

ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA BIẾN CHỦNG *Streptomyces orientalis* 4912-81-61 SINH VANCOMYCIN

CHU THANH BÌNH ⁽¹⁾, LÊ GIA HY ⁽²⁾, NGUYỄN PHƯƠNG NHUỆ ⁽²⁾

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vancomycin là kháng sinh thuộc nhóm glycopeptides, có hoạt tính kháng các cầu khuẩn và vi khuẩn Gram (+) như: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*... Cơ chế tác dụng của vancomycin giống như các kháng sinh nhóm β -lactam là phong tỏa sinh tổng hợp thành tế bào vi sinh vật, mặt khác cũng có thể tác dụng thẳng lên màng cytoplasma. Kháng sinh này được sử dụng để chữa bệnh do vi khuẩn, thường là *Staphylococcus* kháng penicillin và methicillin gây nên (Sussmuth, 2006). Hiện nay, tuy nhiều loại kháng sinh mới đang được tiếp tục tìm kiếm nhưng vancomycin vẫn được xem là kháng sinh quan trọng do hiệu quả chữa bệnh cao. Bởi vậy, việc nghiên cứu sinh tổng hợp chất kháng sinh này đang rất được quan tâm, đặc biệt là vấn đề tạo được chủng giống có năng suất cao và ổn định (Jung *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008). Bài báo này trình bày một số kết quả nghiên cứu đặc điểm sinh học và khả năng sinh vancomycin của biến chủng *S. orientalis* 4912-81-61 nhận được sau khi gây đột biến tế bào trần chủng *Streptomyces orientalis* 4912 bằng hoá chất N-metyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG). Những kết quả này là cơ sở cho việc nghiên cứu lên men vancomycin, tạo tiền đề cho việc xây dựng quy trình sản xuất chất kháng sinh này trong tương lai gần.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces orientalis* 4912 và các chủng vi sinh vật kiểm định *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* PA2, *S. aureus* 208P và *B. cereus* ATCC 21778 nhận được từ Bộ sưu tập giống của Phòng Công nghệ lên men, Viện Công nghệ sinh học.

Môi trường nuôi cấy: Môi trường lên men vancomycin MT48 (KCTC Strain Database); môi trường dùng cho nghiên cứu đặc điểm sinh học: Gauze1, Gauze 2 (Egorov, 1976), ISP4, ISP6 và khoai tây (Shirling and Gottlieb, 1966).

Hoạt tính kháng sinh được xác định theo phương pháp cục thạch và phương pháp đục lỗ thạch (Egorov, 1976).

Nghiên cứu đặc điểm sinh học của xạ khuẩn theo các phương pháp của Shirling và Gottlieb (1966) và Khóa phân loại Bergey (Stanley, 1989).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm sinh học của biến chủng *Streptomyces orientalis* 4912-81-61

Với mục đích lựa chọn chủng giống có hoạt tính vancomycin cao và bền vững, trong một nghiên cứu trước đây, chủng xạ khuẩn *S. orientalis* 4912 được gây đột biến tế bào trần bằng hoá chất N-metyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) theo phương pháp của Hopwood và cộng sự (1985). Sau quá trình đột biến thu được biến chủng *S. orientalis* 4912-81-61 có hoạt tính vancomycin cao hơn chủng gốc 94,3% (Nguyễn Phương Nhue và cộng sự, 2012).

Để sử dụng cho lên men sinh tổng hợp chất kháng sinh vancomycin, biến chủng *S. orientalis* 4912-81-61 được nghiên cứu đặc điểm sinh học. Những kết quả nghiên cứu này rất cần thiết, giúp rút ngắn thời gian nghiên cứu thành phần môi trường và điều kiện lên men thích hợp, bên cạnh đó còn theo dõi được giống trong quá trình nuôi cấy, bảo đảm độ thuần của giống và tránh tạp nhiễm.

