

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

-----

**HOÀNG THỊ NƯƠNG**

**NGHIÊN CỨU THU NHẬN VANCOMYCIN TỪ MÔI TRƯỜNG  
LÊN MEN CHỦNG XẠ KHUẨN *S. orientalis***

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC  
*Chuyên ngành: CÔNG NGHỆ SINH HỌC*

**THÁI NGUYÊN - 2015**

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

-----

**HOÀNG THỊ NƯƠNG**

**NGHIÊN CỨU THU NHẬN VANCOMYCIN TỪ MÔI TRƯỜNG  
LÊN MEN CHỦNG XẠ KHUẨN *S. orientalis***

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC  
*Chuyên ngành: CÔNG NGHỆ SINH HỌC*

Mã số: 60420201

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC  
**TS. Nguyễn Phương Huệ**

**THÁI NGUYÊN – 2015**

## LỜI CAM ĐOAN

*Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu do chính tôi thực hiện. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn này là trung thực và chưa có ai công bố trong bất cứ công trình nào khác.*

*Thái Nguyên, ngày 20 tháng 9 năm 2015*

**Tác giả**

**Hoàng Thị Nương**

## LỜI CẢM ƠN

*Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc nhất tới TS. Nguyễn Phương Huệ - phó trưởng phòng Công nghệ lên men - Viện công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam đã định hướng nghiên cứu, tận tình hướng dẫn và dìu dắt tôi trong suốt quá trình thực hiện và hoàn thành luận văn.*

*Tôi xin chân thành cảm ơn các cán bộ Phòng Công nghệ lên men, Viện Công nghệ sinh học đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình nghiên cứu. Tôi xin chân thành cảm ơn những tình cảm quý báu đó.*

*Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn tới các thầy cô Khoa Khoa học Sự Sống, Trường Đại học Khoa học đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu.*

*Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đến gia đình và bạn bè, những người luôn bên tôi, động viên, góp ý và tạo điều kiện tốt nhất cho tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu.*

*Thái Nguyên, ngày 20 tháng 9 năm 2015*

**Tác giả**

**Hoàng Thị Nương**

# MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN

LỜI CẢM ƠN

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

DANH MỤC CÁC BẢNG

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ VÀ ĐỒ THỊ

MỞ ĐẦU.....	1
1. Đặt vấn đề .....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu.....	2
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....	3
1.1. Giới thiệu về chất kháng sinh vancomycin.....	3
1.1.1. Lịch sử phát triển và ứng dụng trong điều trị bệnh của vancomycin... 3	
1.1.2. Cấu trúc phân tử và đặc tính hóa lý của vancomycin .....	4
1.1.3. Cơ chế kháng khuẩn của vancomycin.....	7
1.1.4. Sinh tổng hợp vancomycin ở xạ khuẩn.....	8
1.2. Nguồn nguyên liệu có ở Việt Nam dùng cho lên men sinh vancomycin .	12
1.2.1. Nguồn bột đao.....	12
1.2.2. Nguồn cao nấm men .....	12
1.3. Tối ưu hóa môi trường .....	13
1.3.1. Khái niệm về tối ưu môi trường.....	13
1.3.2. Phương pháp bề mặt đáp ứng.....	14
1.4. Phương pháp tách chiết vancomycin .....	15
1.4.1. Tách chiết bằng dung môi hữu cơ .....	15
1.4.2. Tách chiết bằng hấp phụ.....	16
1.4.3. Tách chiết bằng trao đổi ion.....	18
Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	22
2.1. Vật liệu.....	22

