

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG BỨC XẠ ION HÓA KẾT HỢP CÔNG NGHỆ RIBOSOME CẢI THIỆN KHẢ NĂNG SINH PROTEASE CỦA CHỦNG VI KHUẨN *Bacillus subtilis*

TRẦN BĂNG DIỆP¹, NGUYỄN THỊ THOM¹, HOÀNG ĐĂNG SÁNG¹, NGUYỄN VĂN BÌNH¹, TRẦN XUÂN AN¹, HOÀNG PHƯƠNG THẢO¹, TRẦN MINH QUỲNH¹, VÕ THỊ THƯƠNG LAN²

¹Trung tâm chiếu xạ Hà Nội, km 12, Đường 32, Minh Khai - Bắc Từ Liêm - Hà Nội

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia, 334 Nguyễn Trãi - Thanh Xuân - Hà Nội.

Email: tranfbangdiep@yahoo.com

Tóm tắt: *Bacillus subtilis* B5 là chủng vi khuẩn có khả năng sinh protease cao được tuyển chọn từ một số phòng thí nghiệm trong nước. Huyền phù dịch tế bào ở giai đoạn phát triển theo hàm mũ và đĩa thạch dinh dưỡng có cấy tế bào của chủng vi khuẩn này được xử lý chiếu xạ ở dải liều 0-3000 Gy trên nguồn Co-60 tại Trung tâm Chiếu xạ Hà Nội. Kết quả cho thấy tỷ lệ vi khuẩn sống sót đều giảm theo liều và đường cong sống sót của chúng dường như tuân theo lý thuyết mô hình truyền năng lượng. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của xử lý chiếu xạ liều khác nhau tới khả năng kháng streptomycin (20 µg/ml) của chủng *Bacillus subtilis* B5 cũng được khảo sát. Tần số đột biến kháng streptomycin của chủng vi khuẩn này tăng đáng kể nhờ xử lý chiếu xạ. Tần số đột biến cao nhất là $1,61 \times 10^{-3}$ (621 CFU thu được 1 đột biến) khi xử lý chiếu xạ liều 1000 Gy, tần số đột biến thấp hơn khoảng $3,09 \times 10^{-6}$ ($0,323 \times 10^6$ CFU thu được 1 đột biến) khi chiếu xạ liều 100 Gy. Trong khi đó, số liệu cho thấy tần số đột biến kháng streptomycin tự nhiên trung bình là $1,78 \times 10^{-6}$ ($0,56 \times 10^6$ CFU thu được 1 đột biến).

Sau lần sàng lọc đầu tiên, 25 khuẩn lạc kháng streptomycin 20 µg/ml có khả năng sinh protease cao hơn chủng thuần được lựa chọn từ 361 khuẩn lạc *Bacillus subtilis* B5 kháng xạ. Trong các lần sàng lọc tiếp theo, bằng cách tăng dần nồng độ kháng sinh (KS) trong môi trường nuôi cấy đã thu được 6 khuẩn lạc kháng xạ, kháng KS có khả năng sinh protease vượt trội so với các chủng gốc ban đầu. Kết quả xác định trình tự gen *rpoB* và *rpsL* của 6 khuẩn lạc *Bacillus* cho thấy 3/6 khuẩn lạc có gen *rpoB* mang đột biến, không có bất kì đột biến nào trên gen *rpsL* được phát hiện, chứng tỏ tính kháng streptomycin do đột biến ở gen *rpoB* và liên quan đến khả năng tăng sinh tổng hợp protease, phù hợp với các công bố quốc tế trước đây. Trong số các đột biến thì dòng 609 (tạo được nhờ chiếu xạ liều 500 Gy kết hợp xử lý streptomycin 200 µg/ml) có khả năng sinh protease vượt trội (cao hơn 2,7 lần so với chủng gốc) và ổn định so với các đột biến còn lại.

Sử dụng phương pháp mô hình hóa đáp ứng bề mặt - thiết kế tại tâm (RSM – CCD) kết hợp với phần mềm tin sinh Design Expert và kiểm tra bằng thực nghiệm đã xác định điều kiện tối ưu của bốn yếu tố trong nuôi cấy dòng đột biến *Bacillus subtilis*-609 thu protease cực đại là 2299,49 UI/ml ở các giá trị hàm lượng pepton 6,5 g/l, hàm lượng cao thịt 2 g/l, pH 7,16, thời gian nuôi cấy là 21 giờ. Tiến hành thí nghiệm với các giá trị dự đoán, hoạt độ protease nhận được từ kết quả thực nghiệm là 2257,32 UI/ml.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, chiếu xạ gamma, protease, streptomycin, tỷ lệ sống sót, tần số đột biến

1. MỞ ĐẦU

Protease là nhóm enzyme có chức năng phân giải các liên kết peptide của protein để tạo thành các acid amine đơn lẻ. Với tiềm năng ứng dụng to lớn trong nhiều lĩnh vực đời sống nên protease đang thu hút mối quan tâm của nhiều nhà khoa học cũng như các công ty hóa dược lớn trên thế giới. Theo tính toán, hiện nay protease chiếm đến 65% sản phẩm enzyme thương mại toàn cầu và sản lượng có thể đạt đến giá trị 2.767 triệu bảng Anh vào cuối năm 2019 [1].

