

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA LIỀU CHIẾU XẠ GAMMA ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP PROTEASE CỦA VI KHUẨN *Bacillus* spp.

Võ Thị Thúy Huệ^{1*}, Phan Hữu Tín², Nguyễn Thị Thu Trang¹, Nguyễn Thị Thuỳ Trang², Nguyễn Minh Quang²

¹Khoa Khoa học sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

²Viện Nghiên cứu Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Protease là một trong những enzyme thương mại quan trọng được sử dụng phổ biến trong nhiều ngành công nghiệp (thực phẩm, thuốc da, chất tẩy rửa...). Vi sinh vật có vai trò quan trọng trong việc sản xuất các enzyme ngoại bào, đặc biệt là *Bacillus*. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu sàng lọc được chủng *Bacillus* có khả năng sinh tổng hợp protease cao bằng chiếu xạ gamma. Sau chiếu xạ, tỷ lệ sống sót, dải liều tối ưu tạo đột biến sinh tổng hợp protease cao và liều chiếu tạo đột biến sinh tổng hợp protease cao ở 2 chủng *Bacillus* được xác định. Hoạt tính enzyme của chủng thuần và chủng sau đột biến được xác định bằng phương pháp cấy điểm trên đĩa thạch chứa cơ chất casein. Kết quả cho thấy cả 4 chủng *Bacillus* thuần chủng đều có khả năng sinh tổng hợp protease, cao nhất là 2 chủng *Bacillus velezensis* (BS1) và *Bacillus licheniformis* (BL4) với đường kính vòng phân giải lần lượt là 19,75 mm và 27,15 mm. Sau chiếu xạ, khả năng sống sót của 2 chủng *Bacillus* bị ảnh hưởng nhiều bởi bức xạ gamma, tỷ lệ sống sót của vi khuẩn giảm dần khi liều bức xạ tăng. Tần số đột biến cao ở khoảng liều 1 - 1,25 kGy và cao nhất tại liều 1 kGy đối với chủng *B. velezensis* (BS1) và *B. licheniformis* (BL4) lần lượt là 36,67% và 40%. Bốn khuẩn lạc từ 2 chủng BS1 và BL4 sau chiếu xạ sàng lọc được có khả năng sinh tổng hợp protease vượt trội và ổn định ít nhất sau 3 thế hệ.

Từ khóa: *Bacillus*, chiếu xạ gamma, đột biến, protease, sống sót.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Protease là nhóm enzyme có chức năng phân giải liên kết peptide của protein để tạo thành peptide ngắn hơn và các amino acid. Protease có tiềm năng ứng dụng to lớn trong nhiều lĩnh vực nên thu hút được nhiều mối quan tâm của nhiều nhà khoa học và các công ty hóa dược ở Việt Nam cũng như trên Thế giới (Hoàng Đăng Sáng *et al.*, 2018). Mặc dù nguồn vi sinh vật để sản xuất protease có rất nhiều nhưng chỉ một số ít được công nhận để sản xuất protease ở quy mô công nghiệp. Nhóm vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* như *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. licheniformis*, *B. megaterum* chiếm ưu thế trong lĩnh vực công nghiệp, là nguyên liệu thích hợp để sản xuất protease ở quy mô lớn nhờ việc thu nhận sản phẩm dễ dàng, điều kiện nuôi cấy đơn giản, có hoạt tính ổn định ở nhiệt độ cao và các điều kiện pH. Khảo sát tác động của chiếu xạ gamma làm tăng khả năng sinh tổng hợp protease là một hướng nghiên cứu nhiều hứa hẹn cho ngành công nghiệp sản xuất protease. Đột biến ngẫu nhiên thường được tạo ra bằng các phương pháp vật lý và hóa học, chiếu xạ gamma, tia UV, tia X là các loại bức xạ ion hóa thường được sử dụng để gây đột biến (Hing *et al.*, 2022). Các tác nhân vật lý như: các tia X, tia γ , α , β , 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 DNA, thay đổi cấu trúc của DNA hoặc hình thành các hợp chất có hoạt tính không ổn định làm biến đổi DNA. 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 (Khavari, 2020). Năm 2018, Huỳnh Đăng Sáng và đồng tác giả (2018) đã thực hiện chiếu xạ ba chủng *B. subtilis* B5, H12, VI bằng bức xạ gamma trên nguồn Co-60, kết quả cho thấy đột biến sinh tổng hợp protease cao ở tất cả các liều chiếu xạ, tỷ lệ đột biến dương như cao hơn trong khoảng liều 700-1500 KGy. Tại khoảng liều này các tác giả nhận thấy số lượng tế bào sống sót sau chiếu xạ giảm từ 1000-10000 lần (3-4 đơn vị Log) so với dạng thuần không chiếu xạ. Như vậy, việc xử lý chiếu xạ có thể giúp tăng khả năng sinh tổng hợp protease. Với mong muốn sử dụng bức xạ gamma tạo dòng vi khuẩn *Bacillus* biến dị có khả năng sinh tổng hợp protease cao, nghiên cứu này bước đầu khảo sát ảnh hưởng của liều chiếu xạ gamma tới khả năng sống sót và sinh tổng hợp protease của vi khuẩn *Bacillus* spp.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các chủng vi khuẩn *B. velezensis* (BS1), *B. subtilis* (BS2), *B. megaterum* (BS3), *B. licheniformis* (BL4) có khả năng sinh tổng hợp protease được lưu trữ tại Phòng thí nghiệm Công nghệ lên men, Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* lỏng NB có thành phần (g/L): peptone 5, NaCl 5, yeast extract 1,5, HM peptone 1,5, nước cất. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* NA thạch có thành phần (g/L): peptone 5, NaCl 5,

