(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) **2-0001788**

(51)[7] **C12N 15/01**

(13) **Y**

(21) 2-2015-00239
(22) 13.08.2015
(45) 27.08.2018 365
(43) 25.12.2015 333
(73) VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC, VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội
(72) Đỗ Thị Tuyên (VN), Lê Thanh Hoàng (VN)

(54) CHỦNG XẠ KHUẨN ĐỘT BIẾN ACTINOPLANES SP. EBL.VN1 CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ACARBOZA

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng xạ khuẩn đột biến Actinoplanes EBL.VN1 mang các đột biến ngẫu nhiên trong hệ gen được tạo ra khi xử lý bào tử chủng Actinoplanes sp. VN1 tự nhiên bằng chất đột biến N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG) ở nồng độ 200 µg kết hợp với chiếu UV ở bước sóng 254 nm trong 30 phút. Chủng này có hoạt tính sinh tổng hợp acarboza cao, đạt khoảng 10,9 g/lít dịch lên men.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến chủng xạ khuẩn đột biến *Actinoplanes* sp. EBL.VN1 sản xuất acarboza cao.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Acarboza là một hợp chất giả đường, được tìm thấy ở một số loài vi sinh vật đặc biệt là các loài thuộc chi Actinomyces. Ở niêm mạc ruột non, acarboza tác động bằng cách ức chế cạnh tranh α-glucosidaza, làm giảm quá trình phân giải hydrat cacbon (di-, oligo- và polysaccarit) thành monosacarit là dạng có thể hấp thụ được. Do đó, acarboza được sử dụng làm giảm nồng độ đường huyết sau ăn cho những bệnh nhân bị mắc bệnh đái tháo đường, không làm tăng insulin huyết, không gây kháng insulin, bảo toàn tế bào beta, giảm nồng độ HbA1c (glycohaemoglobin), triglyxerit và giảm các biến chứng do chứng đái tháo đường gây ra. Khả năng ức chế cạnh tranh của acarboza có được là nhờ vào cấu tạo phân tử của nó. Acarboza có cấu trúc và kích thước gần giống với một tetrasacarit, gồm bốn tiểu phần nhỏ cấu tạo nên. Bốn tiểu phần này nối với nhau bằng liên kết α–1,4 giống như trong phân tử đường. Do đó, acarboza có thể liên kết dễ dàng với α-glucosidaza, cạnh tranh trung tâm hoạt động của enzym với các oligosacarit. Khi ăn, tinh bột bị α-amylaza thủy phân thành các oligosacarit. Ở màng ruột non, α-glucosidaza tiếp tục thủy phân oligo-, tri- và disacarit thành glucoza và các monosacarit khác.

Acarboza liên kết trực tiếp với α-glucosidaza ở bề mặt niêm mạc ruột non. Những liên kết trên có thể kéo dài từ 4-6 giờ. Do đó, bệnh nhân mắc bệnh đái tháo đường tránh được hiện tượng tăng đường huyết sau khi ăn. Acarboza không có hoạt tính ức chế lactoza và do đó không gây ra hiện tượng không dung nạp lactoza trong cơ thể.

Ở Việt Nam, lĩnh vực nghiên cứu các chủng xạ khuẩn *Actinoplanes* sp. để sản xuất acarboza đang vẫn còn mới mẻ, đặc biệt là nghiên cứu các chủng đột biến có khả năng sinh tổng hợp acarboza cao. Quyền Đình Thi, và các đồng tác giả., 2012 đã nghiên cứu tạo chủng đột biến từ chủng *Actinoplanes* VTCC-A1779 nhằm làm tăng khả năng sinh tổng hợp acarboza. Từ 60 dòng đột biến, các tác giả đã chọn được 6 dòng sinh tổng hợp acarboza cao hơn chủng gốc và 6 dòng có hoạt tính ức chế α-glucosidaza trên 60%. Tuy nhiên, nhược điểm của quy trình đột biến này là phải sử dụng nồng độ NTG rất cao và các dòng đột biến thu được vẫn bị suy giảm về chất lượng sau ba lần cấy chuyển. Trên thế giới cũng đã có nghiên cứu về sản xuất acarboza, chẳng hạn tài liệu "Breeding of acarbose-producing strain and improvement of fermentation technology", 2008 đã đề cập đến việc tạo chủng đột biến từ chủng *Actinoplantes* sp. bằng chất gây đột biến NTG và chiếu xạ bằng tia UV nhằm tạo ra các đột biến trong hệ gen của chủng *Actinoplantes* sp.. Tuy nhiên, chủng đột biến thu được có năng suất tổng hợp acarboza thấp, chỉ đạt 3,13 g/lít dung dịch lên men. Nghiên cứu của Sun và cộng sự (2012) cũng đã đề cập đến chủng đột biến *A. utahensis* ZJB- 08196 có khả năng sinh tổng hợp acarboza cao khi bổ sung chất cảm ứng đắt tiền là hợp chất S-adenosylmethionin (SAM) vào môi trường nuôi cấy để làm tăng khả năng sinh tổng hợp acarboza. Điều này thường dẫn đến làm tăng giá thành của sản phẩm.

Do đó, vẫn có nhu cầu tìm kiếm các chủng xạ khuẩn đột biến mới có khả năng sản xuất acarboza cao mà không cần đến chất cảm ứng nhằm khắc phục các nhược điểm nêu trên.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích nhằm đề xuất chủng xạ khuẩn đột biến *Actinoplanes* sp. EBL.VN1 mang các đột biến ngẫu nhiên trong hệ gen được tạo ra khi xử lý bào tử chủng *Actinoplanes* sp. VN1 tự nhiên được phân lập tại mẫu đất ở Việt Nam bằng chất gây đột biến NTG ở nồng độ 200 µg kết hợp với chiếu UV ở bước sóng 254 nm sau 30 phút, chủng này có các đặc tính sau:

i) phát triển tối ưu trong môi trường lên men MT1 bao gồm các thành phần tính theo (g/lít): 30 glucoza; 50 maltoza; 15 bột ngô; 1,0 mononatri glutamat và các khoáng chất (2,0 $CaCl_2$; 2,5 $CaCO_3$; 1,0 $KH_2PO_4.3H_2O$) độ pH= 7, nuôi lắc ở điều kiện 28°C, 200 vòng/phút, trong thời gian 144 giờ; và

ii) có khả năng sinh tổng hợp acarboza cao đạt khoảng 10,9 g/lít dịch lên men.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. Hình ảnh khuẩn lạc của chủng *Actinoplanes* sp. VN1 (A) và chủng đột biến *Actinoplanes* EBL.VN1 (B).