2.1.1. Đối tượng .....	22
2.1.2. Hóa chất.....	22
2.1.3. Dụng cụ.....	22
2.2. Môi trường nghiên cứu .....	22
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	24
2.3.1. Phương pháp bảo quản giống .....	24
2.3.2. Nhận biết đặc điểm sinh học của chủng <i>S. orientalis</i> 4912.....	24
2.3.3. Phương pháp lên men .....	25
2.3.4. Phương pháp xác định hoạt tính kháng sinh.....	27
2.3.5. Phương pháp tách chiết vancomycin.....	28
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....	32
3.1. Nhận biết đặc điểm sinh học của chủng <i>Streptomyces orientalis</i> 4912....	32
3.1.1. Đặc điểm hình thái.....	32
3.1.2. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa.....	33
3.2. Lựa chọn môi trường lên men.....	35
3.3. Ảnh hưởng của các thành phần trong môi trường lên men .....	36
3.3.1. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến khả năng sinh tổng hợp vancomycin của chủng <i>S. orientalis</i> 4912 .....	36
3.3.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng sinh tổng hợp vancomycin của chủng <i>S. orientalis</i> 4912.....	38
3.4. Tối ưu hoá thành phần môi trường lên men sinh tổng hợp vancomycin từ chủng <i>S. orientalis</i> 4912 theo phương pháp bề mặt đáp ứng.....	40
3.5. Động thái quá trình lên men sinh tổng hợp vancomycin của chủng <i>S. orientalis</i> 4912 trên môi trường tối ưu.....	44
3.6. Nghiên cứu chế độ lên men vancomycin.....	46
3.6.1. Chế độ lên men vancomycin theo mẻ.....	46
3.6.2. Chế độ lên men bán liên tục .....	48
3.7. Tách chiết vancomycin từ dịch lên men bằng dung môi .....	49
3.7.1. Khả năng tách chiết vancomycin của các loại dung môi khác nhau .	49

3.7.2. <i>Tỉ lệ phối trộn dung môi và dịch lên men phù hợp cho tách chiết vancomycin</i> .....	52
3.7.3. <i>Xác định thời gian tách chiết</i> .....	54
3.8. Tách chiết vancomycin từ dịch lên men bằng phương pháp hấp phụ .....	55
3.8.1. <i>Khả năng hấp phụ vancomycin của một số chất hấp phụ</i> .....	55
3.8.2. <i>Nồng độ than hoạt tính và dung môi sử dụng để nhả hấp phụ</i> .....	55
3.8.3 <i>Xác định pH và thời gian nhả hấp phụ</i> .....	57
3.8.4. <i>Xác định tỷ lệ hỗn hợp dung môi</i> .....	58
3.9. Tách chiết vancomycin từ dịch lên men bằng phương pháp trao đổi ion.	60
3.9.1. <i>Tách chiết vancomycin với một số chất trao đổi ion</i> .....	60
3.9.2. <i>Kiểm tra vancomycin tách chiết được từ dịch lên men</i> .....	63
Chương 4: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	64
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	65
PHỤ LỤC .....	69

## DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

PG	Peptidoglycan
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
MRSA	Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. orientalis</i> 4912	<i>Streptomyces orientalis</i> 4912
DLM	Dịch lên men
KSC	Kháng sinh chuẩn
HPLC	Sắc kí lỏng cao áp
CKS	Chất kháng sinh
RSM	Reponse Surface methodology
HTKS	Hoạt tính kháng sinh
ĐKVVK	Đường kính vòng vô khuẩn
VVK	Vòng vô khuẩn
SKU	Sinh khối ướ́t



## DANH MỤC CÁC BẢNG

Số hiệu	Tên bảng	Trang
1.1	Phổ kháng khuẩn của vancomycin	6
3.1	Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của chủng <i>S.orientalis</i> 4912	32
3.2	Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của chủng <i>S.orientalis</i> 4912	32
3.3	Khả năng đồng hoá đường của chủng <i>S. orientalis</i> 4912	34
3.4	Khả năng sinh tổng hợp vancomycin của chủng <i>S. orientalis</i> 4912 trên một số môi trường	35
3.5	Ảnh hưởng của các nguồn cacbon đến khả năng sinh tổng hợp vancomycin của chủng <i>S. orientalis</i> 4912	36
3.6	Ảnh hưởng của các nguồn nitơ đến khả năng sinh tổng hợp vancomycin của chủng <i>S. orientalis</i> 4912	39
3.7	Các yếu tố biến đổi của thành phần môi trường lên men	41
3.8	Bố trí thí nghiệm và kết quả tối ưu hóa môi trường sinh tổng hợp vancomycin từ chủng <i>S. orientalis</i> 4912 theo RSM-CCD	41
3.9	Bảng phân tích hồi quy mô hình tối ưu	42
3.10	Kết quả kiểm chứng sự tương thích của mô hình với thực nghiệm	44
3.11	HTKS của chủng <i>S. orientalis</i> 4912 khi lên men theo mẻ	47
3.12	Hiện tượng trộn dịch lên men với các dung môi	50
3.13	Hoạt tính kháng khuẩn của các dung môi khác nhau sau quá trình tách chiết từ dịch lên men	52
3.14	Hoạt tính kháng khuẩn của dung môi n – Butanol tách chiết tỉ lệ 2/1 ở các khoảng thời gian khác nhau	54
3.15	Khả năng hấp phụ chất kháng sinh của một số chất hấp phụ	55
3.16	Ảnh hưởng của nồng độ than hoạt tính tới khả năng hấp phụ chất kháng sinh	56
3.17	Ảnh hưởng của dung môi tới khả năng nhả hấp phụ vancomycin	56
3.18	Ảnh hưởng của pH và thời gian đến quá trình nhả hấp phụ vancomycin	58
3.19	Ảnh hưởng của tỷ lệ hỗn hợp dung môi tới quá trình nhả hấp phụ vancomycin	59
3.20	Khả năng tách chiết vancomycin với một số chất trao đổi ion	60

## DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ VÀ ĐỒ THỊ

Số hiệu	Tên hình và đồ thị	Trang
1.1	Cấu trúc hóa học và cấu trúc không gian của vancomycin	4
3.1	Khuẩn lạc của chủng <i>S. orientalis</i> 4912 trên MT thạch 48	33
3.2	Hình dạng khuẩn ty và chuỗi bào tử của chủng <i>S. orientalis</i> 4912	34
3.3	Hoạt tính vancomycin của chủng <i>S. orientalis</i> 4912 trên các môi trường lên men khác nhau	36
3.4	Ảnh hưởng của các nguồn cacbon đến khả năng sinh tổng hợp vancomycin của chủng <i>S. orientalis</i> 4912	37
3.5	Ảnh hưởng của nồng độ bột gạo đến khả năng sinh tổng hợp vancomycin của chủng <i>S. orientalis</i> 4912	38
3.6	Ảnh hưởng của nồng độ cao nấm men đến khả năng sinh tổng hợp vancomycin của chủng <i>S. orientalis</i> 4912	40
3.7	Vùng tối ưu của cặp yếu tố ảnh hưởng bột gạo – cao nấm men	43
3.8	Động thái quá trình lên men sinh tổng hợp vancomycin của chủng <i>S. orientalis</i> 4912 trên môi trường tối ưu	46
3.9	Hoạt tính kháng sinh của chủng <i>S. orientalis</i> lên men theo mẻ	48
3.10	HTKS của chủng <i>S. orientalis</i> lên men bán liên tục	48
3.11	Kết quả tách chiết vancomycin bằng các dung môi khác nhau	51
3.12	Hoạt tính kháng khuẩn của dung môi 2 - Butanol sau khi chiết vancomycin từ dịch lên men	53
3.13	Hoạt tính kháng khuẩn của dung môi n - Butanol sau khi chiết vancomycin từ dịch lên men	53
3.14	Hoạt tính kháng MRSA của dung môi n – Butanol tách chiết tỉ lệ 2:1 ở các khoảng thời gian khác nhau	54
3.15	Nhả hấp phụ vancomycin từ than hoạt tính với các dung môi khác nhau	57
3.16	Kết quả sắc ký giấy chất kháng sinh vancomycin	59
3.17	Sơ đồ tách chiết vancomycin trên cột trao đổi ion	61
3.18	Sơ đồ quy trình tách chiết vancomycin bằng nhựa trao đổi ion	62
3.19	Sắc kí đồ HPLC của vancomycin sau khi đã làm tinh khiết từ dịch lên men chủng <i>S. orientalis</i> 4912	63
3.20	Sắc đồ HPLC của vancomycin chuẩn (Merck)	63