

Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men chủng *Bacillus subtilis* DB104 thu nhận peptide kháng khuẩn tái tổ hợp bằng phương pháp đáp ứng bề mặt

Trần Quốc Tuấn^{1*}, Đinh Thị Lan Anh¹, Lê Thị Thúy Ái², Đinh Minh Hiệp²

¹Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

²Ban Quản lý Khu Nông nghiệp Công nghệ cao TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 7/8/2018; ngày gửi phản biện 10/8/2018; ngày nhận phản biện 17/9/2018; ngày chấp nhận đăng 21/9/2018

Tóm tắt:

Trong những năm gần đây, nhiều loại peptide kháng khuẩn (AMPs) đã được tìm thấy trong các sinh vật khác nhau và rất đa dạng, bao gồm cả động vật lưỡng cư, động vật có vú, thực vật và prokaryote. Hoạt động kháng khuẩn của các peptide hiệu quả trên nhiều vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Bên cạnh các peptide tự nhiên, nhiều AMPs tổng hợp đã được nghiên cứu và thu nhận. Các peptide có hoạt tính kháng khuẩn là do sự tác động của peptide làm biến đổi cấu trúc tự nhiên của màng vi khuẩn, vì vậy peptide kháng khuẩn vẫn có hoạt tính trên một số vi khuẩn đa kháng thuốc. Nghiên cứu này tập trung tối ưu hóa thành phần môi trường nuôi cấy nhằm thu nhận peptide kháng khuẩn từ chủng *Bacillus subtilis* DB104 tái tổ hợp. Trong một môi trường thích hợp, các thành phần này được sàng lọc lại với các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính kháng khuẩn của peptide bằng thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman. Trong các yếu tố khảo sát, pepton, K_2HPO_4 và rỉ đường là ba yếu tố tác động nhiều nhất ($p < 0,05$). Thí nghiệm được thiết kế theo phương pháp đáp ứng bề mặt (Response surface methodology-RSM). Kết quả nhận được môi trường thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp peptide gồm: 12,4 g/l pepton, 5,1 g/l K_2HPO_4 , 8 g/l rỉ đường. Thời gian lên men sau 36 giờ cho hoạt tính kháng khuẩn cao nhất 1.600 AU/ml, cao hơn trước khi tối ưu 2,5 lần (640 AU/ml), chiếm 60%.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, đáp ứng bề mặt, peptide tái tổ hợp, thành phần môi trường, tối ưu hóa.

Chỉ số phân loại: 2.8

Giới thiệu

Hiện nay, các peptide kháng khuẩn (antimicrobial peptide - AMPs) được coi như nguồn “kháng sinh tự nhiên” của sinh vật đã được phát hiện ở nhiều loài sinh vật khác nhau. Chúng đang được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu, mang một ý nghĩa lớn khi hiện trạng kháng thuốc kháng sinh của các vi sinh vật gây bệnh trên người và động vật ngày càng nhiều. Các peptide có hoạt tính kháng khuẩn có nguồn gốc khá đa dạng, từ côn trùng, giáp xác, động vật có vú tới vi sinh vật [1-3]. Peptide kháng khuẩn thường gồm 12-50 amino acid. Hoạt động kháng khuẩn của các peptide khá đa dạng và hiệu quả trên nhiều vi khuẩn Gram âm và Gram dương, nấm mốc, virus và một số ký sinh trùng. Bên cạnh các peptide tự nhiên, nhiều peptide kháng khuẩn tổng hợp đã được nghiên cứu và thu nhận. Thuộc nhóm peptide này, cecropin đã được phân lập đầu tiên từ nhộng bướm tằm *Hyalophora cecropia* bị lây nhiễm vi khuẩn. Boman và đồng tác giả (1994) đã phân lập được ba nhóm cecropin A, B và D. Trong đó cecropin B có hoạt tính kháng khuẩn mạnh, tác động lên cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương [4-6]. Cấu trúc xoắn α , mang điện tích dương, kích thước nhỏ nên cho phép