Yeast extract 1,5, HM peptone 1,5, Agar 15, nước cất. Môi trường chứa cơ chất casein 0,1% có thành phần (g/L): casein 1, peptone 5, NaCl 5, yeast extract 1,5, HM peptone 1,5, agar 15, nước cất. Hóa chất nhuộm khảo sát vòng phân giải: amido black (Sigma), acetic acid (Sigma).

Phương pháp

Xác định hoạt tính protease bằng phương pháp cấy điểm

Môi trường chứa cơ chất casein 0,1% được hấp khử trùng và tiến hành đổ đĩa, các đĩa có đường kính bằng nhau được đổ cùng một thể tích (25 mL/1 đĩa ϕ 9) để đảm bảo độ dày của lớp thạch casein là như nhau ở tất cả các đĩa thí nghiệm. Các chủng *Bacillus* sẽ được nuôi cấy trong môi trường NB và cấy rìa trên đĩa thạch chứa môi trường NA. Sau đó, dùng que cấy lấy các khuẩn lạc riêng rẽ đưa vào đĩa thạch môi trường môi trường casein 0,1%, mỗi đĩa cấy 1 điểm. Mỗi chủng vi khuẩn sẽ được cấy 2 đĩa và lặp lại 3 lần. Ủ trong 48 giờ ở 37°C. Sau khi ủ tiến hành nhuộm các đĩa thạch bằng amido black 0,1% trong 30 phút, rửa nhuộm và quan sát vòng phân giải casein. Các chủng có vòng phân giải casein lớn là chủng có khả năng sinh tổng hợp protease cao.

Kích thước vòng phân giải casein được tính theo công thức:

$$A = D - d$$

Trong đó: A: Kích thước vòng phân giải (mm).

D: Đường kính vòng phân giải (mm).

d: Đường kính khuẩn lạc (mm).

Từ đó, chọn ra hai chủng *Bacillus* có khả năng sinh tổng hợp protease cao nhất.

Nuôi cấy huyền dịch tế bào

Dùng que cấy truyền các khuẩn lạc riêng rẽ của 2 chủng *Bacillus* vào bình tam giác chứa 100 mL môi trường NB, nuôi cấy lắc 120 vòng/phút, ở 37°C trong 24 giờ để thu huyền dịch tế bào sơ cấp. Sau khi nuôi cấy sơ cấp, chuyển 100 μ L huyền dịch tế bào vào các ống nghiệm chứa môi trường NB (tỷ lệ 1/100) và tiếp tục nuôi cấy lắc 120 vòng/phút ở 37°C trong 24 giờ. Các ống nghiệm sau khi nuôi cấy thứ cấp được dán nhãn (ghi liều chiếu xạ dự kiến) và được xử lý chiếu xạ trên thiết bị gamma Co-60 tại Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

Chiếu xạ dung dịch nuôi cấy

Các ống nghiệm chứa huyền dịch tế bào vi khuẩn được đem xử lý chiếu xạ trên nguồn gamma Co-60 dải liều 0 - 1,25 kGy được chia làm 5 liều chiếu (0,25; 0,5; 0,75; 1,0 và 1,25 kGy) và 1 liều đối chứng (0 kGy), lặp lại 3 ống nghiệm cho mỗi liều chiếu.