Để nghiên cứu đặc điểm nuôi cấy, biến chủng *S. orientalis* 4912-81-61 được nuôi trên các môi trường thạch có thành phần dinh dưỡng khác nhau. Đây là các môi trường nuôi cấy đặc trưng để phân loại các chủng xạ khuẩn. Một số thông tin thu được về đặc điểm nuôi cấy của biến chủng này trong một số môi trường được ghi ra ở bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm nuôi cấy của biến chủng *S. orientalis* 4912-81-61

Môi trường	Sinh trưởng	Màu khuẩn ty khí sinh	Màu khuẩn ty cơ chất	Sắc tố tan
Gauze 1	++	Trắng đỏ nhạt	Đỏ nhạt	Không có
Gauze 2	++	Trắng vàng	Nâu vàng	Không có
ISP -6	+	Trắng đỏ nhạt	Nâu vàng nhạt	Không có
ISP-4	±	Trắng vàng	Trắng vàng	Không có
MT 48	+	Trắng	Xám nhạt	Không có
Khoai tây	+	Trắng	Nâu vàng	Không có

Ghi chú: ++: Sinh trưởng tốt;

+: Sinh trưởng bình thường; ±: Sinh trưởng kém

Việc nuôi cấy cho thấy, sau 14 ngày khuẩn ty khí sinh của biến chủng *S. orientalis* 4912-81-61 trên các môi trường khác nhau đều có màu trắng. Sau đó, xạ khuẩn hình thành bào tử nên có sự thay đổi màu sắc của khuẩn ty khí sinh trên các môi trường Gauze1, ISP-6 (đỏ nhạt), Gauze 2 và ISP-4 (trắng vàng), còn trên môi trường MT48 và môi trường khoai tây thì vẫn là màu trắng, biến chủng không sinh sắc tố tan. Trên môi trường MT48, bề mặt khuẩn lạc biến chủng *S. orientalis* 4912-81-61 nhìn thoáng qua có vẻ nhẵn do khuẩn ty khí sinh bện chặt (hình 1). Biến chủng sinh trưởng tốt trên môi trường này, đây là môi trường có thành phần đơn giản, do đó có thể dùng để hoạt hóa chủng trước khi nhân giống.



Hình 1. Khuẩn lạc của biến chủng *S. orientalis* 4912-81-61 trên môi trường MT48

Để nghiên cứu đặc điểm sinh lý, sinh hóa, biến chủng *S. orientalis* 4912-81-61 được nuôi trên môi trường MT 48 trong 7-14 ngày ở các điều kiện pH, nhiệt độ, nồng độ NaCl... khác nhau. Kết quả cho thấy, biến chủng có thể sinh trưởng trong dải nhiệt độ từ 25 - 37 °C, tối ưu ở 28 - 30 °C và hoàn toàn không phát triển được ở 40°C hoặc cao hơn. Biến chủng sinh trưởng được trong khoảng pH từ 6 đến 9, tốt nhất là ở pH 7. Trong môi trường có pH 5 và 10 chủng sinh trưởng yếu, đồng thời không sinh ra chất kháng sinh. Ở pH thấp hơn 5 chủng ngừng phát triển. Chủng không hình thành sắc tố melanin trên môi trường thạch hữu cơ chứa sắt và có khả năng chịu mặn (NaCl) dưới 6%. Khi được nuôi trên các môi trường sữa đã tách chất béo để xác định khả năng pepton hoá sữa, trên môi trường gelatin để xác định hoạt tính gelatinase, trên môi trường chứa carboxymethyl cellulose (CMC) để thử hoạt tính cellulase, trên môi trường casein để xác định hoạt tính protease và trên môi trường tinh bột để xác định khả năng sinh amylase, kết quả thu được cho thấy biến chủng này có khả năng sinh một số enzym ngoại bào thủy phân các cơ chất nghiên cứu trừ CMC, điều này rất thuận lợi cho việc lựa chọn thành phần môi trường lên men. Nghiên cứu khả năng đồng hóa các nguồn đường cho thấy, biến chủng *S. orientalis* 4912-81-61 có khả năng sử dụng hầu hết các nguồn đường thông dụng (bảng 2).