gắn và chèn vào màng đôi của tế bào vi khuẩn hình thành các lỗ trên màng và tiêu diệt vi khuẩn [7]. Gen mã hóa cho một số cecropin được thiết kế và tổng hợp đã cho thấy hiệu quả kháng bệnh ở động vật và thực vật do vi khuẩn gây nên [5]. Cecropin có cấu trúc bậc hai dạng xoắn α , mang điện tích dương mạnh, lưỡng cực, gồm 35-50 amino acid, khối lượng phân tử khoảng 4,1 kDa. Trong nghiên cứu trước đó có liên quan, chúng tôi sử dụng kỹ thuật gen tạo chủng *B. subtilis* DB104 có khả năng biểu hiện peptide cecropin B trong giai đoạn tạo bào tử. Peptide cecropin B sẽ được phiên mã trong giai đoạn muộn của sự hình thành bào tử nhờ hoạt động của promoter P_{cotB} và được giải phóng ra ngoài môi trường khi tế bào mẹ ly giải phóng thích bào tử. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung khảo sát tối ưu hóa môi trường nuôi cấy cho thu nhận peptide cao nhất.

Phương pháp tối ưu hóa truyền thống thực hiện việc tối ưu từng nhân tố (one-factor-at-a-time) đơn giản, dễ thực hiện và những tác động của các thành phần có thể được nhận thấy trên đồ thị mà không cần phải phân tích thống kê. Tuy nhiên, mô hình này thường xuyên thất bại trong việc xác định vị trí tại khu vực đáp ứng tối ưu vì những tác động chung của các yếu tố trên

*Tác giả liên hệ: Email: trquuan@hcmus.edu.vn

Optimisation of medium composition for recombinant antibacterial peptide production from *Bacillus subtilis* DB104 by using response surface methodology

Quoc Tuan Tran^{1*}, Thi Lan Anh Dinh¹,
Thi Thuy Ai Le², Minh Hiep Dinh²

¹University of Sciences, National University of Ho Chi Minh City

²Agricultural Hi-Tech Park of Ho Chi Minh City

Received 7 August 2018; accepted: 21 September 2018

Abstract:

Antimicrobial peptides (AMPs) were described as having a broad spectrum of antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, but lacking the ability to lyse eukaryotic cells. Some peptides which exhibit antimicrobial activity derive from quite diverse sources, such as insects, crustaceans, and mammals. In this study, we optimised the medium composition for the production of recombinant antibacterial peptides from *Bacillus subtilis* DB104. The medium composition was selected in order to make the base for screening factors affecting the peptide activity by Plackett-Burman experiments. Among factors surveyed, pepton, K_2HPO_4 , and molasses were considered significantly ($p < 0.05$). These factors were subsequently optimised using the response surface methodology (RSM). The obtained results showed the appropriate medium for the biosynthesis of peptides included 12.4 g/l pepton, 5.1 g/l K_2HPO_4 , and 8 g/l molasses. After 36 hours of fermentation, the peptide activity reached the highest level of 1,600 AU/ml, 2.5 times higher than that of the pre-optimized one (640 AU/ml).

Keywords: *Bacillus subtilis*, medium composition, optimisation, recombinant peptide, response surface methodology.

Classification number: 2.8

bề mặt đáp ứng không thấy được, điều này có ý nghĩa khi lên men ở quy mô lớn [7].

