

Characterization of actinomyces strain with bioactivity against *Erwinia carotovora* causing soft rot disease on some crops

Nguyen Xuan Canh, Nguyen Thi Khanh, Pham Hong Hien

Abstract

In this study experiments were performed to screen and identify the actinomyces strains that were capable of antagonism to *Erwinia carotovora* causing the soft rot disease on plants. Using the agar diffusion plate method, 05 strains that were capable of antagonism to *Erwinia carotovora* were obtained. The strain number L2.5 had strongest activity with a diameter of 23 mm clear zone of bacteria. The L2.5 strain was capable to produce the straight spore chains after 03 days of culture, non-induced the soluble pigments on ISP-6 medium, growing well at temperatures between 30 - 35 °C and neutral pH, and adapting to low salt concentration medium. It could be used some carbon and nitrogen sources including sucrose, fructose, cellulose, raffinose, meat extract, peptone and KNO₃. Results of 16S rRNA sequence analysis showed that strain L2.5 had a similarity of 99% comparing to *Streptomyces psammotiscus* KP1404. Based on morphology, culture, physiological, biochemical characteristics and molecular biological analyzes we have identified the strain L2.5 belonging to *Streptomyces psammotiscus* species.

Key words: Actinomyces, *Erwinia carotovora*, *Streptomyces* sp., soft rot

Ngày nhận bài: 7/6/2017

Ngày phản biện: 14/6/2017

Người phản biện: TS. Trần Thị Mỹ Hạnh

Ngày duyệt đăng: 25/6/2017

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY, MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN GL30

Nguyễn Văn Giang¹, Đinh Văn Lợi¹, Phạm Hồng Hiến²

TÓM TẮT

Mục đích của thí nghiệm này là khảo sát ảnh hưởng của trạng thái nuôi (tĩnh, lắc) và các nguồn carbon, nitơ, nhiệt độ, pH môi trường nuôi cấy tới khả năng sinh trưởng và khả năng kháng khuẩn của chủng xạ khuẩn GL30. Chủng xạ khuẩn GL30 đối kháng mạnh nhất với 3 chủng vi sinh vật gây bệnh là *Bacillus cereus* ATCC-11778, *Escherichia coli* VTCC-B-482, *Staphylococcus aureus* VTCC-B-658. Khi nuôi chủng xạ khuẩn GL30 trong bình tam giác (V=250 ml) với các nguồn carbon và nitơ khác nhau, giá trị pH môi trường nuôi ban đầu từ 3 - 11, tại các nhiệt độ (25, 30, 40, 50°C), kết quả cho thấy hoạt tính kháng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* VTCC-B-658 của chủng GL30 đạt cao nhất sau 4 ngày nuôi cấy ở điều kiện lắc. Chủng GL30 sinh tổng hợp chất kháng khuẩn và sinh trưởng tốt tại pH 6 - 8, nhiệt độ 30°C, lắc 150 vòng/phút, thể tích dịch nuôi cấy/thể tích môi trường là 20%. Bọt ngô 2%, pepton 2% là nguồn cacrbon và nitơ tốt nhất cho chủng GL30 sinh trưởng và sinh chất kháng khuẩn.

Từ khóa: Trạng thái nuôi cấy, môi trường dinh dưỡng, khả năng đối kháng, *Streptomyces*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ô nhiễm môi trường sống đang tác động trực tiếp đến sức khỏe con người, đặc biệt làm gia tăng rất nhiều bệnh truyền nhiễm do vi sinh vật gây ra. Hơn nữa, các vi sinh vật gây hại không ngừng biến đổi để thích nghi với môi trường và có khả năng kháng lại chất diệt khuẩn. Điều này đã đặt ra thách thức trong nghiên cứu phát hiện và phân tích những loại hợp chất kháng khuẩn mới. Trong số các vi sinh vật sinh chất kháng khuẩn đã biết, xạ khuẩn, đặc biệt là các loài thuộc chi *Streptomyces*, đóng vai trò hàng đầu và được xem là nguồn sản xuất chất kháng khuẩn nhiều nhất (Intra *et al.*, 2011). Tuy nhiên, hàm lượng

kháng khuẩn thu được phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện nuôi cấy và môi trường dinh dưỡng (Gesheva *et al.*, 2004).

