

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ CHẤT PHỤ GIA ĐẾN HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM CỦA CHẾ PHẨM VALYDAMYCIN A

■ CN. Ngô Hoàng Linh⁽¹⁾, ThS. Lê Minh Thanh⁽¹⁾
KS. Nguyễn Đức Nam⁽¹⁾, TS. Nguyễn Văn Hiếu⁽²⁾

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Validamycin A (Val-A) là một chất kháng sinh nhóm aminoglycoside có hoạt tính kháng nấm được sinh tổng hợp chủ yếu bởi *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus* (Liao *et al.*, 2009; Iwasa *et al.*, 1971) và *S. hygroscopicus* subsp. *Jingganensis* 5008 (Shen, 1988; Zhou *et al.*, 2014). Theo Nioh và Mizushima (1974), Validamycin A không gây ức chế sự sinh trưởng của nấm và không làm thay đổi hàm lượng protein, nucleic acid và thành phần của thành tế bào nhưng gây thay đổi hình thái của nấm *Rhizoctonia solani* bằng cách ức chế quá trình sinh tổng hợp myo-inositol và làm giảm độ tinh của nấm mốc. Val-A cũng ức chế trehalase của *R. solani* cũng như ở nhiều loài sinh vật khác như chuột, thỏ, lợn, nấm men và côn trùng với IC₅₀ = 10⁻⁸ - 10⁻⁶ M. Val-A là chất kìm hãm yếu (IC₅₀ = 10⁻³ M) các enzym thủy phân đường khác như maltase, isomaltase và sucrase trong ruột lợn.

Val-A được sử dụng để trừ bệnh đốm vằn hại lúa, bắp, bệnh đốm lá và thân lúa, bắp do *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia oryzae* và *Sclerotium oryzae-sativa* gây nên. Ngoài ra thuốc còn trừ bệnh thối củ, thối rễ khoai tây, bông, cà chua và nhiều loại rau do nấm *Rhizoctonia solani* (Motoo Shibata *et al.*, 1982, Yutaka Kido *et al.*, 1986), bệnh héo xanh do vi khuẩn *Pseudomonas solanacearum* gây nên (Ishikawa *et al.*, 1996).

Các chủng *S. hygroscopicus* có hoạt tính tổng hợp kháng sinh rất yếu, không mang tính ổn định và bền vững cao để hạn chế hình thành các sản phẩm phụ, rút ngắn thời gian lên men và giảm chi phí sản xuất.

Xuất phát từ thực tế trên, chúng tôi tiến hành thực hiện: “Nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất phụ gia đến hoạt tính kháng nấm của chế phẩm Valydamycin A” nhằm mục đích tạo sự ổn định hoạt tính cho hợp chất Val-A, tăng cường hoạt tính của hoạt chất, đồng thời tạo chất dẫn giúp hoạt chất có thể tiếp xúc dễ dàng với tác nhân nấm, thúc đẩy mạnh hiệu quả của hoạt chất.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

- Sản phẩm Val-A có trong dịch lên men của chủng xạ khuẩn *S. hygroscopicus* DA15 được Trung tâm Ứng dụng Tiến bộ Khoa học và Công nghệ Nghệ An sản xuất.

- Một số hóa chất như: axit citric, acid green 25, polyethylenglycol, linigulfonate...

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp đục lỗ

Dùng thiết bị đục lỗ, đục lên môi trường thạch đã cấy vi sinh vật kiểm định trong

⁽¹⁾ Trung tâm Ứng dụng Tiến bộ Khoa học và Công nghệ Nghệ An; ⁽²⁾ Viện Môi trường Nông nghiệp

hộp peptri, sau đó nhỏ vào lỗ dung dịch chất kháng sinh và dung dịch lên men cần thử. Tiếp theo để vào tủ lạnh 4-6 giờ cho chất kháng sinh khuếch tán vào môi trường, sau đó đem nuôi ở tủ ấm 37°C. Hoạt tính kháng sinh được xác định bằng đường kính vòng kháng khuẩn (D - d, mm). Trong đó: D là đường kính vòng vi khuẩn, d là đường kính thoi thạch.