Thiết kế thí nghiệm thống kê cung cấp một cách tiếp cận hiệu quả để tối ưu hóa. Phương pháp này tối ưu nhiều hơn một yếu tố ở hai hay nhiều mức độ khác nhau và bao gồm nhiều thiết kế như thiết kế các yếu tố đầy đủ (full factorial design), thiết kế Box-Behnken (Box-Behnken design-BBD). Phương pháp bề mặt đáp ứng là một kỹ thuật mô hình thực nghiệm được sử dụng để đánh giá mối quan hệ giữa một tập hợp của các yếu tố thử nghiệm kiểm soát. Dựa trên kết quả kiểm tra biến, mô hình kiểm tra các biến thử nghiệm cần thiết cho tổng hợp peptide tối ưu bằng cách sử dụng thiết kế Box-Behnken và phương pháp bề mặt đáp ứng [8].

Với việc sử dụng thống kê trong thiết kế thí nghiệm được thực hiện với các yếu tố được chọn nhằm tìm ra môi trường tối ưu cho thu nhận peptide đạt năng suất cao nhất là hướng tiếp cận của nghiên cứu này.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Chủng vi sinh vật

Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* DB104 [*his*, *nprR2*, *nprE18*, Δ *aprA3*] (Đại học Bayreuth, Đức) được chèn Cassette $P_{cotB-cecB}$ ở bộ gen, biểu hiện gen mã hóa cecropin B (*B. subtilis* DB104 amyE:PcotB-cecB).

Chủng vi khuẩn khảo sát kháng khuẩn: *Edwardsiella ictalury* do Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản II (TP Hồ Chí Minh) cung cấp.

Xác định hoạt tính kháng khuẩn

Từ môi trường thích hợp, cấy vi khuẩn (đã được tăng sinh từ 12-16 giờ) vào các môi trường khảo sát với tỷ lệ nạp giống 1% và nuôi trong điều kiện lắc ở 37°C với tốc độ lắc 200 vòng/phút. Thu canh trường nuôi cấy sau 24 giờ. Ly tâm 15.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng thu dịch để loại tế bào. Kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn của mẫu dịch thu được trên vi khuẩn *Edwardsiella ictalury* bằng phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn. Hoạt tính kháng khuẩn (AU/ml) được xác định theo phương pháp pha loãng hai lần tuần tự (Schilliner và Rest, 2003): hoạt tính kháng khuẩn được tính theo công thức $AU/ml = DF_i \times (1/V)$, AU: đơn vị hoạt tính; DF_i : độ pha loãng cao nhất có vòng ức chế [9].

Điện di polyacrylamide và phân tích hoạt tính trên gel

Điện di protein SDS-PAGE được thực hiện trên gel 12,5% polyacrylamide và 4% gel gom theo phương pháp được mô tả bởi Leammli (1970) [10].

Để thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn, tiến hành điện di tương tự SDS-PAGE, tuy nhiên mẫu không qua bước xử lý nhiệt. Sau khi chạy điện di xong, cắt phần gel chứa peptide ngâm trong dung dịch Triton-X100 2,5% để loại SDS, sau đó rửa lại bằng dung dịch đệm Tris-HCl pH 7,0. Tiến hành áp gel lên đĩa thạch chứa môi trường cao thịt peptone đã trải vi khuẩn

Edwardsiella ictalryi. Ủ 30°C trong 24 giờ. Quan sát vùng vô khuẩn.

Tối ưu hóa và thiết kế thí nghiệm

Sàng lọc yếu tố có ý nghĩa bằng thiết kế Plackett-Burman: từ kết quả nghiên cứu trước đó có liên quan môi trường được chọn có thành phần gồm: 10 g/l glucose, 1,7 g/l ammonium citrate, 11,13 g/l peptone, 7,2 g/l ri đường, 1μM FeSO₄.7H₂O, 0,38 g/l MgSO₄.7H₂O, 4,58 g/l K₂HPO₄, 0,01 g/l CaCl₂, được sử dụng thiết kế Plackett-Burman nhằm sàng lọc các yếu tố có ảnh hưởng đến hoạt tính kháng khuẩn của peptide [7]. Các yếu tố được chọn cho nghiên cứu này là ri glucose, peptone, MgSO₄, K₂HPO₄, ri đường, CaCl₂, MnCl₂, amonium citrate và FeSO₄ được liệt kê trong bảng 1. Thiết kế ma trận Plackett-Burman được trình bày trong bảng 2. Kết quả nghiên cứu được phân tích bằng chương trình “Design Expert® 7.0” Stat-Ease, Inc., Minneapolis, Hoa Kỳ.