Vi sinh vật (VSV), đặc biệt là chủng vi khuẩn *Bacillus* là nguồn nguyên liệu thích hợp để sản xuất protease ở quy mô công nghiệp nhờ việc thu nhận sản phẩm dễ dàng, nuôi cấy đơn

giản trên môi trường rẻ tiền và đặc biệt protease của chủng vi khuẩn này có hoạt tính ổn định ở các điều kiện pH, nhiệt độ cao [2]. Tuy nhiên, các chủng *Bacillus* tự nhiên thường cho năng suất sinh protease không cao và vì thế việc tạo ra các thể đột biến có khả năng sinh sản phẩm thứ cấp vượt trội là một lựa chọn lý tưởng cho ngành công nghiệp sản xuất protease.

Trong tự nhiên, tỷ lệ đột biến phụ thuộc vào điều kiện phát triển của vi sinh vật và nằm trong khoảng từ 10^{-10} đến 10^{-6} . Tỷ lệ này có thể tăng một cách rõ rệt bằng cách sử dụng các tác nhân gây đột biến thực nghiệm và thực tế có thể lên đến 10^{-5} đến 10^{-1} [3]. Các tác nhân vật lý như: các tia X, γ , tia neutron có bước sóng ngắn nên có khả năng ion hóa và khả năng xuyên sâu cao. Các tia phóng xạ có thể gây đột biến bằng cách làm đứt gãy ADN, thay đổi cấu trúc của ADN hoặc hình thành các hợp chất có hoạt tính không ổn định làm biến đổi ADN. Bức xạ ion hóa có thể tạo ra đột biến tại những vị trí xác định nhằm cải thiện hoạt tính của vi sinh vật [4].

Nhiều nghiên cứu cho thấy một số thể đột biến kháng kháng sinh ở vi sinh vật có thể tăng cường sản xuất sản phẩm thứ cấp như enzyme, sắc tố, kháng sinh [5, 6, 7] cũng như tăng khả năng chịu hợp chất độc hại [8]. Ở *Bacillus subtilis*, đột biến kháng streptomycin làm tăng lượng sản phẩm enzyme α – amylase lên 20 – 30% [9] và lượng sản phẩm này cũng tăng từ 1,5 – 2 lần với thể đột biến kháng rifampicin [5]. Cơ chế phân tử liên quan được phân tích, đánh giá trong nhiều công trình nghiên cứu cho thấy sự tác động này chủ yếu theo hai con đường chính là gây đột biến gen *rpsL* mã hóa cho protein ribosome S12 và gây đột biến gen *rpoB* mã hóa cho tiểu phần β của RNAP [5, 6, 7, 10]. Đây cũng là cơ sở cho sự ra đời của công nghệ ribosome (Ribosome Engineering), một kỹ thuật khá mới liên quan đến việc gia tăng hoạt tính của các ribosome tham gia dịch mã, nhằm mục đích tăng khả năng dịch mã. Như vậy gen đích không hề bị cải biến nhưng khả năng sinh tổng hợp sản phẩm của gen được tăng lên nhờ các đột biến liên quan đến bộ máy tổng hợp ribosome. Kỹ thuật này đã chứng minh được tính hiệu quả, do có thể làm tăng khả năng sinh tổng hợp ở vi sinh vật lên hàng chục, thậm chí hàng trăm lần.

Rõ ràng, công nghệ ribosome là một kỹ thuật gây đột biến định hướng, tương đối đơn giản, hiệu quả. Tuy nhiên, thời gian sàng lọc đột biến ribosome khá dài, tốn nhiều công sức vì vậy việc sử dụng kết hợp công nghệ ribosome với xử lý chiếu xạ được xem là một giải pháp nhằm làm tăng áp lực chọn lọc, giảm thời gian sàng lọc, tăng tần suất thu được thể đột biến mong muốn, đặc biệt là tăng khả năng kháng với KS của VSV [11, 12, 13]. Như vậy, cùng với kỹ thuật gây đột biến phóng xạ, công nghệ ribosome có thể giúp tạo ra chủng VSV có khả năng sinh tổng hợp enzyme cao hơn chủng thuần nhiều lần, giúp tăng khả năng ứng dụng thực tiễn của nghiên cứu.

Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của xử lý chiếu xạ tia gamma tới tỷ lệ sống sót và tần số kháng streptomycin của chủng *Bacillus subtilis* B5 đã được khảo sát. Đồng thời, sử dụng kết hợp chiếu xạ tia gamma và công nghệ ribosome (cụ thể là xử lý streptomycin) để tạo ra các chủng vi khuẩn đột biến kháng xạ, kháng kháng sinh có khả năng sinh protease vượt trội so với chủng gốc đã được thực hiện. Ngoài ra, điều kiện tối ưu trong nuôi cấy dòng đột biến tạo được để thu protease cực đại cũng được xem xét và đánh giá.

2. NỘI DUNG

2.1. Đối tượng và phương pháp

2.1.1. Đối tượng

Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B5 có khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào cao được cung cấp bởi Viện Công nghệ Sinh học và Công nghiệp Thực phẩm - ĐH Bách Khoa.

Môi trường nuôi cấy vi sinh vật: NB (Nutrient Broth), NA (Nutrient Agar) do hãng Difco cung cấp.

Các hóa chất: Streptomycin (Sigma), Casein (Sigma), acid acetic (Merck), Amido black (Sigma), Agar (Hạ long)...đều đảm bảo độ sạch phân tích.

2.1.2. Phương pháp

2.1.2.1. Bảo quản và giữ giống

Chủng giống *Bacillus subtilis* thuần được bảo quản theo phương pháp cấy truyền trên ống thạch nghiêng chứa môi trường NA, nuôi qua đêm trong tủ ấm 37°C và được bảo quản tối đa 30 ngày ở 4°C trước khi cấy truyền đợt tiếp theo.