Xác định số lượng tế bào vi sinh vật

Số lượng tế bào vi khuẩn của 2 chủng vi khuẩn *Bacillus* trước và sau chiếu xạ được xác định thông qua đếm số lượng khuẩn lạc mọc trên đĩa môi trường NA. Dịch nuôi cấy vi khuẩn (trước và sau xử lý chiếu xạ) được pha loãng theo dãy thập phân. 100 μ L dịch nuôi cấy ở các độ pha loãng thích hợp được cấy vào đĩa petri chứa môi trường NA. Ba đĩa petri cho mỗi nồng độ pha loãng. Sử dụng que cấy trang dàn đều dịch nuôi cấy trên bề mặt thạch. Số khuẩn lạc được đếm sau 24 giờ nuôi cấy ở 37°C và từ đó tính ra 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 : Số khuẩn lạc trung bình trên đĩa.

D_i : Nồng độ pha loãng.

V: Thể tích huyền dịch tế bào cấy vào mỗi đĩa (mL).

Sàng lọc các khuẩn lạc sinh tổng hợp protease cao từ 2 chủng *Bacillus* bằng xử lý chiếu xạ

Dịch huyền phù tế bào sau nuôi cấy thứ cấp được xử lý chiếu xạ dải liều 0 - 1,25 kGy. Tiến hành pha loãng dung dịch sau chiếu xạ tới nồng độ thích hợp và cấy trang trên đĩa petri chứa môi trường NA sao cho mỗi đĩa chứa khoảng 50 - 200 khuẩn lạc đơn, ủ đĩa trong 24 giờ. Lựa chọn 30 khuẩn lạc đơn ở mỗi liều chiếu để tiến hành kiểm tra khả năng sinh tổng hợp protease bằng phương pháp cấy chấm điểm trên đĩa thạch - casein. So sánh vòng phân giải, những khuẩn lạc có kích thước vòng phân giải lớn 10% so với chủng thuần được coi là các đột biến sinh tổng hợp protease cao. Tần số đột biến sinh tổng hợp protease cao ở mỗi liều chiếu xạ được tính theo công thức:

$$\text{Tần số đột biến (\%)} = (\text{Số khuẩn lạc đột biến} / \text{Số khuẩn lạc khảo sát}) \times 100$$

Đánh giá sự ổn định khả năng sinh tổng hợp protease của các khuẩn lạc tiềm năng qua các thế hệ

Các khuẩn lạc đột biến của các chủng *Bacillus* tiềm năng được kiểm tra khả năng sinh tổng hợp protease bằng phương pháp định tính dựa vào vòng phân giải casein qua các thế hệ. Trong nghiên cứu này, mỗi lần cấy truyền được xem là một thế hệ.

Xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm được nhập và xử lý sơ bộ, tính giá trị trung bình và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Excel 2019, phân tích ANOVA một nhân tố các chỉ tiêu khảo sát bằng phần mềm Minitab 16.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tuyển chọn chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng sinh tổng hợp protease cao làm nguyên liệu chiếu xạ gamma

Bốn chủng vi khuẩn *Bacillus* thuần chủng có khả năng sinh tổng hợp protease được cung cấp, nuôi cấy riêng rẽ trên môi trường NB. Hoạt tính protease của chúng được khảo sát qua vòng phân giải casein xuất hiện trên đĩa thạch chứa cơ chất casein 0,1% và nhuộm bằng thuốc nhuộm amido black 0,1%, kết quả thu được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Kích thước vòng phân giải casein của 04 chủng vi khuẩn *Bacillus*

Thời gian (giờ)	Kích thước vòng phân giải (mm)				P -value
	BS1	BS2	BS3	BL4	
48	19,75 ^b ± 0,67	17,06 ^c ± 0,78	16,28 ^c ± 1,65	27,15 ^a ± 1,29	0,000

Trong đó, các chữ cái a, b, c chỉ sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,01$).

Ảnh hưởng của xử lý chiếu xạ tới khả năng sống sót và khả năng sinh tổng hợp protease tới hai chủng vi khuẩn *Bacillus*

Ảnh hưởng của xử lý chiếu xạ tới khả năng sống sót của vi khuẩn *Bacillus*

Sau khi khảo sát khả năng sinh tổng hợp protease, hai chủng vi khuẩn *Bacillus* được chọn sẽ được nuôi cấy để thu huyền dịch tế bào thứ cấp và các ống nghiệm chứa dịch tế bào sẽ được đem đi chiếu xạ bằng nguồn gamma Co-60 dải liều 0 – 1,25 kGy (0; 0,25; 0,75; 1,0 và 1,25 kGy). Tác động của bức xạ gamma tại các liều chiếu khác nhau tới khả năng sống sót tới hai chủng *Bacillus* được xác định thông qua việc đếm số khuẩn lạc ở cả dịch nuôi cấy xử lý chiếu xạ và không chiếu xạ. Khả năng sống sót của vi khuẩn bị ảnh hưởng đáng kể bởi bức xạ gamma, tỷ lệ sống sót ở cả 2 chủng đều giảm dần khi tăng liều bức xạ. Tác động của bức xạ được biểu hiện dưới hàm logarit của mật số vi khuẩn sống sót (log₁₀ CFU/mL) tại các liều chiếu xạ sau 24 giờ nuôi cấy (Bảng 2).