Bảng 1. Các biến trong ma trận Plackett-Burman.

Yếu tố	Đơn vị	Ký hiệu	Mức		Mức độ ảnh hưởng	
			Thấp (-1)	Cao (+1)	Ảnh hưởng	Prob>F
Glucose	g/l	X1	5	15	9,42 ^b	0,1136
Peptone	g/l	X2	5	15	121,25 ^a	0,0008
MgSO ₄	g/l	X3	0,3	0,5	-9,42 ^b	0,1136
K ₂ HPO ₄	g/l	X4	4	6	31,75 ^a	0,0118
Ri đường	g/l	X5	5	10	36,58 ^a	0,0089
CaCl ₂	g/l	X6	0,01	0,05	-4,58 ^b	0,3182
MnCl ₂	mM	X7	10	20	9,42 ^b	0,1136
Amonium citrate	g/l	X8	1	2,5	-13,42 ^b	0,0611
FeSO ₄	μM	X9	0,5	2	-18,25 ^a	0,0344

^aCó ý nghĩa ở độ tin cậy α=0,05; ^bKhông có ý nghĩa ở độ tin cậy α=0,05.

Bảng 2. Ma trận thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman.

Thí nghiệm	Các biến									Hoạt tính kháng khuẩn (AU/ml)	
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	Thực nghiệm	Mô hình
1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	457	462
2	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	320	324,83
3	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	160	155
4	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	160	155
5	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	50	54,83
6	1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	320	315,17
7	-1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	320	315,17
8	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	291	295,83
9	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	50	55
10	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	50	45,17
11	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	50	55
12	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	267	262

Tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt: ba yếu tố chính từ kết quả sàng lọc thu được được xác định giá trị tối ưu và được nghiên cứu ở 3 mức (-1, 0 và +1) (bảng 3) với 15 thí nghiệm trong đó có 3 thí nghiệm ở tâm (bảng 4).

Bảng 3. Nồng độ các yếu tố sử dụng trong Box-Behnken.

Yếu tố	Đơn vị	Ký hiệu	Mức		
			-1	0	+1
Peptone	g/l	X1	5	10	15
Ri đường	g/l	X2	5	7,5	10
K ₂ HPO ₄	g/l	X3	4	5	6

Hàm đáp ứng được chọn là hoạt tính kháng khuẩn (Y, AU/ml dịch nuôi cấy). Mô hình hóa được biểu diễn bằng phương trình bậc hai: $Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2$. Trong đó, B₀ là hệ số hồi quy bậc 0; B₁, B₂, B₃ là các hệ số bậc 1; B₁₁, B₂₂ và B₃₃ là hệ số bậc 2; B₁₂, B₂₃ và B₁₃ là các hệ số tương tác của từng cặp yếu tố; X₁, X₂, X₃ là các biến độc lập. Số liệu được phân tích bằng chương trình “Design Expert® 7.0” Stat-Ease, Inc., Minneapolis, Hoa Kỳ. Từ kết quả phân tích xác định mức tối ưu của các yếu tố khảo sát cho hoạt tính kháng khuẩn cao nhất.

Bảng 4. Thiết kế Box-Behnken.