2.2. Ảnh hưởng của các chất phụ gia đến hoạt tính kháng nấm của chế phẩm Val-A

Dịch lên men được nâng nhiệt lên 55°C và được bổ sung thêm axit citric để điều chỉnh pH, tiếp đến được lọc để loại bỏ sinh khối và được kiểm tra hoạt tính sau lên men. Sau khi đã kiểm tra được hoạt tính sinh học, dịch được lọc để loại bỏ sinh khối. Dịch sau lọc được chuyển đến thiết bị để đông hóa bổ sung thêm các chất phụ gia:

- Ảnh hưởng của lượng acid citrit;
- Ảnh hưởng của acid green 25;
- Ảnh hưởng của hàm lượng linigunfonat;
- Ảnh hưởng của polyethylenglycol.

2.3. Phương pháp HPLC

HPLC là một sắc ký cột (column chromatograph) đi kèm với một detector nhạy để có thể phát hiện được các chất tách ra trong quá trình chạy sắc ký. Với những tiến bộ kỹ thuật về cột, detector đã chuyển sắc ký cột thành phương pháp phân tích có tốc độ nhanh và hiệu suất cao. Loại này cần phải có hệ thống bơm cao áp để đẩy pha động với áp suất cao đến khoảng 30 Mpa (300atm) nhằm tạo dòng chảy với lưu lượng vài ml/phút. Phương pháp sắc ký HPLC sử dụng hệ sắc ký:

- Cột thép không gỉ 25cm x 4,6mm với chất nhồi octadecylsilane gắn silica (5µm);
- Pha động: một hỗn hợp gồm 50 thể tích của 0,2% (w/v) axit acetic trong nước, 25 thể

tích acetonitril, 25 thể tích metanol, lọc và khử khí;

- Tốc độ dòng 1ml/phút;
- Phổ kế ở 240nm;
- Thể tích mẫu tiêm 20µl.

Cách tính nồng độ Val-A có trong dịch lên men:

- Dung dịch kiểm nghiệm: là dịch lên men, hoặc các dịch chiết, trước khi bơm mẫu phải lắc đều đảm bảo độ đồng nhất của mẫu với nồng độ Val-A cần xác định (mg/l);

- Dung dịch chuẩn: Pha dung dịch chuẩn Val của Sigma được dung dịch nồng độ Cc (mg/l);

- Bơm dung dịch chuẩn: Phép thử sẽ không hợp lệ nếu như độ lệch chuẩn tương đối giữa các lần bơm mẫu lớn hơn 2%;

- Bơm dung dịch kiểm nghiệm, dựa vào sắc ký đồ tính toán hàm lượng Val trong dịch lên men, dịch chiết theo công thức sau: $C_{kn} = C_c \cdot C_{kn} / S_c$. Trong đó: S_{kn} là diện tích pic của dung dịch Val kiểm nghiệm, S_c là diện tích pic của dung dịch Val chuẩn. Đo nồng độ Val-A bằng HPLC được thực hiện tại Trung tâm Kỹ thuật Nhiệt đới Việt Nga.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Ảnh hưởng của lượng acid citrit đến hoạt tính Val-A

Val-A được cấu tạo từ các phân tử đường, do đó thường không bền, dễ dàng bị phân hủy nhiều hệ enzym có trong vi khuẩn như *Pseudomonas*, *Bacillus*. Do vậy, đối với dung dịch lỏng cần có sự điều chỉnh về pH hoặc nhiệt độ để ức chế sự hoạt động của các loại vi sinh vật. Tuy nhiên các hoạt chất bổ sung cần tạo sự ổn định hoạt tính cho hợp chất Val-A hoặc tăng cường hoạt tính của hoạt chất, đồng thời một số chất tạo chất dẫn giúp hoạt chất có thể tiếp xúc dễ dàng với tác nhân nấm, chính điều này thúc đẩy mạnh hiệu quả của hoạt chất.

Dịch lên men của chủng xạ khuẩn nuôi trên môi trường tối ưu cho quá trình Val-A được loại bỏ sinh khối và đưa về hoạt độ đúng như yêu cầu và được bổ sung lượng acid citric khác nhau và được theo dõi ảnh hưởng của thời gian đến hoạt tính kháng chủng nấm *Rhizoctonia solani*.