Bảng 2. Khả năng sống sót 2 chủng vi khuẩn *Bacillus* tại các liều chiếu sau 24 giờ nuôi cấy

Liều chiếu (kGy)	Mật số vi khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy			
	BS1		BL4	
	Log ₁₀ (CFU/mL)	CFU/mL	Log ₁₀ (CFU/mL)	CFU/mL
ĐC	8,366 ^a ± 0,004	2,33 × 10 ⁸	6,724 ^a ± 0,035	0,55 × 10 ⁷
0,25	8,193 ^b ± 0,016	1,56 × 10 ⁸	6,639 ^{ab} ± 0,007	0,42 × 10 ⁷
0,5	7,741 ^c ± 0,012	5,51 × 10 ⁷	6,544 ^b ± 0,018	0,31 × 10 ⁷
0,75	7,406 ^d ± 0,029	2,55 × 10 ⁷	6,423 ^c ± 0,012	0,24 × 10 ⁷
1	6,971 ^e ± 0,059	0,94 × 10 ⁷	6,203 ^d ± 0,038	0,9 × 10 ⁶
1,25	6,842 ^f ± 0,022	0,67 × 10 ⁷	6,060 ^e ± 0,027	0,8 × 10 ⁶

Trong cùng một cột các giá trị trung bình có các ký tự theo sau khác nhau có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,01$).

Kết quả cũng cho thấy sự sống sót của vi khuẩn *Bacillus* phụ thuộc vào liều chiếu xạ. Sau 24 giờ nuôi cấy, mật số vi khuẩn có trong dịch chiếu xạ giảm dần khi liều chiếu xạ tăng. Ở chủng BS1 mật số vi khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy giảm dần từ 8,366 log₁₀ (CFU/mL) tương đương 2,33 × 10⁸ CFU/mL ở đối chứng xuống còn 6,842 log₁₀ (CFU/mL) tương đương 0,67 × 10⁷ (CFU/mL) ở liều 1,25 kGy. Tương tự ở chủng BL4 giảm dần từ 6,724 log₁₀ (CFU/mL) tương đương 0,55 × 10⁷ CFU/mL ở đối chứng xuống còn 6,060 log₁₀ (CFU/mL) tương đương 0,8 × 10⁶ CFU/mL ở liều 1,25 kGy.

Nghiên cứu thực hiện với *Bacillus* sp. NMBCC 10023 được phân lập từ mẫu đất cho thấy sau khi được chiếu xạ gamma với liều lượng từ 1 kGy đến 40 kGy thì số lượng vi khuẩn sống sót trên đĩa thạch giảm khi liều chiếu xạ

gamma tăng (Chyan *et al.*, 2010). Không có mẫu phân lập nào được phục hồi ở liều chiếu xạ lớn hơn 10 kGy. Nghiên cứu cũng đã xác định liều gây chết 90% (LD90) của bức xạ gamma đối với *Bacillus* sp. NMBCC 0023 nằm trong khoảng 2 - 4 kGy. Trong một nghiên cứu khác cho thấy tỷ lệ chết của *B. subtilis* NCD-2 tăng theo liều chiếu xạ gamma trong khoảng 100 đến 2000 Gy và ở liều 1000 Gy tỷ lệ chết lên đến 99,5% (Liu *et al.*, 2011). Sự khác biệt này cũng có thể giải thích khi cho rằng các yếu tố nhiệt độ, môi trường sinh trưởng, thành phần hóa học của môi trường cấy,... cũng như điều kiện sinh lý và khả năng tự sửa chữa của tế bào đã ảnh hưởng tới khả năng sống sót của vi khuẩn sau khi chiếu xạ.

Ảnh hưởng của xử lý chiếu xạ tới khả năng sinh tổng hợp protease của hai chủng vi khuẩn *Bacillus*

Khả năng sinh tổng hợp protease của hai chủng *Bacillus* sau chiếu xạ

Các khuẩn lạc đơn kháng xạ đã được cấy trang và lựa chọn 30 khuẩn lạc đơn có khả năng phát triển tốt cho mỗi liều chiếu để kiểm tra khả năng sinh tổng hợp protease bằng phương pháp cấy chấm điểm trên đĩa thạch casein. Những khuẩn lạc có kích thước vòng phân giải casein lớn hơn 10% so với chủng thuần được xem là các khuẩn lạc đột biến có khả năng sinh tổng hợp protease cao. Từ kết quả khảo sát tính ra tần số đột biến sinh tổng hợp protease cao tại mỗi liều chiếu xạ khác nhau.