Hình 2. Kết quả chạy TLC để xác định khả năng sinh tổng hợp acarboza của các dòng đột biến so với chủng gốc (1-15 là các dòng đột biến tương ứng ở các nồng độ C: Acarboza, W: chủng gốc *Actinoplanes* sp. VN1).

Hình 3. Khả năng ức chế α-gucosidase của 15 biến thể (từ số 1 đến số 15 và 01 chủng gốc *Actinoplanes* sp. VN1 (số 16).

Hình 4. Kết quả chạy TLC các mẫu acarboza được tổng hợp từ chủng đột biến *Actinoplanes* sp. EBL.VN1 trong các môi trường lên men (1: MT1, 2: MT2, 3: MT3, 4: MT4, 5: MT5).

Hình 5. Kết quả chạy TLC để xác định khả năng tổng hợp acarboza của chủng đột biến *Actinoplanes* sp. EBL.VN1 và chủng gốc *Actinoplanes* sp. VN1 tự nhiên.

Hình 6. Kết quả chạy HPLC để định lượng acarboza của chủng gốc và chủng đột biến *Actinoplanes* sp.EBL.VN1 ((a): chuẩn acarboza (Sigma); (b): chủng gốc; (c): chủng đột biến).

Hình 7. Hoạt tính ức chế α-glucosidaza từ chủng đột biến *Actinoplanes* sp. EBL.VN1 và chủng *Actinoplanes* sp. VN1 gốc tự nhiên.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng xạ khuẩn đột biến *Actinoplanes* sp. EBL.VN1 sinh tổng hợp acarboza cao mà không cần đến chất cảm ứng lên yếu tố điều khiển. Chủng này có khả năng sinh tổng hợp acarboza cao đạt khoảng 10,9 g/lít dịch lên men do mang các đột biến nucleotit ngẫu nhiên trong hệ gen khi xử lý bào tử của chủng *Actinoplanes* sp. VN1 gốc tự nhiên.

Hình thái của chủng *Actinoplanes* sp. EBL.VN1 có màu vàng đậm hơn so với chủng gốc tự nhiên *Actinoplanes* sp. VN1 (xem hình 1). Khả năng phục hồi sau bảo quản tương tự so với chủng gốc, tức là đều phải qua khâu hoạt hóa, chọn lọc và cấy truyền lại để đảm bảo chủng này không bị thoái hoá và phát triển tốt trên môi trường nhân giống và đặc biệt là môi trường lên men.

Chủng *Actinoplanes* sp. VN1 gốc được sử dụng trong giải pháp này là chủng tự nhiên được phân lập tại mẫu đất ở Việt Nam. Chủng *Actinoplanes sp.* VN1 hiện được lưu giữ trong môi trường thạch YSA ở nhiệt độ 25°C tại Phòng Công nghệ sinh học enzym - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Chất gây đột biến chủng *Actinoplanes sp.* VN1 là N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG). NTG làm biến đổi bazơ gây ra sự kết cặp sai. NTG sẽ alkyl hóa cả 4 loại bazơ nucleotit. Tuy nhiên, đột biến hầu như chỉ xảy ra khi nhóm alkyl được thêm vào ở oxy số 6 của guanin tạo ra O-6-alkylguanin. Sự alkyl hóa này dẫn đến sự kết cặp nhầm với thymin. Kết quả sinh ra đột biến đồng hoán G-X -> A-T trong lần sao chép tiếp theo. NTG là một tác nhân được cho là có hiệu quả gây đột biến cao nhất đối với vi sinh vật. Khoảng 90% các đột biến do NTG gây ra là các đột biến điểm, thay thế cặp GC thành cặp AT, một số rất ít các trường hợp dẫn đến dịch chuyển khung đọc hoặc mất đoạn.

Dưới tác động của tia cực tím (UV), các pyrimidin dime, và 6-4 pyrimidin-pyramidon được tạo thành và cả hai đều gây nên đột biến gen. Pyrimidin dime được tạo thành do liên kết đôi cộng hóa trị giữa hai bazơ pyrimidin (thymin và cytosin) cạnh nhau trong phân tử ADN. Còn 6,4 pyrimidin-pyramidon được tạo thành bằng liên kết đơn giữa hai nguyên tử cacbon trong vòng pyrimidin. Tiếp đó,

khi ADN nhân bản, cả hai sợi đều được sử dụng làm khuôn để tổng hợp sợi mới. Dime cytosin có thể kết hợp với adenin (thay vì guanin như bình thường) trong chuỗi tổng hợp mới. Đến lần tái bản ADN tiếp theo, CC sẽ bị đột biến thành TT.

Quá trình gây đột biến chủng xạ khuẩn *Actinoplanes* sp. VN1 được thực hiện như sau:

Chủng xạ khuẩn *Actinoplanes* sp. VN1 được nuôi cấy trên đĩa môi trường thạch YSA ở 28°C trong 5 ngày. Bào tử được thu lại vào ống eppendorf và hòa vào dung dịch 0,2% Tween-20 sao cho đạt mật độ 10^6-10^8 bào tử/ml. Dịch bào tử được ly tâm và thu cặn. Cặn bào tử được trộn với dung dịch NTG ở các nồng độ 50µg, 100µg, 150µg và 200µg. Mỗi nồng độ đều được xử lý trong 30, 60, 90 và 120 phút. Sau khi ủ, ly tâm ở tốc độ 12500 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, thu lấy cặn bào tử, tiếp tục rửa bằng dung dịch 0,2% Tween-20 lặp lại từ 4-6 lần. Cặn sau khi rửa được hòa vào 200 µl dung dịch 0,2% Tween-20. Bào tử sau khi xử lý với NTG sẽ được chiếu tia UV ở bước sóng 254nm ở các khoảng cách 10 cm, 20cm và 30cm trong thời gian 30, 60, 90 và 120 phút. 50µl dịch bào tử sau khi xử lý tia UV ở mỗi nồng độ NTG tương ứng từ 50µg, 100µg, 150µg và 200µg sẽ được dùng để cấy trải trên mỗi đĩa thạch. Các đĩa nuôi cấy được ủ ở nhiệt độ 28°C, sau 5 ngày đếm số khuẩn lạc mọc trên các đĩa thạch và tính tỷ lệ sống sót.