Thí nghiệm	Các biến			Hoạt tính kháng khuẩn (AU/ml)	
	X1	X2	X3	Thực nghiệm	Mô hình
1	0	1	1	640	653,5
2	1	0	1	800	773,375
3	-1	-1	0	200	186,875
4	1	-1	0	457	473,875
5	0	0	0	1067	1067
6	0	-1	1	291	300,75
7	0	1	-1	533	523,25
8	-1	0	-1	229	255,625
9	0	0	0	1067	1067
10	0	0	0	1067	1067
11	-1	0	1	400	403,375
12	1	1	0	914	927,125
13	1	0	-1	800	796,625
14	-1	1	0	320	303,125
15	0	-1	-1	320	306,5

Kết quả và thảo luận

Sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính kháng khuẩn

Với 9 yếu tố được chọn để sàng lọc gồm glucose, ammonium citrate, peptone, ri đường, FeSO₄.7H₂O, MgSO₄.7H₂O, K₂HPO₄, MnCl₂ và CaCl₂ với hai mức thấp và cao, tiến hành thí nghiệm theo ma trận Plackett-Burman. Qua kết quả xử lý bằng phần mềm Design expert 7.0 (bảng 1) cho thấy, các yếu tố có giá trị ảnh hưởng dương và lớn gồm pepton, K₂HPO₄ và ri đường sẽ ảnh hưởng dương (+) tới hoạt tính kháng khuẩn với mức ý nghĩa α=0,05 (p-value <0,05). Trong khi đó, kết quả nghiên cứu sàng lọc yếu tố của Juan và cộng sự (2005) khi khảo sát 17 yếu tố đã chọn glucose, NH₄NO₃, glutamic acid, CaCl₂ và MnSO₄ [11]; Monteiro và cộng sự (2014) [12] chọn glucose, ammonium sulphate và CaCl₂; Shi và cộng sự (2007) [13] chọn (NH₄)₂SO₄, bột bắp và MgSO₄ ảnh hưởng mạnh lên khả năng tạo bào tử của vi khuẩn. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi chọn pepton, K₂HPO₄ và ri đường cho thiết kế thí nghiệm theo phương pháp đáp ứng bề mặt-Box-Behnken.

Tối ưu hóa giá trị các yếu tố ảnh hưởng lên hoạt tính kháng khuẩn

Các thí nghiệm lên men thu nhận dịch peptide được thực hiện trên ba yếu tố ở ba mức gồm 15 công thức, trong đó 3 lần lặp lại của các điểm trung tâm được thể hiện trong bảng 4 với các giá trị hàm đáp ứng. Kết quả phân tích ANOVA (bảng 5) cho thấy, mô hình có ý nghĩa thống kê ($P < 0,0001$), hệ số hồi quy R^2 là $0,9980 > 0,75$ chứng tỏ mô hình tương thích với thực nghiệm. Hơn nữa, giá trị R^2 dự đoán là $0,9679$ phù hợp với R^2 điều chỉnh là $0,9944$ (độ lệch $0,0265 < 0,2$), tỷ lệ tín hiệu so với nhiễu là $24,12 > 4$ thể hiện tín hiệu đã đầy đủ.

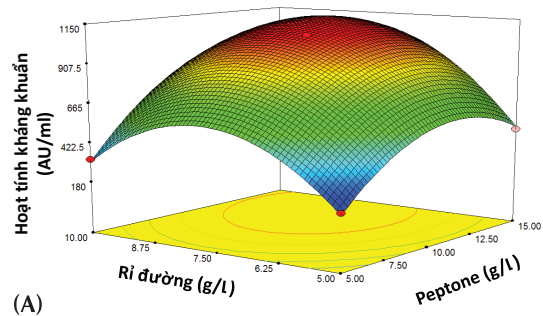
Bảng 5. Kết quả phân tích ANOVA.