Kết quả thử hoạt tính kháng sinh cho thấy, với hàm lượng acid citric bổ sung 0,05-0,5% đã không ảnh hưởng đến hoạt kháng nấm *Rhizoctonia solani* của chế phẩm trong thời gian 3 tháng, tuy nhiên việc bổ sung

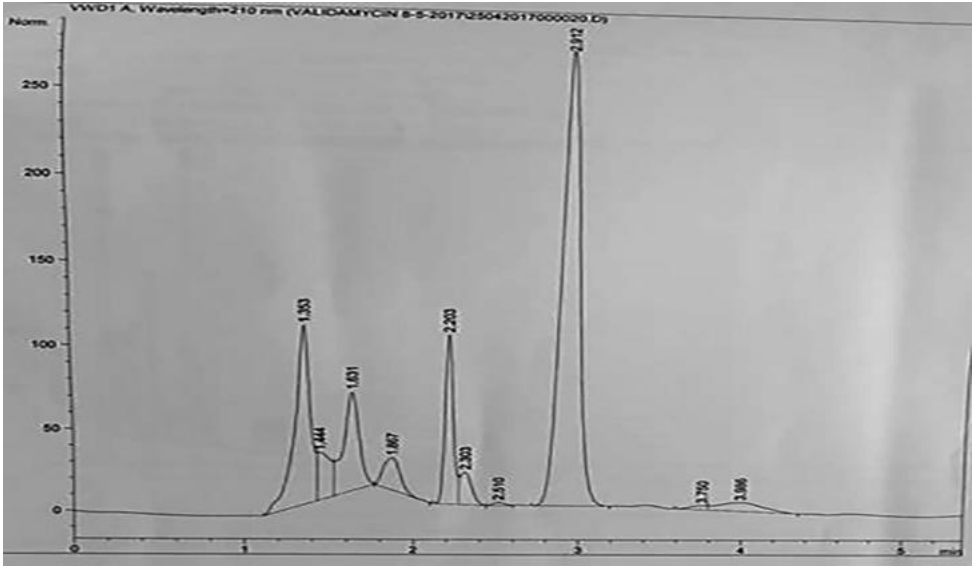
với hàm lượng 0,4-0,5% kiểm tra giá trị pH hạ thấp dưới 3,0 lại không thích hợp khi sử dụng, vì ở pH này có thể gây ra các ảnh hưởng đối với cơ thể thực vật. Chế phẩm sau thời gian theo dõi đã được đo kiểm nồng độ Val-A, kết quả cho thấy nồng độ Val không có sự thay đổi nhiều so với ban đầu.

Bảng 1. Kiểm tra nồng độ Val-A có trong chế phẩm

theo thời gian khi có bổ sung chế phẩm acid citric

Hình 1. Kiểm tra hoạt tính Val-A sau 120 ngày khi có bổ sung acid citric với lượng 0,3%

Khối lượng acid citric (%)	Ảnh hưởng của lượng acid citric sau thời gian 3 tháng đến nồng độ của Val-A (mg/l)			
	Ban đầu	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3
0,2	6732	6730	6731	672 8
0,3	6732	6736	6725	6723



2. Ảnh hưởng của lượng acid green 25 đến hoạt tính Val-A

Tất cả các hóa chất và phụ gia cho thêm đều nhằm mục đích tạo sự ổn định hoạt tính cho hợp chất Val-A, một số phụ gia cho thêm có tác dụng làm tăng cường hoạt tính của hoạt chất, đồng thời một số chất tạo chất dẫn giúp hoạt chất có thể tiếp xúc dễ dàng với tác nhân nấm, chính điều này thúc đẩy mạnh hiệu quả của hoạt