Bảng 3. Tần số đột biến sinh tổng hợp protease cao của 2 chủng vi khuẩn *Bacillus* tại các liều chiếu xạ

Liều chiếu (kGy)	BS1		BL4	
	Kích thước vòng phân giải (mm)	Tần số đột biến (%)	Kích thước vòng phân giải (mm)	Tần số đột biến (%)
0(ĐC)	19,98	-	26,99	-
0,25	19,92 ^d ± 0,020	16,67	27,87 ^c ± 0,010	20,00
0,5	20,29 ^c ± 0,053	16,67	27,64 ^d ± 0,045	23,33
0,75	18,90 ^e ± 0,023	10,00	25,95 ^e ± 0,026	16,67
1	20,86 ^a ± 0,040	36,67	29,82 ^a ± 0,030	40,00
1,25	20,72 ^b ± 0,020	26,67	29,40 ^b ± 0,050	33,33

Trong cùng một cột các giá trị trung bình có các ký tự theo sau khác nhau có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,01$).

Chiếu xạ là quá trình chuyển năng lượng của bức xạ cho đối tượng bị chiếu xạ. Khi chiếu xạ các chủng vi khuẩn ở dạng dung dịch nuôi cấy có thể làm tăng ảnh hưởng của xử lý chiếu xạ lên vi khuẩn do sự gia tăng quá trình hình thành các gốc tự do từ các phân tử nước gây ra bởi bức xạ. Vì vậy, chiếu xạ vi khuẩn trong dung dịch nuôi cấy có thể gây ảnh hưởng tới vi khuẩn nhiều hơn so với chiếu xạ chúng trên môi trường thạch. Việc sử dụng phương án chiếu xạ dung dịch nuôi cấy vi khuẩn sẽ được lựa chọn để sàng lọc chủng *Bacillus* đột biến có khả năng sinh tổng hợp protease cao.

Tần số đột biến thường bị ảnh hưởng bởi liều chiếu xạ (Hoe *et al.*, 2016). Từ Bảng 3 cho thấy đột biến làm tăng khả năng sinh tổng hợp protease cao xuất hiện ở tất cả các liều chiếu xạ và dường như tần số đột biến sinh tổng hợp protease cao hơn ở khoảng liều 1 – 1,25 kGy. Trong đó, tần số đột biến cao nhất ở liều chiếu 1,0 kGy và lặp lại ở cả 2 chủng BS1 và BL4 lần lượt với tần số là 36,67% và 40%. Như vậy, dựa vào khả năng sống sót phụ thuộc vào liều chiếu xạ của 2 chủng này (bảng 2) cho thấy tần số đột biến sinh tổng hợp protease cao thu được nhiều hơn khi số lượng tế bào sống sau chiếu xạ giảm khoảng 1000 lần so với chủng thuần không chiếu xạ. Nghiên cứu của Trần Bằng Diệp và đồng tác giả (2017) sử dụng huyền dịch tế bào ở giai đoạn phát triển theo hàm mũ và đĩa thạch dinh dưỡng có cấy tế bào của 3 chủng vi khuẩn *B. subtilis* 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 dù xử lý chiếu xạ theo cách nào thì tỷ lệ vi khuẩn sống sót đều giảm theo liều chiếu và đường cong sống sót của chúng dường như tuân theo lý thuyết mô hình truyền năng lượng. Đột biến sinh protease cao ở các chủng *B. subtilis* xuất hiện ở tất cả các liều xạ và tỷ lệ đột biến cao hơn trong khoảng liều từ 700-1500 Gy là khoảng liều mà số lượng tế bào sống sót sau chiếu xạ giảm từ 3-4 đơn vị Log so với dạng thuần không chiếu xạ. Nghiên cứu cho thấy tỷ lệ tế bào sống của chủng vi khuẩn *B. megaterium* NMBCC50018, *B. subtilis* NMBCC50025 giảm dần theo liều chiếu xạ, LD50 của *B. megaterium* NMBCC50018, *B. subtilis* NMBCC50025 được xác định lần lượt là 1,2 kGy, 0,2 kGy. Mỗi loài vi khuẩn bị ảnh hưởng khác nhau khi được chiếu xạ bằng bức xạ gamma (Hing *et al.*, 2022).

Để tạo ra các đột biến vi sinh vật bằng bức xạ gamma, các phương pháp với liều lượng bức xạ và điều kiện chiếu xạ khác nhau đã được công bố và tổng hợp (Hoe *et al.*, 2016). Tuy nhiên, không có bất kỳ một khuyến cáo chung nào về khoảng liều tối ưu để đạt được tỷ lệ đột biến cao do ảnh hưởng của bức xạ tới mỗi loài hay chủng vi sinh vật là không giống nhau. Do đó, việc xác định liều chiếu tối ưu gây đột biến vi khuẩn là không đơn giản. Tổng hợp các nghiên cứu có liên quan để có được thông tin về hiệu quả của liều xử lý, điều kiện chiếu xạ là cần thiết để xác định khoảng liều phù hợp cho các đột biến mong muốn.

Đánh giá sự ổn định khả năng sinh tổng hợp protease của các khuẩn lạc tiềm năng sau ba thế hệ

Nhằm mục đích xác định sự ổn định về khả năng sinh tổng hợp protease của các khuẩn lạc tiềm năng ở các thế hệ tiếp theo trong nghiên cứu này tiến hành khảo sát khả năng sinh tổng hợp protease của các khuẩn lạc sau ba thế hệ liên tục (ba lần cấy truyền, mỗi lần cách nhau 1 tháng). Từ kết quả khảo sát khả năng sinh tổng hợp protease của hai chủng vi khuẩn *Bacillus* sau chiếu xạ gamma thu được các khuẩn lạc sinh tổng hợp protease cao, từ đó chọn ra 5 khuẩn lạc có kích thước vòng phân giải casein lớn nhất từ mỗi chủng vi khuẩn *Bacillus* (Bảng 4).

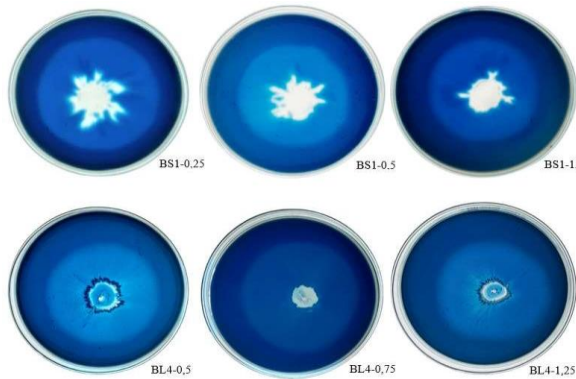
Bảng 4. Kích thước vòng phân giải casein của 5 khuẩn lạc có khả năng sinh tổng hợp protease vượt trội của hai chủng vi khuẩn *Bacillus*

Ký hiệu	Liều chiếu (kGy)	Kích thước (mm)	Ký hiệu	Liều chiếu (kGy)	Kích thước (mm)
<i>B. velezensis</i> BS1	Đối chứng	19,98	<i>B. licheniformis</i> BL4	Đối chứng	26,99
BS1.1	0,25	26,60 ^b ± 0,113	BL4.1	0,5	41,30 ^b ± 0,114
BS1.2	0,25	25,55 ^c ± 0,141	BL4.2	0,75	42,35 ^a ± 0,080
BS1.3	0,5	26,95 ^a ± 0,050	BL4.3	0,75	42,35 ^a ± 0,070
BS1.4	1	24,85 ^d ± 0,157	BL4.4	1,25	40,60 ^c ± 0,854
BS1.5	1	24,85 ^d ± 0,132	BL4.5	1,25	40,25 ^c ± 0,087

Trong cùng một cột các giá trị trung bình có các ký tự theo sau khác nhau có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,01$).

Ở chủng vi khuẩn *B. velezensis* (BS1), các khuẩn lạc thu nhận có kích thước vòng phân giải casein từ 24,85 mm đến 26,95 mm và lớn hơn so với chủng thuần từ 1,24 – 1,35 lần. Đối với chủng vi khuẩn *B. licheniformis* (BL4) các khuẩn lạc có kích thước vòng phân giải casein từ 40,25 mm đến 42,35 mm và lớn hơn so với chủng thuần từ 1,49 – 1,57 lần.

Các khuẩn lạc tiềm năng sinh tổng hợp protease cao nhất đã chọn từ hai chủng vi khuẩn *Bacillus* sẽ được cấy truyền và khảo sát khả năng sinh tổng hợp protease thế hệ thứ hai thông qua kích thước vòng phân giải casein xuất hiện trên đĩa thạch - casein.