2.1.2.2. Xử lý chiếu xạ

Nuôi cấy huyền dịch tế bào: Huyền phù dịch tế bào vi khuẩn được nuôi cấy theo phương pháp được mô tả trong nghiên cứu của Al-Sudany. G. A. và cs [11]. Dùng que cấy vô trùng chuyển các khuẩn lạc riêng rẽ của các chủng *Bacillus subtilis* thuần vào các bình tam giác chứa môi trường NB, nuôi cấy lắc 120 vòng/phút trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C để thu được huyền dịch tế bào sơ cấp. Chuyển 100 µl huyền dịch tế bào dịch sơ cấp sang các bình tam giác chứa môi trường NB (tỷ lệ 1/100) và tiếp tục nuôi cấy lắc 4-6 giờ ở 37°C. Khi quá trình sinh trưởng của *Bacillus subtilis* đạt tới pha Log ($OD_{550} = 0,6-0,7$), tiến hành thu huyền dịch tế bào thứ cấp.

Chiếu xạ dung dịch nuôi cấy: Các ống nghiệm có chứa 10 ml huyền dịch tế bào thứ cấp được đem xử lý chiếu xạ trên nguồn gamma Co-60 ở dải liều 0-3000 Gy (3 ống nghiệm lặp lại cho mỗi liều).

Chiếu xạ thạch đĩa: Huyền dịch tế bào thứ cấp được pha loãng (theo dãy thập phân) tới nồng độ thích hợp và cấy trải trên đĩa petri có chứa môi trường NA. Đĩa petri sau khi cấy vi khuẩn cũng được đem chiếu xạ trên nguồn gamma Co-60 ở dải liều 0-3000 Gy và ủ ở 37°C trong 24 giờ để đếm số lượng vi khuẩn ở mỗi đĩa (3 đĩa lặp lại cho mỗi liều).

Liều kế Gammachrome YR được sử dụng để đo liều hấp thụ đối với cả hai phương án chiếu xạ.

2.1.2.3. Xác định số lượng tế bào vi sinh vật

Dịch nuôi cấy vi khuẩn (trước và sau chiếu xạ) được pha loãng theo dãy thập phân. 0,1 ml mẫu ở các độ pha loãng thích hợp được cấy vào đĩa petri chứa môi trường NA (3 đĩa petri/độ pha loãng). Sử dụng que gạt vô trùng dàn đều các tế bào trên bề mặt thạch. Tiến hành đếm số khuẩn lạc sau 24 giờ nuôi cấy ở 37°C và tính số lượng tế bào trong 1 ml mẫu theo công thức:

$$M_i (\text{CFU/ml}) = A_i \times D_i / V$$

Trong đó: A_i là số khuẩn lạc trung bình/đĩa; D_i là độ pha loãng và V là thể tích dịch huyền phù tế bào cấy vào mỗi đĩa (ml)

2.1.2.4. Sàng lọc các đột biến kháng streptomycin

Sau khi chiếu xạ, huyền dịch tế bào chủng *Bacillus subtilis* B5 ngay lập tức được cấy trải lên môi trường NA có bổ sung kháng sinh streptomycin nồng độ 20 µg/ml (đối chứng dương là dịch nuôi cấy sau chiếu xạ được trải lên môi trường NA không kháng sinh). Quan sát và thống kê số lượng khuẩn lạc mọc lên sau 1-3 ngày, đây là những khuẩn lạc vừa kháng xạ vừa kháng kháng sinh. Tần số đột biến kháng streptomycin ở mỗi liều chiếu xạ là tỷ số giữa số lượng khuẩn lạc sống sót trên môi trường bổ sung kháng sinh và số khuẩn lạc ở lô đối chứng dương.

2.1.2.5. Sàng lọc các chủng đột biến sinh protease vượt trội từ các chủng kháng xạ và kháng streptomycin

Các khuẩn lạc đơn kháng xạ và kháng streptomycin 20 µg/ml sẽ được lựa chọn và nuôi cấy riêng rẽ ở 120 vòng/phút, 37°C, 24 giờ trong các ống Eppendorf chứa 700 µl môi trường NB. Ly tâm tách tế bào ở 10.000 vòng/ phút, 4°C trong 10 phút để thu dịch enzyme ngoại bào. Hoạt tính protease của dịch enzym được kiểm tra định tính bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch-casein [14] và định lượng bằng phương pháp Anson cải tiến [15]. Những khuẩn lạc sinh protease với kích thước vòng phân giải casein lớn hơn so với chủng thuần được xem là các đột biến sinh protease cao tiềm năng.

Nuôi cấy các khuẩn lạc tiềm năng trên môi trường NA có nồng độ streptomycin tăng dần với mục đích tăng áp lực chọn lọc để thu được chủng đột biến có khả năng sinh protease cao nhất.

2.1.2.6. Phân tích đột biến

Các chủng kháng kháng sinh có khả năng sinh protease cao được tách chiết DNA hệ gen, PCR, tinh sạch và gửi giải trình tự gen tại Bộ môn Sinh học phân tử, trường Đại học Khoa học Tự nhiên Hà Nội và Công ty 1st-base, Singapore, với mục đích tìm ra các đột biến mong muốn trên các chủng đã sàng lọc được.

2.1.2.7. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy để dòng đột biến sinh protease cao

Phương pháp mô hình hóa đáp ứng bề mặt với thiết kế tại tâm (RSM – CCD) kết hợp với phần mềm tin sinh Design Expert được sử dụng nhằm xác định các điều kiện tối ưu của bốn yếu tố là hàm lượng pepton, hàm lượng cao thịt, pH và thời gian nuôi cấy đến quá trình sinh protease của dòng đột biến thu được.

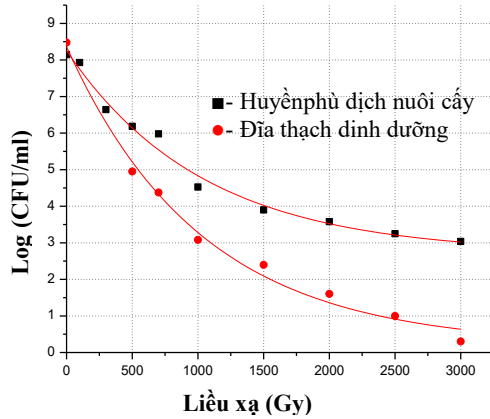
2.2. Kết quả

2.2.1. Ảnh hưởng của xử lý chiếu xạ tới tỷ lệ sống sót của chủng *Bacillus subtilis* B5

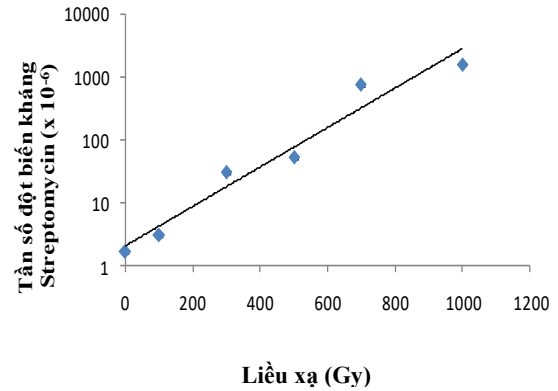
Tác động của bức xạ gamma đối với các chủng *Bacillus subtilis* được biểu diễn bởi mối tương quan giữa Logarit của số lượng tế bào vi khuẩn sống sót (CFU/ml) với liều chiếu xạ (Hình 1). Rõ ràng dù xử lý chiếu xạ huyền dịch tế bào hay đĩa thạch dinh dưỡng có cấy tế bào thì khả năng sống sót của chủng *Bacillus subtilis* B5 đều bị ảnh hưởng đáng kể bởi bức xạ gamma. Tỷ lệ tế bào sống sót giảm khi tăng liều chiếu xạ. Tuy nhiên, so với cách xử lý huyền dịch tế bào thì xử lý chiếu xạ đĩa thạch dinh dưỡng làm số lượng tế bào giảm nhanh hơn hay nói cách khác các tế bào trở nên nhạy cảm hơn với bức xạ. Về mặt vật lý học và toán học, mối tương quan giữa số lượng tế bào *Bacillus subtilis* sống sót với liều chiếu xạ có thể giải thích bằng lý thuyết của Mô hình truyền năng lượng [16, 17].

Nghiên cứu khả năng sống sót của bào tử *Bacillus* sp bởi bức xạ gamma, Yoon Ki-Hong và cs nhận thấy tỷ lệ sống sót của bào tử *Bacillus* sp. 79-23 chiếu xạ giảm theo cấp số nhân trong dải liều dao động từ 0,5 đến 5 kGy. Ở liều 3 và 5 kGy số lượng tế bào còn lại tương ứng xấp xỉ 5% và 1% [18]. Trong một nghiên cứu khác, Gui Jun và cs báo cáo rằng tỷ lệ chết của *Bacillus subtilis* NCD-2 tăng theo liều chiếu xạ gamma trong khoảng 100 đến 2000 Gy và ở liều 1000 Gy tỉ lệ chết lên đến 99,5% [19]. Xử lý chiếu xạ tia gamma chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* UTB1 ở dải liều 100 – 3000 Gy Afsharmaesh và cs cũng nhận thấy tỷ lệ sống sót của chủng UTB1 tỷ lệ nghịch với liều chiếu xạ và mối tương quan giữa số lượng vi khuẩn sống sót và liều xử lý dường như theo một mô hình khá tuyến tính [20].

Những khác biệt trong các kết quả nghiên cứu có thể được giải thích khi cho rằng các yếu tố như nhiệt độ, giai đoạn sinh trưởng, bản chất của môi trường dạng khí, thành phần hóa học của môi trường nuôi cấy... cũng như điều kiện sinh lý và khả năng tự sửa chữa của tế bào vi khuẩn đã ảnh hưởng đến sự tồn tại của chúng sau chiếu xạ.



Hình 1. Ảnh hưởng của xử lý chiếu xạ tới tỷ lệ sống sót của các chủng *Bacillus subtilis* B5



Hình 2. Tần số đột biến kháng streptomycin 20µg/ml của chủng *Bacillus subtilis* B5 ở các liều chiếu xạ khác nhau

2.2.2. Ảnh hưởng của xử lý chiếu xạ tới tần số kháng streptomycin của chủng *Bacillus subtilis* B5

Trong nghiên cứu này không xuất hiện bất kỳ một khuẩn lạc đột biến kháng kháng sinh nào trên các đĩa thạch NA có bổ sung 20 µg/ml streptomycin được cấy huyền dịch TB *Bacillus subtilis* B5 chiếu xạ liều lớn hơn 1200 Gy. Sau 24-48 giờ nuôi cấy, chỉ có những khuẩn lạc đột biến từ các TB được chiếu xạ ở dải liều dưới 1000 Gy xuất hiện với số lượng khác nhau ở mỗi liều chiếu xạ (Hình 2). Có thể thấy rằng tần số đột biến tăng khi tăng liều bức xạ. Tần số đột biến cao nhất đạt $1,61 \times 10^{-3}$ (từ 621 CFU thu được 1 đột biến) khi xử lý chiếu xạ ở liều 1000 Gy, tần số đột biến thấp hơn $3,09 \times 10^{-6}$ (từ $0,323 \times 10^6$ CFU thu được 1 đột biến) khi chiếu xạ ở liều 100 Gy. Các số liệu cũng cho thấy tần số đột biến tự phát trung bình kháng streptomycin (20 mg/ml) khoảng $1,78 \times 10^{-6}$ (từ $0,56 \times 10^6$ CFU thu được 1 đột biến). Những kết quả thu được chứng tỏ khả năng kháng streptomycin của chủng *Bacillus subtilis* B5 đã được cải thiện nhờ xử lý chiếu xạ.