Source	Tổng bình phương	Bậc tự do	Sai số chuẩn	Ảnh hưởng	F - Value	Prob > F
Model	1445679	9	13,93		276,07	<0,0001
X_1	414960,5	1	8,53	227,75	713,17	<0,0001
X_2	162165,1	1	8,53	142,375	278,71	<0,0001
X_3	7750,125	1	8,53	31,125	13,32	0,0148
$X_1 X_2$	28392,25	1	12,06	84,25	48,80	0,0009
$X_1 X_3$	7310,25	1	12,06	-42,75	12,56	0,0165
$X_2 X_3$	4624	1	12,06	34	7,95	0,0371
X_1^2	215343,7	1	12,55	-241,5	370,10	<0,0001
X_2^2	459443,3	1	12,55	-352,75	789,63	<0,0001
X_3^2	265691,3	1	12,55	-268,25	456,63	<0,0001
Sai số	0,00	2				
Tổng	1448588	14				

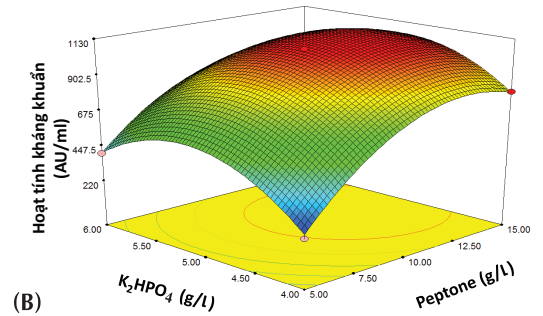
$R^2 = 0,9980$; $CV = 3,97\%$; R^2 -điều chỉnh = $0,9944$; R^2 -dự đoán = $0,9679$.

Phương trình hồi quy nhận được như sau: hoạt tính kháng khuẩn (AU/ml) = $1067 + 227,75 X_1 + 142,38 X_2 + 31,12 X_3 + 84,25 X_1 X_2 - 42,75 X_1 X_3 + 34 X_2 X_3 - 241,5 X_1^2 - 352,75 X_2^2 - 268,25 X_3^2$.

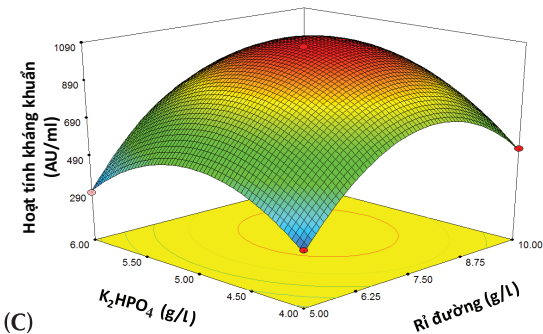
Để xác định mức độ tối ưu của mỗi biến cho hoạt tính kháng khuẩn của peptide tối ưu, đồ thị bề mặt ba chiều tương tác được xây dựng với trục Z là hoạt tính kháng khuẩn và hai biến độc lập bất kỳ, trong khi duy trì biến còn lại ở mức tối ưu của chúng. Kết quả ở hình 1A cho thấy, hoạt tính kháng khuẩn tăng cực đại khi gia tăng pepton và rỉ đường. Trong khi đó, ở hình 1B và 1C cho thấy hoạt tính kháng khuẩn ảnh hưởng nhiều bởi pepton và rỉ đường. K_2HPO_4 dường như không ảnh hưởng đến hoạt tính kháng khuẩn. Từ các dữ liệu thí nghiệm thu được và phương trình trên, các thông số tối ưu của mỗi biến được xác định: pepton 12,4 g/l, K_2HPO_4 5,1 g/l và rỉ đường 8 g/l, mô hình dự đoán hoạt tính kháng khuẩn tối đa đạt được (1.143,5 FU/ml). Trong nghiên cứu của Chen và cộng sự (2010) chọn hàm lượng peptone 7,7 g/l và nhận thấy rỉ đường là nguồn carbon thích hợp cho *B. subtilis* WHK-Z12 sinh bào tử tốt hơn các đường đơn (glucose, fructose...), tuy nhiên hàm lượng cao hơn trong nghiên cứu này (20,75 g/l) [14]. Mô hình được kiểm chứng khi thực hiện thí nghiệm tại các giá trị tối ưu trên đạt hoạt tính kháng khuẩn là 1.067 AU/ml sau 24 giờ nuôi cấy. Qua



(A)



(B)



(C)

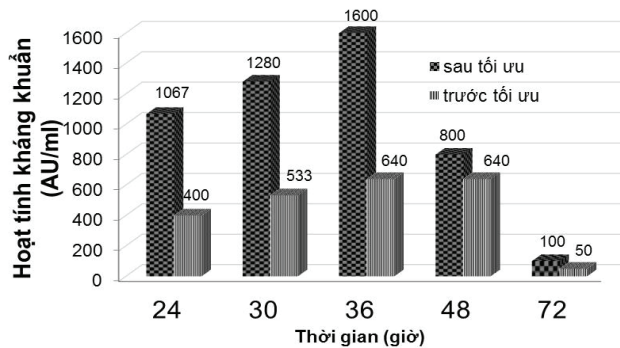
Hình 1. Mặt đáp ứng hoạt tính kháng khuẩn theo hai yếu tố: (A) Peptone (X_1) - rỉ đường (X_2) với K_2HPO_4 ở nồng độ 5 g/l; (B) Peptone (X_1) - K_2HPO_4 (X_3) với rỉ đường ở nồng độ 7,5 g/l; (C) Rỉ đường (X_2) - K_2HPO_4 (X_3) với peptone ở nồng độ 10 g/l.

thực nghiệm cho thấy nghiên cứu đã đưa ra thành phần môi trường tối ưu cho thu nhận peptide cao nhất.

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên hoạt tính kháng khuẩn của peptide

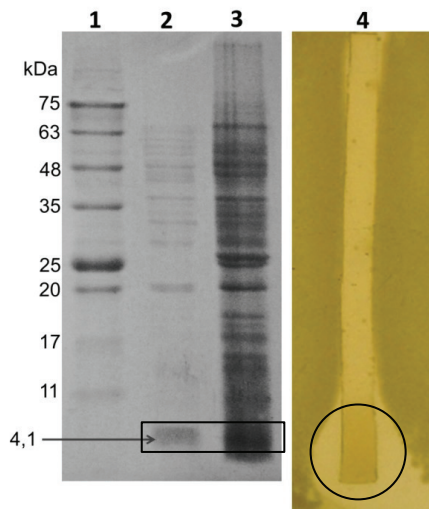
Tiến hành thu nhận và khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của peptide sau 24 giờ, 30 giờ, 36 giờ, 48 giờ và 72 giờ nuôi cấy chủng vi khuẩn trên môi trường tối ưu. Kết quả hình 2 cho thấy khi tăng thời gian nuôi cấy từ 24 đến 36 giờ, hoạt tính kháng khuẩn tăng dần và đạt giá trị cao nhất ở cả hai môi trường trước và sau tối ưu hóa. Khi so sánh với môi trường khi chưa tối ưu hoạt tính kháng khuẩn đạt 640 AU/ml, sau tối ưu hóa tăng 2,5 lần (60%). Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Chen và cộng sự (2010) khi chọn thời điểm sau 36 giờ cho hiệu

suất tạo bào tử cao nhất [14]. Chúng tôi chọn thời điểm 36 giờ nuôi cấy cho thu nhận peptide.



Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng kháng khuẩn của peptide khi lên men chủng *Bacillus subtilis* trên môi trường trước và sau khi tối ưu hóa.

Kết quả thể hiện trong hình 3 với peptide có khối lượng phân tử 4,1 kDa theo thiết kế xuất hiện vạch đậm và rõ hơn ở dịch sau lên men *Bacillus subtilis* trên môi trường sau tối ưu so với môi trường ban đầu. Giếng 4 (hình 3) cũng thể hiện rõ hoạt tính kháng khuẩn của gel sau khi chạy điện di tương ứng với vạch peptide.



Hình 3. Điện di SDS-PAGE và phân tích hoạt tính kháng khuẩn trên gel.

Giếng 1: thang protein chuẩn; Giếng 2: dịch nuôi trên môi trường ban đầu; Giếng 3: dịch nuôi trên môi trường tối ưu; Giếng 4: band gel được cắt sau khi chạy điện di và áp lên thạch đĩa chứa môi trường với vi khuẩn *Edwardsiella ictalury*.

Kết luận

Từ 9 yếu tố ban đầu chọn 3 yếu tố ảnh hưởng là pepton, K_2HPO_4 và ri đường bằng thiết kế ma trận Plackett-Burman. Sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt-Box-Behnken đã tối ưu hóa thành phần môi trường cho hoạt tính kháng khuẩn cao nhất với pepton 12,4 g/l, K_2HPO_4 5,1 g/l và ri đường 8 g/l. Hoạt tính

tối đa đạt được là 1.600 AU/ml sau 36 giờ nuôi cấy chủng *B. subtilis* DB104 tái tổ hợp. Kết quả làm cơ sở cho nghiên cứu lên men với quy mô pilot nhằm thu nhận peptide nhiều hơn để có thể ứng dụng trong thủy sản. Hướng nghiên cứu mở ra trong tương lai nhằm nâng cấp quy mô nhân nuôi và thu nhận ở mức công nghiệp để có thể ứng dụng vào thực tiễn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H. Steiner, D. Hultmark, A. Engstrom, H. Bennich, H.G. Boman (1981), "Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity", *Nature*, **292**, pp.246-248.
- [2] J. Vizioli, M. Salzet (2002), "Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates", *Trends Pharmacol. Sci.*, **23**, pp.494-496.
- [3] W.S.C. Chen (1997), "Effects of the anti-bacterial peptide cecropin B and its analogs, cecropins B-1 and B-2, on liposomes, bacteria, and cancer cells", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1336**, pp.171-179.
- [4] H.G. Boman (1994), "Cecropins: Antibacterial peptides from insects and pigs", *Phylogenetic Perspectives in Immunity: The Insect Host Defence Hoffmann*, pp.3-17.
- [5] P. Bulet, M. Charlet, C. Hetru (2003), "Innate Immunity, Humana Press", *Totowa*, pp.89-107.
- [6] P. Bulet, R. Stöcklin, L. Menin (2004), "Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates", *Immunological Reviews*, **198**, pp.169-184.
- [7] R.L. Plackett, J.P. Burman (1946), "The design of optimum multifactorial experiments", *Biometrika*, **33**, pp.305-325.
- [8] G. Box, D. Behnken (1960), "Some new three level designs for the study of quantitative variables", *Technometrics*, **2**, pp.455-475.
- [9] S.T.Ogunbanwo, A.I. Sanni, and A.A. Onilude (2003), "Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1", *African Journal of Biotechnology*, **2(8)**, pp.219-227.
- [10] U.K. Laemmli (1970), "Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, **227**, pp.680-685.
- [11] S. Juan, L.Z. Xin, B.X. Mei, L.F. Xia and H.X. Qing (2005), "Media optimization for the novel antimicrobial peptide by *Bacillus sp.* fmbj224", *Chinese Journal of Biotechnology*, **21(4)**, pp.609-614.
- [12] S.M.S. Monteiro, J.J. Clemente, M.J.T. Carrondo, A.E. Cunha (2014), "Enhanced spore production of *Bacillus subtilis* grown in a chemically defined medium", *Advances in Microbiology*, **4**, pp.444-454.
- [13] F.Y. Shi, Y.B. Zhu (2007), "Application of statistically-based experimental designs in medium optimization for spore production of *Bacillus subtilis* from distillery effluent", *BioControl*, **52**, pp.845-853.
- [14] Z.M. Chen, Q. Li, H.M. Liu, N. Yu, T.J. Xie, M.Y. Yang, P. Shen, X.D. Chen (2010), "Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**, pp.1353-1360.