Hình 1. Vòng phân giải casein của các khuẩn lạc sinh tổng hợp protease cao nhất của chủng BS1 và BL4

Bảng 5. Kết quả đánh giá khả năng sinh tổng hợp protease của 5 khuẩn lạc vượt trội từ hai chủng *Bacillus* ở thế hệ thứ hai

Ký hiệu	Liều chiếu (kGy)	Kích thước (mm)	Ký hiệu	Liều chiếu (kGy)	Kích thước (mm)
BS1	ĐC	20,03 ^c ± 0,205	BL4	ĐC	27,04 ^d ± 0,238
BS1.1	0,25	26,60 ^a ± 0,350	BL4.1	0,5	41,42 ^{ab} ± 0,202
BS1.2	0,25	25,43 ^b ± 0,202	BL4.2	0,75	42,23 ^a ± 0,535
BS1.3	0,5	26,72 ^a ± 0,202	BL4.3	0,75	42,12 ^a ± 0,202
BS1.4	1	25,08 ^b ± 0,202	BL4.4	1,25	40,48 ^{bc} ± 0,202
BS1.5	1	25,20 ^b ± 0,350	BL4.5	1,25	39,78 ^c ± 0,535

Kích thước vòng phân giải được tính bằng trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột các giá trị trung bình có các ký tự theo sau khác nhau có sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,01$).

Từ kết quả đánh giá khả năng sinh tổng hợp protease của các khuẩn lạc tiềm năng ở thế hệ thứ 2 bằng phương pháp định tính dựa vào đường kính vòng phân giải casein, có thể nhận thấy, ở chủng BS1 có khuẩn lạc BS1.1 ở liều chiếu 0,25 kGy và BS1.3 từ liều chiếu 0,5 kGy có kích thước vòng phân giải casein lớn hơn, có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các khuẩn lạc còn lại lần lượt là 26,60 mm và 26,72 mm (Bảng 5). Chủng BL4 có khuẩn lạc BL4.2 và BL4.3 đều ở liều chiếu 0,75 kGy có kích thước vòng phân giải casein lần lượt là 42,23 mm và 42,12 mm. Các khuẩn lạc này cho kích thước vòng phân giải casein có khả năng sinh enzyme vượt trội hơn so với chủng thuần và các khuẩn lạc đột biến còn lại.

Bốn khuẩn lạc tiềm năng từ hai chủng vi khuẩn *Bacillus* BS1 và BL4 ở thế hệ thứ hai (BS1.1, BS1.3, BL4.2 và BL4.3) được lựa chọn để tiếp tục cấy truyền và đánh giá sự ổn định khả năng sinh tổng hợp protease ở thế hệ thứ ba. Kết quả khảo sát sau 3 thế hệ được thể hiện ở Bảng 6.

Bảng 6. Kích thước vòng phân giải casein của các khuẩn lạc tiềm năng từ chủng vi khuẩn BS1 và BL4 sau 3 thế hệ

Thế hệ	Kích thước vòng phân giải (mm)			
	BS1.1	BS1.3	BL4.2	BL 4.3
ĐC	20,03 ^b ± 0,205	20,03 ^b ± 0,205	27,09 ^b ± 0,269	27,09 ^b ± 0,269
Thế hệ thứ 1	26,60 ^a ± 0,173	26,95 ^a ± 0,492	42,35 ^a ± 0,132	42,35 ^a ± 0,150
Thế hệ thứ 2	26,60 ^a ± 0,350	26,72 ^a ± 0,202	42,23 ^a ± 0,535	42,12 ^a ± 0,202
Thế hệ thứ 3	26,72 ^a ± 0,115	26,76 ^a ± 0,064	42,23 ^a ± 0,350	42,00 ^a ± 0,120

Kích thước vòng phân giải được tính bằng trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột các giá trị trung bình có các ký tự theo sau có sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,01$).

Từ kết quả đánh giá sự ổn định về khả năng sinh tổng hợp protease của 4 khuẩn lạc BS1.1, BS1.3, BL4.2 và BL4.3 cho thấy kích thước vòng phân giải casein của các khuẩn lạc này lớn hơn so với chủng thuần và ổn định ít nhất sau 3 thế hệ liên tiếp.