Quá trình tổng hợp các hợp chất trao đổi chất thứ cấp chịu tác động rất lớn bởi thành phần môi trường (nguồn C, N và P), tốc độ sinh trưởng, nhiệt độ, pH và tốc độ cung cấp ôxi (Sánchez *et al.*, 2010). Trong đó, C và N có vai trò quan trọng trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật, chúng cung cấp năng lượng và các tiền chất để vi sinh vật trao đổi chất, tạo sinh khối và sinh tổng hợp các hợp chất trao đổi thứ chất (Wang *et al.*, 2010). Trong nghiên cứu này, một số chủng xạ khuẩn có khả năng sinh chất diệt khuẩn đã được

¹ Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

phân lập và tuyển chọn tại địa bàn huyện Gia Lâm. Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy đã được khảo sát nhằm cải thiện mức độ sinh tổng hợp chất kháng khuẩn từ xạ khuẩn. Đây là cơ sở cho nghiên cứu thu nhận chất kháng khuẩn, hướng tới sản xuất thuốc trong tương lai.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các mẫu đất được thu thập ở độ sâu từ 5 - 10 cm tại một số khu vực thuộc huyện Gia Lâm - Hà Nội. Chúng vi sinh vật kiểm định, bao gồm *Bacillus cereus* ATCC-11778, *Escherichia coli* VTCC-B-482, *Staphylococcus aureus* VTCC-B-658, *Salmonella typhimurium* VTCC-B-480, *Shigella flexneri* VTCC-B-479, *Listeria monocytogenes* được cung cấp từ khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

Môi trường nuôi xạ khuẩn: Môi trường Gause I (g/l): tinh bột tan 20 g, KNO_3 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, K_2HPO_4 0,5 g, FeSO_4 0,01 g, NaCl 0,5 g, agar 20 g, pH 7,0 - 7,2. Môi trường Starch Nitrate Broth (g/l): starch, 20 g; NaNO_3 2 g; K_2HPO_4 1 g; MgSO_4 0,5 g; KCl, 100 g; 1ml dung dịch muối kim loại vết, gồm $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/100 ml); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/100 ml); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/100 ml), pH 7,1 $\pm$ 0,2 at 25°C.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp phân lập và đánh giá khả năng sinh kháng khuẩn: Chúng xạ khuẩn được phân lập trên môi trường Gause I theo phương pháp của Vinogradkii (1952) (trích theo Nguyễn Thành Đạt, 2000). Khả năng đối kháng của chủng xạ khuẩn với vi sinh vật kiểm định được tiến hành dựa theo phương pháp của Nguyễn Lâm Dũng và cộng tác viên (1997).

- Phương pháp khảo sát một số đặc điểm sinh học chủng xạ khuẩn: Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn được xác định dựa trên các đặc điểm nuôi cấy, bao gồm màu sắc của khuẩn ty khí sinh, màu sắc của khuẩn ty cơ chất, khả năng sinh sắc tố tan (Tresner and Backus, 1963) và sự hình thành sắc tố melanin trên hệ thống môi trường ISP.

- Phương pháp khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, tỷ lệ dịch nuôi cấy/thể tích bình: Xạ khuẩn được nuôi trong môi trường nhân giống cấp 1 (w/v): 1% yeast extract; 1% dextrose dạng lỏng (pH 7,0). Hút 10ml dịch nuôi bổ sung vào 100 ml môi trường Starch Nitrate Broth (SNB) (pH 6,8 - 7,0) chứa trong bình tam giác (V= 250 ml). Các bình này được đặt

ở hai trạng thái tĩnh và lắc 150 vòng/phút, với dải nhiệt độ 25 - 50 °C và pH 3 - 11. Sau 3, 4, 5, 6, 7, 9 ngày nuôi tiến hành xác định khả năng sinh chất kháng khuẩn (Nguyễn Lâm Dũng và ctv., 1997) và sinh khối khô (Oskay, 2011). Ảnh hưởng của tỷ lệ dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn/thể tích bình được xác định dựa theo nghiên cứu trước của Nguyễn Văn Hiếu và cộng tác viên (2012). Môi trường SNB được bổ sung vào bình tam giác 250ml với thể tích tương ứng là 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40% thể tích bình. Tiếp theo, 10% giống cấp 1 được bổ sung và nuôi ở trạng thái nhiệt độ, pH tối ưu. Trọng lượng sinh khối khô và hoạt tính kháng khuẩn được xác định vào ngày nuôi cấy tối ưu.

- Phương pháp khảo sát ảnh hưởng của nguồn C và N: Xạ khuẩn được nuôi khởi động 3 ngày trong môi trường nhân giống cấp 1 dạng lỏng (w/v): 1% yeast extract; 1% dextrose, pH 7. Dịch nuôi cấy sau đó được chuyển sang môi trường SNB với các nguồn C và N khác nhau. Hàm lượng tinh bột được thay thế bằng các nguồn đường, như bột gạo, bột đao, bột ngô với tỷ lệ thay thế 2%. Môi trường chứa 2% tinh bột là đối chứng dương, môi trường không bổ sung nguồn C là đối chứng âm. Tiếp theo, NaNO_3 trong môi trường SNB được thay thế bằng các nguồn N khác, như peptone, cao thịt bò, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 , urea, bột đậu tương, bã đậu và bột canola. Môi trường chứa 0,2% NaNO_3 là đối chứng dương, môi trường không bổ sung nguồn N là đối chứng âm. Hoạt tính kháng khuẩn được xác định bởi đường kính vòng đối kháng với *Staphylococcus aureus* VTCC-B-658.

2.3. Thời gian và địa điểm và nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam từ tháng 3 đến tháng 12 năm 2014.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn thu thập

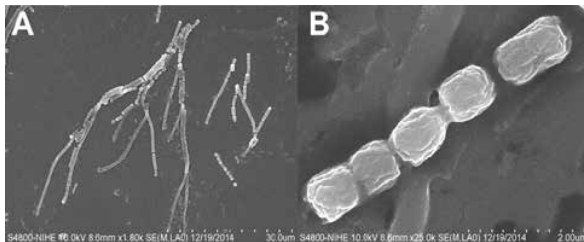
Từ các mẫu đất thu thập tại địa bàn Gia Lâm - Hà Nội đã phân lập được các chủng xạ khuẩn với đặc điểm hình thái và màu sắc khuẩn lạc khác nhau trên môi trường Gause I. Các chủng này sau đó đã được kiểm tra khả năng kháng vi sinh vật kiểm định bằng hai phương pháp thổi thạch và khuếch tán đĩa thạch. Kết quả thu được 4 chủng có hoạt tính mạnh với đường kính vòng kháng khuẩn từ 2 - 18 mm (Bảng 1). Chủng GL30 có biểu hiện hoạt tính mạnh nhất nên được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 1. Hoạt tính kháng vi sinh vật của 4 chủng xạ khuẩn được tuyển chọn

Chủng	Hiệu quả ức chế vi sinh vật kiểm định (đường kính vòng kháng khuẩn, mm)											
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. typhimurium</i>		<i>S. flexneri</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>B. cereus</i>	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
VS15	11	10	10	10	4	7	8	10	4	4	4	5
VS18	5	5	13	17	2	4	9	13	5	5	3	3
VS28	5	4	16	20	3	5	14	16	4	5	4	6
GL30	9	10	15	18	5	6	12	12	6	6	2	2

Ghi chú: I - phương pháp thời thạch; II - phương pháp khuếch tán đĩa thạch

Khuẩn lạc của chủng GL30 có kích thước từ 4 - 6 mm, bề mặt khuẩn lạc khô, lõm ở tâm, hình phóng xạ và được bao phủ bởi nhiều lớp khuẩn ty khí sinh màu nâu trắng. Khuẩn ty cơ chất có màu vàng nhạt sau 7 ngày nuôi cấy. Bên cạnh đó, khuẩn ty của GL30 là khí sinh dạng thẳng, phân nhánh, không bị đứt, cuống sinh bào tử thẳng, bào tử có bề mặt trơn, kích thước khoảng 0,7 - 1.37 × 0,6 - 0,9 μm (Hình 1). Màu sắc hệ sợi khí sinh và cơ chất của chủng GL30 khi nuôi cấy trên các môi trường hầu như không có sự thay đổi lớn. Sau 21 ngày, màu sắc khuẩn lạc hầu như không thay đổi. Trên hệ thống môi trường Gause - I, ISP, sau thời gian 7, 14 và 21 ngày nuôi cấy, chủng GL30 có màu xám, xám trắng, trắng. Đặc biệt, khảo sát khả năng sinh sắc tố melanin trên môi trường ISP 6, không có sự thay đổi màu rõ rệt qua các ngày nuôi cấy được ghi nhận. Kết quả cho thấy, chủng xạ khuẩn GL30 không có khả năng sinh sắc tố melanin.

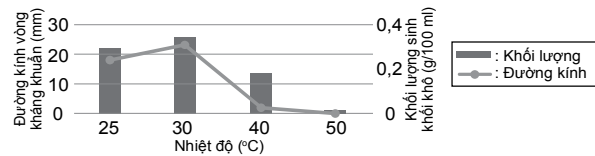


Hình 1. Hình thái chuỗi bào tử của chủng xạ khuẩn GL30 (A × 1800); (B × 25000)

3.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến sinh trưởng và sinh tổng hợp chất kháng khuẩn của chủng xạ khuẩn GL30

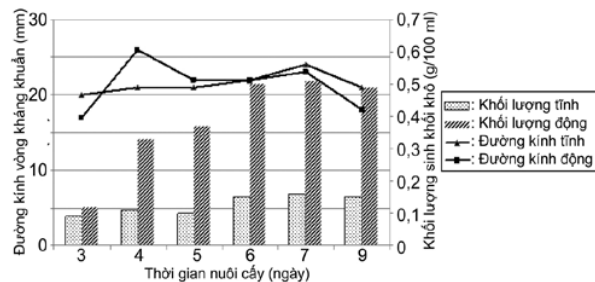
Khi nuôi ở 30°C, GL30 sinh chất kháng khuẩn mạnh nhất với đường kính vòng đối kháng *S. aureus* VTCC-B-658 lên tới 23 mm. Ở 25 và 40°C, chủng GL30 cho kích thước vòng kháng khuẩn lần lượt là 18 và 2 mm (Hình 2). Chủng GL30 không sinh trưởng tại 50°C. Như vậy, dải nhiệt độ từ 25 - 30°C thích hợp cho chủng xạ khuẩn GL30 sinh trưởng và sinh chất kháng khuẩn. Trước đó, Sunita Bundale và cộng tác

viên (2015) cũng đã kết luận rằng nhiệt độ 30°C là thích hợp nhất với chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. phân lập từ đất.



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng và sinh kháng khuẩn của chủng GL30

Chủng GL30 sau 3 - 9 ngày nuôi ở trạng thái lầy và tĩnh đã có biểu hiện sai khác rõ rệt về khả năng sinh chất kháng khuẩn và khối lượng sinh khối khô. Khi nuôi lầy, hoạt tính của chủng GL30 xuất hiện ngay từ ngày nuôi cấy thứ 3, sau 4 ngày đường kính vòng đối kháng với *S. aureus* VTCC-B-658 đạt 26 mm. Chủng GL30 sinh trưởng cực đại với lượng sinh khối khô lên tới 0,51 g/100 ml sau 7 ngày nuôi (Hình 3), sau đó giảm dần từ ngày thứ 9. Các chủng xạ khuẩn trong nghiên cứu của Sunita Bundale và cộng tác viên (2015) cũng biểu hiện tính kháng khuẩn mạnh nhất sau 4 ngày nuôi và duy trì trong khoảng 10 ngày.

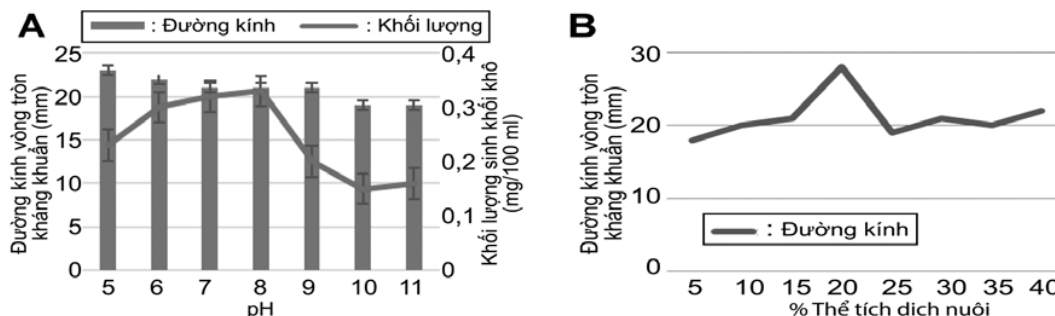


Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng và khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng GL30

Khi được nuôi trong môi trường với dải pH từ 5 - 11 (Hình 4.A), chủng GL30 có thể sinh trưởng và biểu hiện hoạt tính kháng *S. aureus* VTCC-B-658 tương đối mạnh (đường kính vòng kháng khuẩn từ

19 - 23 mm). Trước đó, Ababutain và cộng tác viên (2013) đã khẳng định xạ khuẩn có thể sinh trưởng tốt tại các giá trị pH này. Tại pH 5, chủng xạ khuẩn GL30 sinh trưởng chậm, tuy nhiên hoạt tính đối kháng mạnh, đường kính vòng kháng khuẩn đạt 23 mm. Tại pH 6 - 8, sinh khối của chủng này cao nhất từ 0,30 -

0,33 g/100 ml, đường kính vòng kháng khuẩn đạt 21 - 22 mm. Khi tiếp tục tăng pH, hoạt tính đối kháng của chủng GL30 không tăng và có khuynh hướng giảm. Kết quả này cũng đã được ghi nhận trước đó trên các nhóm xạ khuẩn khác (Oskay, 2011; Nguyễn Văn Hiếu và *ctv.*, 2012; Sunita Bundale *et al.*, 2015).

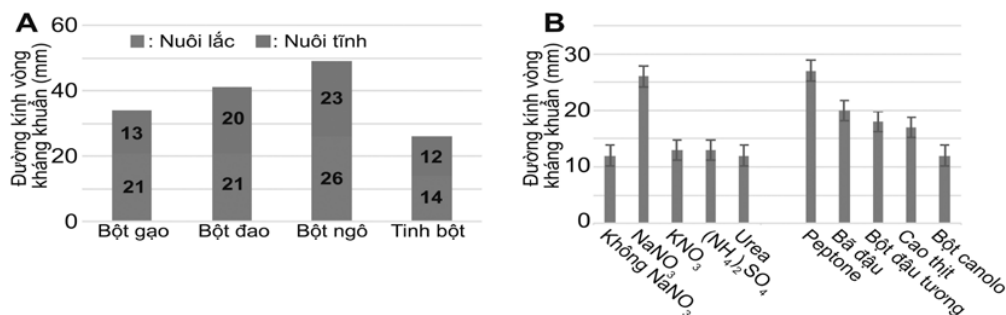


Hình 4. Ảnh hưởng pH môi trường (A) và độ thông khí (B) đến khả năng sinh trưởng, sinh tổng hợp chất kháng khuẩn của chủng xạ khuẩn GL30

Bên cạnh đó, nuôi chủng xạ khuẩn GL30 trên môi trường SNB và thay đổi thể tích môi trường lên men đã ghi nhận sự ảnh hưởng đến khuếch tán ôxi không khí vào môi trường nuôi. Kết quả thí nghiệm cho thấy với lượng môi trường lên men chiếm 20% thể tích bình sẽ cho hiệu quả tổng hợp chất kháng khuẩn cao nhất, vòng kháng khuẩn tương ứng với chủng *S. aureus* VTCC-B-658 là 28 mm (Hình 4.B). Kết quả này có sự sai khác so với ghi nhận trước đó của Nguyễn Văn Hiếu và cộng tác viên (2012) khi đánh giá ảnh hưởng của độ thông khí tới hoạt tính kháng khuẩn của chủng xạ khuẩn HLD 3.16.

3.3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nguồn C và N

Trong số các nguồn C thí nghiệm, bột ngô và tinh bột là 2 nguồn hydratcacbon thích hợp nhất cho chủng GL30 sinh trưởng và sinh chất kháng khuẩn. Đặc biệt, khi nuôi trong môi trường có bột ngô, kích thước đường kính vòng kháng khuẩn của chủng GL30 lên tới 26 mm (Hình 5.A). Bột ngô chứa các thành phần protein, lipid, tinh bột, đường, chất xơ ở vỏ nội nhũ và cả trong phôi, vì vậy nó là nguồn chất dinh dưỡng thích hợp cho vi sinh vật sinh trưởng. Gần đây, nhóm nghiên cứu của Silva cũng kết luận bột ngô và cao nấm men thích hợp với chủng xạ khuẩn No. 01 (Silva *et al.*, 2012).



Hình 5. Ảnh hưởng của các nguồn carbon (A) và các nguồn nitơ (B) đến hoạt tính kháng khuẩn của chủng GL30

Trên các môi trường với các nguồn N vô cơ và hữu cơ khác nhau, chủng GL30 đều có thể sinh trưởng và biểu hiện hoạt tính kháng khuẩn. Trong đó, pepton và NaNO₃ thích hợp cho chủng GL30 sinh tổng hợp chất kháng khuẩn với kích thước vòng kháng khuẩn lớn nhất, trong đó nguồn pepton cho kích thước lên đến 27 mm (Hình 5.B). Kết quả này cũng được ghi nhận trong một số nghiên cứu trước đó (Oskay,

2011; Nguyễn Văn Hiếu và *ctv.*, 2012) trong các thí nghiệm trên đối tượng *Streptomyces* sp. KGG32 và HLD 3.16. Tuy nhiên Gao và cộng tác viên (2009) lại công bố nguồn nitơ tốt nhất cho chủng xạ khuẩn *Streptomyces avermitilis* 14-12A là cao nấm men. Nghiên cứu này sẽ được tiếp tục nhằm nghiên cứu khả năng thu nhận chất kháng khuẩn, hướng tới sản xuất thuốc trong tương lai.

IV. KẾT LUẬN

Đã phân lập được 4 chủng xạ khuẩn từ mẫu đất thu tập tại địa bàn Gia Lâm - Hà Nội. Trong đó, chủng xạ khuẩn GL30 có hoạt tính kháng khuẩn cao, biểu hiện ở ngày nuôi cấy thứ 3 và đạt cực đại sau 4 ngày nuôi trong điều kiện nuôi lắc 150 vòng/phút tại nhiệt độ 30°C, pH 6 - 8.

Chủng GL30 sinh trưởng tốt ở ngưỡng nhiệt độ từ 25 - 40°C, tốt nhất tại 30 °C, pH 6 - 8, thể tích dịch nuôi cấy/thể tích bình là 20%, sinh khối cực đại đạt từ 0,30 - 0,33 g/100 ml, đường kính vòng kháng khuẩn đạt 21 - 22 mm.

Bột ngô và pepton đã được xác định là nguồn C và N thích hợp nhất cho chủng xạ khuẩn GL30 phát triển. Hai nguồn này có tiềm năng thay thế cho tinh bột và NaNO₃ có trong môi trường Starch Nitrate Broth.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Văn Ty, Nguyễn Đình Quỳ, 1997. *Vi sinh vật học* - tập II. Nhà xuất bản Đại học và Trung học chuyên nghiệp. Hà Nội.
- Nguyễn Thành Đạt, 2000. Sinh học vi sinh vật, Nhà xuất bản Giáo dục.
- Nguyễn Văn Hiếu, Nguyễn Phương Huệ, Vũ Thị Hạnh Nguyên, Phan Thị Hồng Thảo, Phạm Thanh Huyền, Phí Quyết Tiến, Lê Gia Hy, 2012. Nghiên cứu chủng xạ khuẩn HLD 3.16 có hoạt tính kháng khuẩn phân lập từ vùng ven bờ biển Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 50(5): 581-593.
- Ababutain, I.M., Aziz, Z.K.A., AL-Meshhen, N.A., 2013. Optimization of environmental and nutritional conditions to improve growth and antibiotic productions by *Streptomyces* sp. isolated from Saudi Arabia soil. *Int Res J Microbiol*, 4(8): 179-187.
- Da Silva, I.R., Martins, M.K., Carvalho, C.M., de Azevedo, J.L., de Lima Procópio, R.E., 2012. The effect of varying culture conditions on the production

- of antibiotics by *Streptomyces* spp., isolated from the Amazonian soil. *Ferment Technol*, 1(105): 1-3.
- Gao, H., Liu, M., Liu, J., Dai, H., Zhou, X., Liu, X., Zhuo, Y., Zhang, W., Zhang, L., 2009. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology. *Bioresour Technol*, 100(17): 4012-4016.
- Gesheva, V., Ivanova, V., Gesheva, R., 2004. Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiological*, 160(3): 243-248.
- Intra, B., Mungsuntisuk, I., Nihira, T., Igarashi, Y., Panbangred, W., 2011. Identification of actinomycetes from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum* spp, the causative agent of anthracnose disease. *BMC Research Notes*, 4: 98.
- Oskay M., 2011. Effects of some environmental conditions on biomass and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp., KGG32. *Int J Agric Biol*, 13(3): 317-324.
- Sánchez, S., Chavez, A., Forero, A., Garcia-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., Rocha, D., Sánchez, B., Avalos, M., Guzman-Trampe, S., Rodriguez-Sanoja, R., Langley, E., Ruiz, B., 2010. Carbon source regulation of antibiotic production. *J. Antibiot.*, 63(8): 442-459.
- Sunita, B., Begde, D., Nashikkar, N., Kadam, T., Upadhyay, A., 2015. Optimization of Culture conditions for production of bioactive metabolites by *Streptomyces* spp. isolated from soil. *Adv Microbiol*, 5(6): 441-451.
- Tresner H. D., Backus E. J., 1963. System of color wheels for *streptomycete* taxonomy. *Applied microbiology*, 11(4): 335-338.
- Wang, X., Huang, L., Kang, Z., Buchenauer, H., Gao, X., 2010. Optimization of the fermentation process of actinomycete strain Hhs.015T. *J. Biomed Biotechnol*, 2010: 1-10.

Effects of cultural and nutritional conditions on growth of new isolated GL30 *Streptomyces* strain

Nguyen Van Giang, Dinh Van Loi, Pham Hong Hien

Abstract

The purpose of the present study was to survey the effects of some cultural conditions, including temperature, pH, different resources of C and N, the culture medium / flask's volume ratio, cultural status (static and shaking) on growth and antibacterial metabolite production of *Streptomyces* GL30 strain, isolated from different soil samples. Strain GL30 exhibited antagonistic ability to three pathogens: *Bacillus cereus* ATCC-11778, *Escherichia coli* VTCC-B-482 and *Staphylococcus aureus* VTCC-B-658. Antibacterial activity of *Streptomyces* GL30 strain was evaluated based on the diameter of inhibition zone of pathogenic microorganisms. The results showed that the antibacterial activity of GL30 strain reached highest after 4 days of growth under shaking conditions, the temperature of 30 °C, pH 6-8 and culture media/ flask's volume was 20%. Cornstarch of 2%, peptone 2% was the best carbon and nitrogen source for growth and antibacterial production of strains GL30. The results also showed that strain GL30 was a potential soil microorganism with antimicrobial activity and may be used for biotechnological purposes

Key words: Cultural conditions, nutrient conditions, antimicrobial activity, *Streptomyces*

Ngày nhận bài: 10/7/2017

Ngày phản biện: 13/7/2017

Người phản biện: TS. Nguyễn Xuân Cảnh

Ngày duyệt đăng: 27/7/2017

ẢNH HƯỞNG CỦA NHIỆT ĐỘ SẤY VÀ CHẾ ĐỘ NGÂM CHIẾT TỚI SỰ BIẾN ĐỔI THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ CẢM QUAN CỦA GIÁ THỂ SAU THU HOẠCH ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO

Nguyễn Thị Thanh Thuý¹, Phí Quyết Tiến²

TÓM TẮT

Đông trùng hạ thảo (ĐTHT) có tác dụng tăng cường sức khỏe, chống ung thư, chống viêm nhờ một số hoạt chất sinh học như adenosine và cordycepin chứa trong nó. Thành phần này thay đổi tùy thuộc vào nhiều yếu tố trong đó có môi trường nuôi cấy và phương thức xử lý nhiệt. Ngoài quả thể là thành phần chính được thu nhận, giá thể sau thu hoạch (đế) của ĐTHT hiện mới chỉ được sấy khô, sử dụng ở dạng thô. Nghiên cứu này nhằm tìm ra được nhiệt độ sấy khô và nhiệt độ ngâm chiết tới sự biến đổi hoạt chất và tính chất cảm quan. Hai loại giá thể sau thu hoạch sử dụng được nuôi trên môi trường bán tổng hợp (MT1) có hàm lượng adenosine và cordycepin lần lượt là 0,34 mg/g; 2,34 mg/g và môi trường tự nhiên (MT2) với hàm lượng hai hoạt chất này đạt 0,36 mg/g; 2,71 mg/g. Sấy ở 70°C cho hoạt chất thu được là cao nhất với điểm cảm quan xếp loại khá. Chế độ ngâm chiết cho hàm lượng hoạt chất và cảm quan tốt nhất là 90°C - 15 phút và 90°C - 20 phút cho đế MT1; 95°C - 10 phút cho đế MT2.

Từ khoá: Adenosine, cordycepin, đế, đông trùng hạ thảo, giá thể sau thu hoạch

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*), là một loại dược liệu quý có nhiều tác dụng chữa bệnh, tốt cho sức khỏe và phù hợp với nhiều lứa tuổi. Cordycepin và adenosine là hai hợp chất quan trọng nhất dùng để đánh giá chất lượng nguyên liệu này. Cordycepin chỉ có trong đông trùng hạ thảo, đóng vai trò quan trọng trong việc hỗ trợ điều trị ung thư (Fan *et al.*, 2012, Peter *et al.*, 2008), chống viêm (Shashidhar *et al.*, 2013), bảo vệ gan, phổi (Bueriz *et al.*, 2005), bảo vệ thận và giảm chấn thương lách do tiểu đường (Ma *et al.*, 2015). Adenosine có tác dụng chống viêm, tác dụng tốt trên phổi, hệ tim mạch, tuần hoàn và thần kinh trung ương (Hori *et al.*, 1991).

Đông trùng hạ thảo gồm phần quả thể và phần giá thể sau thu hoạch (đế). Phần quả thể đang được quan tâm rất nhiều trong khi đế dù chứa nhiều hoạt chất sinh học nhưng chưa được sử dụng hiệu quả.

Trong đế vẫn còn cơ chất môi trường giàu dinh dưỡng và hoạt chất. Lượng hoạt chất phụ thuộc nhiều yếu tố trong đó có môi trường nuôi cấy và điều kiện xử lý nhiệt. Đế khô mới chỉ được ứng dụng để trích ly lấy hoạt chất hay bổ sung vào các sản phẩm như cháo, rượu hay ủ uống như trà, tuy nhiên điều kiện ngâm chiết như thế nào để đạt được hàm lượng hoạt chất cao nhất cũng chưa được nghiên cứu nhiều. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của hai môi trường nuôi cấy tạo đế: môi trường bán tổng hợp (MT1) và môi trường tự nhiên (MT2); chế độ gia nhiệt khô (sấy) và nhiệt ẩm (ngâm chiết) tới sự biến đổi lượng hoạt chất và tính chất cảm quan

của sản phẩm sau sấy, của dịch chiết được quan tâm nhằm để xuất điều kiện tác động phù hợp sao cho hàm lượng hoạt chất cordycepin và adenosine được giữ lại nhiều nhất và chất lượng cảm quan tốt nhất. Đây cũng là cơ sở để khuyến cáo những ứng dụng về sau.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Để đông trùng hạ thảo nuôi trên môi trường MT1 gồm thành phần chính là: Gạo lứt, peptone, glucose, vi lượng, nhộng tằm, trứng, nước cốt dừa, khoai tây, vitamin...; Môi trường MT2 gồm thành phần chính là gạo lứt, nhộng tằm, trứng, nước cốt dừa, khoai tây được cung cấp bởi Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Khoa Công nghệ sinh học - Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Để tươi sau khi thu về được tiến hành thí nghiệm trong vòng 24 giờ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

- Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy tới hàm lượng hoạt chất và chất lượng cảm quan của đế đông trùng hạ thảo. Yếu tố phi thí nghiệm: Đế đông trùng hạ thảo nuôi ở môi trường MT1 và MT2. Yếu tố thí nghiệm: Nhiệt độ sấy đối lưu lần lượt là 50, 60, 70, 80°C. Sấy cho tới khối lượng không đổi. Chỉ tiêu theo dõi: Độ ẩm, lượng hoạt chất và cảm quan.

- Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của chế độ ngâm chiết tới hàm lượng hoạt chất và chất lượng cảm quan của dịch chiết đông trùng hạ thảo. Để đông

¹ Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam