

NGHIÊN CỨU LÊN MEN SINH TỔNG HỢP KHÁNG SINH NHỜ *STREPTOMYCES 15.29 - STREPTOMYCES MICROFLAVUS*

CAO VĂN THU, BÙI VIỆT HÀ, QUÁCH THỊ LÊ HÀ, NGUYỄN HỒNG HẠNH,
NGUYỄN THỊ THÚY HIỀN, PHAN VĂN KIÊM, VÕ THỊ LINH, VŨ NGUYỄN THÀNH,
VÕ THỊ THU THỦY

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Streptomyces là chi xạ khuẩn gồm nhiều loài có khả năng sinh tổng hợp kháng sinh đa dạng về cấu trúc và đặc tính kháng sinh, một số loài trong chi này còn có khả năng sinh tổng hợp các kháng sinh chữa ung thư và điều trị HIV/AIDS.

Trong số các *Streptomyces* mà chúng tôi phân lập được từ cơ chất Việt Nam có *Streptomyces 15.29* là chủng xạ khuẩn có độ ổn định di truyền học tốt, có khả năng sinh tổng hợp kháng sinh phổ rộng và có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực phòng bệnh và chữa bệnh. Bài báo này giới thiệu những kết quả nghiên cứu về chủng *Streptomyces 15.29* bao gồm nghiên cứu các đặc điểm hình thái và sinh lí, giải trình tự gen 16s rADN nhằm phân loại, xác định tên khoa học, nghiên cứu cải tạo giống tăng cường hiệu suất tổng hợp kháng sinh bằng sàng lọc và đột biến sử dụng ánh sáng UV và quá trình lên men chìm trên máy lắc cũng như trong bình lên men 5 L và 500 L, nghiên cứu chiết xuất, tinh chế xác định cấu trúc hóa học của kháng sinh và một số kết quả về phổ tác dụng của kháng sinh.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Chủng *Streptomyces 15.29* được phân lập từ cơ chất Việt Nam tại phòng thí nghiệm Vi sinh vật học, Bộ môn Vi sinh và Sinh học, trường Đại học Dược Hà Nội.

Giống vi sinh vật kiểm định bao gồm 5 vi khuẩn Gram- và 5 vi khuẩn Gram +.

Bẫy môi trường nuôi cấy xạ khuẩn đã được sử dụng bao gồm MT1, MT2, MT3, MT4, MT5, MT6, và MT7 và các biến thiên bỏ thạch (có thể được bổ sung thêm 0,5% tinh bột sắn) từ đây làm các môi trường lên men.

Các môi trường phân loại theo ISP đã được sử dụng từ ISP1 đến ISP9. **Các nguồn đường** để phân loại *Streptomyces* bao gồm: D-Glucose, L-arabinose, D-Xylose, Inositol, D-mannitol, Rhamnose, Raffinose, Saccarose và D-fructose.

Môi trường để nuôi cấy vi sinh vật kiểm định bao gồm môi trường *canh thang*, *thạch thường*, *Sabouraud*.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phân loại *Streptomyces* theo ISP và phân loại nhờ giải trình tự gen 16s rADN được áp dụng để phân loại *Streptomyces 15.29*. Cải tạo và chọn giống *Streptomyces 15.29*

ứng dụng phương pháp sàng lọc ngẫu nhiên và đột biến sử dụng ánh sáng UV 254 nm kết hợp với sàng lọc ngẫu nhiên sau đột biến. Đánh giá hoạt tính kháng sinh được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán sử dụng khối thạch, giếng thạch hoặc khoanh giấy lọc. Phương pháp lên men mẻ trên máy lắc Taitec BR 300 LF, lên men trong bình lên men 5 L và 500 L được áp dụng để nghiên cứu tổng hợp kháng sinh của *Streptomyces* 15.29 trong các môi trường dịch thể. Phương pháp chiết kháng sinh từ dịch lọc bằng ethyl acetat ở pH 5,0 được áp dụng để chiết xuất kháng sinh. Phương pháp sắc kí lớp mỏng được sử dụng để khảo sát các thành phần của kháng sinh. Phương pháp sắc kí cột với chất hấp phụ là silica gel, ôxyt nhôm, Sephadex G10, YMC được sử dụng để tinh chế kháng sinh. Bước đầu khảo sát tác dụng của kháng sinh tinh khiết đối với một số vi sinh vật kiểm định và sơ bộ xác định MIC.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả phân loại theo ISP và giải trình tự gen 16s rADN

Streptomyces 15.29 được nuôi cấy trên các môi trường ISP đặc chủng để phân loại, các đặc trưng phân loại của nó có thể trình bày được như sau: Khuẩn ty khí sinh có màu vàng trắng (WY), tạo sắc tố melanoid – không tạo (0), màu khuẩn ty cơ chất – không có (0), sắc tố hoà tan – có (1), dạng chuỗi bào tử – thẳng hơi cong (RF), bề mặt bào tử – nhẵn (Sm), tiêu thụ arabinose – có (+), tiêu thụ xylose – có (+), tiêu thụ inositol – không (-), tiêu thụ manitol – có (+), tiêu thụ fructose – có (+), tiêu thụ rhamnose – không (-), tiêu thụ sacarose – không (-), tiêu thụ raffinose – không (-). Tóm tắt các đặc trưng phân loại của *Streptomyces* 15.29 đồng thời có kết hợp so sánh với các đặc điểm phân loại của *Streptomyces sinensis* được giới thiệu tiếp theo:

<i>Streptomyces</i> 15.29	WY 0 0 1 RF Sm + + - + + - -
<i>Streptomyces sinensis</i>	WY 0 0 0 RF Sm + + - + + - -

Các đặc trưng phân loại của *Streptomyces* 15.29 cơ bản giống với các đặc điểm của *Streptomyces sinensis* (92,86% trùng khớp), như vậy sơ bộ có thể lập luận *Streptomyces* 15.29 có thể có tên là *Streptomyces sinensis*.

Tuy nhiên khi giải trình tự gen 16s rADN ứng dụng PCR fingerprinting sử dụng môi MST1 của *Streptomyces* 15.29 cho thấy chủng có tính di truyền độc lập. Gen mố hóa 16SrADN được khuếch đại, rồi giải trình tự. Kết quả thu được gen mố hóa 16SrADN của *Streptomyces* 15.29 như sau:

```
CCACCTTCGACAGCTCCCTCCCACAAGGGGTTGGGCCACCGCTTCGGGTGTTACCG
ACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGC
AATGCTGATCTGCGATTACTAGCAACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCC
AATCCGAAGTGAACCGGCTTTTGTAGATTTCGCTCCGCCTCGCGGCATCGCAGCTCA
TTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGACTT
GACGTCGTCCCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCTGTGAGTCCCCATC
ACCCCGAAGGGCATGCTGGCAACACAGAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA
ACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTATACCGACC
ACAAGGGGGGACCATCTCTGATGCTTTCGGGTATATGTCAAGCCTTGGAAGGTTTC
TTCGCGTTGCGTGAATTAAGCCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAAT
TCCTTTGAGTTTTAGCCTTTCGGCCGTAATCCCAGGCGGGGAACCTTAATGCGTTAG
CTGCGGCACCGACGACGTGGAATGTGCCAACACCTAGTTCCCAACGTTTACGGCG
TGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCA
GTAATGGCCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTT
```

CACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCACACTCTAGCTAGCCCCGTATCGA
 ATGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACATCCGACGTGACAAGCCGCCTAC
 GAGCTCTTTACGCC

Gien này hoàn toàn trùng với gien của: *Streptomyces microflavus* FJ481633 920/920 (100%),

Streptomyces badius FJ486454 920/920 (100%), *Streptomyces argenteolus* FJ486449 920/920 (100%) trong ngân hàng gien.

Như vậy *Streptomyces 15.29* có thể xếp vào loài *Streptomyces microflavus*. Lưu ý rằng *Streptomyces microflavus*, *Streptomyces badius*, *Streptomyces argenteolus* là những loài cần quan tâm vì có họ hàng gần hoặc là synonym. Kết quả này khác so với phân loại theo ISP, nhưng có độ chính xác cao hơn, nên tin cậy hơn (độ trùng khớp gien 100%).

Đã tiến hành cải tạo giống qua sàng lọc ngẫu nhiên kết hợp với đột biến 2 lần bằng ánh sáng UV và sàng lọc ngẫu nhiên sau đột biến cho các kết quả chính được giới thiệu trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả cải tạo giống chính và các biến chủng được chọn
 (\bar{D} - đường kính vòng vô khuẩn, s - độ lệch thực nghiệm chuẩn có hiệu chỉnh,
 SLNN- sàng lọc ngẫu nhiên, ĐB1, ĐB2- đột biến 1, đột biến 2)

Biến chủng	<i>P. mirabilis</i>		<i>S. aureus</i>	
	\bar{D} (mm);s	% biến đổi hoạt tính	\bar{D} (mm);s	% biến đổi hoạt tính
SLNN 21.26	19,34; 0,43	-	23,96; 0,26	-
SLNN 21.18	18,94; 0,25	-	23,74; 0,53	-
SLNN 21.23	18,91; 0,38	-	23,13; 1,54	-
ĐB1 26.5	20,82; 0,84	108,04	24,05; 0,45	104,16
ĐB1 26.12	20,41; 0,62	105,92	23,63; 0,27	102,34
ĐB1 26.3	20,02; 0,64	103,89	23,31; 0,75	100,95
ĐB2 5.3	20,19; 0,44	103,61	23,33; 0,34	103,29
ĐB2 5.10	20,61; 0,34	105,73	24,08; 0,54	106,60
ĐB2 5.21	20,71; 0,28	106,24	24,20; 0,62	107,13

Tiến hành lên men gián đoạn trên máy lắc các biến chủng đã lựa chọn để chọn chủng tốt nhất cho lên men chìm. Kết quả giới thiệu ở bảng 2.

Biến chủng *Streptomyces 15.29.21.23* có kết quả lên men tốt và ổn định nên được chọn là biến chủng chính cho các nghiên cứu tiếp theo.

Đã tiến hành lên men trong bình lên men 5 l quy mô thí nghiệm. Kết quả được giới thiệu ở bảng 3 với các tham số: cấp khí 0,3 VVM, nhiệt độ 28°C, pH 7,0.

Bảng 2. Kết quả lên men chọn biến chủng lên men tốt nhất
(\bar{D} - đường kính vòng vô khuẩn, s - độ lệch thực nghiệm chuẩn có hiệu chỉnh)

Biến chủng	<i>P. mirabilis</i>		<i>S. aureus</i>	
	\bar{D} (mm)	s	\bar{D} (mm)	s
SLNN 21.26	19,29	0,71	23,87	0,83
SLNN 21.18	20,75	0,76	24,68	0,80
SLNN 21.23	19,83	0,91	24,18	0,34
ĐB1 26.5	19,26	0,42	24,07	0,57
ĐB1 26.12	18,59	0,53	23,74	0,36
ĐB1 26.3	18,18	0,17	19,65	0,51
ĐB2 5.3	18,45	0,48	22,40	0,76
ĐB2 5.10	19,35	0,83	23,22	1,02
ĐB2 5.21	17,38	0,86	20,42	0,64

Bảng 3. Kết quả lên men biến chủng *Streptomyces* 15.29.21.23 trong bình lên men 5 lít
(\bar{D} - đường kính vòng vô khuẩn, s - độ lệch thực nghiệm chuẩn có hiệu chỉnh)

Thời gian (giờ)	<i>P. mirabilis</i>		<i>S. aureus</i>	
	\bar{D} (mm)	s	\bar{D} (mm)	s
0	0	0	0	0
24	12,19	0,68	13,90	1,36
48	12,04	0,64	13,00	1,73
72	13,16	0,81	14,16	1,75
96	15,03	1,29	16,09	1,01
120	16,35	0,79	17,39	0,43

Sau khi lên men ở bình 5 lít, khả năng tổng hợp kháng sinh của chủng *Streptomyces* 15.29.21.23 là khá tốt, tuy nhiên vẫn thấp hơn so với lên men trên máy lắc. Kết quả này là cơ sở để tiến hành lên men bán công nghiệp chủng *Streptomyces* 15.29.21.23 quy mô 500 lít.

Đã tiến hành lên men *Streptomyces* 15.29.21.23 trong bình lên men 500 L quy mô Pilot với các tham số: cấp khí 0,3 VVM, nhiệt độ 28°C, pH 7,0 trong thời gian 120 giờ. Các kết quả thu được hoàn toàn tương đương với lên men quy mô 5 lít, đặt cơ sở tốt cho nghiên cứu nâng cấp, mở rộng quy mô tiếp theo.

Khi kết thúc lên men, dịch lên men được lọc thu dịch lọc. Dịch lọc được chiết xuất bằng các dung môi khác nhau, kết quả chính được giới thiệu trong bảng 4 với *S. aureus* là vi sinh vật kiểm định.

Bảng 4. Kết quả chiết dịch lọc *Streptomyces 15.29.21.23*
(\bar{D} - đường kính vòng vô khuẩn, s - độ lệch thực nghiệm chuẩn có hiệu chỉnh)

pH	Đường kính vòng vô khuẩn (mm), <i>S. aureus</i>			
	Ethylacetat		n-Butanol	
	Pha nước	Pha hữu cơ	Pha nước	Pha hữu cơ
3	6,22	30,37	6,52	28,28
5	0,00	32,67	6,02	31,67
7	0,00	29,27	6,00	28,82
9	6,36	26,25	6,68	26,44
11	6,72	20,83	6,92	28,60

Dịch ethylacetat tại pH 5 cho kết quả chiết tốt nhất, do đó này được chọn làm dung môi chiết đối với kháng sinh đang nghiên cứu.

Dịch chiết hữu cơ kháng sinh được sắc kí lớp mỏng để nghiên cứu thành phần hỗn hợp kháng sinh sử dụng các hệ dung môi tiếp theo:

Hệ 1: Metanol: Chloroform: amoni hydroxyt 25% (2 : 2 : 1);

Hệ 2: n-Butanol : Ethanol : Dimethylformamid (3 : 1 : 1);

Hệ 3: Butylacetat : Acetone : Triethylamin (1 : 2 : 1);

Hệ 3.1: Butylacetat : Acetone : Triethylamin (2 : 2 : 1).

Kết quả được trình bày trong bảng 5, hiện hình bằng *S. aureus*.

Bảng 5. Kết quả sắc kí lớp mỏng hỗn hợp kháng sinh với các dung môi chạy độc lập

Hệ dung môi	Rf		
	Vết 1	Vết 2	Vết 3
Hệ 1	0,95	-	-
Hệ 2	0,82	-	-
Hệ 3	0,88	0,67	0,00
Hệ 3.1	0,84	0,66	0,00

Dịch chiết ethylacetat kháng sinh được loại dung môi thu được hỗn hợp kháng sinh thô. Hỗn hợp kháng sinh được tinh chế bằng sắc kí cột silica gel sử dụng hệ dung môi rửa rải là hệ 3.3 cải biến (Ethylacetat : Acetone : Triethylamin (4 : 2 : 1)) và (Ethylacetat : Acetone : Triethylamin : Methanol (4 : 2 : 1 : 2)), thu được 4 kháng sinh thành phần trong 50 phân đoạn sắc kí. Thành phần kháng sinh chính (H = 51%, Rf = 0,78 trong hệ dung môi 3.3 (Butylacetat : Acetone : Triethylamin (4 : 2 : 1)) được tinh chế tiếp tục bằng sắc kí cột ôxyt nhôm hoạt hóa sử dụng hệ dung môi rửa rải là hệ 3.2 cải biến (Ethylacetat : Acetone : Triethylamin (3 : 2 : 1)) và

(Ethylacetat : Acetone : Triethylamin : Methanol (3 : 2 : 1 : 2)), thu được 2 thành phần kháng sinh. Thành phần kháng sinh chính (H = 66%, Rf = 0,78 trong hệ dung môi 3.3 (Butylacetat : Acetone : Triethylamin (4 : 2 : 1)) được tinh chế tiếp tục bằng sắc kí cột Sephadex sử dụng hệ dung môi rửa rửa là hệ 3.1 cải biến (Ethylacetat : Acetone : Triethylamin (2 : 2 : 1)) và (Ethylacetat : Acetone : Triethylamin : Methanol (2 : 2 : 1 : 2)), thu được 1 thành phần kháng sinh, sau khi loại dung môi và kết tinh lại trong ethylacetat : n-hexan (1 : 4) thu kháng sinh tinh khiết là tinh thể màu đỏ tươi, hiệu suất 66%.

Kết quả đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của chất kháng sinh tinh khiết này cho thấy nó có hoạt tính rất mạnh kháng các chủng vi sinh vật kiểm định như *S. aureus*, *P. mirabilis*, *S. flexneri*, *S. typhi* với giá trị MIC nằm trong khoảng 0,1 - 0,3 µg/ml.

4. KẾT LUẬN

Streptomyces 15.29 là xạ khuẩn gốc được phân lập từ đất việt nam. Phân loại theo ISP và giải trình tự gen 16s rADN chúng tôi đã cơ bản xác định được *Streptomyces* 15.29 có tên khoa học là *Streptomyces microflavus*. Cải tạo giống qua sàng lọc ngẫu nhiên và đột biến ánh sáng UV kết hợp với sàng lọc sau đột biến đã làm tăng trưởng được hiệu suất tổng hợp kháng sinh của chủng. Biến chủng *Streptomyces* 15.29.21.23 là biến chủng tốt nhất hiện tại mà chúng tôi tạo được. Lên men chìm trên máy lắc và trong bình lên men 5 lít và 500 lít được thực hiện và kết quả là lên men trên máy lắc cho kết quả tốt nhất, còn lên men trong bình lên men 5 lít và 500 lít cho kết quả tương đương, tuy nhiên kém hơn lên men trên máy lắc nhiều. Từ dịch lọc dịch lên men kháng sinh chiết được tốt nhất bằng ethylacetat ở pH 5,0. Sắc kí lớp mỏng và sắc kí cột cho thấy hỗn hợp kháng sinh có ít nhất 4 thành phần. Trong đó thành phần chính Thành phần chính được tinh chế bằng sắc kí cột silica gel, cột oxyt nhôm, YMC và cột Sephadex có hiệu suất 66%. Bước đầu xác định giá trị MIC của kháng sinh này là khá thấp: từ 0,11 – 0,30 µg/ml đối với *S. aureus*, *P. mirabilis*, *S. flexneri*, *S. typhi*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. W. Crueger, A. Crueger - *Biotechnologia*, Mezoegazdasagi Kiados, Budapest, 1987.
2. [2] Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp.* 41, 95-98.
3. [3] Từ Minh Koóng (2004): *Cơ sở công nghệ sinh học và sản xuất Dược phẩm*, NXB Y học, Hà Nội.
4. [4] Shigetoshi Okada, Sinroku Iwamatu (1997), "Scale up production of milbemycin by *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *aureolacrimosus* with control of internal pressure, temperature, aeration and agitation", *J. Chem. Technol. Biotechnol*, Vol. 70, p. 179-187.
5. [5] E. B. Shirling and D. Gottlieb (1966), "Methods for characterization of *Streptomyces* species", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Vol. 16. No.3, p. 313-340.
6. [6] Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignments aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 25, 4786-4882.

Fermentation researches for antibiotic biosynthesis by *Streptomyces* 15.29 - *Streptomyces microflavus*

Thu Cao Van, Ha Bui Viet, Ha Quach Thi Le, Hanh Nguyen Hong, Hien Nguyen Thi Thuy, Kiem Phan Van, Linh Vo Thi, Thanh Vu Nguyen and Thuy Vo Thi Thu

Streptomyces 15.29 is an original Actinomycete strain that has been isolated from Vietnamese soil. Based on the ISP and 16s rDNA gene sequence determination classification method we have basically determined that *Streptomyces15.29* is *Streptomyces microflavus*. Strain improvement by random selection and selection after UV light mutation is successful with strain's significantly better antibiotics producing activity has been reached. The *Streptomyces 15.29.21.23* is the our best mutant by now. Submerged fermentation on bioshaker machine and in 5 L, 500 L bioreactor has been carried out and the fermentation on bioshaker is the best, the fermentation in 5 L, 500 L bioreactor is equivalent , but its result is weaker than fermentation's result on bioshaker. From the filtrate of fermentation broth antibiotic were extracted best by ethyl acetate at pH 5,0. Thin layer chromatography and column chromatography have showed that the antibiotic mixture has 4 components. Main antibiotics component has been purified by column chromatography on silica gel, aluminum oxide, YMC and sephadex G10. The results of antibiotic assay showed that this component has strong antibiotic activity with the MIC values in the range from 0.11 to 0.30 µg/ml for *S. aureus*, *P. mirabilis*, *S. flexneri*, and *S. typhi*.

Key words: *Streptomyces*, *Streptomyces microflavus*, 16s rADN, antibiotic, fermentation.

Cao Văn Thu^a , Bùi Việt Hà, Quách Thị Lê Hà, Nguyễn Hồng Hạnh, Nguyễn Thị Thúy Hiền, Phan Văn Kiệt^{b*}, Võ Thị Linh, Vũ Nguyên Thành^c và Võ Thị Thu Thủy^a

^aTrường Đại học Dược Hà Nội, ^bViện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên-Viện KHCNVN, ^c Viện Công nghiệp Thực Phẩm

*Phankiem@vast.ac.vn