khuẩn sản xuất phytase hiệu quả, dùng để phân lập các vi khuẩn có khả năng phân hủy chất xơ và các hợp chất hữu cơ phức tạp, với nhiều ứng dụng tiềm năng trong nghiên cứu và công nghệ sinh học. Chính vì lý do trên, nghiên cứu “Tinh sạch phytase của vi khuẩn được phân lập và

tuyển chọn từ dạ cỏ cừu” được thực hiện với mong muốn sử dụng hiệu quả enzyme phytase từ dòng vi khuẩn này.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Dịch dạ cỏ cừu được thu tại lò giết mổ gia súc Sơn Quỳnh, xã Minh Đức, huyện Mỏ Cày Nam, tỉnh Bến Tre. Các ống dẫn thông với dạ cỏ (thực quản và ruột non) được bịt chặt bằng dây nylon sau khi dạ cỏ được lấy ra khỏi cơ thể gia súc. Mỗi loại dịch dạ cỏ được thu tại 3 vị trí khác nhau trên cùng một dạ cỏ thông qua ống inox (vô trùng) có 1 đầu nhọn cắm trực tiếp vào dạ cỏ, một đầu còn lại nối với ống cao su vô trùng dẫn vào ống falcon 50 mL (vô trùng), bảo quản ổn nhiệt 8 - 10°C dịch dạ cỏ trong tối để chuyển mẫu về phòng thí nghiệm. Đồng nhất dịch dạ cỏ trước khi tiến hành phân lập.

Cám gạo và bắp được mua ở tại cửa hàng thuốc thú y và thức ăn gia súc Diễm Thủy, được sấy khô ở 50°C và nghiền mịn với kích thước lỗ lưới 1 mm.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Thành phần hóa học nguyên liệu

Bột đậu nành, cám, bột phytase và thức ăn sau khi xay nhuyễn được phân tích hàm lượng dinh dưỡng. Thành phần hóa học vật chất khô, CP % được phân tích theo AOAC (Horwitz, 2000), phosphate hòa tan (mg/g), phospho tổng số (mg/g) theo AOAC 986.24 (Horwitz, 2000).

#### 2.2.2. Phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn sinh phytase

Phân lập vi khuẩn: Dịch huyền phù vi khuẩn dạ cỏ được chuyển lên đĩa petri với thành phần dung dịch khoáng môi trường nuôi cấy (Ryckeboer et al., 2003), được ủ trong 48 giờ ở 35°C trong bình ủ thủy tinh có nắp kín, ngọn nên được đặt bên trong bình thủy tinh để đốt hết oxy trong bình ủ (gọi là bình ủ kỵ khí). Các khuẩn lạc rời rạc khác nhau về độ nổi, dạng bìa, màu sắc được chọn để tiếp tục cấy ria trong các lần cấy chuyên tiếp theo. Vi khuẩn tiếp tục được cấy chuyên lên môi trường minimal (Sikorski et al., 2002), sau đó là môi trường phytate hydrolysing bacteria (Hill et al., 2007) và được ủ 48 giờ ở 35°C trong bình ủ kỵ khí. Khuẩn lạc đồng nhất về hình dạng, màu sắc dạng bìa sẽ được quan sát ở vật kính độ phóng đại x100 để xác định độ rỗng của mẫu, mô tả đặc điểm của vi khuẩn theo Linh et al. (2008).

Tuyển chọn vi khuẩn sinh phytase: Các dòng vi khuẩn sau khi được tách rỗng được tiến hành tuyển chọn khả năng sản sinh phytase thông qua môi

trường chứa cơ chất đặc hiệu phytate. Nhân dòng mật số các dòng vi khuẩn phân lập được trên môi trường minimal cải tiến (Sikorski et al., 2002), ủ kỵ khí ở 35°C trong 48 giờ. Chúng 1% dung dịch vi khuẩn vào môi trường phytate hydrolysing bacteria lỏng, tiếp tục ủ kỵ khí ở nhiệt độ 35°C trong 72 giờ (Hill et al., 2007), dung dịch ngoại bào được ly tâm tốc độ 5.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C.

Định danh vi khuẩn: Trích DNA của vi khuẩn theo phương pháp của Maniatis et al. (1989). Phản ứng PCR khuếch đại vùng 16S rDNA của vi khuẩn (Turner et al., 1999) được thực hiện bằng cặp mồi 8F và 1492R. Sản phẩm PCR được tiến hành giải trình tự bằng máy giải trình tự tự động DNA Applied Biosystem 3130 (Mỹ) và được so sánh trình tự nucleotide đoạn gen 16S rDNA giữa các dòng vi khuẩn của dữ liệu ngân hàng gen bằng chương trình BLAST N để so sánh mức độ tương đồng trình tự nucleotide vùng 16S rDNA của vi khuẩn giữa các loài.

2.2.3. Tinh sạch phytase vi khuẩn

Chuẩn bị dung dịch phytase thô: Vi khuẩn được cấy trên môi trường minimal (Sikorski et al., 2002) và ủ kỵ khí ở 35°C trong 48 giờ. Nhân mật số các dòng vi khuẩn bằng môi trường assaye activity (Hariprasad & Niranjana, 2009). Chúng 1% (v/v) dung dịch huyền phù vi khuẩn có mật số 10<sup>7</sup> CFU/mL vào môi trường chứa cơ chất với cám gạo và bột bắp với tỉ lệ 1:1. Ủ ở nhiệt độ 35°C trong 3 ngày ở điều kiện kỵ khí. Ly tâm 5.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C để thu nhận dung dịch enzyme thô.

Tinh sạch phytase: Dung dịch phytase thô được sử dụng để kết tủa protein thô bằng muối ammonium sulphate 80% bão hòa. Phần kết tủa được phân tách bằng ly tâm lạnh với tốc độ 5000 vòng/phút trong 10 phút; được hòa tan và thẩm tích bằng dung dịch đệm Tris HCl 0,02 M; pH 7,2. Phân đoạn protein thu được dùng để phân tích phytase bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion trên gel DEAE-cellulose. Dung dịch đệm Tris 0,02 M pH 7,2 được bơm với tốc độ 1 mL/phút. Rửa giải các protein bám cột bằng gradient nồng độ NaCl từ 0 - 1 M với tốc độ 1 mL/phút. Hàm lượng protein hòa tan, hoạt tính, và khối lượng phân tử lần lượt được xác định theo phương pháp Bradford (1976), Heinonen and Lahti (1981) và phương pháp điện di SDS-PAGE (Hames, 1998).

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được thu thập, lưu trữ, xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016. Giá trị trung bình, độ lệch chuẩn và sai số chuẩn được tính toán thống kê

bằng phần mềm Minitab 16. Trung bình số liệu giữa các nghiệm thức thí nghiệm được so sánh bằng phương pháp phân tích phương sai ANOVA theo kiểm định Tukey ở mức ý nghĩa là 0,05.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát nguồn cơ chất

Nguồn cơ chất được khảo sát các chỉ tiêu vật chất khô, phospho tổng số (mg/g), phosphate hòa tan tổng số (mg/g) trước khi lên men.

Bảng 1. Thành phần hóa học nguyên liệu

Thành phần hóa học	Cám gạo	Bột bắp
Vật chất khô (%)	91,6 ± 0,252	90,9 ± 1,012
Protein tổng số (%)	11,8 ± 0,153	9,2 ± 0,153
Phospho (mg/g)	25,7 ± 0,028	5,3 ± 0,005
Phosphate hòa tan (mg/g)	0,333 ± 0,010	0,004 ± 0,000

3.2. Phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn sinh phytase

3.2.1. Phân lập vi khuẩn sinh phytase từ dạ cỏ cừu

Kết quả Bảng 2 cho thấy các dòng vi khuẩn sinh phytase đã phân lập được và được xác định dạng khuẩn lạc (hình dạng, độ nổi, dạng bìa, màu), tế bào vi khuẩn (dạng tế bào, Gram), kích thước (µm), catase, oxydase, tính di động. Phần lớn các chủng vi khuẩn phân lập được trong dạ cỏ cừu cũng có khuẩn lạc dạng tròn và không đều, trong đó dạng tròn chiếm 9/16 chủng vi khuẩn phân lập được, dạng không đều chiếm 7/16 chủng vi khuẩn. Độ nổi của khuẩn lạc gồm bốn dạng chính là mô, lồi, phẳng và cầu chông. Các chủng vi khuẩn có dạng bìa nguyên, răng cưa và chia thùy, màu sắc khuẩn lạc thay đổi từ màu trắng trong, trắng đục, xám nhạt và vàng. Trong 16 chủng vi khuẩn phân lập được từ dạ cỏ cừu, có 7 chủng vi khuẩn có tế bào hình cầu, 9 chủng có tế bào hình que, 8 chủng vi khuẩn có tế bào Gram dương và 8 dòng vi khuẩn có tế bào Gram âm.



Hình 1. Vi khuẩn C8 Gram dương, hình que



**Bảng 2. Đặc điểm vi khuẩn phân lập được từ dạ cỏ cừu**

Vi khuẩn lạc (hình dạng, độ nổi, dạng bìa, khuẩn màu)	Tế bào vi khuẩn (hình dạng, Gram)	Kích thước (µm)	Catalase	Oxydase	Di động
C1 Tròn- Lài- Nguyên- Trắng trong	Cầu Gram +	0,99	+	+	-
C2 Tròn- Lài- Nguyên- Xám nhạt	Cầu Gram +	1,19	+	-	-
C3 Không đều- Phẳng- Chia thùy- Trắng đục	Cầu Gram -	1,98	+	+	+
C4 Tròn- Cầu chông Nguyên- Trắng đục	Cầu Gram -	1,98	+	+	+
C5 Tròn- Lài- Nguyên- Trắng đục	Cầu Gram +	1,78	+	+	-
C6 Không đều- Mô- Răng cưa- Trắng đục	Que, Gram +	1,48 x 0,49	+	+	+
C7 Tròn- Mô- Nguyên- Trắng đục	Que, Gram -	1,48	-	-	+
C8 Không đều- Lài- Răng cưa- Trắng đục	Que, Gram +	1,48 x 0,59	+	+	+
C9 Không đều- Mô- Răng cưa- Xám nhạt	Que, Gram -	1,38 x 0,49	+	-	+
C10 Tròn- Lài- Răng cưa- Trắng đục	Que, Gram -	1,48 x 0,59	-	-	+
C11 Tròn- Lài- Nguyên- Trắng đục	Que, Gram -	2,47 x 0,89	-	-	+
C12 Tròn- Mô- Nguyên- Trắng trong	Cầu Gram -	1,39	+	+	-
C13 Không đều- Mô- Nguyên- Trắng đục	Que, Gram +	1,48 x 0,59	+	-	+
C14 Không đều- Phẳng- Răng cưa- Trắng đục	Que Gram +	5,44 x 0,49	+	-	+
C15 Không đều- Lài- Răng cưa- Trắng đục	Que, Gram +	1,48 x 0,59	+	+	+
C16 Tròn- Mô- Nguyên- Lài	Que, Gram -	1,48 x 0,59	+	-	+

\* Ghi chú: + gram dương; - gram âm

### 3.2.2. Tuyển chọn vi khuẩn

Phytate là cơ chất đặc hiệu cho phytase, trong điều kiện môi trường hạn hẹp về nguồn phosphate hòa tan sẽ kích thích vi sinh vật sản xuất enzyme để thủy phân phytate bổ sung nguồn phosphor cho quá trình sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật. Vì vậy, các chủng vi khuẩn sẽ thúc đẩy quá trình sản sinh phytase để xúc tác phản ứng cắt gốc phosphate liên kết với inositol, giải phóng phosphate tự do cung cấp cho tế bào.