Trong nghiên cứu khác, chúng tôi cũng nhận thấy tần số kháng rifampicin 0,2 µg/ml của chủng *Bacillus subtilis* B5 tăng đáng kể khi liều chiếu tăng và đạt giá trị cao nhất là $1,78 \times 10^{-1}$ ở liều 2000 Gy, cao hơn tần số đột biến tự phát $5,46 \times 10^3$ lần. Ở các liều xử lý cao hơn (2500 và 3000 Gy) tần số đột biến có xu hướng giảm [12].

2.2.3. Sàng lọc các chủng *Bacillus subtilis* có khả năng sinh protease cao từ các chủng kháng xạ và kháng streptomycin

Sau chiếu xạ, các khuẩn lạc đơn kháng streptomycin 20 µg/ml và có kích thước vòng phân giải casein lớn hơn 10% so với chủng thuần được xem là các khuẩn lạc tiềm năng sinh protease cao. Ở nồng độ KS 20 µg/ml, chúng tôi chọn được 25 khuẩn lạc tiềm năng có vòng phân giải casein lớn hơn chủng thuần (gọi là khuẩn lạc KKS-20), trong đó ở liều 100 Gy thu được 10 khuẩn lạc, liều 300 Gy thu được 10 khuẩn lạc và liều 500 Gy thu được 5 khuẩn lạc. Không thu được khuẩn lạc tiềm năng nào từ chủng *Bacillus subtilis* B5 kháng streptomycin 20 µg/ml ở liều chiếu xạ 700 và 1000 Gy (Bảng 1).

Bảng 1. Số lượng khuẩn lạc kháng streptomycin 20 µg/ml có khả năng sinh protease cao từ các chủng *Bacillus subtilis* B5 chiếu xạ

Liều (Gy)	Số khuẩn lạc kháng streptomycin 20 µg/ml	Số khuẩn lạc kháng streptomycin 20 µg/ml có vòng phân giải casein lớn hơn chủng thuần (KKS-20)
100	142	10
300	127	10
500	77	5
700	12	-
1000	3	-
Tổng	361	25

(-) Không thu được khuẩn lạc tiềm năng nào

Với mục đích tăng áp lực chọn lọc, 25 khuẩn lạc KKS-20 được tiếp tục nuôi cấy trên môi trường NA bổ sung streptomycin ở các nồng độ cao hơn. Cuối cùng, ở nồng độ streptomycin 200 µg/ml đã thu được 6 khuẩn lạc kháng xạ, kháng KS có khả năng sinh protease vượt trội so với chủng gốc ban đầu, đó là các khuẩn lạc 301, 321, 322, 528, 533 và 609 (Hình 3, Bảng 2).



Hình 3. Kích thước vòng phân giải casein của chủng *Bacillus subtilis* B5 thuần và của các khuẩn lạc kháng streptomycin 200 µg/ml xuất phát từ chủng thuần chiếu xạ

Bảng 2. Protease của các khuẩn lạc *Bacillus subtilis* sinh protease vượt trội sàng lọc được từ các liều xạ khác nhau trên môi trường bổ sung streptomycin 200 µg/ml

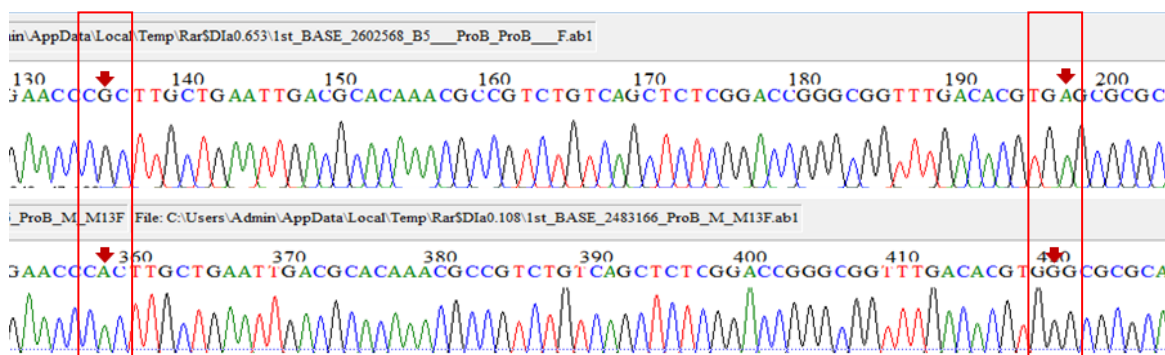
STT	Khuẩn lạc <i>B. subtilis</i> sinh protease vượt trội	Liều (Gy)	Đường kính vòng phân giải casein (mm)	Hoạt độ protease (UI/ml)
1	301	300	24,83±1,44	1556,32±51,91
2	321	300	26,17±0,89	1684,15±55,10
3	322	300	29,33±1,78	1826,42±58,66
4	528	500	23,83±1,44	1518,75±59,97
5	533	500	27,83±0,78	1735,84±65,40
6	609	500	33,50±0,33	2017,54±21,35
7	B5 thuần		18,66±0,89	745,83±19,40