Quá trình sàng lọc chủng đột biến được thực hiện như sau:

Sau 5 ngày ủ ở nhiệt độ 28°C, chọn ngẫu nhiên 3-5 dòng khuẩn lạc được xử lý từ mỗi nồng độ NTG và chiếu tia UV để chuyển sang môi trường nhân giống CPC (g/l): 30 sucroza; 2 pepton; 1 muối natri casein; 0,5 KCl; 0,1 $FeSO_4.7H_2O$; 1 $K_2HPO_4.3H_2O$; pH=7 được khử trùng ở 121°C trong 30 phút và nuôi cấy lắc ở 25-28°C, 200 vòng/phút trong khoảng 48 giờ. Giống sau khi đã cấy nhân giống trong bình tam giác dung tích 250 ml, được soi kiểm tra mức độ đồng đều của tế bào và khẳng định mẫu là thuần khiết để tiến hành chuyển sang lên men trong thiết bị lên men dung tích 2,5lít. Chuyển 3% dịch nuôi cấy giống sang 1,0 lít môi trường lên

men MT1 gồm các thành phần tính theo g/lít: 30 glucoza; 50 maltoza; 15 bột ngô; 1,0 mononatri glutamat và các khoáng chất (2,0 $CaCl_2$; 2,5 $CaCO_3$; 1,0 $KH_2PO_4.3H_2O$) độ pH =7 và nuôi cấy lắc ở 28°C, 200 vòng/phút, thời gian 144 giờ. Sau 7 ngày nuôi cấy lắc, dịch nuôi cấy từ các dòng khuẩn lạc được kiểm tra lần lượt trên sắc ký bản mỏng (TLC), và sắc ký lỏng tính năng cao-HPLC để kiểm tra định tính và định lượng hàm lượng acarboza được tổng hợp của các biến thể và kiểm tra khả năng ức chế α-glucosidaza để từ đó tìm được biến thể có khả năng tổng hợp acarboza cao nhất.

Dịch nuôi cấy lên men của các biến thể được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút, loại bỏ cặn, và thu lấy phần dịch. Sau đó, tiếp tục ly tâm tốc độ cao ở 12500 vòng/phút trong 15 phút, loại bỏ cặn, thu lấy phần dịch. Dịch thu được được tủa bằng cồn 96° theo tỷ lệ thể tích 1:4. Sau 30 phút tủa bằng cồn, tiến hành ly tâm ở tốc độ 12500 vòng/phút trong 15 phút, loại tủa, thu được dịch chứa hoạt chất acarboza của các biến thể.

Để định tính hoạt chất acarboza có trong mẫu, sắc ký lớp mỏng TLC được thực hiện trên bản mỏng silica gel Merck 60 F254, dày 0,25mm, với hệ dung môi gồm 94% dung dịch A và 6% dung dịch B (trong đó dung dịch A bao gồm etyl axetat: metanol là 1:1 và dung dịch B là H_2O: axit formic là 5:2), sau đó hiện màu bằng axit 10% H_2SO_4 trong cồn ở 121°C trong 5 phút. Kết quả cho thấy trong 15 biến thể và 01 chủng gốc đều xuất hiện vạch ngang cùng với acarboza chuẩn của hãng Sigma (mã số A8980) (xem hình 2).

Để xác định hoạt tính ức chế α-glucosidaza, sử dụng đĩa 96 giếng. Hút vào mỗi giếng 40µl đệm 0,1M phosphat, độ pH =6,9, thêm 10µl dịch chứa hoạt chất acarboza của mỗi biến thể vào. Bổ sung tiếp 100µl α-glucosidaza 1 µ/ml được pha trong 0,1M phosphat pH 6,9 vào. Hỗn hợp được ủ ở 25°C trong 10 phút, lắc 300 vòng/phút, sau đó thêm 50µl dung dịch 5mM *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranosit trong 0,1M phosphat, độ pH= 6,9 vào. Trộn hỗn hợp và ủ ở 25°C trong 5 phút. Đo khả năng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 405 nm trước và sau khi ủ cơ chất. Giá trị

Δ là giá trị trung bình độ chênh lệch OD trước và sau khi ủ 5 phút. Kết quả cho thấy các biến thể số 4, số 11 và số 14 có hoạt tính ức chế α-glucosidaza cao nhất, cao hơn so với chủng gốc (số 16) (xem hình 3).

Để định lượng hàm lượng acarboza, dịch nuôi cấy lên men được kiểm tra bằng phương pháp sắc ký lỏng tính năng cao-HPLC. Các mẫu được phân tích bằng hệ thống HPLC với hệ dung môi axetonitril : nước theo tỷ lệ 3:1 (v/v), tốc độ dòng chảy 0,5 ml/phút, thời gian chạy 30 phút. Hàm lượng acarboza được xác định dựa trên sắc ký đồ HPLC của acarboza chuẩn tại nồng độ xác định.

Từ phương pháp đột biến và sàng lọc này, đã lựa chọn được chủng đột biến *Actinoplanes* sp. EBL.VN1 (số 14) sau khi được xử lý bằng chất gây đột biến NTG ở nồng độ 200 µg kết hợp với chiếu tia UV ở bước sóng 254 nm sau 30 phút có khả năng sinh tổng hợp acarboza cao nhất. Chủng này mang các đột biến ngẫu nhiên trong hệ gen làm tăng khả năng tổng hợp acarboza đạt khoảng 10,9 g/lít dịch lên men, gấp 3,7 lần so với chủng gốc tự nhiên, cũng như có hoạt tính ức chế enzym α-glucosidaza cao hơn 37,9% so với chủng gốc được phân lập tự nhiên.

Chủng đột biến *Actinoplanes* sp. EBL.VN1 vẫn duy trì được khả năng tổng hợp acarboza cao và ổn định sau khi bảo quản trong môi trường YS có bổ sung 30% glyxerol ở -85°C cũng như cấy truyền qua nhiều thế hệ (10-20 thế hệ).