Khả năng sinh tổng hợp phytase của các chủng vi khuẩn dạ cỏ được xác định dựa trên khả năng phân giải cơ chất thành  $PO_4^{3-}$  ở dạng khó tan trong cấu trúc phytate thành các gốc  $PO_4^{3-}$  tự do. Hàm lượng  $PO_4^{3-}$  tự do được xác định thông qua phương pháp xanh molybdate (Olsen & Sommers, 1982).

Từ kết quả phân tích hàm lượng  $PO_4^{3-}$  hòa tan, hầu hết các dòng vi khuẩn sau 3 ngày nuôi cấy trong môi trường lỏng Phytate hydrolysing bacteria (Hill et al., 2007), ở 35°C và trong điều kiện kỵ khí đều có khả năng giải phóng  $PO_4^{3-}$  từ muối phytate làm thay đổi hàm lượng  $PO_4^{3-}$  hòa tan có trong môi

trường. Theo Pandey et al. (2001), tùy vào nhóm vi sinh vật cũng như vi khuẩn, và cũng tùy vào môi trường và loài sẽ ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp protein và hàm lượng phosphate hòa tan được tạo ra dưới tác động của phytase.

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy, hàm lượng protein sinh ra từ các chủng vi khuẩn dạ cỏ cừu dao động từ 0,169 mg (vi khuẩn C3) đến 0,320 mg (vi khuẩn C8), trong đó dung dịch trích ly từ chủng vi khuẩn C8 có hàm lượng protein cao nhất với 0,320 mg và

khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng vi khuẩn còn lại.

Hàm lượng phosphate trong dịch trích của các mẫu vi khuẩn tại thời điểm thu mẫu dao động trong khoảng từ 0,35 mg (vi khuẩn C3) đến 11,76 mg (vi khuẩn C8). Chủng vi khuẩn C8 cho hàm lượng phosphate cao nhất với 11,76 mg và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng vi khuẩn còn lại. Ngoài ra, dòng vi khuẩn C15 và C16 cũng có khả năng tạo ra hàm lượng phosphate trong môi trường cao sau 3 ngày nuôi cấy, lần lượt là 10,07 và 9,42 mg.

**Bảng 3. Kết quả phân tích hàm lượng protein tổng và hàm lượng phosphate hòa tan tổng từ vi khuẩn dạ cỏ cừu**

Ký hiệu	Thể tích (mL)	Tổng hàm lượng protein (mg)	Tổng hàm lượng phosphate hòa tan (mg)
C1	4,73 ± 0,058	0,134 <sup>efg</sup> ± 0,003	3,00 <sup>hi</sup> ± 0,016
C2	4,70 ± 0,000	0,156 <sup>dc</sup> ± 0,009	8,36 <sup>d</sup> ± 0,042
C3	4,70 ± 0,100	0,169 <sup>d</sup> ± 0,011	0,35 <sup>l</sup> ± 0,042
C4	4,77 ± 0,058	0,212 <sup>c</sup> ± 0,005	7,09 <sup>e</sup> ± 0,160
C5	4,70 ± 0,000	0,220 <sup>bc</sup> ± 0,021	3,48 <sup>gh</sup> ± 0,042
C6	4,73 ± 0,058	0,128 <sup>fg</sup> ± 0,006	5,12 <sup>f</sup> ± 0,104
C7	4,67 ± 0,058	0,091 <sup>h</sup> ± 0,006	4,58 <sup>f</sup> ± 0,150
C8	4,70 ± 0,000	0,320 <sup>a</sup> ± 0,003	11,76 <sup>a</sup> ± 0,597
C9	4,70 ± 0,100	0,032 <sup>i</sup> ± 0,004	3,81 <sup>g</sup> ± 0,055
C10	4,70 ± 0,000	0,218 <sup>bc</sup> ± 0,012	4,93 <sup>f</sup> ± 0,104
C11	4,63 ± 0,058	0,109 <sup>gh</sup> ± 0,002	1,58 <sup>k</sup> ± 0,138
C12	4,73 ± 0,115	0,142 <sup>ef</sup> ± 0,005	6,86 <sup>e</sup> ± 0,084
C13	4,60 ± 0,000	0,227 <sup>bc</sup> ± 0,005	5,17 <sup>f</sup> ± 0,108
C14	4,70 ± 0,100	0,144 <sup>def</sup> ± 0,007	2,10 <sup>jk</sup> ± 0,123
C15	4,73 ± 0,058	0,207 <sup>c</sup> ± 0,003	10,07 <sup>b</sup> ± 0,266
C16	4,70 ± 0,000	0,239 <sup>b</sup> ± 0,012	9,42 <sup>c</sup> ± 0,119
CV%		5,04%	3,82%