Các kỹ thuật sinh học phân tử như PCR, tách dòng và giải trình tự đối với các gen *rpoB* và *rpsL* liên quan tới khả năng tăng tổng hợp protease ở *Bacillus subtilis* đã được sử dụng để xác

định và phân tích đột biến ở các chủng kháng xạ kháng kháng sinh có khả năng sinh protease vượt trội. Kết quả nhận thấy, 3 khuẩn lạc 528, 533 và 609 mang đột biến trên gen *rpoB* và đều là các đột biến điểm. Vị trí đột biến ở các khuẩn lạc được trình bày trong Bảng 3 và Hình 4. Trong số các đột biến thì dòng 609 (tạo được nhờ chiếu xạ liều 500 Gy kết hợp xử lý streptomycin 200 µg/ml) có khả năng sinh protease vượt trội là 2017,54 UI/ml (cao hơn 2,7 lần so với chủng gốc) và ổn định so với các đột biến còn lại.

Bảng 3. Các khuẩn lạc có đột biến ở gen *rpoB*. Vị trí đột biến được chỉ ra trên kết quả trình tự

STT	Ký hiệu	Đột biến (vị trí trên kết quả giải trình tự)
1	528	G487C
2	533	G487C, C488T
3	609	G135A, A197G



Hình 4. Trình tự gen *rpoB* của chủng thuần (B5_ *rpoB*) với khuẩn lạc đột biến 609 (*rpoB*-M). Vị trí đột biến được chỉ ra bằng mũi tên đỏ

Tuy nhiên, không có bất kì đột biến nào trên gen *rpsL* được phát hiện ở tất cả các khuẩn lạc nghiên cứu, chứng tỏ tính kháng streptomycin do đột biến ở gen *rpoB* và liên quan đến khả năng tăng sinh tổng hợp protease, phù hợp với các công bố quốc tế trước đây [5, 6, 7].

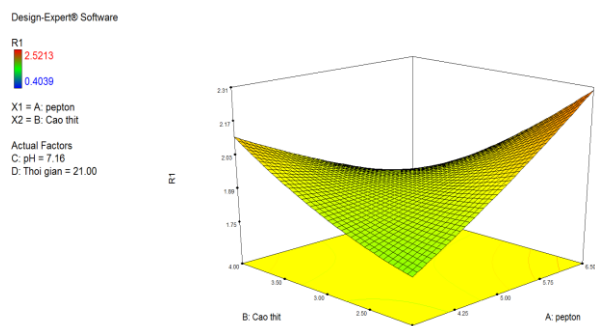
2.2.4. Lựa chọn điều kiện nuôi cấy thích hợp để chủng đột biến sinh protease cao

Vì protease là sản phẩm trao đổi thứ cấp của vi sinh vật nên việc tối ưu hóa thành phần môi trường và điều kiện nuôi cấy là rất quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp của chúng. Việc sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt (Response surface methods - RSM) gồm tập hợp các công cụ toán học nhằm thiết kế và phân tích các thí nghiệm cho quá trình tối ưu từ đó có thể nghiên cứu đồng thời tác động của nhiều yếu tố trong cùng một thời gian, cũng như tương tác giữa các yếu tố đến khả năng tạo enzym và một số các sản phẩm thứ cấp khác từ các chủng vi sinh vật [21, 22, 23].

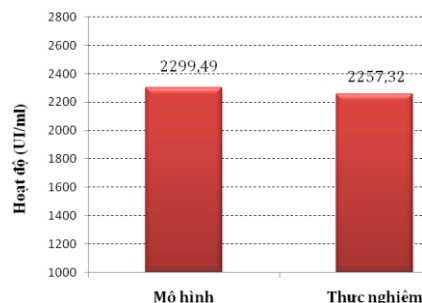
Trong nghiên cứu này, phương pháp RSM với thiết kế tại tâm (Central composite design - CCD) kết hợp với phần mềm tin sinh Design Expert được sử dụng nhằm xác định các điều kiện tối ưu của bốn yếu tố là hàm lượng pepton, hàm lượng cao thịt, pH và thời gian nuôi cấy đến quá trình sinh protease của dòng đột biến 609-B5. Mô hình đã dự đoán sản lượng protease tối đa đạt được là 2299,49 UI/ml khi hàm lượng pepton 6,5 g/l, hàm lượng cao thịt 2 g/l, pH 7,16 và thời gian nuôi cấy là 21 giờ (Hình 5).

Để kiểm tra kết quả của mô hình, tiến hành thí nghiệm với các giá trị dự đoán để thu protease cực đại. Hoạt độ protease nhận được từ kết quả thực nghiệm là 2257,32 UI/ml, hoạt tính protease thu được theo dự đoán của mô hình là 2299,49 UI/ml (Hình 6). Sự tương quan chặt

chênh lệch giữa kết quả thực nghiệm và tính toán chứng tỏ tính chính xác của mô hình và sự tồn tại của điểm tối ưu.