Bảng 2. Khả năng đồng hóa đường của biến chủng *S. orientalis* 4912-81-61

Nguồn đường	Sinh trưởng
Glucose	++
Sucrose	++
Maltose	±
Lactose	+
Fructose	++
Manitol	++
Raffinose	+
Arabinose	++
Inositol	++
Xylose	-

Ghi chú: ++ : sinh trưởng tốt + : sinh trưởng bình thường
 ± : sinh trưởng kém - : không sinh trưởng

Kết quả nghiên cứu đặc điểm sinh học của biến chủng *S. orientalis* 4912-81-61 được trình bày trên bảng 3.

Bảng 3. Một số đặc điểm sinh học của biến chủng *S. orientalis* 4912-81-61

Các chỉ tiêu	Biến chủng <i>S. orientalis</i> 4912-81-61
Khuẩn lạc trên MT 48	Tròn, đường kính 6 - 8mm, không xé thùy, bề mặt khô, có mấu lồi ở trung tâm
Khuẩn ty khí sinh	Màu trắng, dạng sợi mảnh phân nhánh, bền chặt làm bề mặt khuẩn lạc như màng dẻo
Khuẩn ty cơ chất	Màu trắng
Tạo bào tử	Có
Sử dụng glucose, sucrose	Có
Phân giải cellulose	Không
Phân giải casein	Có
Phân giải gelatin	Có
Khả năng pepton hóa sữa	Có
Thủy phân tinh bột	Có
Hình thành melanin	Không
Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng (°C)	28 - 30
pH tối ưu cho sinh trưởng	7
Khả năng chịu muối (%)	< 6

3.2. Khả năng kháng khuẩn của biến chủng *S. orientalis* 4912-81-61

Đã tiến hành nuôi biến chủng trên môi trường MT48 trong 5 ngày ở 28°C và kiểm tra hoạt tính kháng sinh. Kết quả thu được thể hiện trên bảng 4 cho thấy, biến chủng *S. orientalis* 4912-81-61 có hoạt tính kháng khuẩn mạnh, ức chế được cả vi khuẩn Gram (+) và Gram (-), đặc biệt ức chế mạnh đối với *B. subtilis* ATCC 6633.

Bảng 4. Hoạt tính kháng khuẩn của biến chủng *S. orientalis* 4912-81-61

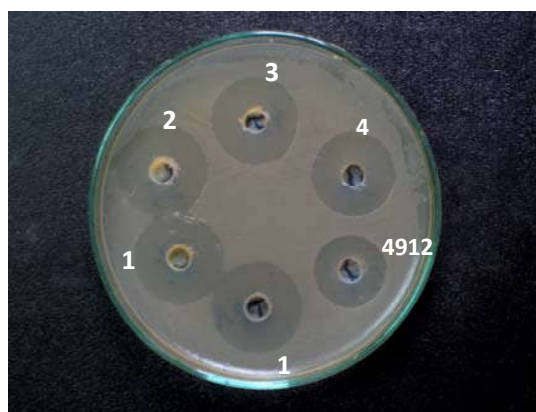
Vi sinh vật kiểm định	Hoạt tính kháng sinh (D-d, mm)
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	23
<i>B. cereus</i> ATCC 21778	21
<i>E. coli</i> PA2	20
<i>S. aureus</i> 208P	20

3.3. Tính ổn định hoạt tính kháng sinh của biến chủng *S. orientalis* 4912-81-61

Tính ổn định của biến chủng được so sánh với chủng gốc qua thời gian bảo quản trong glycerin lỏng 1 năm ở -20°C và trong ống thạch nghiêng 6 tháng ở +4°C. Sau đó lấy ra cấy vào môi trường Gauze 2 để hoạt hóa, pha loãng, cấy gạt