\*Ghi chú: số liệu là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại, trong cùng một cột với các giá trị cùng ký tự biểu diễn sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

3.2.3. Định danh vi khuẩn C8

DNA của dòng vi khuẩn C8 đã được ly trích và khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi 27F và 1495R. Kết quả giải trình tự của đoạn DNA 16S-rDNA của vi khuẩn C8 cho trình tự 16S rDNA với tổng số 729 nucleotide (Hình 2).

Khi so sánh trình tự 16S rDNA dòng vi khuẩn C8 với dữ liệu ngân hàng gen bằng chương trình BLAST, trình tự này tương đồng với trình tự 16S rDNA với mức độ tương đồng 93,16% với *Bacillus ruginosus* strain SPB7.

Vi khuẩn C8 được phân lập từ dạ cỏ cừu (Bảng 2) trên môi trường thạch có khuẩn lạc không đều, độ nổi lồi, bia răng cưa, khuẩn lạc màu trắng đục, hình que ngắn, kích thước 1,48 x 0,59 µm, Gram dương, catalase và oxydase dương tính, khả năng di động;

phù hợp với đặc điểm một số loài thuộc chi *Bacillus* với đặc điểm Gram dương, hình que, kích thước tế bào có chiều rộng từ 1,1-1,5 µm chiều dài từ 2-6 µm.

```
GCTGGCTCCTAAAAGGTTACTCCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCWC
KGGGTGACGGCGGTTGTACARGGCSCGGGAACGATTACCAGCGGC
ATGCTGATCCCGATTACTAGCGATTACAGCTTACCGAGTCGAGTTGCA
ACTCGATCCGAAGTGGAGAACAGATTTGTGGATTGGCTTAACTCGCGG
TTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGAGCCAGGTCAT
AAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACC
GGCAGTCACCTTAKAGTGCCCAACTGAATGCTGGSACTAASATCAAGGG
TTGGCTCGTTGGGGACTTAAACCAACATCTCASKACWCRAAGCTGAARA
CAACATGCACCACTGTCACTCTGCCCCSAAGGGGACGTCCTATCTCTA
GGATTGTCARAGGATGTCMAGACCTGGTAAGGTTCTTCKCGTTGCTTCTA
ATTAAAMCAGATGCTCACCRCTGTGCGGGSCSCKTCAATTCTTTGA
GTTTCAGTCTTGCGACCGWACTCCSAGGGGARTGSTWAATGSGKTA
TGCAGCACTAAAGGGGGARACMCCCTAMCACTTAGCACTCAWCGTTTA
CRGMRTGGACGACMAAGSTATCTAATCMTGTTCCGCTCCCACGCTTCKC
TCCTCASCGWAGTTTACAGACCAGAGAGT
```

**Hình 2. Trình tự gen 16S rDNA của vi khuẩn C8**

**Bảng 4. Mức độ tương đồng trình tự 16S rDNA của vi khuẩn dạn cỏ cừu**

Vi khuẩn	Trình tự tương đồng trên NCBI	Độ tương đồng (%)
C8	<i>Bacillus rugosus</i> strain SPB7	93,16

**3.3. Tinh sạch phytase vi khuẩn**

**3.3.1. Thu nhận phytase bằng ammonium sulphate**

Kết quả kết tủa phytase thô bằng ammonium sulfate ở nồng độ 80% (Bảng 5).