Hình 5. Bề mặt đáp ứng của hoạt tính enzyme dưới tác động của các điều kiện tối ưu



Hình 6. So sánh hoạt tính protease (UI/ml) giữa kết quả thực nghiệm và mô hình

3. KẾT LUẬN

Xử lý chiếu xạ tia gamma huyền dịch tế bào ở giai đoạn phát triển theo hàm mũ hay đĩa thạch dinh dưỡng có cấy tế bào đều ảnh hưởng tới tỷ lệ sống sót của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B5. Tỷ lệ tế bào sống sót giảm dần khi liều xạ tăng dần trong dải liều 100-3000 Gy. Tuy nhiên, tần số đột biến kháng streptomycin 20 µg/ml của chủng vi khuẩn này được cải thiện đáng kể nhờ xử lý chiếu xạ, tần số đột biến cao nhất đạt $1,61 \times 10^{-5}$ (từ 621 CFU thu được 1 đột biến) khi xử lý chiếu xạ ở liều 1000 Gy.

Kết hợp xử lý chiếu xạ tia gamma và bổ sung streptomycin với nồng độ tăng dần trong môi trường nuôi cấy đã tạo ra các khuẩn lạc *Bacillus subtilis* kháng xạ, kháng streptomycin có hoạt tính protease tăng tới 2-2,7 lần so với chủng gốc. Kết quả xác định trình tự gen *rpoB* và *rpsL* cho thấy 3/6 khuẩn lạc có gen *rpoB* mang đột biến, không có bất kì đột biến nào trên gen *rpsL* được phát hiện, chứng tỏ tính kháng streptomycin do đột biến ở gen *rpoB* và liên quan đến khả năng tăng sinh tổng hợp protease, phù hợp với các công bố quốc tế trước đây. Trong số các đột biến thì dòng 609 (tạo được nhờ chiếu xạ liều 500 Gy kết hợp xử lý streptomycin 200 µg/ml) có khả năng sinh protease vượt trội (cao hơn 2,7 lần so với chủng gốc) và ổn định so với các đột biến còn lại.

Sử dụng phương pháp mô hình hóa đáp ứng bề mặt - thiết kế tại tâm (RSM – CCD) kết hợp với phần mềm tin sinh Design Expert và kiểm tra bằng thực nghiệm đã xác định điều kiện tối ưu của bốn yếu tố trong nuôi cấy dòng đột biến *Bacillus subtilis*-609 thu protease cực đại là 2299,49 UI/ml ở các giá trị hàm lượng pepton 6,5 g/l, hàm lượng cao thịt 2 g/l, pH 7,16, thời gian nuôi cấy là 21 giờ. Tiến hành thí nghiệm với các giá trị dự đoán, hoạt độ protease nhận được từ kết quả thực nghiệm là 2257,32 UI/ml

Các kết quả thu được là cơ sở để xây dựng một phương pháp mới tạo chủng đột biến sinh protease cao ở vi khuẩn *Bacillus subtilis*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. <http://www.prnewswire.co.uk/news-releases/protease-enzymes-market>
2. Olajuyigbe, F.M. and Ajele, J.O. (2005): Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species. *African Journal of Biotechnology*, 4, 776-779.
3. Davati, N., Najafi, M. B. H. (2013): Overproduction strategies for microbial secondary metabolites: A review. *Life Science*, 3, 23-37.

4. Awan, S. D., Tabbasam, N., Ayub, N., Babar, M. E., Rahman, M., Ran, S. M., Rajoka, M. I. (2011): Gamma radiation induced mutagenesis in *Aspergillus niger* to enhance its microbial fermentation activity for industrial enzyme production. *Mol. Biol. Rep*, 38, 1367-1374.
5. Ochi, K. (2007): From microbial differentiation to ribosome engineering. *BiosciBiotechnol Biochem*, 71, 1373–1386.
6. Ochi, K. and Hosaka, T. (2013): New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 87– 98.
7. Wang, G., Hosaka, T., Ochi, K. (2008): Dramatic activation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by cumulative drug resistance mutations. *Appl Environ Microbiol*, 74, 2834–2840.
8. Hosokawa, K., Park, N. H., Inaoka, T., Itoh, Y., Ochi, K. (2002): Streptomycin – resistant (rpsL) of rifampicin – resistant (rpoB) mutation in *Pseudomonas putida* KH146 – 2 confer enhanced tolerance to organic chemical. *Environ Microbiol*, 4,703–712.
9. Kurosawa, K., Hosaka, T., Tamehiro, N., Inaoka, T. and Ochi K. (2006): Improvement of α – amylase production by modulating the ribosomal component S12 protein in *Bacillus subtilis* 168. *Appl. Environ. Microbiol*, 72, 71–77.
10. Lai, C., Xu, J., Tozawa, Y., Hosoya, Y., Yao, X., Ochi, K. (2002): Genetic and physiological characterization of rpoB mutations that activate antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Microbiology*, 148, 3365–3373.
11. Al-Sudany, G. A., Majeed, W. Z., Al-Aubeidi, H. J. (2010): Detection of gamma radiation effect induced by colbelt-60 on *Escherichia coli* cells. *Journal of Al-Nahrain university Science*, 13(3), 129-133.
12. Diep T. B., Thom N. T., Sang H. D., Binh N. V., An T. X., Thao H. P., Quynh T. M., Lan V. T. T. *Effects of gamma irradiation on the viability and mutant frequency of rifampicin resistance of some Bacillus subtilis strains having high protease-producing.*The 12th National Conference on Nuclear Science and Technology. Nha Trang 2-4/8/2017. (In Vietnamese)
13. De Groot, A., Chapon, V., Servant, P., Christen, R., Fischer-Le Saux, M., et al. (2005): *Deinococcus deserti* sp. nov., a gamma-radiation-tolerant bacterium isolated from the Sahara Desert. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55, 2441–2446.
14. Vermelho, A. B., Meirelles, M. N. L., Lopes, A., Petinate, S. D. G., Chaia, A. A., Branquinha, M. H. (1996): Detection of Extracellular Proteases from Microorganisms on Agar Plates. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 91(6), 755-760.
15. <http://www.sigmaaldrich.com/> Sigma's Universal Protease Activity Assay: Casein as a Substrate
16. Nghiep, T.D., Kojima, T. (1996): An energy-transfer model for radiation dosimetry. *Communication in Physics*, 6 (2), 5-12.
17. Nghiep, T.D., Minh, D. T. N., Cong, N. T. (2010): Formation and characterization of a hydrophilic polymer hydrogel. *Journal of Radioanalytical & Nuclear Chemistry*, 285, 719-721.
18. Yoon, K. H., In-Kyung, S., Kyung, H. J., Seung-Hwan, P. (1999): Hyper-CMC-Producing mutants of *Bacillus* sp. 79-23 induced by gamma-radiation. *J. Microbiol. Biotechnol*, 9(4), 518- 521.
19. GuiJun, L., You-ting, M., Su-ling, Y., Fang, B., Hong-zhong, S. (2011): Study on γ -ray irradiation mutation of *Bacillus subtilis* NCD2. *Agricultural Science & Technology*, 12(11), 1633-1636.
20. Afsharmaesh, H., Ahmadzadeh, M., Javan-Nikkhah, M., Behboudi, K. (2014): Improvement in biocontrol activity of *Bacillus subtilis* MTB1 against *Aspergillus flavus* using gamma irradiation. *Crop Protection*, 60, 83-92.
21. Palsaniya, P., Rinki, M., Beejawat, N., Sethi, S. and Gupta, B.L. (2012): Optimization of alkaline protease production from bacteria isolated from soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2(6), 695- 701.
22. Dagbagli, S., Goksunur, Y. (2008): Optimization of β -galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11, (4).
23. Prasad, M. P, Sethi, R., Arthirajan, J. (2014): Optimization studies of Protease enzyme in in-vitro conditions from *Bacillus licheniformis*, *Inter Res J Biol Sci*. 3, 34-49.

STUDY ON THE COMBINATION OF GAMMA IRRADIATION AND RIBOSOME ENGINEERING FOR THE ENHANCEMENT OF *Bacillus subtilis*'S PROTEASE-PRODUCING

TRAN BANG DIEP¹, NGUYEN THI THOM¹, HOANG DANG SANG¹, NGUYEN VAN BINH¹, TRAN XUAN AN¹, HOANG PHUONG THAO¹, PHAM DUY DUONG¹, TRAN MINH QUYNH¹, TA BICH THUAN², VO THI THUONG LAN²

¹Hanoi Irradiation Centre, Minh Khai- Tu Liem- Hanoi

²Faculty of Biology, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, ThanhXuan, Hanoi.

Email: tranfbangdiepj@yahoo.com

Abstract: *Bacillus subtilis* B5 is high protease-producing bacteria selected from various domestic laboratories. The suspensions in a log growth phase and nutrient agar plates inoculated these bacteria were irradiated at doses ranging 0-3000 Gy under gamma Cobalt-60 source at Hanoi Irradiation Center. In both cases of irradiation treatment, the survival rate of bacteria decreases with the increasing dose of gamma ray and their log cell survival curve seems to follow the theory of energy transfer model.

In this study, the effect of gamma irradiation at different doses to mutation frequency of antibiotic resistance (streptomycin 20 µg/ml) of *Bacillus subtilis* B5 is also investigated. The results show that the mutation frequency of antibiotic resistance was improved significantly by radiation treatment. The greatest mutant frequency 1.61×10^{-3} (1 mutation per 621 CFU), was induced by irradiation at 1000 Gy, the smallest one 3.09×10^{-6} (1 per 0.323×10^6 CFU), was induced by irradiation at 100 Gy. The data also revealed the frequency of spontaneous mutation was about 1.78×10^{-6} on average (1 per 0.56×10^6 CFU).

After the first screening, 25 potential 20 µg/ml streptomycin-resistant colonies with higher production of protease than original strain were selected from 361 radiation resistant colonies of *Bacillus subtilis* B5. In the subsequent screening, 6 hyper-protease-producing colonies were obtained by using the culture medium containing incrementally higher antibiotic concentrations.

The results of PCR, cloning and sequencing techniques showed that 3/6 colonies carried point mutations on the *rpoB* gene. No mutation was detected on the *rpsL* gene in all analyzed colonies. It suggested that various types of point mutations mapped in *rpoB* gene encoding the RNAP β-subunit increase the antibiotic-resistant *Bacillus subtilis*' surviving ability and regain the capability of producing more and more protease. The obtained results are also suitable for published articles. Among of the obtained mutants, mutant 609 (induced by *Bacillus subtilis* B5 irradiated at a dose of 500 Gy combining 200 µg /ml streptomycin treatment) produced superior proteases (2,7 times higher activity than that of parent strain) and it is more stable compared with other mutants.

Response surface methodology (RSM) - Central composite design (CCD) was used to investigate the effects of four fermentation parameters on protease production of 609 mutant. Maximum enzyme activity of 2299.49 UI/ml was obtained at the optimum levels of process variables (peptone 6.5 g/l, beef extract 2 g/l, pH 7,16, cultivation time 21 hours). The response surface methodology was found to be useful in optimizing and determining the interactions among process variables in protease production. Testing the model obtained with protease activity of 2257.32 UI/ml.

This study is the basis to establish a new method creating high protease-producing mutants from *Bacillus subtilis*.

Key word: *Bacillus subtilis*, gamma irradiation, protease, streptomycin, survival, mutation frequency