Chủng đột biến *Actinoplanes* sp. EBL.VN1 hiện đang được lưu giữ tại Phòng Công nghệ Enzym-Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, ở nhiệt độ bảo quản -85°C, trong môi trường YS, có bổ sung 30% glycerol.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Các ví dụ dưới đây chỉ nhằm minh họa các phương án thực hiện giải pháp hữu ích mà không làm giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Ví dụ 1. Thử nghiệm về khả năng phát triển trong các môi trường lên men

Chủng *Actinoplanes* sp. EBL.VN1 thu được được thử nghiệm về khả năng sinh tổng hợp acarboza và ức chế enzym α-glucosidaza trong các môi trường lên men khác nhau MT1, MT2, MT3, MT4 và MT5.

Bảng 1. Các môi trường lên men được sử dụng

Môi trường	Thành phần môi trường (g/L)										% ức chế α-glucosidaza
	G	M	S	BN	BĐT	C	Glu	P	glycerol	khoáng	
MT1	30	50	-	15	-	-	1	-	-	+	84,8 ± 3,9
MT2	-	30	-	10	-	-	1	-	-	+	47,1 ± 2,5
MT3	-	-	30	-	-	0,1	-	0,2	-	+	0,0 ± 0,0
MT4	40	43	-	-	17	-	5	-	5	+	49 ± 4,1
MT5	30	50	-	-	17	-	5	-	5	+	53 ± 1,9

Ghi chú: -: không tham gia, +: có tham gia. G: Glucoza; M: maltoza; S: sucroza; C: casein; Glu: glutamat; P: pepton; MT: môi trường, BN: bột ngô, BĐT: bột đậu tương.

Sắc ký đồ TLC của hoạt chất acarboza trong các môi trường lên men khác nhau được thể hiện trên Hình 4. Các dịch nuôi trong môi trường MT1, MT2, MT4, MT5 đều xuất hiện băng ngang chuẩn acarboza (Sigma). Trong đó, môi trường MT2 có thành phần chứa maltoza và bột ngô, không có glucoza, băng acarboza xuất hiện mờ hơn môi trường MT1 (làn 2). Trong 5 môi trường nghiên cứu chỉ có môi trường MT3 với thành phần không có glucoza, maltoza và bột ngô hay bột đậu tương mà thay vào đó là sucrozơ, casein và pepton không sinh tổng hợp acarboza, dịch nuôi không có băng ngang chuẩn acarboza trên sắc ký đồ (làn 3).

Kết quả sinh tổng hợp acarboza của chủng *Actinoplanes* EBL.VN1 trong các môi trường lên men còn được khẳng định bởi hoạt tính ức chế α-glucosidaza của hoạt chất acarboza. Từ kết quả nêu trong bảng 1 cho thấy, môi trường MT1 phù hợp cho quá trình sinh trưởng của chủng sinh tổng hợp acarboza cao, và có hoạt tính ức chế α-glucosidaza mạnh. Môi trường này có hiệu quả về kinh tế bởi nguồn nguyên liệu rẻ tiền và dễ kiếm. Do đó, môi trường MT1 được lựa chọn để phát triển tối ưu chủng *Actinoplanes* EBL.VN1 sinh tổng hợp acarboza.

Ví dụ 2: Đánh giá khả năng tổng hợp acarboza và hoạt tính ức chế α-glucosidaza của acarboza từ chủng đột biến *Actinoplanes* EBL.VN1

Khả năng tổng hợp acarboza của chủng *Actinoplanes* EBL.VN1, có thể được xác định bằng cách chạy điện di trên sắc ký bản mỏng TLC cùng với acarboza chuẩn hoặc xác định hoạt tính ức chế α-glucosidaza cũng như xác định hàm lượng acarboza bằng HPLC có sử dụng acarboza chuẩn của Sigma.

(i) Định tính acarboza trên sắc ký bản mỏng TLC

Một khuẩn lạc chủng đột biến *Actinoplanes* EBL.VN1 và một khuẩn lạc chủng *Actinoplanes* sp. VN1 gốc được nuôi cấy trong môi trường nhân giống CPC (g/l): 30 sucroza; 2 pepton; 1 muối natri casein; 0,5 KCl; 0,1 $FeSO_4.7H_2O$; 1 $K_2HPO_4.3H_2O$; pH=7 được khử trùng ở 121°C trong 30 phút và nuôi cấy lắc ở 25-28°C, 200 vòng/phút trong khoảng 48 giờ. Giống sau khi đã cấy nhân giống trong bình tam giác dung tích 250 ml, được soi kiểm tra mức độ đồng đều của tế bào và khẳng định mẫu là thuần khiết để tiến hành chuyển sang lên men trong thiết bị lên men dung tích 2,5 lít.

Chuyển lần lượt 30 ml dịch nuôi cấy chủng đột biến *Actinoplanes* EBL.VN1 và 30 ml dịch nuôi cấy chủng *Actinoplanes* sp. VN1 gốc làm đối chứng vào trong 1 lít môi trường lên men MT1 tối ưu gồm các thành phần (g/l): 30 glucoza; 50 maltoza; 15 bột ngô; 1,0 mononatri glutamat và các khoáng chất (2,0 $CaCl_2$; 2,5 $CaCO_3$; 1,0 $KH_2PO_4.3H_2O$) độ pH=7 và nuôi cấy lắc ở điều kiện 28°C, ở tốc độ 200 vòng/phút, trong thời gian 144 giờ.

Sau 7 ngày nuôi cấy lắc, toàn bộ dịch nuôi cấy lên men của chủng đột biến và chủng gốc được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút, loại bỏ cặn, và thu phần dịch trên. Sau đó, tiếp tục ly tâm tốc độ cao ở 12500 vòng/phút trong 15 phút, loại bỏ cặn, và thu lấy phần dịch trên. 1 lít dịch thu được được tủa bằng 4 lít cồn 96°. Sau 30 phút, tủa cồn bằng cách ly tâm ở tốc độ 12500 vòng/phút trong 15 phút, loại tủa, thu dịch chứa hoạt chất acarboza và kiểm tra trên sắc ký lớp mỏng TLC cùng với acarboza chuẩn của hãng Sigma (mã số A8980). Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng silica gel Merck 60 F254, dày 0,25 mm, với hệ dung môi gồm 94% dung dịch A và 6% dung dịch B (trong đó dung dịch A bao gồm etyl

axetat: metanol =1:1 và dung dịch B là H_2O: axit formic = 5:2), sau đó hiện màu bằng axit (10% H_2SO_4 trong cồn) ở 121°C trong 5 phút. Kết quả định tính acarboza được thể hiện trên hình 5 cho thấy băng acarboza từ dịch lên men chủng đột biến *Actinoplanes* EBL.VN1 hiện màu tương ứng với băng acarboza từ chủng *Actinoplanes* sp. VN1 gốc và acarboza chuẩn đã biết trước hàm lượng.