Theo khảo sát hàm lượng protein, hoạt tính tổng và hoạt tính đặc hiệu của phytase thì hàm lượng protein tổng lần lượt là 236 mg, 18.429 U và 78,0 U/mg. Hiệu suất thu hồi so với mẫu thô là 89,0% và độ tinh sạch 0,921. Vi khuẩn *Bacillus cereus* TD5B cũng có hoạt tính đặc hiệu 77,2 U/mg theo Atik et al. (2018).

**Bảng 5. Hàm lượng protein, hoạt tính enzyme, hoạt tính đặc hiệu các phân đoạn**

Phân đoạn	Thể tích (mL)	Hàm lượng protein tổng (mg)	Hoạt tính tổng (U)	Hoạt tính đặc hiệu (U/mg)	Hiệu suất thu hồi (%)	Độ tinh sạch
Thô	35	245±2,25	20.775±253	84,6	100	1,00
AS 80%	33	236±3,18	18.429±496	78,0	89,0	0,921

**3.3.2. Thu nhận phytase bằng sắc ký trao đổi ion**

Theo Shimizu et al. (1992) và Ullah et al. (2000) thì điểm đẳng điện của phytase nằm trong khoảng 6,50 đến 7,04, vì thế trong môi trường dung dịch đệm Tris-HCl 0,02 M, pH 7,2 thì phytase ở trạng thái tích điện dương. Mẫu sau khi được kết tủa phân đoạn chọn được nồng độ 80% để thực hiện quá trình tinh sạch tiếp theo bằng sắc ký trao đổi ion trên cột gel DEAE-Cellulose. Kết quả sắc ký đồ (Hình 4) cho thấy bằng sắc ký trao đổi ion gel DEAE Cellulose đã thu nhận được 2 phân đoạn gồm: 1 phân đoạn protein không bám (UB) và 1 phân đoạn protein bám trên cột gel (F1).

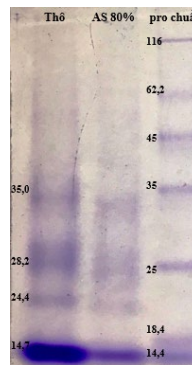
**Bảng 6. Hàm lượng protein, hoạt tính enzyme, hoạt tính đặc hiệu của phương pháp sắc kí trao đổi ion DEAE-Cellulose**

Phân đoạn	Hàm lượng protein tổng (mg)	Hoạt tính tổng (U)	Hoạt tính đặc hiệu (U/mg)	Hiệu suất (%)	Độ tinh sạch
Thô	245±2,25	120.775±253	84,6	100	1,00
AS 80%	236±3,18	18.429±496	78,0	89	0,92
UB	77,7±2,33	5.273±27,3	67,9	32,8	0,73
F1	31,2±0,706	8.733±145,5	280	13,2	3,04

Ghi chú: UB: phân đoạn protein không bám, F1: phân đoạn protein được rửa giải.

Hàm lượng protein tổng ở phân đoạn F1 là 31,2 mg, thấp hơn 2,5 lần so với phân đoạn UB là 77,7

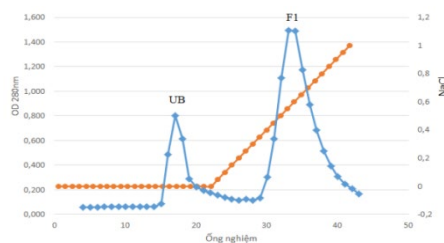
mg. Nhưng ở phân đoạn F1 hoạt tính đặc hiệu là 280 U/mg, cao hơn gấp 4,12 lần so với Ub có hoạt tính



**Hình 3. Phân đoạn protein được kết tủa bằng ammonium sulphate 80%**

Ghi chú: đơn vị kDa

Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy mẫu thô và phân đoạn protein tủa bằng AS 80% xuất hiện băng protein khoảng 35kDa bên cạnh 3 băng protein với khối lượng phân tử 28,2; 24,4 và 14,7 kDa.

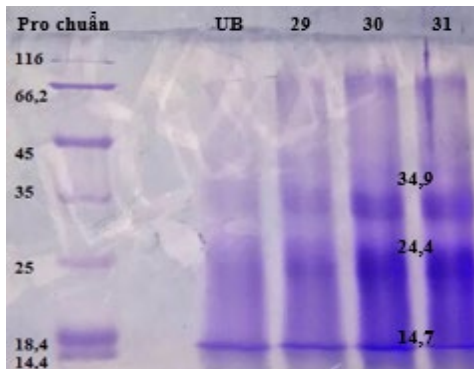


**Hình 4. Sắc ký đồ của phân đoạn ammonium sulphate 80% bằng gel DEAE-Cellulose**

\*Ghi chú: đường màu xanh: OD 280mm

đường màu cam: nồng độ muối NaCl

đặc hiệu là 67,9 U/mg (Bảng 6), hiệu suất thu hồi là 13,2% và độ tinh sạch tăng 3,04 lần.



**Hình 5. Khối lượng phân tử protein phân đoạn UB và F1**

Ghi chú: đơn vị kDa, 29,30,31: số thứ tự ống nghiệm của phân đoạn F1

Dựa vào kết quả điện di (Hình 5) cho thấy, protein sau khi sắc kí trao đổi ion DEAE Cellulose

ở phân đoạn F1 có 3 băng protein với khối lượng phân tử khoảng 34,9 kDa, 24,4 kDa, và 14,7 kDa. Theo Rao et al., (2008) phytase của vi khuẩn *Bacillus* sp. có khối lượng phân tử là 40 kDa, vi khuẩn *Pedobacter nyackensis* cũng cho thấy phytase có khối lượng phân tử khoảng 38 kDa (Huang et al., 2009).

#### 4. KẾT LUẬN

Dòng vi khuẩn C8 đã được phân lập và tuyển chọn từ dung dịch dạ cỏ cừu có khả năng sinh tổng hợp phytase mạnh nhất trong 16 chủng vi khuẩn và C8 có trình tự gen vùng 16S rDNA tương đồng 93,16% với *Bacillus rugosus* strain SPB7.

Phương pháp tinh sạch kết hợp kết tủa protein bằng muối ammonium sulphate 80% và sắc kí trao đổi ion trên gel DEAE Cellulose đã thu hồi được phân đoạn phytase đạt hiệu suất 13,2%, độ tinh sạch tăng 3,04 lần, hoạt tính tổng 8.733 U, hoạt tính đặc hiệu là 280 U/mg protein và khối lượng phân tử là 34,9 kDa.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ajila, C. M., Leelavathi, K. U. J. S., & Rao, U. P. (2008). Improvement of dietary fiber content and antioxidant properties in soft dough biscuits with the incorporation of mango peel powder. *Journal of cereal science*, 48(2), 319-326. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.10.001>
- Atik, A. F., Suryadevara, C. M., Schweller, R. M., West, J. L., Healy, P., Herndon II, J. E., Kendra, L. C., Sanchez-Perez, L., Roger, E. M., Gerald, E. A., Fecci, P., John, H. S., & Sampson, J. H. (2018). Hyaluronic acid based low viscosity hydrogel as a novel carrier for Convection Enhanced Delivery of CAR T cells. *Journal of Clinical Neuroscience*, 56, 163-168. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2018.06.005>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/00032697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/00032697(76)90527-3)
- Cao, L., Wang, W., Yang, C., Yang, Y., Diana, J., Yakupitiyage, A., ... & Li, D. (2007). Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme and microbial technology*, 40(4), 497-507. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.007>
- Debnath, D., Pal, A. K., Sahu, N. P., Jain, K. K., Yengkokpam, S., & Mukherjee, S. C. (2005). Effect of dietary microbial phytase supplementation on growth and nutrient digestibility of *Pangasius pangasius* (Hamilton) fingerlings. *Aquaculture Research*, 36(2), 180-187. <https://doi.org/10.1111/j.13652109.2004.01203.x>
- Dos Santos Aguilar, J. G., & Sato, H. H. (2018). Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, 103, 253-262. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.044>
- Fu, X. (2008). Foreign direct investment, absorptive capacity and regional innovation capabilities: evidence from China. *Oxford development studies*, 36(1), 89-110. <https://doi.org/10.1080/13600810701848193>
- Hames, B. D. (Ed.). (1998). *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach* (Vol. 197). OUP Oxford.
- Hariprasad, P., & Niranjana, S. R. (2009). Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant and soil*, 316, 13-24. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9754-6>
- Heinonen, J. K., & Lahti, R. J. (1981). A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Analytical biochemistry*, 113(2), 313-317. [https://doi.org/10.1016/00032697\(81\)90082-8](https://doi.org/10.1016/00032697(81)90082-8)
- Huang, F. C., Molnar, P., & Schwab, W. (2009). Cloning and functional characterization of carotenoid cleavage dioxygenase 4



- genes. *Journal of experimental botany*, 60(11), 3011-3022. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp137>
- Hill, V. R., Kahler, A. M., Jothikumar, N., Johnson, T. B., Hahn, D., & Cromeans, T. L. (2007). Multistate evaluation of an ultrafiltration-based procedure for simultaneous recovery of enteric microbes in 100-liter tap water samples. *Applied and environmental microbiology*, 73(13), 4218-4225. <https://doi.org/10.1128/AEM.02713-06>.
- Horwitz, W. (2000). Official Methods of AOAC International. 17th Edition, Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International, Gaithersburg.
- Mittal, N., Scherrer, T., Gerber, A. P., & Janga, S. C. (2011). Interplay between posttranscriptional and posttranslational interactions of RNA-binding proteins. *Journal of molecular biology*, 409(3), 466-479. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.03.064>.
- Mullaney, E. J., Daly, C. B., & Ullah, A. H. (2000). Advances in phytase research. [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(00\)47004-8](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(00)47004-8)
- Linh, Đ. L., Phương, Đ. M., Tuyết, P. T., Anh, K. H & Giang, N. T. (2008). Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn lactic phân lập trên địa bàn thành phố Hà Nội. *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, 24(3), 221-226. <https://js.vnu.edu.vn/NST/article/view/3541>
- Olsen, S. R., & Sommers, L. E. (1982). Phosphorus soluble in sodium bicarbonate. *Methods of soil analysis, part, 2*, 404-430.
- Pandey, A., Negi, S. and Soccol, C.R. (Eds.), (2016). *Current developments in biotechnology and bioengineering: Production, isolation and purification of industrial products*. Elsevier Science.
- Pandey, G. (2001). *Remembering partition: Violence, nationalism, and history in India* (Vol. 7). Cambridge University Press.
- Rao, D. E. C. S., Rao, K. V., Reddy, T. P., & Reddy, V. D. (2009). Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases: an overview. *Critical reviews in biotechnology*, 29(2), 182-198. <https://doi.org/10.1080/07388550902919571>.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Vaes, K., Klammer, S., De Clercq, D., Coosemans, J., Insam, H., & Swings, J. (2003). A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Annals of microbiology*, 53(4), 349-410. <https://biblio.ugent.be/publication/218678>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Shan, J., Fu, J., Zhao, Z., Kong, X., Huang, H., Luo, L., & Yin, Z. (2009). Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264. 7 cells through suppressing NF-κB and JNK/AP-1 activation. *International immunopharmacology*, 9(9), 1042-1048. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2009.04.011>
- Shimizu, M. (1992). Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56(8), 1266-1269. <https://doi.org/10.1271/bbb.56.1266>
- Sikorski, J., Möhle, M., & Wackernagel, W. (2002). Identification of complex composition, strong strain diversity and directional selection in local *Pseudomonas stutzeri* populations from marine sediment. *Environmental Microbiology*, 4(8), 465-476. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00325.x>
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P., & Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis 1. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 327-338. <https://doi.org/10.1111/j.15507408.1999.tb04612.x>