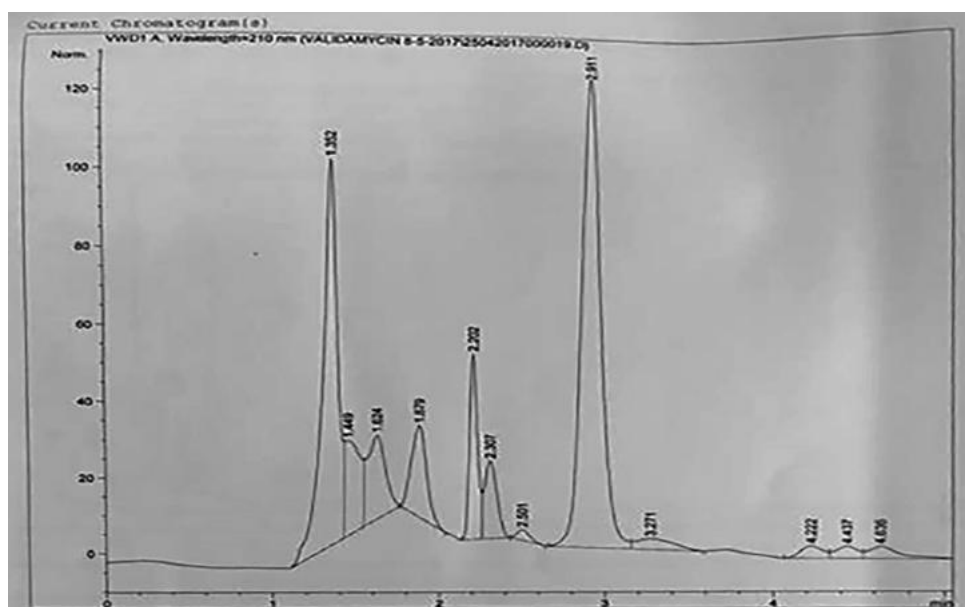
chất. Việc bổ sung chất màu acid green 25 vào chế phẩm Val-A có thể gây ra những tác động làm ảnh hưởng đến hoạt tính kháng nấm của chế phẩm và có ảnh hưởng đến người sử dụng, kết quả thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của lượng acid green 25 và thời gian

đến độ hoạt tính kháng nấm của chế phẩm Val-A

Hình 2. Kiểm tra hoạt tính Val-A sau 120 ngày khi có bổ sung acid green 25 với lượng 0,01%

Khối lượng acid green 25 (%)	Ảnh hưởng của lượng acid green 25 (%) và thời gian (ngày) đến hoạt tính kháng nấm của chế phẩm Val-A (mm)				
	1	7	14	28	120
0,001	21,5	21,4	21,3	21,4	21,3
0,005	21,5	21,3	21,3	21,3	21,3
0,01	21,5	21,4	21,4	21,3	21,4
0,02	21,5	21,4	21,4	21,4	21,3



Kết quả thí nghiệm cho thấy với hàm lượng acid green 25 bổ sung 0,001-0,02% đã không ảnh

hưởng đến hoạt kháng nấm *Rhizoctonia solani* của chế phẩm trong thời gian 3 tháng. Việc bổ sung hàm lượng chất màu lớn có thể làm gia tăng giá thành của sản phẩm, đồng thời có thể gây tác động xấu đến thực vật, do vậy nồng độ 0,01% đã được lựa chọn.

3. Ảnh hưởng của lượng linigsunfona đến hoạt tính Val-A

Để giúp cho các tiểu phần hoạt chất Val-A có thể bám dính lên các lông tơ bề mặt của thực vật. Khi sử dụng ở dạng rắn thì các hợp chất này ở dạng bột mịn, khi ở dạng lỏng chúng cần dễ dàng tan trong

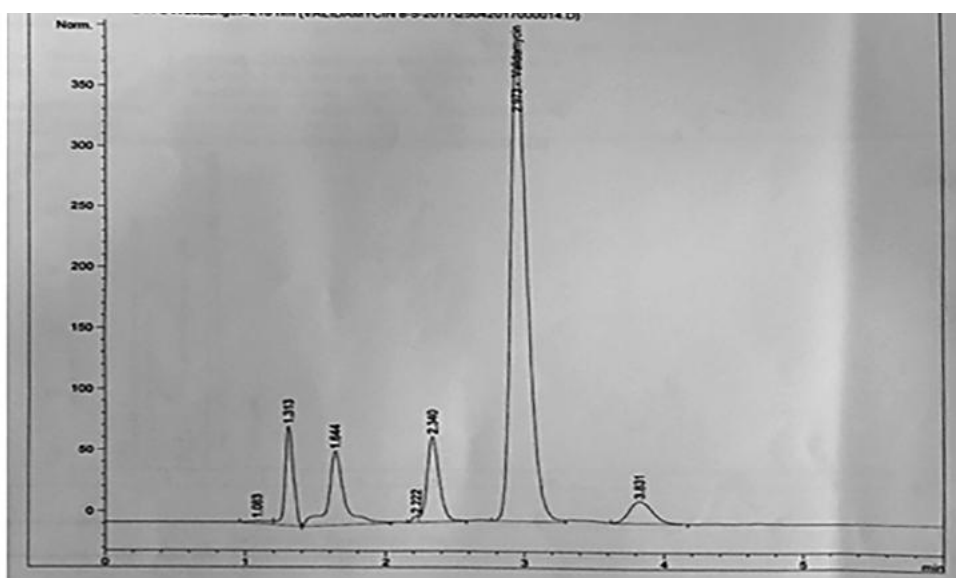
nước để có thể hòa tan giúp được chất có thể bám dính vào sợi nấm, đồng thời các chất này có vai trò như một chất hoạt động bề mặt có thể kể đến các muối axit polyacrylic, muối axit lignosulfonic, muối của axit phenolsulfonic hoặc naphthalenesulfonic. Tuy nhiên các hợp chất sử dụng phải ở dạng bền vững không gây ảnh hưởng đến môi trường và người sử dụng. Trong nghiên cứu này sử dụng hợp chất linigsunfonate, là một phế liệu của ngành công nghiệp chế biến giấy, có mức độ kết dính cao. Ảnh hưởng của nồng độ chất linigsunfonate đến hoạt chất Val-A của chế phẩm được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của lượng linigsunfonate và thời gian

đến độ hoạt tính kháng nấm của chế phẩm Val-A

Hình 3. Kiểm tra hoạt tính Val-A sau 120 ngày khi có bổ sung linigsunfonate với lượng 2%

Khối lượng linigsunfonate (%)	Ảnh hưởng của linigsunfonate (%) và thời gian đến hoạt tính kháng nấm của chế phẩm Val A (mm)				
	1	7	14	28	120
1,0	21,5	21,4	21,3	21,4	21,3
1,5	21,5	21,3	21,3	21,3	21,3
2,0	21,5	21,4	21,4	21,3	21,4
2,5	21,5	21,4	21,4	21,4	21,3
3,0	21,5	21,4	21,4	21,4	21,4



Kết quả thí nghiệm cho thấy, với hàm lượng linigsunfonate bổ sung 1-3% đã không ảnh hưởng đến hoạt tính kháng nấm *Rhizoctonia solani* của chế phẩm trong thời gian 3 tháng. Việc bổ sung hàm lượng linigsunfonate có thể gây ra hiện tượng kết tủa của sản phẩm, đồng thời có thể gây tác động xấu đến thực vật, do vậy nồng độ 1,5% đã được lựa chọn.

4. Ảnh hưởng của lượng polyethylenglycol đến hoạt tính Val-A

Chất hoạt động bề mặt được nghiên cứu bổ sung có thể là chất làm nhũ, phân tán hoặc làm ướt các dạng ion, hoặc không ion, hoặc hỗn hợp các chất hoạt động. Sự có mặt của ít nhất một

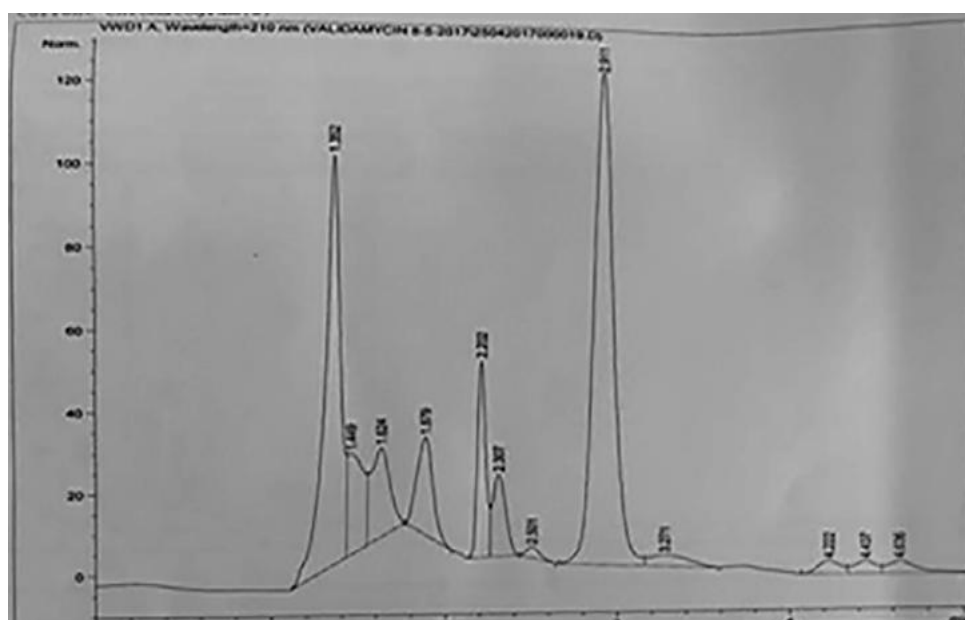
chất hoạt động bề mặt nói chung là cần thiết khi chất hoạt tính hoặc chất mang không hoạt động không hòa tan trong nước và môi trường cho việc phun là nước. Do đó các chế phẩm Val-A dùng trong nông nghiệp có thể chứa các chất hoạt động trong giới hạn rất rộng, dao động từ 0,05-95% (theo trọng lượng). Trong nghiên cứu này đã sử dụng hợp chất polyethylenglycol. Ảnh hưởng của hàm lượng chất này đến hoạt tính Val-A được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của khối lượng polyethylenglycol và thời gian

đến hoạt tính Val-A của chế phẩm

Hình 3.4. Kiểm tra hoạt tính Val-A sau 120 ngày khi có bổ sung polyethylenglycol với lượng 2,5%.

Khối lượng polyethylenglycol (%)	Ảnh hưởng của polyethylenglycol và thời gian đến hoạt tính kháng nấm của Val-A (mm)				
	1	7	14	28	120
1,0	21,5	21,4	21,3	21,4	21,3
2,5	21,5	21,3	21,3	21,3	21,3
5,0	21,5	21,4	21,4	21,3	21,4
7,5	21,5	21,4	21,4	21,4	21,3
10,0	21,5	21,4	21,4	21,4	21,4



Kết quả thí nghiệm cho thấy với hàm lượng polyethylenglycol bổ sung 1-10% đã không ảnh hưởng đến hoạt kháng nấm *Rhizoctonia solani* của chế phẩm trong thời gian 3 tháng. Việc bổ sung hàm lượng polyethylenglycol có thể làm gia tăng giá thành của sản phẩm, đồng thời có thể gây tác động xấu đến thực vật, do vậy nồng độ 2,5% đã được lựa chọn.

Bảng 5. Kiểm tra nồng độ Val-A có trong chế phẩm theo thời gian

khi có bổ sung chế phẩm các chất phụ gia

Chế phẩm sau khi phối trộn hoàn thiện đã đánh giá ảnh hưởng của thời gian theo dõi, được đo

Mẫu	Ảnh hưởng của thời gian tháng đến nồng độ của ValA (mg/l)			
	1	3	6	9
Mẫu 1	6732	6730	6731	672 8
Mẫu 2	6732	6730	6731	672 8
Mẫu 3	6732	6730	6731	672 8

kiểm nồng độ Val-A, kết quả cho thấy nồng độ Val không có sự thay đổi nhiều so với ban đầu trong thời gian 9 tháng.

IV. KẾT LUẬN

- Một số chất phụ gia đã được bổ sung vào chế phẩm Val-A nhằm mục đích tạo sự ổn định hoạt tính cho hợp chất Val-A, tăng cường hoạt tính của hoạt chất, đồng thời tạo chất dẫn giúp hoạt chất có thể tiếp xúc dễ dàng với tác nhân nấm, chính điều này thúc đẩy mạnh hiệu quả của hoạt chất.

- Kết quả nghiên cứu đã chọn được nồng độ các chất phụ gia thực hợp bổ sung vào chế phẩm Val-A bao gồm (%): acid citric: 0,3; acid green 25: 0,01; polyethylenglycol: 2,5 và linigsunfonate với lượng 2%.

- Chế phẩm Val-A sau khi hoàn thiện đã được theo dõi ảnh hưởng theo thời gian bảo quản ở nhiệt độ phòng đã ổn định trong thời gian 9 tháng./.

Tài liệu tham khảo:

1. Asano, N., Yamaguchi, T., Kameda, Y., and Matsui, K. (1987). Effect of validamycins on glycohydrolases of *Rhizoctonia solani*. *J. Antibiot.* 40:526-532.
2. CHEN Li-li, LU Ying-xin, Screening of High Yielding Jinggangmycin Strain by Microwave Mutation, *Biotechnology*, 2003-05.
3. Geoffrey DR, Paul JK., Anthony PJ. (1989), Effect of Validamycin A on the Inositol Content and Branching of *Rhizoctonia cerealis* and Other Fungi, *Journal of General Microbiology*, 135:139-150.
4. Haifeng Qian, Baolan Hu, Zhiye Wang, Xi Xu, Tao Hong (2007), Effects of validamycin on some enzymatic activities in soil, *Environ Monit Assess.*, 125:1-8.
5. HUANG Yong-chun et al, Breeding of Agricultural Antibiotic-producing Strain of *Streptomyces hygroscopicus* with High Yield by Ultraviolet Mutagenesis, *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008-16.
6. Iwasa, T.; E. Higashide & M. Shibata (1971), Studies on validamycins, new antibiotics. III. Bioassay methods for the determination of validamycin. *J. Antibiotics*, 24 :

114-118.

7. Jain P., Pundir R. K. - Effect of fermentation medium, pH and temperature variation on antibacterial soil fungal metabolite production. *J Agri Technol*, 7 (2011) 247-269.
8. LIAO Xiao-Xun, TAO Ke, HOU Tai-Ping, Breeding of a jinggangmycin producing strain and optimization on fermentation conditions, *Journal of Sichuan University, Natural Science Edition*, 2008-04.
9. Liao Y., Wei Z., Bai L., Deng Z., and Zhong J. - Effect of fermentation temperature on Validamycin A production by *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *J. Biotechnol.* 142 (2009) 271-274.
10. Matsuura, K. (1983). Characteristics of validamycin A in controlling *Rhizoctonia* diseases. In "Pesticide Chemistry: Human Welfare and the Environment" (J. Miyamoto and P. C. Kearney, eds.), 2:301-308. Pergamon, Oxford.
11. Motoo Shibata, Kazuo Mori, Masako Hamashima (1982), Inhibition of hyphal extension factor formation by validamycin in *Rhizoctonia solani*, *The Journal of Antibiotics*, 2:1422-1423.
12. Takako Nioh, Shoji Mizushima (1974), Effect of Validamycin on the growth and morphology of *Pellicularia sasakii*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 20:373-383.
13. Wang Shishan Chen Shouwen Yu Ziniu, Selection of Nitrogen Sources and Proportion of Carbon and Nitrogen of Jinggangmycin of *Streptomyces hygroscopicus*, *Journal of Huazhong Agricultural*, 2001-06.
14. YU Long AN Xiao, Screening on the high yield validamycin producing strain by implantation with N~+ and Ti~+ ion sources, *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*, 2007-06.
15. Yu Y., Bai L., Minagawa K., Jian X., Li L., Li J., Chen S., Cao E., Mahmud T., Floss H. G., Zhou X., Deng Z. - Gene cluster responsible for validamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *jinggangensis* 5008. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 5066-5076.
16. Zheng Yuguo, Chen Xiaolong, Wang Zhao, Shen Yinchu (2004), Production of Validamycins from Crude substrates by *Streptomyces hygroscopicus* in an External-loop Airlift Bioreactor with a Low Height-to-Diameter Ratio, *Chinese J. Chem. Eng.*, 12(1) 102-107.