

NGHIÊN CỨU TỐI ƯU MÔI TRƯỜNG LÊN MEN CHÙNG *STREPTOMYCES ORIENTALIS* 4912 SINH VANCOMYXIN

NGUYỄN PHƯƠNG NHUỆ, NGUYỄN VĂN HIẾU, LÊ GIA HY

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vancomycin là chất kháng sinh thuộc nhóm glycopeptit, do xạ khuẩn *Streptomyces orientalis* sinh ra, trong cấu trúc chứa một disacarit ở vị trí axit amin thứ 4, là vị trí cho phép gắn phân tử ngoại lai để hình thành nên các vancomycin bán tổng hợp có hoạt tính cao và chọn lọc. Vancomycin có hiệu quả cao khi dùng phối hợp hoặc thay thế kháng sinh nhóm β -lactam để chữa các bệnh nhiễm trùng do các loại vi khuẩn đã nhờn với các kháng sinh thông dụng gây nên như: bệnh nhiễm trùng máu, viêm xương, viêm đường hô hấp... [7, 8]. Hiện nay, vancomycin từ xạ khuẩn *Streptomyces orientalis* đã được sản xuất ở qui mô công nghiệp nhưng hiệu suất còn thấp làm cho giá thành của chất kháng sinh này khá cao. Để giải quyết vấn đề này, ngoài việc nghiên cứu tạo chủng sản có hoạt tính vancomycin cao thì quan trọng khác là tối ưu điều kiện nuôi cấy bao gồm thành phần môi trường, pH, nhiệt độ... Việc lựa chọn thành phần môi trường tối ưu có thể nâng cao sản lượng sinh khối và làm tăng cường tích lũy chất kháng sinh của chủng sản lên nhiều lần [2, 9].

Bài báo này trình bày một số kết quả nghiên cứu tối ưu thành phần môi trường lên men sản xuất vancomycin bởi chủng xạ khuẩn *Streptomyces orientalis* 4912, nhằm thu được lượng kháng sinh cao nhất.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Chủng *Streptomyces orientalis* 4912 và chủng vi sinh vật kiểm định *Bacillus subtilis* ATCC 6633 nhận từ Bộ sưu tập giống của Phòng Công nghệ lên men, Viện Công nghệ sinh học.

Môi trường lên men từ MT1 đến MT12 [3] và các môi trường nhân giống như Gause I [1], A 4, A-4H, TH₄-47, A 12, A 9 [10] và 48 [12] là các môi trường đặc trưng cho nghiên cứu xạ khuẩn.

2.2. Phương pháp

Xác định hoạt tính kháng sinh bằng phương pháp đục lỗ thạch [1]. Dùng thiết bị đục lỗ, đục trên môi trường thạch đã cấy vi sinh vật kiểm định, nhỏ vào lỗ dung dịch lên men cần thử. 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 trong 24 giờ để vi sinh vật kiểm định phát triển. Hoạt tính kháng sinh được xác định bằng đường kính vòng vô khuẩn (mm), vòng càng lớn thì hoạt tính kháng sinh càng cao.

Định lượng chất kháng sinh bằng phương pháp vi sinh vật học theo Dmitreva [1]. Nồng độ dung dịch chất kháng sinh chuẩn và chất kháng sinh nghiên cứu được định lượng theo phương pháp đục lỗ, vòng vô khuẩn càng gần 17 mm càng chính xác, chất kháng sinh chuẩn được pha loãng theo hệ số 2. Tính hiệu số vòng vô khuẩn giữa hai nồng độ liền kề và tra bảng của Dmitreva tìm hiệu số chính, sau đó nhân với hiệu số pha loãng và nồng độ kháng sinh chuẩn sẽ được nồng độ chất kháng sinh nghiên cứu (mcg/ml).

Tối ưu hoá thành phần môi trường theo phương pháp qui hoạch thực nghiệm Box-Wilson [1]. Phương pháp này cho phép nghiên cứu đồng thời tác động của các nguồn dinh dưỡng lên quá trình sinh tổng hợp chất kháng sinh, ngoài ra còn cho phép đánh giá một cách định lượng về mức độ của những ảnh hưởng này.

Để chuẩn bị giống cho lên men sinh tổng hợp kháng sinh, nuôi cấy chủng *S. orientalis* 4912 trong bình tam giác trên máy lắc với tốc độ 220 vòng/phút, ở nhiệt độ 28°C, trong thời gian 36 - 48 giờ, sinh khối đạt 3 - 4 mg/ml. Quá trình lên men, với môi trường đã tối ưu, được thực hiện trên thiết bị Bioflo 110 dung tích 5 lít, pH ban đầu 7,0; tỉ lệ giống bổ sung 4%, tuổi giống 36 - 48 giờ, nhiệt độ nuôi 28°C, độ thông khí 15% (v/v) [6].

Xác định đường khử bằng phương pháp DNSA [4]. Dựa trên phản ứng tạo màu giữa lượng đường khử còn lại trong dịch lên men với thuốc thử dinitrosalicylic acid (DNSA). Từ đồ thị lập được đối với glucoza tinh khiết sẽ tính được hàm lượng đường khử qui về glucoza có trong mẫu.

Xác định sinh khối bằng cách sấy ở nhiệt độ 105°C đến khi khối lượng không đổi [1].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

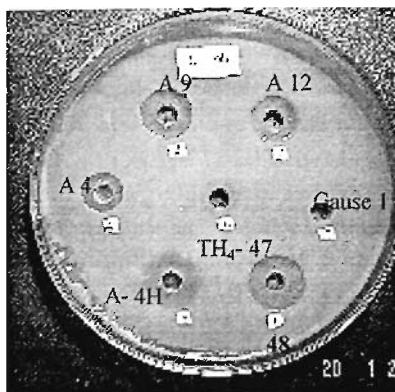
3.1. Lựa chọn môi trường nhân giống và môi trường lên men

Để lựa chọn môi trường nhân giống thích hợp, chủng *S. orientalis* 4912 được nuôi cấy trên một số môi trường như Gause 1, A 4, A- 4H, TH₄- 47, A 12, A 9 và 48 trong 120 giờ, ở 28°C [5]. Kết quả cho thấy, chủng xạ khuẩn này phát triển tốt, ngoài ra còn tạo thành chất kháng sinh ức chế vi sinh vật kiểm định ở mức độ khác nhau (bảng 1 và hình 1). Trên môi trường 48, chủng 4912 sinh trưởng tốt nhất, sinh khối đạt 5,5 mg/ml, do vậy được chọn làm môi trường nhân giống.

Bảng 1. Khả năng sinh trưởng của chủng *S. orientalis* 4912 trên một số môi trường

Môi trường	Sinh trưởng (SK, mg/ml)
Gause 1	4,6
A 4	4,0
A- 4H	4,3
TH ₄ - 47	3,5
A 12	3,3
A 9	4,3
48	5,5

Ghi chú: SK: Sinh khối



Hình 1. Hoạt tính kháng sinh của chủng *S. orientalis* 4912 trên một số môi trường nhân giống

Môi trường lên men được lựa chọn từ 12 môi trường thường dùng để sản xuất kháng sinh từ xạ khuẩn [3]. Kết quả ở bảng 2 cho thấy, chủng 4912 tạo sinh khối và tích lũy chất kháng sinh cao nhất khi được nuôi cấy trên môi trường MT 11, vì thế môi trường này được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 2. Hoạt tính sinh tổng hợp kháng sinh của chủng *S. orientalis* 4912 trên một số môi trường

STT	Tên môi trường	Hoạt tính kháng sinh (ĐKVVK, mm)	Sinh trưởng (SK, mg/ml)
1	MT 1	13	4,6
2	MT 2	12	4,0
3	MT 3	0,0	4,3
4	MT 4	14,5	5,5
5	MT 5	14,3	5,3
6	MT 6	14,4	5,5
7	MT 7	0,0	3,8
8	MT 8	0,0	4,3
9	MT 9	14,1	5,1
10	MT 10	14,0	5,0
11	MT 11	15,5	6,0
12	MT 12	12	4,2

Ghi chú : ĐKVVK : Đường kính vòng vô khuẩn (mm) ; SK : Sinh khối (mg/ml)

3.2. Ảnh hưởng của các thành phần môi trường lên men

Trên cơ sở môi trường MT11, nghiên cứu ảnh hưởng của các thành phần chính là cacbon và nitơ, nhằm tìm ra nguồn dinh dưỡng thích hợp nhất cho quá trình sinh tổng hợp vancomycin bởi chủng *S. orientalis* 4912 [11].

Ảnh hưởng của nguồn cacbon. Chủng *S. orientalis* 4912 được nuôi trên môi trường MT 11, lần lượt thay thế các nguồn cacbon khác nhau. Kết quả trên bảng 3 cho thấy, chủng xạ khuẩn này sử dụng tốt các nguồn cacbon dùng trong thí nghiệm. Khi môi trường có ri đường hoặc sacaroza, hoạt tính sinh kháng sinh và sự sinh trưởng của chủng đạt cao nhất (đường kính vòng vô khuẩn là 16 và 16,5 mm, sinh khối là 6,0 và 6,2 mg/ml). Tuy nhiên, ri đường là phế liệu của ngành đường và thường có thành phần không ổn định, gây khó khăn cho việc tách chiết chất kháng sinh sau này, do vậy sacaroza được lựa chọn là nguồn cacbon cho lên men sinh tổng hợp kháng sinh của chủng *S. orientalis* 4912.

Ảnh hưởng của nguồn nitơ. Trên cơ sở cao nấm men có trong môi trường MT 11, lần lượt thay thế cao nấm men bằng các nguồn nitơ khác như bột đậu tương, cao ngô, pepton.... Kết quả ở Bảng 3 cho thấy, các nguồn nitơ hữu cơ có ảnh hưởng tốt đến sự sinh trưởng và khả năng sinh chất kháng sinh của chủng *S. orientalis* 4912. Sau quá trình nuôi cấy, xác định hoạt tính kháng sinh và sự sinh trưởng của chủng, đường kính vòng vô khuẩn và sinh khối đều có giá trị cao hơn so với khi trong môi trường có các nguồn nitơ vô cơ. Nuôi cấy chủng 4912 trên môi trường có pepton cho kết quả tốt nhất, đường kính vòng vô khuẩn đạt 16mm, sinh khối đạt 6 mg/ml. Như vậy, pepton được lựa chọn làm thành phần thay thế cho cao nấm men ở môi trường MT 11 trong quá trình lên men tiếp theo.

Bảng 3. Ảnh hưởng nguồn nitơ và cacbon tới hoạt tính sinh tổng hợp vancomycin của chủng *S. orientalis* 4912

Nguồn nitơ	Hoạt tính kháng sinh (ĐKVVK, mm)	Sinh trưởng (SK, mg/ml)	Nguồn cacbon	Hoạt tính kháng sinh (ĐKVVK, mm)	Sinh trưởng (SK, mg/ml)
Bột đậu tương	14,4	5,3	Glucoza	15,5	5,5
Trypton đậu tương	15,7	6,0	Maltoza	14,6	4,9
Trypton	15,8	6,0	Sacaroza	16,5	6,2
Pepton	16,0	6,0	Tinh bột tan	15,3	5,3
Cao ngô	11,3	5,8	Galactoza	14,1	4,9
Cazein thủy phân	14,4	4,9	Lactoza	15,4	5,4
(NH ₄) ₂ SO ₄	7,6	3,5	Mannoza	15,3	5,4
NH ₄ Cl	10,4	2,8	Dextrin	13,5	4,5
Cao nấm men	15,8	5,7	Ri đường	16,0	6,0

Ghi chú : ĐKVVK : Đường kính vòng vô khuẩn (mm) ; SK : Sinh khối (mg/ml).

3.3. Tối ưu môi trường lên men theo Box-Wilson

Mục đích tối ưu thành phần môi trường lên men trong thí nghiệm này là tìm tỷ lệ cacbon/nitơ thích hợp, nhằm thu được lượng chất kháng sinh lớn nhất trong thời gian ngắn nhất [11], được thực hiện theo phương pháp thực nghiệm Box-Wilson. Để có thể thực hiện theo phương pháp này, cần phải tìm ra giới hạn trong các khoảng xác định của các yếu tố. Trong thành phần môi trường MT 11, có 3 yếu tố cần xác định được khoảng thay đổi là glucoza, sacaroza và pepton, các yếu tố được giữ nguyên gồm có (g/l): CaCO₃ 2; NaCl 2,5 và pH 7,0. Ba yếu tố cần xác định kí hiệu: x₁: nồng độ sacaroza (g/l); x₂: nồng độ pepton (g/l); x₃: nồng độ glucoza (g/l). Kết quả được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của hàm lượng glucoza, sacaroza và pepton lên khả năng sinh tổng hợp vancomyxin của chủng *S. orientalis* 4912

Hàm lượng glucoza (g/l)	Hoạt tính kháng sinh (ĐKVVK, mm)	Hàm lượng sacaroza (g/l)	Hoạt tính kháng sinh (ĐKVVK, mm)	Hàm lượng pepton (g/l)	Hoạt tính kháng sinh (ĐKVVK, mm)
10	13	10	8	2	15
15	15	15	14	4	16,3
20	17,5	30	17,0	6	17,3
25	15	45	15	8	15
30	12	60	10	10	7,8

Ghi chú : ĐKVVK : Đường kính vòng vô khuẩn (mm).

Số liệu ở bảng 4 cho thấy, khoảng nồng độ của glucoza có ý nghĩa về mặt công nghệ là 15-25 (g/l), của sacaroza là 15 - 45 (g/l) và của pepton là 2 - 8 (g/l), khi tối ưu theo Box-Wilson được chia theo các mức thể hiện ở bảng 5. Trong môi trường nuôi cấy, hàm lượng các nguồn dinh dưỡng này ở ngoài khoảng trên thì hoạt tính sinh tổng hợp kháng sinh của chủng *S. orientalis* 4912 giảm đi. Theo như bảng 4, nồng độ glucoza trong môi trường là 10 hoặc 30 g/l, sau khi nuôi cấy chủng 4912, xác định hoạt tính kháng sinh thì đường kính vòng vô khuẩn chỉ đạt 13 và 12mm, thấp hơn so với khi nuôi cấy chủng xạ khuẩn này trên môi trường có nồng độ glucoza nằm trong khoảng 15 - 25 (g/l). Tương tự với sacaroza và pepton cũng như vậy.

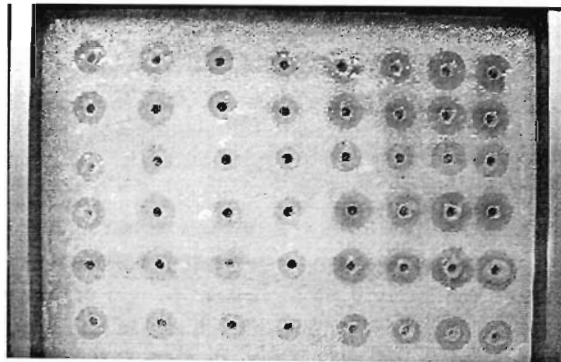
Bảng 5. Mức công nghệ đối với quá trình tối ưu

Mức yếu tố	Nồng độ glucoza (g/l)	Nồng độ sacaroza (g/l)	Nồng độ pepton (g/l)
-	15	15	4
0	20	30	6
+	25	45	8

Kết quả thực nghiệm được đánh giá bằng cách đo vòng vô khuẩn, kí hiệu là y (mm), việc tính ra đơn vị kháng sinh chỉ thực hiện khi tính kết quả cuối. Mỗi thí nghiệm thực hiện qua 3 lần đo, lập ma trận đầy đủ: số thí nghiệm $N = 2^3 = 8$. Theo bảng 6 và hình 2, sự phối hợp của các thành phần môi trường là glucoza, sacaraza và pepton ở nồng độ cao (+) và thấp (-) khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt tới hoạt tính sinh kháng sinh của chủng 4912. Kết quả quá trình thí nghiệm cho thấy, khi nồng độ các thành phần này trong môi trường ở mức thấp (-) thì đường kính vòng vô khuẩn là 19,85 mm. Nhưng chỉ cần thay đổi nồng độ glucoza ở mức cao (+), nồng độ sacaraza và pepton ở mức thấp (-) thì đường kính vòng vô khuẩn thu được lại là 16,3 mm. Dựa trên số liệu bảng 6, quá trình tối ưu tiếp theo sẽ tìm ra một tương quan thích hợp nhất giữa hàm lượng glucoza, sacaraza và peptone trong môi trường nuôi cấy, cho hoạt tính sinh kháng sinh của chủng 4912.

Bảng 6. Ma trận thí nghiệm

STT	x_1	x_2	x_3	Y_1	Y_2	Y_{tb}	S_j^2
1	-	-	-	19,85	19,85	19,85	0
2	-	-	+	16	16,6	16,3	0,18
3	-	+	-	21,5	20,05	20,775	1,052
4	-	+	+	20,4	19,35	19,875	0,55
5	+	-	-	15,9	16,65	16,275	0,28
6	+	-	+	15,6	16,85	16,225	0,78
7	+	+	-	18,3	18,5	18,4	0,02
8	+	+	+	17,4	18,15	17,775	0,28



Hình 2. Vòng vô khuẩn tạo thành khi nuôi cấy chủng *S. orientalis* 4912 trên môi trường MT11 có các thành phần dinh dưỡng phối hợp ở nồng độ khác nhau

* Chuẩn Cochran theo tính toán: $G_{ii} = \frac{\max S_j^2}{\sum S_j^2} = \frac{1,052}{3,142} = 0,3348$; tra bảng chuẩn

Cochran G_b (0,05; f_1 ; f_2), với: 0,05 (mức ý nghĩa), $f_1 = k - 1 = 1$ (k: số thí nghiệm lặp lại), $f_2 = N = 8$ (số thí nghiệm), thì $G_b = 0,6788 > G_{ii}$ nên ma trận đồng nhất.

* Xác định hệ số của mô hình: $b_0 = \frac{\sum \bar{Y}}{N} = 18,3$; $b_1 = -1,14$; $b_2 = 1,147$; $b_3 = -0,766$.

* Kiểm tra sự có nghĩa của các hệ số theo chuẩn Student:

+ Chuẩn Student t tra theo số bậc tự do:

$$F = N \times (k-1) = 8 \times (2-1) = 8, \text{ với mức ý nghĩa } \alpha = 0,05 \rightarrow t = 2,306.$$

+ Phương sai cho từng thí nghiệm: $S_y^2 = \frac{1}{N} \sum S_j^2 = \frac{1}{8} 3,142 = 0,392$.

+ Phương sai cho mỗi lần đo: $S_y^2 = \frac{1}{k} S_y^2 = \frac{1}{2} 0,392 = 0,196$.

+ Phương sai mà các hệ số xác định:

$$S_b^2 = \frac{1}{B} S_y^2 = \frac{1}{4} 0,196 = 0,0484 \rightarrow S_b = 0,22 \quad (B \text{ là số các hệ số kể cả } b_0).$$

+ Xét: $t \times S_b = 2,306 \times 0,22 = 0,51$, thấy: $|b_i| > t \times S_b$ nên các hệ số đều có nghĩa.

+ Lập phương trình hồi quy:

$$Y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 = 22,625 + 0,58 x_1 + 0,75 x_2 + 0,875 x_3.$$

* Kiểm tra sự thích ứng của mô hình ta có: $\sum (Y^{tt} - Y^{tn})^2 = 4$

+ Phương sai thích ứng: $S_{tt}^2 = \left(\frac{1}{N - B'} \right) \sum (Y^{tt} - Y^{tn})^2 = 1$

(B' : số các hệ số có nghĩa $= B = 4$).

+ Mô hình thích ứng khi chuẩn Fisher:

$$F_{tt} < F_b, \text{ với: } F_{tt} = \frac{S_{tt}^2}{S_y^2} = \frac{1}{0,196} = 0,507$$

F_b tra bảng với $f_1 = N - B' = 4$; $f_2 = N = 8$; $\rightarrow F_b = 5,3$; $F_{tt} < F_b \rightarrow$ Mô hình thích ứng.

* Tối ưu hoá: chọn λ_1 : $[15 \div 45]$; λ_2 : $[4 \div 8]$ và λ_3 : $[15 \div 25]$.

Khi đó ta sẽ có $\lambda_1 = 30 \rightarrow |b_1 \cdot \lambda_1| = |-1,14 \times 30| = 34,2$

$$\lambda_2 = 6 \rightarrow |b_2 \cdot \lambda_2| = |1,147 \times 6| = 6,882$$

$$\lambda_3 = 20 \rightarrow |b_3 \cdot \lambda_3| = |-0,766 \times 20| = 15,32.$$

Chọn min $|b_1 \cdot \lambda_1|$ tức $|b_2 \cdot \lambda_2|$ là biến cơ sở với bước nhảy được chọn là $\Delta_2 = 0,2$ như vậy:

$$\Delta_1 = \frac{|b_1 \times \lambda_1|}{|b_2 \times \lambda_2|} \Delta_2 \cong 1; \quad \Delta_3 = \frac{|b_3 \times \lambda_3|}{|b_2 \times \lambda_2|} \Delta_2 \cong 0,5$$

bước nhảy của x_1 (sacaroza) là 1 g/l; x_2 (pepton) là 0,2 g/l; bước nhảy của x_3 (glucoza) là 0,5 g/l. Thực nghiệm theo ma trận tương tự thu được kết quả như trong bảng 7.

Bảng 7. Kết quả tối ưu thành phần môi trường lên men

STT	x ₁	x ₂	x ₃	y ₁	y ₂	y ₃	y _{tb} (mm)
1	30	6,0	20,0	18,5	18,7	18,5	18,6
2	31	6,2	20,5	19	19,2	19,4	19,2
3	32	6,4	21,0	19,6	19,8	19,8	19,7
4	33	6,6	21,5	20,5	20,5	20,3	20,4
5	34	6,8	22,0	21,2	21,5	21,6	21,4
6	35	7,0	22,5	19,3	19	19,2	19,2
7	36	7,2	23,0	18,7	18,6	18,5	18,6

Qua ma trận trên, chủng *S. orientalis* 4912 sẽ sinh tổng hợp kháng sinh cực đại trong khoảng có ý nghĩa công nghệ được chọn với môi trường có thành phần tối ưu như sau (g/l): glucoza 22,0; sacaroza 34,0; pepton 6,8; NaCl 2,5; CaCO₃ 2,0; pH ban đầu 7,0.

3.4. Sinh tổng hợp vancomycin của chủng *S. orientalis* 4912 trên môi trường tối ưu

Quá trình lên men được tiến hành trên thiết bị Bioflo 110 dung tích 5 lít với môi trường MT11 đã tối ưu, kết quả thí nghiệm được trình bày trên bảng 8, trong đó hoạt tính vancomycin của dịch nuôi cấy chủng *S. orientalis* 4912 được tính ra đơn vị mcg/ml. Sau 120 giờ lên men, sinh khối của chủng *S. orientalis* 4912 là 8,8 mg/ml, xác định hoạt tính kháng sinh thu được 1567 mcg/ml (tương đương đường kính vòng vô khuẩn 21,5 mm). Như vậy, trên môi trường tối ưu tạo thành sinh khối và tích lũy chất kháng sinh của chủng xạ khuẩn này đã tăng lên so với khi nuôi trên môi trường gốc (đường kính vòng vô khuẩn đạt 15,5 mm; sinh khối đạt 6,0 mg/ml).

Bảng 8. Sinh tổng hợp vancomycin bởi chủng *S. orientalis* 4912 trên môi trường tối ưu

Chỉ tiêu	Thời gian lên men (giờ)						
	0	24	48	72	96	120	144
Hoạt tính kháng sinh (mcg/ml)	0	0	1080	1345	1534	1567	1523
Sinh khối (mg/ml)	-	-	6,8	7,8	8,6	8,8	8,9

4. KẾT LUẬN

Trong công nghệ sản xuất chất kháng sinh, môi trường lên men đóng vai trò rất quan trọng, ảnh hưởng trực tiếp tới sự hình thành và tích lũy chất kháng sinh. Trên cơ sở môi trường nhân giống 48 và môi trường lên men MT11, kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn cacbon và nitơ cho thấy, hai nguồn dinh dưỡng này có tác động rất lớn tới quá trình sinh tổng hợp vancomycin của chủng *S. orientalis* 4912. Sacaroza và pepton được lựa chọn cho lên men sinh tổng hợp chất

kháng sinh của chủng xạ khuẩn này. Nghiên cứu tối ưu thành phần môi trường MT 11 theo phương pháp qui hoạch thực nghiệm Box-Wilson cho thấy, môi trường lên men cho sinh tổng hợp chất kháng sinh đạt cực đại có thành phần như sau (g/l): glucoza 22; sacaroza 34; pepton 6,8; NaCl 2,5; CaCO₃ 2. Sau 120 giờ nuôi cấy chủng *S. orientalis* 4912 trên môi trường tối ưu, sự tích lũy sinh khối và chất kháng sinh đã tăng lên so với khi nuôi trên môi trường gốc, chất kháng sinh tăng 38,7%, sinh khối tăng 46,6%.

Lời cảm ơn. Công trình này được thực hiện bởi kinh phí của đề tài "Nghiên cứu xây dựng quy trình lên men sản xuất kháng sinh vancomycin" cấp Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các nghiên cứu được tiến hành có sử dụng trang thiết bị của Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. N. X. Egorov - Thực tập vi sinh vật học (Nguyễn Lâm Dũng dịch), Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 1976.
2. H. M. Jung, S. Y. Kim, H. J. Moon, D. K. Oh, J. K. Lee - Optimization of culture conditions and scale-up to pilot and plant scales for vancomycin production by *Amycolatopsis orientalis*, *Appl Microbiol Biotechnol* 77 (2007) 789-795.
3. H. M. Mack, Lawrence and M. M. James - Vancomycin and method for its preparation, Patented Dec 4 (1962) 165-174.
4. G. L. Miller - Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal Chem* 31 (1959) 426-428.
5. Nguyễn Phương Huệ, Nguyễn Văn Hiếu, Lê Gia Hy - Đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn *Streptomyces orientalis* 4912 sinh vancomycin, *Tạp chí Công nghệ sinh học* 2 (4) (2004) 511-516.
6. Nguyễn Phương Huệ, Nguyễn Văn Hiếu, Lê Gia Hy - Ảnh hưởng của điều kiện lên men tới quá trình sinh tổng hợp vancomycin của chủng xạ khuẩn *Streptomyces orientalis* 4912, *Tạp chí Công nghệ sinh học* 6 (4A) (2008) 765-769.
7. E. A. Noris, I. N. Thalia - Mechanism of action of oritavancin and related glycopeptide antibiotics, *FEMS Microbiol Rev.* 26 (2003) 511-532.
8. D. S. Roderich - The chemistry and biology of vancomycin and other glycopeptide antibiotic derivatives. In X. T. Liang, W. S. Fang, eds - Medicinal chemistry of bioactive natural products, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2006, pp. 35-52.
9. F. R. Schmidt - Optimization and scale up of industrial fermentation processes, *Appl Microbiol Biotechnol Mini- rev* (2005) 1-11.
10. B. Vladimir - *Methods in Enzymology*, VXLIII (1975) 100-123.
11. G. E. Yong, L. Yongping, P. Xue-ying, Jin, Z. C. Jian, R. L. Jun - Vancomycin producing strain and optimization of the fermentation medium, *Chinese Journal of Antibiotics* 28 (3) (2003) 134-143.
12. KCTC Strain Database. <http://kctc.kribb.re.kr/intranet>

SUMMARY

MEDIUM OPTIMIZATION FOR IMPROVEMENT OF VANCOMYCIN BIOSYNTHESIS BY *STREPTOMYCES ORIENTALIS* 4912

In fermentation technology for antibiotic production, medium composition plays a crucial role and particularly influences on the biosynthesis and accumulation of antibiotics. In this study, optimization of critical medium components was implemented in order to attain a higher yield of vancomycin biosynthesis by actinomycete *Streptomyces orientalis* 4912. On the basis of inoculum medium 48 and antibiotic fermentation medium MT11 by 4912 strain, the effects of various carbon and nitrogen sources on vancomycin productivity were evaluated. From the results obtained, sucrose and pepton were determined the most effective on vancomycin production. Further optimization of sucrose- and pepton-proportion in MT11 medium by mathematically planned Box-Wilson approach revealed the maximal yield of vancomycin biosynthesis in the medium consisting of glucose 22 g.l⁻¹; sucrose 34 g.l⁻¹; peptone 6.8 g.l⁻¹; NaCl 2.5 g.l⁻¹ and CaCO₃ 2 g.l⁻¹. The results of antibiotic fermentation after 120-hour in the original and optimized media showed that biomass and vancomycin production of the latter were enhanced by 46.6% and 38.7%, respectively.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 12 tháng 3 năm 2009

Viện Công nghệ sinh học,

Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.