trên môi trường MT 48 đặc, xác định hoạt tính kháng sinh của các khuẩn lạc mới nhận được so với chủng ban đầu theo phương pháp cục thạch. Kết quả cho thấy, việc bảo quản biến chủng 4912-81-61 và chủng gốc trong glycerin không có nhiều biến động, thể hiện tính ổn định của biến chủng. Với bảo quản trong ống thạch nghiêng chỉ khoảng 6 tháng một lần phải kiểm tra lại hoạt tính, hoạt hóa, lựa chọn và cấy chuyển lại. Bảo quản trên MT 48 thạch nghiêng ở $+4^{\circ}\text{C}$ không tốt bằng bảo quản trong glycerin ở -20°C (tốt nhất bảo quản ở -80°C). Hình thái các khuẩn lạc từ các mẫu bảo quản nói chung giống nhau. Quan sát hình thái thấy biến chủng 4912-81-61 không có nhiều thay đổi, sau bảo quản cũng phải qua hoạt hóa, chọn lọc, cấy chuyển lại, để đảm bảo chủng không bị thoái hóa.

Khả năng sinh tổng hợp vancomycin là yếu tố quan trọng nhất đối với biến chủng 4912-81-61, các mẫu sau khi bảo quản lâu ở nhiệt độ thấp được lấy ra hoạt hóa trong môi trường Gauze 2, sau đó lên men trong bình tam giác để xác định hoạt tính kháng sinh. Mẫu 1 là chủng bảo quản trong glycerin (1 năm), mẫu 2 trong ống thạch nghiêng (6 tháng), mẫu 3 được cấy chuyển kế tiếp nhau 10 lần từ mẫu 2 (có thể coi như 10 thế hệ), mẫu 4 cũng từ mẫu 2 cấy chuyển qua 20 lần. Mỗi lần cấy chuyển từ ống giống sang ống mới, nuôi 5 ngày ở 28°C , sau đó bảo quản trong lạnh ($+4^{\circ}\text{C}$) 10 ngày, rồi lại cấy chuyển sang ống thạch nghiêng, nhằm xác định mức độ biến động hoạt tính kháng sinh sau bảo quản và nhân giống qua các thế hệ. Cả 4 mẫu giống được hoạt hóa, nhân giống và lên men để xác định hoạt tính kháng sinh theo phương pháp đục lỗ thạch. Kết quả cho thấy hoạt tính kháng sinh của biến chủng 4912-81-61 rất ổn định, các mẫu bảo quản lâu dài cũng như nhân giống qua nhiều lần vẫn giữ được hoạt tính tương đối như nhau (hình 2). Ngoài ra, các đặc điểm sinh học của biến chủng *S. orientalis* 4912-81-61 như khả năng đồng hóa các loại đường, không có sắc tố tan tiết ra môi trường, khả năng sinh enzym ngoại bào, các điều kiện nhiệt độ và pH tối ưu cho sự phát triển của chủng, khả năng chịu muối NaCl, vẫn được duy trì qua các lần cấy chuyển.



Hình 2. Hoạt tính kháng sinh của biến chủng *S. orientalis* 4912-81-61 sau thời gian bảo quản và qua các lần cấy chuyển

1- Hoạt tính kháng sinh của biến chủng *S. orientalis* 4912-81-61 sau khi bảo quản trong glycerin 1 năm (mẫu 1); 2- sau khi bảo quản trong ống thạch nghiêng 6 tháng (mẫu 2); 3- mẫu được cấy chuyển kế tiếp nhau 10 lần từ mẫu 2 (mẫu 3); 4- mẫu được cấy chuyển kế tiếp nhau 20 lần từ mẫu 2 (mẫu 4); 4912- chủng gốc biến chủng *S. orientalis* 4912.

IV. KẾT LUẬN

1. Biến chủng *Streptomyces orientalis* 4912-81-61 có khả năng sinh tổng hợp vancomycin cao, ức chế được cả vi khuẩn Gram (+) và Gram (-) như *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 21778, *Staphylococcus aureus* 208P và *Escherichia coli* PA2.

2. Hoạt tính kháng sinh của biến chủng ổn định qua thời gian bảo quản 6 tháng đến 1 năm và cấy chuyển.

3. Biến chủng phát triển tốt ở pH 6-8 và nhiệt độ 28-30°C, chịu được NaCl dưới 6%, sử dụng tốt các nguồn đường thông dụng như glucose, saccharose, fructose, lactose,... và có khả năng sinh các enzym thủy phân tinh bột, casein, gelatin, nên sẽ thuận lợi cho việc lựa chọn các nguồn dinh dưỡng khi lên men sản xuất vancomycin trong điều kiện Việt Nam.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện bằng kinh phí của đề tài “Nghiên cứu xây dựng quy trình sản xuất vancomycin hydrochlorid công suất 1kg/mẻ” thuộc “Chương trình Nghiên cứu khoa học công nghệ trọng điểm quốc gia phát triển công nghệ hoá dược đến năm 2020”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Phương Huệ, Chu Thanh Bình, Lê Gia Hy, “Nâng cao khả năng sinh chất kháng sinh vancomycin của chủng *Streptomyces orientalis* 4912 bằng gây đột biến tế bào trần”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, **50**, 3B, tr.150 - 157.
2. Egorov N. X. (Nguyễn Lâm Dũng dịch), 1976, *Thực tập vi sinh vật học*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
3. Hopwood D.A., Bibb M.J., Chater K.F., Kieser T., Bruston C.J., Kieser H.M., Lydiate D.J., Smith C.P. and Ward J.M., 1985, “Genetic manipulation of *Streptomyces*”, *A laboratory manual*, F.Crowe & Sons, Norwich, England, p.35-41.
4. Jung H.M., Kim S.Y., Moon H.J., Oh D.K. and Lee J.K., 2007, “Optimization of culture conditions and scale-up to pilot and plant scale for vancomycin production by *Streptomyces orientalis*”, *Applied Microbiology Biotechnology*, **77**, p.789-795.
5. KCTC Strain Database, <http://kctc.kribb.re.kr/intranet>

6. Sussmuth R.D., 2006, "The chemistry and biology of vancomycin and other glycopeptide antibiotic derivatives", In: Liang X.T., Fang W.S., eds, *Medicinal chemistry of bioactive natural products*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, p.35-52.
7. Shirling E.G., Gottlieb D., 1966, "Methods for characterization of *Streptomyces* species", *Int J Syst Bacteriol*, **16**, p.313-340.
8. Stanley T., Williams M.E., Sharpe and J.G., Holt, 1989, *Bergey's Manual of Systematic bacteriology*, Williams & Wilkins, **4**, p.2452-2492.
9. Kim S.Y., Kim D.S., Jung H.M., Lee J.K., 2008, "Mutant strain of *Amycolaptosis orientalis* and process for preparing vancomycin hydrochloride", *European patent application EP 1959006A1*.

SUMMARY

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF MUTANT STRAIN *Streptomyces orientalis* 4912-81-61 PRODUCING VANCOMYCIN

Vancomycin, which is produced by *Streptomyces orientalis*, is an antibiotic used in clinical treatment against pathogens resistant to many popular antibacterial agents. The mutant strain *Streptomyces orientalis* 4912-81-61 producing high yield of vancomycin was obtained as the result of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine treatment on the protoplasts of original strain *S. orientalis* 4912. In the present work, the mutant strain *Streptomyces orientalis* 4912-81-61 was studied with respect to the biological characteristics. Antibiotic production of this mutant strain was enhanced by 94,3% compared to the original strain. The antibiotic produced by this mutant strain was determined as vancomycin with a anti-microbial spectrum, inhibiting tested strains of genera *Bacillus*, *Staphylococcus* and *Escherichia*. This mutant strain grow at favourable conditions such as pH range of 6-8, temperature of 28-30°C, in medium containing NaCl concentration not more than 6%. The strain *S. orientalis* 4912-81-61 express enzyme activities to degrade casein, gelatin and starch. The fermentation process producing vancomycin by the mutant strain *S. orientalis* 4912-81-61 should be performed more convenient as its abilities of enzyme productivity and utilization of different sugars.

Keyword: Antibiotic, biological characteristics, mutant strain, vancomycin, S. orientalis 4912-81-61.

Nhận bài ngày 05 tháng 01 năm 2013

Hoàn thiện ngày 22 tháng 02 năm 2013

⁽¹⁾ *Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga*

⁽²⁾ *Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam*