

# NGHIÊN CỨU CÁC ĐIỀU KIỆN ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH LÊN MEN CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN *STREPTOMYCES HYGROSCOPICUS* DA15 TRÊN THIẾT BỊ LÊN MEN 500 LÍT

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



Các hộ dân tham gia mô hình sử dụng chế phẩm VAL- A phòng trừ bệnh khô vằn hại ngô ở Đơ Lương

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Validamycin A (Val-A) được sản xuất bởi *Streptomyces hygroscopicus*, là một loại kháng sinh chống nấm quan trọng. Do có hiệu quả diệt nấm cao, an toàn đối với sức khỏe con người và động vật, Val-A đã là một trong những thuốc bảo vệ thực vật quan trọng và được sử dụng rộng rãi để điều trị sâu bệnh hại lúa ở nhiều nước trong khu vực Đông Á và ở Việt Nam. Để tạo ra được hàm lượng kháng sinh Val-A cao trong sản phẩm thì việc nhân sinh khối vi sinh vật là một khâu quan

trọng trong công nghệ sản xuất, nó có ý nghĩa quyết định tới chất lượng cũng như giá thành của sản phẩm.

Lên men còn được gọi là quá trình nhân sinh khối, đó là giai đoạn nuôi cấy vi sinh vật để chúng tạo sản phẩm hoặc sinh khối vi sinh vật, hoặc là sản phẩm trao đổi chất. Trong quy trình lên men, tùy từng chủng giống vi sinh vật khác nhau mà cần nhân theo cơ chất, điều kiện và môi trường nhân khác nhau. Phương pháp đang được ứng

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

dụng nhiều trong sản xuất hiện nay là lên men chìm, trong đó vi sinh vật được nuôi cấy trong môi trường dịch thể, chúng sẽ phát triển theo chiều đứng của cột môi trường. Lên men chìm là phương pháp được phổ biến rộng nhất trong quy trình lên men công nghiệp, vì có thể kiểm soát được các khâu trong quá trình một cách dễ dàng. Trong nghiên cứu trước đây, lên men với quy mô nhỏ, thiết bị lên men chỉ từ 5-50 lít, nên việc thu hồi Val-A tương đối thuận lợi, phù hợp với các thông số được nghiên cứu trong phòng thí nghiệm. Nhưng sản xuất quy mô lớn, trong thiết bị lên men 500 lít thì việc hiệu chỉnh lại các thông số trong quá trình lên men để thu hồi Val-A là cần thiết. Đặc biệt, 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 đã tiến hành thực hiện: “Nghiên cứu các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình lên men của chủng xạ khuẩn *streptomyces hygroscopicus* DA15 trên thiết bị lên men 500 lít” nhằm đạt hiệu quả tối ưu trong quá trình thu hồi Val-A trên thiết bị lên men 500lít.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng xạ khuẩn *S. hygroscopicus* DA15 nhận được từ Bộ giống Vi sinh vật của Bộ môn Sinh học Môi trường, Viện Môi trường Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.

Hóa chất sử dụng: Cao nấm men (Himedia, Ấn Độ), cao malt (BHD, Anh), cao thịt, tryptone (Merck, Đức), Pepton, tinh bột tan (Trung Quốc), Sacarose, glucose (Việt Nam), bột ngô

(Việt Nam), bột đậu tương (Việt Nam), nhộng xay (Việt Nam), bột gạo (Việt Nam).

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Nhân giống xạ khuẩn

Chọn các khuẩn lạc đơn trong các ống giống thạch nghiêng hoạt hóa bằng cách cấy truyền sang ống nghiệm chứa môi trường thạch nghiêng và đĩa Petri ISP2, nuôi 4-5 ngày ở 37°C. Tiếp theo cắt cục thạch (1,0x1,0cm) chứa khuẩn lạc đơn vào bình tam giác 250ml chứa 50ml môi trường ISP2, nuôi trên máy lắc tốc độ 220 vòng/phút ở 37°C trong 48 giờ. Mật độ giống của xạ khuẩn đạt trung bình là  $5 \times 10^8$  CFU/ml.

### 2.2. Xác định hoạt tính Val-A

#### 2.2.1. Phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch

Theo phương pháp màng ngược của Iwasa môi trường A1 được để nguội tới 45°C và thêm 2,5% (v/v) dịch huyền phù sợi nấm mốc *R. solani* (được nhân giống trong môi trường Hansen trong 48 giờ, mật độ  $10^9$  CFU/ml). Sau khi pha trộn 5ml môi trường được đổ vào đĩa Petri có đường kính 9cm. Ủ đĩa này ở 27°C trong 48 giờ, tiếp đó phủ 15ml môi trường thạch A2 lên trên bề mặt đĩa. Sau khi đông đặc tiến hành đục các lỗ thạch có đường kính 6,0mm, nhỏ vào các lỗ dung dịch chất kháng sinh chuẩn và dịch kháng sinh thô. Đặt đĩa Petri trên ở 4-5°C trong 4 giờ cho kháng sinh khuếch tán vào môi trường. Tiếp đó, ủ đĩa Petri ở 28°C trong 24 giờ và đo vòng ức chế hình thành trên đĩa Petri. Hoạt tính kháng sinh được xác định dựa vào kích thước vòng vô khuẩn (D - d, mm), D là kích thước vòng vô khuẩn và d là đường kính thoi thạch.

#### 2.2.2. Phương pháp phân tích sắc ký lỏng cao áp (HPLC)

Dịch lên men được ly tâm 12.000

vòng/phút trong 5 phút. Dịch nổi được chiết với chloroform. Dịch chiết được chuyển trực tiếp lên cột Nucleosil C18 (250 x 4,6mm, Sigma-Aldrich). Pha động (5mM đệm sodium phosphate: acetone, 97:3) được bổ sung vào cột với tốc độ 1 ml/phút ở nhiệt độ phòng. Dịch ra được đo ở bước sóng 210 nm trên máy Waters 996 photodiode, số liệu được phân tích bằng Waters Millennium Chromatography Manager được thực hiện tại Trung tâm Kỹ thuật I, Tổng Cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng, Bộ Khoa học và Công nghệ.

### **2.3. Lựa chọn môi trường lên men thích hợp cho sinh tổng hợp Val-A**

Chủng xạ khuẩn được nuôi trên các môi trường FM1, FM2, FM3, FM4, FM5, FM6 là các môi trường đặc trưng cho lên men xạ khuẩn. Sau 72 giờ nuôi ở nhiệt độ 28-30°C, xác định hoạt tính kháng sinh và sinh khối. Trên môi trường nào xạ khuẩn sinh trưởng tốt, tích lũy nhiều sinh khối và chất kháng sinh cao nhất sẽ được lựa chọn làm môi trường lên men thích hợp.

### **2.4. Xác định thời điểm thu hồi Val-A của xạ khuẩn trong thiết bị lên men 500 lít**

Tiến hành lên men chủng xạ khuẩn trong nồi lên men dung tích 500 lít chứa 350 lít môi trường nuôi cấy, với tốc độ khuấy 200-220 vòng/phút, với thành phần môi trường lên men đã lựa chọn ở trên xác định.

Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thu hồi Val-A cần xác định nhiệt độ, pH, độ thông khí và thời gian.

Các yếu tố thay đổi như sau: nhiệt độ 25, 30, 37, 42°C; pH ban đầu 5, 6, 7, 8, 9 và 10; Xác định ảnh hưởng của thời gian lên men sinh tổng hợp Val-A. Trên cơ sở các điều kiện lên men thích hợp và môi trường đã

xác định được, nghiên cứu động thái quá trình lên men trong nồi lên men 500 lít. Trong 120 giờ lên men, cứ 12 giờ lấy mẫu 1 lần để kiểm tra, theo dõi sự biến động của sinh khối, và hoạt tính kháng sinh có trong dịch kháng sinh thô.

### **2.5. Nghiên cứu đặc tính và độ bền của Val-A**

Dịch kháng sinh thô sau khi ly tâm được chỉnh pH về 3; 7 và 10, đun ở các nhiệt độ 40°C, 60°C, 80°C, 100°C trong thời gian 20-80 phút. Sau đó dung dịch được làm nguội về nhiệt độ phòng để xác định hoạt tính kháng nấm.

## **III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN**

### **1. Lựa chọn môi trường lên men**

Việc lựa chọn môi trường lên men có ý nghĩa rất quan trọng trong công nghệ sản xuất và tinh chế kháng sinh. Môi trường thích hợp là môi trường giúp chủng vừa có khả năng sinh trưởng tốt, vừa sinh ra các sản phẩm mong muốn với hiệu suất tối ưu và có giá thành rẻ.

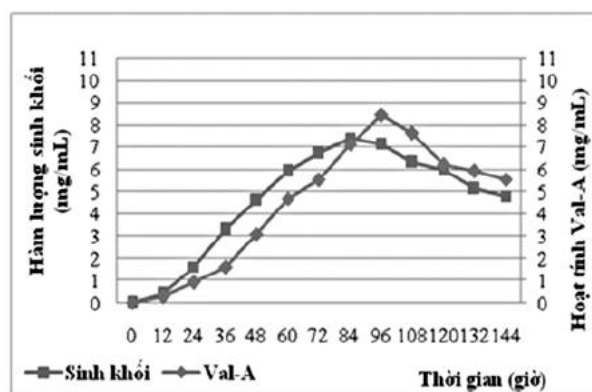
Chủng *S. hygroscopicus* DA15 sinh trưởng và sinh tổng hợp Val-A kém trên các môi trường FM1, FM2, FM5 và FM6. Sinh trưởng tốt trên hai môi trường FM3, FM4 và đạt cao nhất trên FM4 (lượng sinh khô đạt 6000 mg/ml). Tuy nhiên hoạt tính kháng sinh thu được cao nhất trên môi trường FM3 (môi trường có chứa bột ngô và bột đậu tương) đạt 6500mg Val-A/ml. Do vậy, môi trường FM3 được lựa chọn làm môi trường lên men chính cho sinh tổng hợp Val-A của chủng *S. hygroscopicus* DA15.

### **2. Ảnh hưởng của thời gian đến khả năng thu hồi Val-A**

Kéo dài thời gian lên men không đồng nghĩa với tăng hoạt tính kháng sinh (HTKS), mà ngược lại, có thể dẫn đến hình thành các chất độc, gây ức chế quá trình sinh tổng hợp kháng sinh. Lựa chọn thời gian lên men thích hợp không những có thể rút ngắn thời gian lên men, giảm chi phí sản xuất

mà còn giúp thu hồi Val-A hiệu quả nhất.

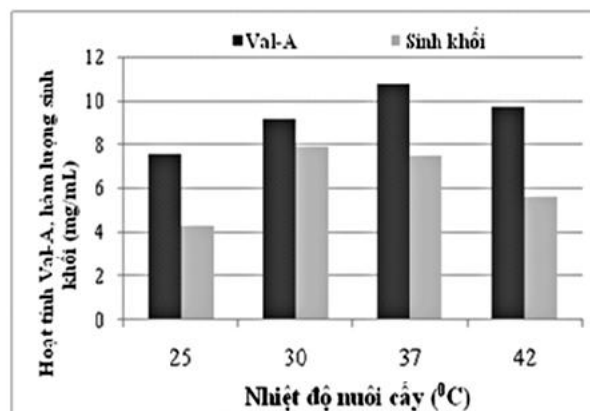
Chủng *S. hygroscopicus* DA15 sinh tổng hợp Val-A cao nhất sau khi sinh trưởng đạt cực đại 120 giờ, đạt 6500 mg/ml. Sau thời gian này, nếu kéo dài thời gian lên men, hoạt tính Val-A giảm dần (Hình 1). Ở thời điểm 144 giờ, hoạt tính kháng sinh giảm 34,5%. Như vậy, thời điểm thích hợp nhất để thu hồi kháng sinh là sau 96 giờ lên men. Đây cũng là thời điểm được nhiều tác giả lựa chọn khi lên men sinh tổng hợp Val-A.



Hình 1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến thu hồi Val-A

### 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men đến khả năng sinh tổng hợp Val-A

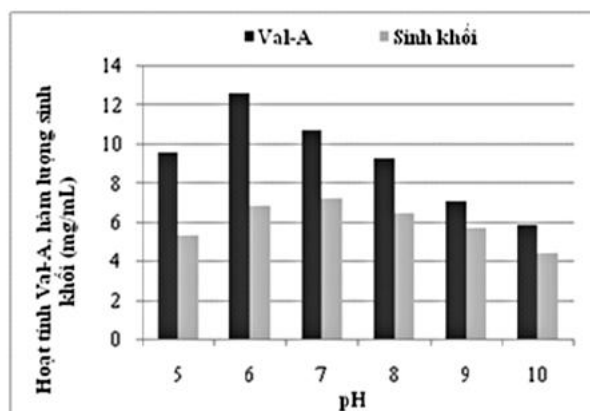
Để xác định nhiệt độ tối thích cho lên men sinh tổng hợp Val-A, tiến hành kiểm tra nhiệt độ trong dải từ 25°C-42°C với các điều kiện công nghệ khác được giữ nguyên. Kết quả nghiên cứu cho thấy nhiệt độ thích hợp cho chủng *S. hygroscopicus* DA15 phát triển không đồng thời là nhiệt độ tối thích cho lên men sinh tổng hợp val-A. Nhiệt độ phát triển thích hợp nhất của xạ khuẩn *S. hygroscopicus* DA15 là 30°C. Tuy nhiên, nhiệt độ tối thích cho quá trình sinh tổng hợp Val-A là ở 37°C (Hình 2). Ở các nhiệt độ 25°C và 42°C, lượng Val-A sinh tổng hợp thấp hơn. Đặc biệt, ở nhiệt độ 25°C hoạt tính Val-A chỉ đạt 71,3% so với nhiệt độ tối ưu.



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh tổng hợp Val-A

### 4. Ảnh hưởng của pH ban đầu đến sinh tổng hợp Val-A

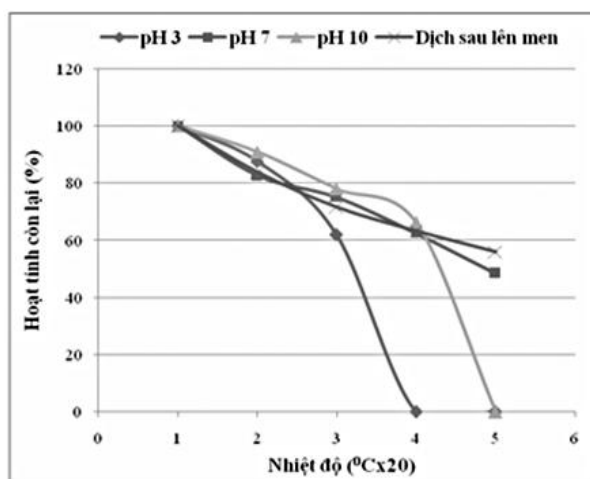
Độ pH ban đầu của môi trường là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và sinh kháng sinh trong quá trình lên men chìm. Hàm lượng ion  $H^+$  hay  $OH^-$  có thể tác động trực tiếp vào tế bào hay tác động gián tiếp bằng cách thay đổi mức độ phân ly của các chất trong môi trường. pH thích hợp cho quá trình phát triển không phải lúc nào cũng đồng thời là pH tối thích cho sinh tổng hợp kháng sinh Val-A của chủng nghiên cứu. Chủng *S. hygroscopicus* DA15 sinh trưởng tốt nhất tại pH 7,0 nhưng lại sinh tổng hợp kháng sinh cao nhất ở pH 6,0 (Hình 3). Theo một số tác giả, thông thường các chủng xạ khuẩn đều sinh tổng hợp Val-A tối ưu trên môi trường có pH từ trung tính đến hơi kiềm.



Hình 3. Ảnh hưởng pH môi trường đến khả năng sinh tổng hợp Val-A

## 5. Độ bền nhiệt và bền pH của dịch Val-A thô

Kháng sinh rất nhạy cảm với sự thay đổi của nhiệt độ và pH. Trong điều kiện nhiệt độ và pH không phù hợp, hoạt tính kháng khuẩn của kháng sinh bị suy giảm mạnh. Khả năng bền nhiệt và bền pH sẽ ảnh hưởng đến quá trình tách chiết và bảo quản về sau [2]. Dịch sau lên men có pH 7,8, được điều chỉnh về các pH 3, 7, 10 và xác định hoạt tính Val-A ban đầu (DVVK, mm). Dịch sau lên men có DVVK = 20,4mm, ở pH 3, 7 và 10 có DVVK tương ứng là 15,3mm, 18,4mm và 16,3mm. Val-A trong dịch lên men không bền nhiệt và chịu ảnh hưởng rất lớn bởi giá trị pH. Ở tất cả các pH, HTKS đều giảm dần khi nhiệt độ tăng. Ở pH 7,0, HTKS trong dịch lên men bền nhất và khả năng chịu nhiệt cao nhất. Tuy nhiên, khi giữ ở 80°C trong 40 phút, dịch Val-A thô vẫn giữ được 62,5% hoạt tính so với dịch Val-A thô ban đầu. Val-A trong dịch lên men không bền trong môi trường axit, hoạt tính bị mất hoàn toàn sau 40 phút ở 80°C. Như vậy, trong quá trình tách chiết hay cô đặc dịch Val-A thô sau này nên sử dụng pH 7,0 và nhiệt độ tối đa của quá trình là 80°C (Hình 4).



Hình 4. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến hoạt tính của dịch Val-A thô

## IV. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu, chúng tôi đã xác định được các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình lên men của chủng xạ khuẩn *Streptomyces hygroscopicus* trên thiết bị lên men 500 lít và hiệu chỉnh thời điểm thu hồi Val-A trên thiết bị lên men 500 lít, cụ thể như sau: Nhiệt độ lên men: 30±2°C; Thời gian lên men: sau 96 giờ; Tốc độ khuấy: 200v/phút./.

## Tài liệu tham khảo:

1. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyên và Phạm Văn Ty (2002), *Vi sinh vật học*, NXB Giáo dục, Hà Nội.
2. Lương Đức Phẩm và Hồ Sưởng (1978), *Vi sinh vật tổng hợp*, NXB Khoa học Kỹ thuật Hà Nội.
3. N.X. Egorov chủ biên (1983), *Thực tập vi sinh vật*, Bản dịch tiếng Việt: Nguyễn Lâm Dũng, NXB Thế giới, Moscow và NXB Khoa học và Kỹ Thuật, Hà Nội.
4. P. Simon - R.Meunier (1981), *Vi sinh vật công nghiệp và kỹ thuật hóa sinh học*, Bản dịch tiếng Việt: Lê Quang Toàn, NXB Y học, Hà Nội.
5. Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Văn Ty, Nguyễn Đình Quyên (1977), *Vi sinh vật học*, tập 2, Nxb Đại học và Trung học chuyên nghiệp, Hà Nội.
6. Nguyễn Thành Đạt (2000), *Sinh học vi sinh vật*, Nxb Giáo dục, Hà Nội.
7. Egorov NX (1976), *Thực tập vi sinh vật học*, Nxb Mir, Maxcova và Đại học THCN, Hà Nội (người dịch Nguyễn Lâm Dũng).
8. Bùi Thị Việt Hà (2006), *Nghiên cứu xạ khuẩn sinh chất kháng sinh chống nấm gây bệnh thực vật ở Việt Nam*, Luận án Tiến sĩ Sinh học, Hà Nội.
9. Đỗ Thu Hà (2004), *Nghiên cứu xạ khuẩn sinh chất kháng sinh chống nấm phân lập từ đất Quảng Nam - Đà Nẵng*, Luận án Tiến sĩ Sinh học, Hà Nội.
10. Nguyễn Như Hiền (2006), *Giáo trình Sinh học tế bào*, Nxb Giáo dục, Hà Nội.
11. Lê Gia Hy (1994), *Nghiên cứu xạ khuẩn thuộc chi streptomyces sinh chất kháng sinh chống nấm gây bệnh đạo ôn và thối cổ rễ phân lập ở Việt Nam*, Luận án phó Tiến sĩ Sinh học, Hà Nội.