(ii) Định lượng acarboza bằng phương pháp sắc ký lỏng tính năng cao (HPLC)

Tiến hành nuôi cấy nhân giống và lên men chủng đột biến *Actinoplanes* EBL.VN1 và chủng *Actinoplanes* sp. VN1 gốc tương tự như nêu trong mục i) nêu trên.

Sau 7 ngày nuôi cấy lắc, toàn bộ dịch nuôi cấy lên men của chủng đột biến *Actinoplanes* EBL.VN1 và chủng *Actinoplanes* sp. VN1 gốc được đem phân tích bằng phương pháp sắc ký lỏng tính năng cao (HPLC). 1 lít dịch thu được được tủa bằng 4 lít cồn 96°. Sau 30 phút, tủa cồn bằng cách ly tâm ở tốc độ 12500 vòng/phút trong 15 phút, loại tủa, thu dịch chứa hoạt chất acarboza. Dịch chứa hoạt chất acarboza được cô quay bằng máy cất quay chân không thu được 10 ml dịch cô đặc. Hút 10 µl dịch cô đặc chứa acarboza hòa tan trong 990 µl nước, thu được dung dịch A. 200µl dung dịch A được hòa trong 800 µl MeOH, thu được 1000 µl dịch B. Hút 10 µl dung dịch B vào hệ thống HPLC để tiến hành định lượng. Các mẫu dịch lên men được phân tích bằng hệ thống HPLC với hệ dung môi axetonitril: nước theo tỷ lệ 3:1 (v/v), tốc độ dòng chảy 0,5 ml/phút, thời gian chạy 30 phút. Hàm lượng acarboza được xác định dựa trên sắc ký đồ HPLC của chuẩn acarboza tại nồng độ xác định. Kết quả cho thấy mẫu acarboza của chủng gốc chỉ đạt 2,91 g/l, trong khi đó mẫu acarboza của chủng đột biến EBL.VN1 đạt 10,9 g/l (xem hình 6).

(iii) Đánh giá khả năng tổng hợp acarboza thông qua hoạt tính ức chế α-glucosidaza

Acarboza là chất ức chế α-glucosidaza, α-amylaza, làm chậm tốc độ thủy phân tinh bột để tạo glucoza. Acarboza là hợp chất hữu cơ giả đường hoạt động như một chất ức chế cạnh tranh α-glucosidaza. Do đó việc xác định hoạt tính ức chế α-glucosidaza của các hoạt chất acarboza là phương pháp hiệu quả để đánh giá khả năng sinh tổng hợp acarboza.

Để xác định hoạt tính ức chế α- glucosidaza, sử dụng đĩa 96 giếng. Hút vào mỗi giếng 40µl đệm 0,1 M phosphat, độ pH= 6,9. Thêm 10 µl dịch chứa hoạt chất acarboza của chủng đột biến *Actinoplanes* EBL.VN1 và chủng *Actinoplanes* sp. VN1 gốc vào. Bổ sung 100µl α-glucosidaza 1µ/ml được pha trong 0,1 M phosphat, độ pH= 6,9. Hỗn hợp được ủ ở 25°C trong 10 phút, lắc ở tốc độ 300 vòng/phút; sau đó thêm 50 µl dung dịch 5 mM *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranosit trong 0,1 M phosphat, độ pH= 6,9. Trộn hỗn hợp và ủ ở 25°C trong 5 phút. Đo khả năng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 405 nm trước và sau khi ủ cơ chất. Giá trị Δ là giá trị trung bình độ chênh lệch OD trước và sau khi ủ 5 phút. Kết quả về hoạt tính ức chế α- glucosidaza được thể hiện trong bảng 2 dưới đây (xem hình 7).

Bảng 2. Khả năng sinh tổng hợp acarboza và hoạt tính ức chế α- glucosidaza của acarboza từ chủng đột biến và chủng gốc tự nhiên

Các mẫu thí nghiệm	% ức chế α-glucosidaza	Hàm lượng acarboza (g/l) (HPLC)
chủng *Actinoplanes* sp. VN1 gốc	46,9±0,37	2,91
chủng đột biến *Actinoplanes* EBL.VN1	84,8±3,9	10,9

Kết quả trong Bảng 2 cho thấy hàm lượng acarboza khi định lượng bằng HPLC ở chủng đột biến đạt 10,9 g/L cao gấp 3,7 lần so với chủng gốc (2,91 g/lít). Hoạt tính ức chế α- glucosidaza của chủng đột biến tăng hơn 37,9% so với chủng gốc tự nhiên.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Chủng đột biến *Actinoplanes* EBL.VN1 thu được theo giải pháp hữu ích có khả năng sinh tổng hợp acarboza cao, đạt khoảng 10,9 g/lít dịch lên men, cao hơn hẳn so với khả năng sinh tổng hợp acarboza từ các chủng đột biến *A. utahensis* ZJB-08196 chỉ đạt 6,606 g/lít (Xue, *et al.*, 2013), *Actinoplanes* sp. A56 chỉ đạt 5,0 g/lít (Li, *et al.*, 2012). Do đó, chủng này rất hữu ích làm nguồn nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm sản xuất acarboza cho mục đích chữa bệnh.

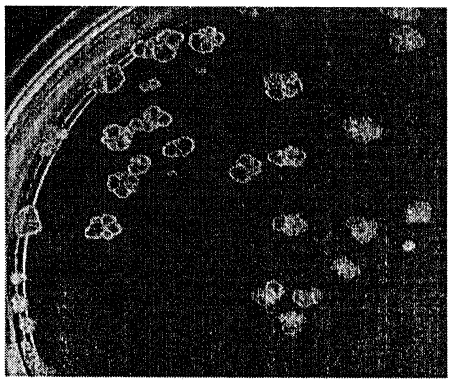
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng xạ khuẩn đột biến *Actinoplanes* sp. EBL.VN1 mang các đột biến ngẫu nhiên trong hệ gen được tạo ra khi xử lý bào tử chủng *Actinoplanes* sp. VN1 tự nhiên được phân lập tại mẫu đất ở Việt Nam bằng chất gây đột biến NTG ở nồng độ 200 µg kết hợp với chiếu UV ở bước sóng 254 nm sau 30 phút, chủng này có các đặc tính sau:

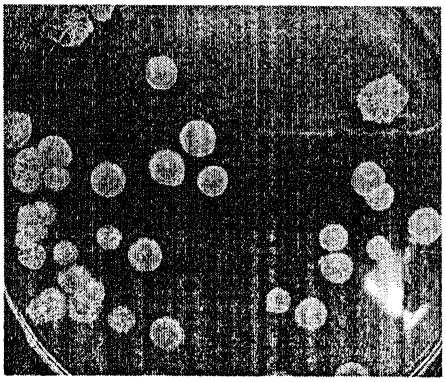
i) phát triển tối ưu trong môi trường lên men MT1 bao gồm các thành phần tính theo (g/lít): 30 glucoza; 50 maltoza; 15 bột ngô; 1,0 mononatri glutamat và các khoáng chất (2,0 $CaCl_2$; 2,5 $CaCO_3$; 1,0 $KH_2PO_4.3H_2O$) độ pH= 7, nuôi lắc ở điều kiện 28°C, 200 vòng/phút, trong thời gian 144 giờ; và

ii) có khả năng sinh tổng hợp acarboza cao đạt khoảng 10,9 g/lít dịch lên men.

Hình 1.

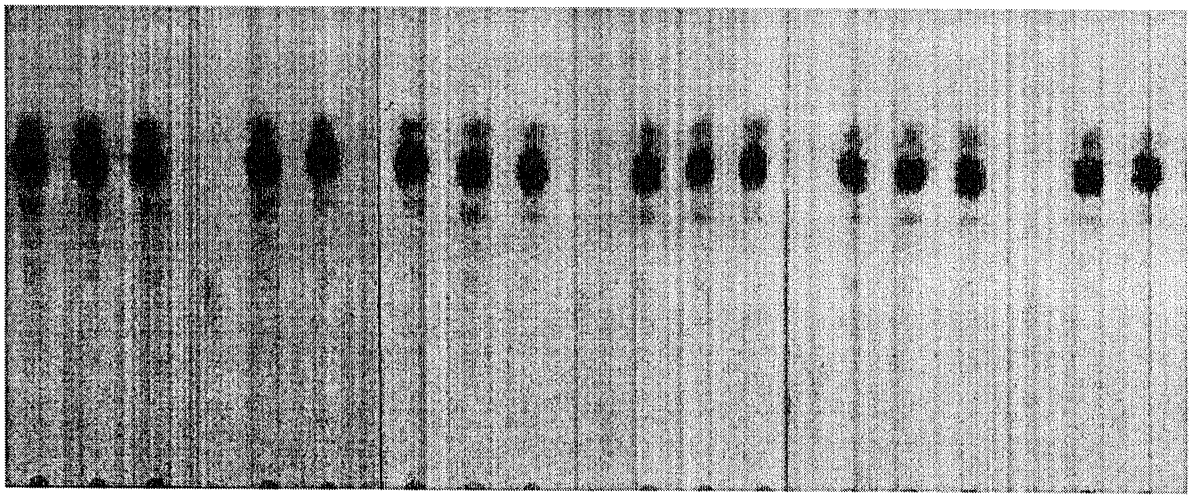


A

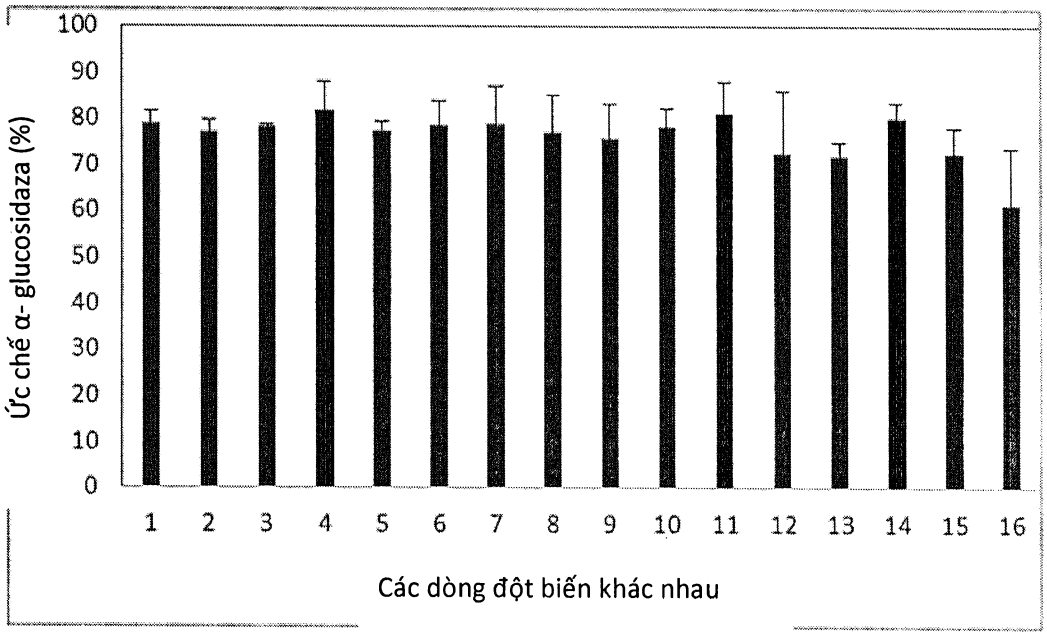


B

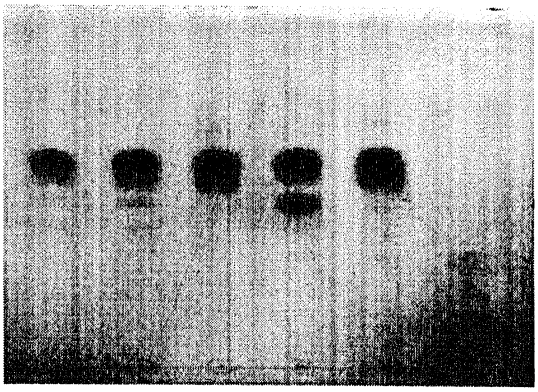
Hình 2.



Hình 3.



Hình 4.

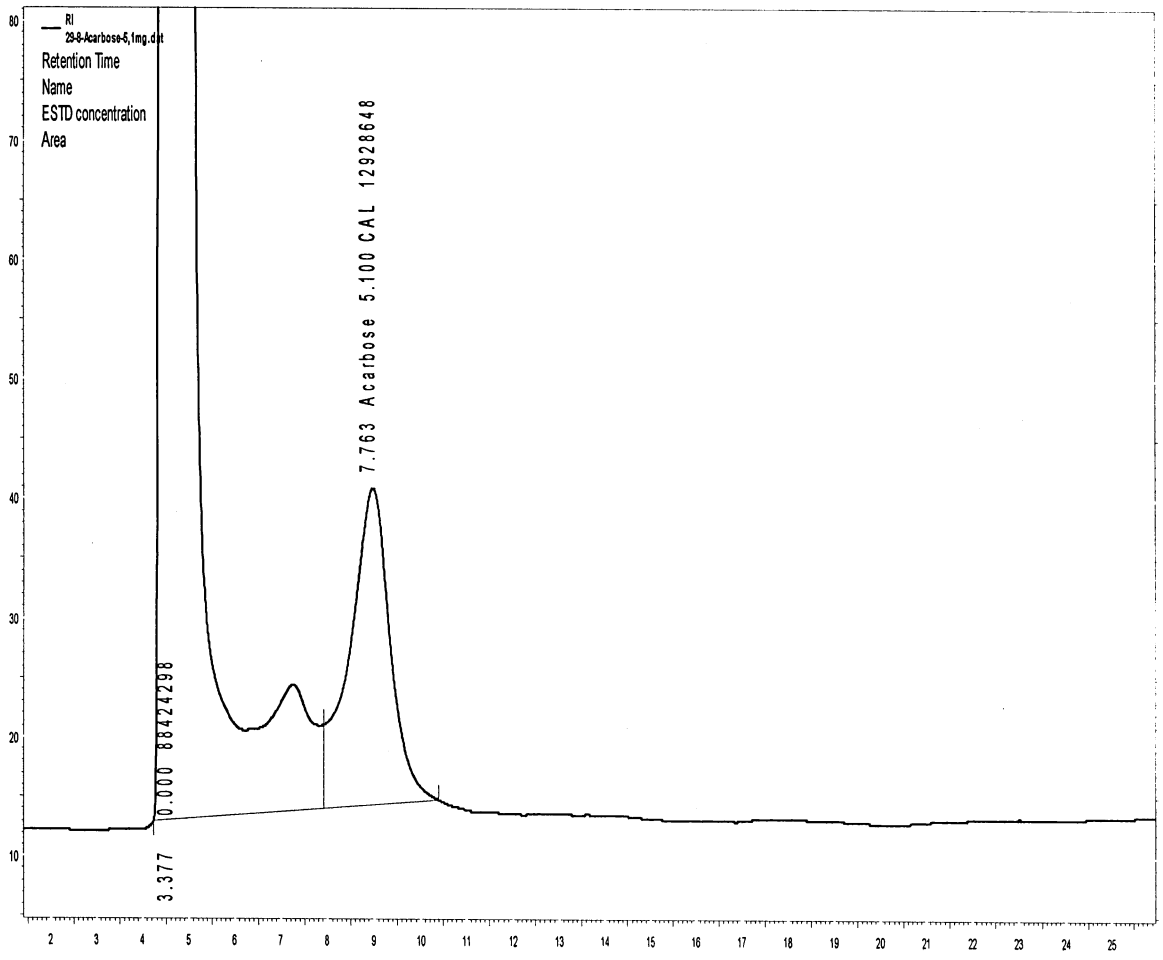


MT1 MT2 MT3 MT4 MT5 C

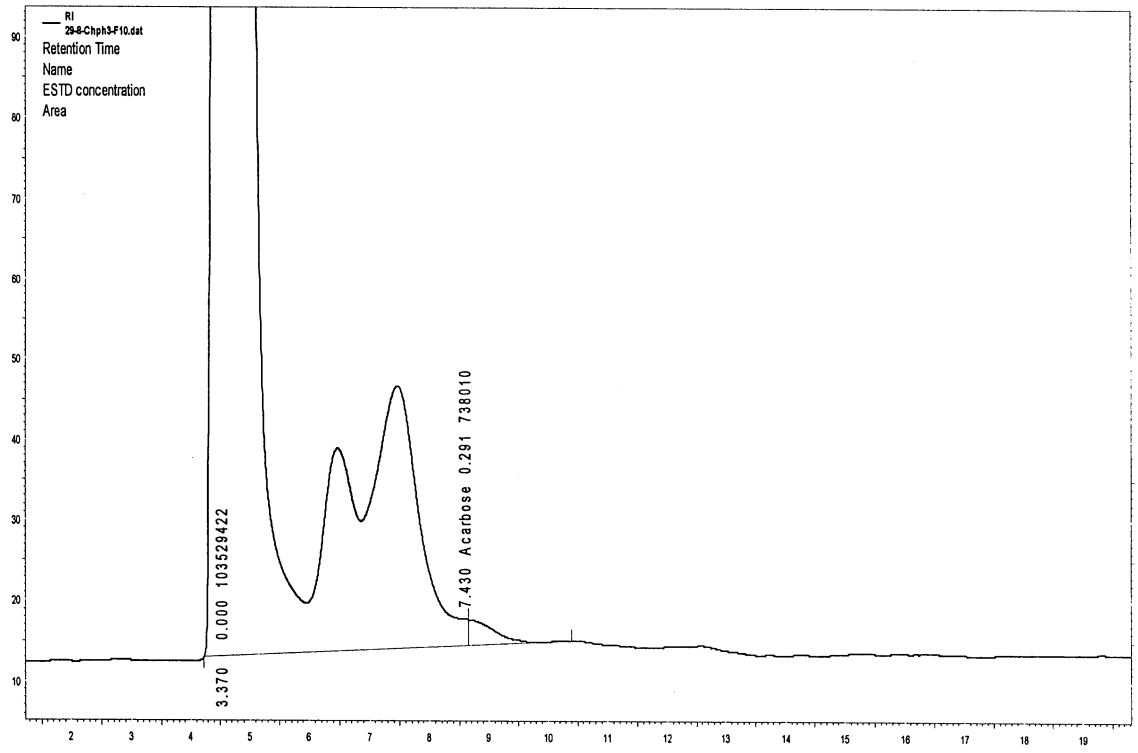
Hình 5

ĐC C EBL.VN1

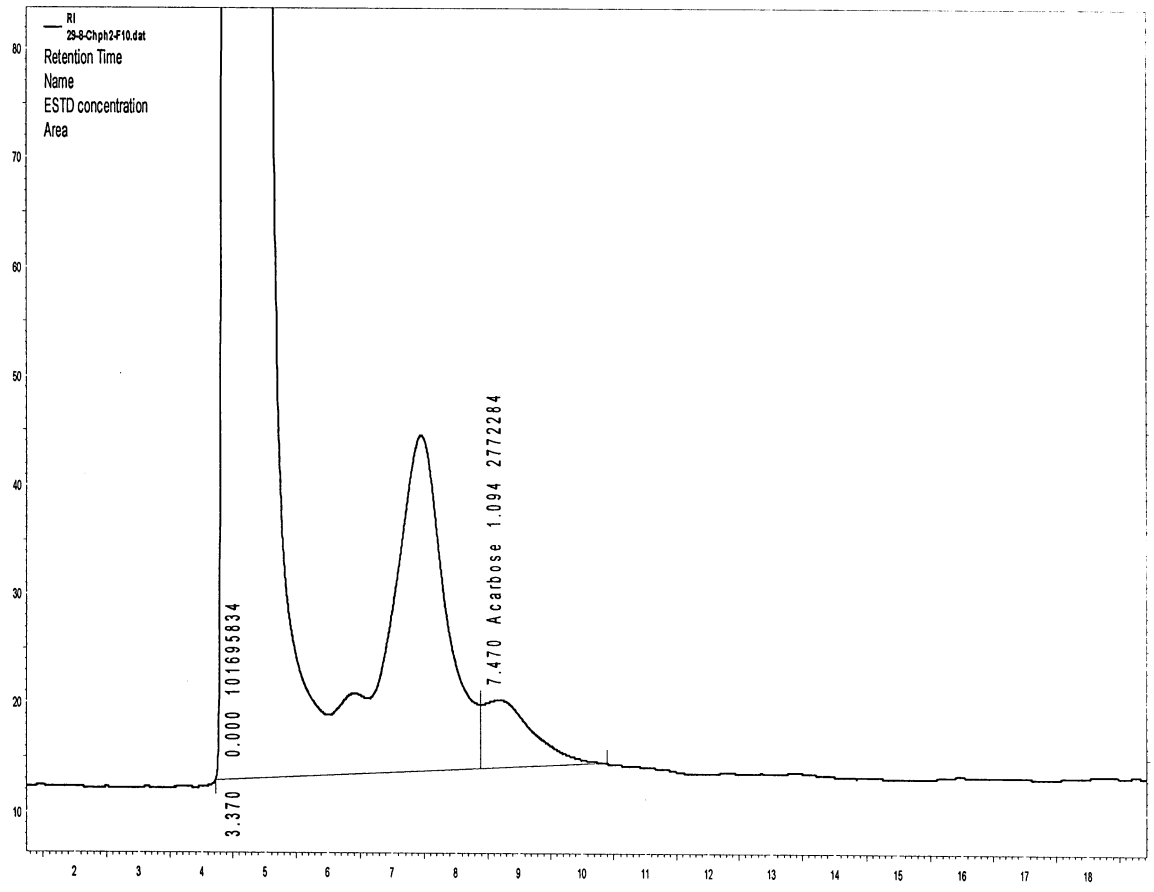
Hình 6.



a)

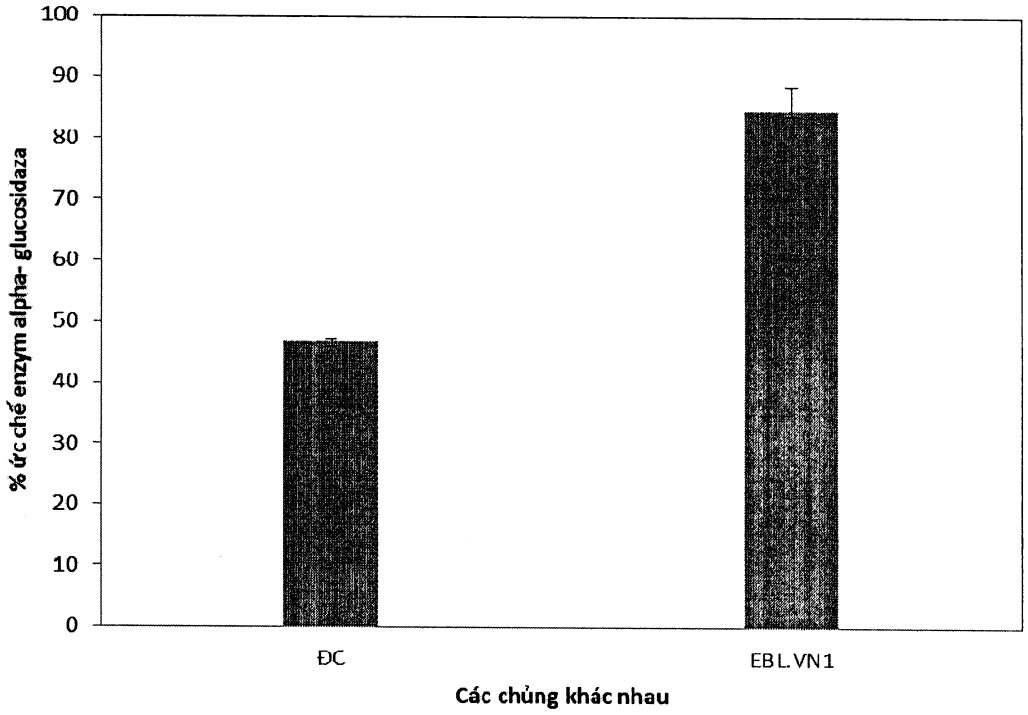

RI
29-8-Chph3-F10.dat
Retention Time
Name
ESTD concentration
Area
0.000 103529422
3.370
7.430 Acarbose 0.291 738010

b)


RI
29-8-Chph2-F10.dat
Retention Time
Name
ESTD concentration
Area
0.000 101695834
3.370
7.470 Acarbose 1.094 2772284

c)

Hình 7.


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% ức chế enzym alpha- glucosidaza
ĐC
EBL.VN1
Các chủng khác nhau