KẾT LUẬN

Tuyển chọn được 2 chủng *B. velezensis* (BS1), *B. licheniformis* (BL4) có kích thước vòng phân giải casein lớn nhất lần lượt là 19,75 mm và 27,15 mm. Tỷ lệ sống sót của *B. velezensis*, *B. licheniformis* giảm dần theo sự tăng dần liều chiếu xạ. Khoảng liều chiếu xạ phù hợp để sàng lọc các chủng sau chiếu xạ có khả năng sinh tổng hợp protease cao là 1 – 1,25 kGy. Sau chiếu xạ sàng lọc được 4 khuẩn lạc có khả năng sinh tổng hợp protease cao vượt trội từ mỗi chủng BS1 và BL4. Đối với *B. velezensis* (BS1) chọn được 2 khuẩn lạc BS1.1 và BS1.3 ở liều chiếu 0,25 kGy và 0,5 kGy có kích thước vòng phân giải casein cao nhất lần lượt là 26,60 mm và 26,95 mm. Đối với chủng *B. licheniformis* (BL4) chọn được 2 khuẩn lạc BL4.2 và BL4.3 đều ở liều chiếu 0,75 kGy với kích thước vòng phân giải casein cao nhất là 42,35 mm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chyan JB, Ying LPW, Dzomir AZM, Hadin SKA, Tumirin NM (2010). Effects of gamma-rays on an indigenous *Bacillus* isolate. *RnD Seminar 2010: Research and Development Seminar 2010, Malaysia*.
- Hoàng Đăng Sáng (2018). Nghiên cứu tạo chủng *Bacillus subtilis* đột biến có khả năng sinh protease cao bằng chiếu xạ gamma kết hợp với xử lý kháng sinh. *Luận văn Tốt nghiệp thạc sĩ*.
- Hoe PCK, Rahim KA, Saud HM (2016). A review on microbial mutagenesis through gamma irradiation for agricultural applications. *Jurnal Sains Nuklear Malaysia*, 28(2), 20-29.
- Liu G, Meng Y, Yang S, Bao F, Shang H (2011). Study on γ -ray irradiation mutation of *Bacillus subtilis* NCD-2. *Agricultural Science & Technology-Hunan*, 12(11), 1633-1743.
- Khavari AP (2020). Role of oxidative stress response in radiosensitivity. *PhD dissertation. Stockholm University*.
- Hing JN, Jong BC, Liew PWY, Elly Ellyna R, Shuhaimi (2022). Gamma radiation dose-response of gram-positive and gram-negative bacteria. *Malaysian Applied Biology*, 51(5): 107-112.
- Trần Bằng Diệp (2017). Nghiên cứu ứng dụng bức xạ ion hóa kết hợp công nghệ ribosome nhằm cải thiện khả năng sinh tổng hợp protease của vi khuẩn *Bacillus subtilis*. Đề tài Nghiên cứu Khoa học cấp Bộ.

EVALUATION THE INFLUENCE OF GAMMA IRRADIATION ON THE PROTEASE ACTIVITY IN *Bacillus* spp.

Vo Thi Thuy Hue^{1*}, Phan Huu Tin², Nguyen Thi Thu Trang¹, Nguyen Thị Thuy Trang², Nguyen Minh Quang²

¹Department of Biological Sciences, Nong Lam University

²Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University

SUMMARY

Protease is one of the most important commercially available enzymes. Proteases have a wide range of applications in different industries like detergent, leather and food industries. Microorganisms are known to play a vital role in technology for the production of extracellular enzymes on an industrial scale. Among bacteria, *Bacillus* species are specific producers of extracellular proteases. The aim of this study was to produce *Bacillus* strains with high protease production by gamma irradiation treatment. After treatment, the irradiated cells were cultured in the nutrient agar plates. The survival rate, the mutation frequency of *Bacillus* strains were determined. The use of gamma radiation increased the production of enzyme by *Bacillus* compared to tests without radiation. The results showed that *Bacillus velezensis* (BS1) and *Bacillus licheniformis* (BL4) were capable of high protease production with a clear zone diameter of 19,75 mm and 27,15 mm, respectively. The radiation effects on their viability and mutant frequency were studied with radiation dose ranging from 0.25 to 1.25 kGy. The viability of *Bacillus* strains was much affected by gamma radiation and the survival rate of bacteria decreased with the increasing dose. The mutation frequency of *B. velezensis* (BS1) and *B. licheniformis* increasing with radiation dose ranging from 1 to 1.25 kGy. The greatest mutation frequency was determined as 36,67% (BS1) and 40% (BL4) obtained by irradiation at 1 kGy. Four bacteria from the two strains BS1 and BL4 following screening radiation were able to produce superior and stable proteases after at least three generations. Thus, gamma radiation treatment is an effective mutant method in enhancing the protease bioactivity of *Bacillus*.

Keywords: *Bacillus*, gamma radiation, mutation, protease, survival.

* Author for correspondence: Tel: 0765359935; Email: thuyhue@hcmuaf.edu.vn