

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



HUỲNH THỊ NGỌC NI

**NGHIÊN CỨU CHIẾT TÁCH, XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC
HOÁ HỌC VÀ ĐÁNH GIÁ TÁC ĐỘNG TỚI
PROTEIN TÁI TỔ HỢP C_{1p}C₁ CỦA CÁC HỢP CHẤT
TỪ MỘT SỐ LOÀI XẠ KHUẨN VIỆT NAM**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

Mã số: 9440114

HÀ NỘI - 2024

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn khoa học 1: PGS.TS. Trần Thị Phương Thảo, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

2. Người hướng dẫn khoa học 2: GS.TSKH. Trần Văn Sung, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi giờ, ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ

2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Huynh Thi Ngoc Ni, Pham Thi Ninh, Tran Van Chien, Nguyen Thi Dung, Dinh Thi Ngoc Mai, Nguyen Thi Van, Nguyen Hong Minh, Ngo Van Hieu, Ho Ngoc Anh, Jinhua Cheng, Joo-Won Suh, Tran Van Sung, Nguyen Kim Nu Thao, Tran Thi Phuong Thao, *Screening for antimycobacterial activity of actinomycetes collected in Vietnam - Isolation and activity of metabolites from Streptomyces alboniger (A121)*, Natural Product Communications, 2024, 19(1), 1-13. DOI: 10.1177/1934578X231224994. (SCIE)

2. Huynh Thi Ngoc Ni, Pham Thi Ninh, Nguyen Thi Dung, Tran Van Chien, Nguyen Quynh Uyen, Ho Ngoc Anh, Joo-Won Suh, Jinhua Cheng, Nguyen Kim Nu Thao, Nguyen Minh Duc, Tran Thi Phuong Thao, *ClpC1 protein inhibition, antimycobacterial, and anti-inflammatory properties of the metabolite from Streptomyces wuyuanensis collected in Nghe An province, Vietnam*, Vietnam Journal of Chemistry, 2024, 62(1), 85-91. Doi: 10.1002/vjch.202300345. (Q3)

3. Huỳnh Thị Ngọc Ni, Phạm Thị Ninh, Hồ Ngọc Anh, Jinhua Cheng, Joo-Won Suh, Trần Văn Sung, Nguyễn Kim Nữ Thảo, Lê Thị Hồng Nhung, Nguyễn Quỳnh Uyên, Nguyễn Minh Đức, Trần Thị Phương Thảo, *Các hợp chất thứ cấp từ chủng xạ khuẩn Actinoplanes missouriensis và hoạt tính ức chế protein ClpC1 của vi khuẩn lao Mycobacterium tuberculosis*, Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội, 2023, 58 (6A), 116-120.

4. Tran Thi Phuong Thao, **Huynh Thi Ngoc Ni**, Pham Thi Ninh, Nguyen Thi Dung, Tran Van Chien, Nguyen Quynh Uyen, Ho Ngoc Anh, Joo-Won Suh, Jinhua Cheng, Nguyen Kim Nu Thao, Tran Van Sung and Nguyen Minh Duc, *Metabolites from Streptomyces aureus (VTCC43181) and their inhibition of Mycobacterium tuberculosis ClpC1 protein*, Molecules, 2024, 29(3), 720-730. Doi: 10.3390/molecules29030720. (Q1)

MỞ ĐẦU

Lao là tình trạng nhiễm vi khuẩn *Mycobacterium tuberculosis*, thường gặp nhất ở phổi nhưng cũng có thể ảnh hưởng đến hệ thần kinh trung ương (lao màng não), hệ bạch huyết, hệ tuần hoàn (lao kê), hệ niệu dục, xương và khớp. Hiện nay lao là một trong các căn bệnh nhiễm khuẩn chính và thường gặp nhất, ảnh hưởng đến 2 tỉ người trên thế giới, với 9 triệu ca mới mỗi năm và làm 2 triệu người tử vong. Bệnh thường gặp ở các nước đang phát triển. Hầu hết 90 % các trường hợp nhiễm khuẩn lao là tiềm ẩn không triệu chứng, 10% còn lại sẽ tiến triển thành bệnh lao có triệu chứng, và nếu không điều trị, 50% số nạn nhân sẽ tử vong. Lao là một trong 3 bệnh truyền nhiễm gây tử vong cao nhất trên thế giới chỉ sau HIV. Sự sao nhãng trong các chương trình kiểm soát lao đã khiến lao trở lại. Hơn nữa, một vấn đề mà các nhà khoa học đang phải đối mặt hiện nay là các chủng lao đa kháng thuốc (MDR, *multiple drug resistant*) đang ngày càng tăng cao. Đặc biệt, theo báo cáo mới đây của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), gần đây tại Ấn Độ (nước có tỷ lệ người nhiễm lao cao nhất thế giới) đã cho thấy hàng loạt trường hợp các bệnh nhân kháng thuốc hoàn toàn đối với tất cả các loại thuốc kháng sinh chữa lao (“totally drug resistant”). Các dòng thuốc kháng lao thế hệ 1, thế hệ 2 và thế hệ 3 đã được nghiên cứu và sử dụng để trị bệnh. Tuy nhiên tình trạng kháng thuốc hoặc kháng thuốc hoàn toàn vẫn đang ngày càng gia tăng. Vì vậy, việc tìm kiếm các hợp chất kháng lao mới để điều trị bệnh là vấn đề rất cần thiết và có tính cấp bách không chỉ ở Việt Nam mà trên toàn thế giới.

Những nghiên cứu mới đây cho thấy xu hướng khai thác các hợp chất có hoạt tính từ các nguồn vi sinh vật: vi khuẩn, xạ khuẩn... đang ngày càng được các nhà khoa học quan tâm. Trong đó, xạ khuẩn (*actinomycete*) từ lâu đã được biết đến là nguồn vi sinh vật cung cấp các hợp chất kháng sinh và kháng lao đã được sử dụng làm thuốc.

Việt Nam được biết đến là một trong những nước có đa dạng sinh

học lớn nhất thế giới. Điều kiện khí hậu, thổ nhưỡng đa dạng ở các vùng miền khác nhau ở Việt Nam sẽ tạo ra các chủng xạ khuẩn khác nhau, phong phú và đa dạng. Chúng chính là nguồn thiên nhiên quý giá để nghiên cứu, tìm kiếm các hợp chất kháng lao mới, góp phần phục vụ cho việc điều trị bệnh lao đa kháng thuốc hiện nay. Tuy nhiên, việc phân lập các hợp chất thứ cấp từ xạ khuẩn vẫn đang còn là một vấn đề mới, ít được nghiên cứu ở Việt Nam. Vì vậy, đề tài “*Nghiên cứu chiết tách, xác định cấu trúc hóa học và đánh giá tác động tới protein tái tổ hợp ClpC1 của các hợp chất từ một số loài xạ khuẩn Việt Nam*” là cần thiết và có ý nghĩa thực tiễn, góp phần tìm ra các loại thuốc mới từ thiên nhiên an toàn, hiệu quả để điều trị bệnh lao.

Mục tiêu của luận án:

Tìm kiếm các chất có tác động tới protein tái tổ hợp ClpC1 từ một số chủng xạ khuẩn ở Việt Nam.

Với mục tiêu như trên, luận án đặt ra các nội dung nghiên cứu sau:

- Thu thập các mẫu xạ khuẩn ở các vùng miền khác nhau, tiếp nhận và xử lý các mẫu sinh khối chủng xạ khuẩn từ Viện vi sinh vật và Công nghệ sinh học, trường Đại học Quốc gia Hà Nội.

- Đánh giá hoạt tính kháng chủng *M. smegmatis* (chủng tương đồng với vi khuẩn lao *M. tuberculosis*) của các chủng xạ khuẩn.

- Tạo các dịch chiết từ dịch nuôi cấy các chủng xạ khuẩn bằng các dung môi khác nhau.

- Tách và tinh chế các chất sạch từ các dịch nuôi cấy của chủng xạ khuẩn.

- Xác định cấu trúc hóa học của các chất sạch phân lập được.

- Đánh giá tác động của các chất sạch phân lập được tới protein tái tổ hợp ClpC1 của vi khuẩn lao.

Những đóng góp mới của luận án:

- Lần đầu tiên hoạt tính kháng chủng *M. smegmatis* (chủng tương

đồng với vi khuẩn lao *M. tuberculosis*) của tám chủng xạ khuẩn được đánh giá. Các chủng bao gồm *Streptomyces spiroverticillatus* VH19-A067, *Streptomyces wuyanensis* VH19-A079, *Streptomyces alboniger* VH19-A105B, *Streptomyces alboniger* VH19-A121, *Streptomyces aureus* VTCC43181, *Streptomyces cyaneus* VTCC43860, *Streptomyces sp.* VTCC43168 và *Actinoplanes missouriensis* VTCC40900.

- Lần đầu tiên 14 hợp chất được phân lập từ tám chủng xạ khuẩn nêu trên. Các chất bao gồm: obscurolide B_{2β} (**AT.01**), chartreusin (**AT.02**), indole-3-carboxylic acid (**AT.03**), nocardamin (**AT.04**), pleurone (**AT.05**), halolitoralin A (**AT.06**), (6Z)-15-methyl-6-hexadecenoic acid (**AT.07**), cardoltriene (**AT.08**), cardoltriene M (**AT.09**), 7-deoxyauramycinone (**AT.11**), 7-acetyl-3,6-dihydroxy-8-methyl tetralone (**AT.12**), valin (**AT.13**), flufuran (**AT.14**), trehalose (**AT.15**). Trong đó có một chất mới được đặt tên là **cardoltriene M (AT.09)**.

Lần đầu tiên hoạt tính kháng chủng vi khuẩn *M. smegmatis* của hợp chất chartreusin (**AT.02**) được nghiên cứu.

- Lần đầu tiên các hợp chất phân lập được từ xạ khuẩn được đánh giá khả năng tác động đến quá trình thủy phân ATP của protein tái tổ hợp ClpC1, một protein điều hòa quan trọng của vi khuẩn lao *M. tuberculosis*.

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. Tình hình bệnh lao ở Việt Nam và thế giới – Tình hình kháng thuốc ở vi khuẩn lao

1.1.1. Tình hình bệnh lao ở Việt Nam và thế giới

1.1.2. Tình trạng kháng thuốc ở vi khuẩn lao tại Việt Nam và trên thế giới

1.2. Các hợp chất kháng lao được phân lập từ xạ khuẩn trên thế giới và ở Việt Nam

1.2.1. Giới thiệu về xạ khuẩn

1.2.2. Các hợp chất kháng lao được phân lập từ xạ khuẩn trên thế giới

1.2.2.1. Hợp chất kháng lao thuộc nhóm aminoglycoside

1.2.2.2. Hợp chất kháng lao thuộc nhóm nitroimidazole

1.2.2.3. Hợp chất kháng lao thuộc nhóm macrolide

1.2.2.4. Hợp chất kháng lao thuộc nhóm cyclopeptide

1.2.2.5. Hợp chất kháng lao thuộc nhóm diaza-anthracene

1.2.2.6. Hợp chất kháng lao thuộc nhóm polyketide

1.2.3. Các hợp chất kháng lao được phân lập từ xạ khuẩn ở Việt Nam

1.3. Tổng quan về một số loài xạ khuẩn là đối tượng nghiên cứu

1.3.1. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger*

1.3.1.1. Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger*

1.3.1.2. Các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học được phân lập từ xạ khuẩn *Streptomyces alboniger*

1.3.2. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces wuyuanensis*

1.3.3. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces aureus*

1.3.3.1. Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn *Streptomyces aureus*

1.3.3.2. Các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học được phân lập từ xạ khuẩn *Streptomyces aureus*

1.3.4. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces spiroverticillatus*

1.3.4.1. Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn *Streptomyces spiroverticillatus*

1.3.4.2. Các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học được phân lập từ xạ

khuẩn Streptomyces spiroverticillatus

1.3.5. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces cyaneus*

1.3.5.1. Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn *Streptomyces cyaneus*

1.3.5.2. Các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học được phân lập từ xạ khuẩn *Streptomyces cyaneus*

1.3.6. Chủng xạ khuẩn *Actinoplanes missouriensis*

1.3.6.1. Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn *Actinoplanes missouriensis*

1.3.6.2. Các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học được phân lập từ xạ khuẩn *Actinoplanes missouriensis*

1.4. Tổng quan về protein ClpC1

Phương pháp sàng lọc các hoạt chất kháng lao sử dụng đích không tế bào ClpC1 là một phương pháp mới và hiện đại đang được một số nhóm nghiên cứu có uy tín trên thế giới sử dụng để sàng lọc các hoạt chất kháng lao từ xạ khuẩn. Phương pháp này không độc hại và không nguy hiểm vì không sử dụng trực tiếp vi khuẩn lao trong quá trình sàng lọc. Phương pháp này cho phép tiến hành sàng lọc hàng loạt các hoạt chất phân lập được xạ khuẩn cũng như từ các nguồn vi sinh vật hoặc nguồn thiên nhiên khác. Trong quá trình xây dựng mô hình sàng lọc, cơ chế tác động của các chất có hoạt tính lên đích ClpC1 của vi khuẩn lao cũng sẽ được làm rõ, giúp tiết kiệm chi phí và thời gian hơn các phép thử thông thường.

Như vậy, có thể thấy đa phần các hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng lao được phân lập từ xạ khuẩn. Xạ khuẩn chính là nguồn cung cấp các hợp chất kháng lao dồi dào, phong phú nhất, đã và đang trở thành đối tượng nghiên cứu tiềm năng để các nhà khoa học tìm kiếm, phát hiện các thuốc kháng lao mới phục vụ cho y dược học. Vì vậy, đề tài luận án Tiến sĩ “*Nghiên cứu chiết tách, xác định cấu trúc hóa học và đánh giá tác động tới protein tái tổ hợp ClpC1 của các hợp chất từ một số loài xạ khuẩn Việt Nam*” là cần thiết, có ý nghĩa khoa học, góp phần tìm kiếm các hợp chất kháng lao từ xạ khuẩn ở Việt Nam và định hướng cho các nghiên cứu tiếp theo trong y dược học.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VÀ THỰC NGHIỆM

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces*

Bảng 2.1. Các chủng xạ khuẩn được phân lập từ các địa điểm thu thập khác nhau

STT	Kí hiệu	Nguồn gốc	Địa điểm thu thập	Toạ độ
1	<i>Streptomyces spiroverticillatus</i> VH19-A067	Mẫu đất	Ngã ba sông Đáy và sông Vạc, xã Thường Kiếm, huyện Kim Sơn, tỉnh Ninh Bình	N20°3'0,8"E106°6'52,8"
2	<i>Streptomyces wuyuanensis</i> VH19-A079	Mẫu đất	Rừng ngập mặn Quỳnh Lương, xã Quỳnh Lương, huyện Quỳnh Lưu, Nghệ An	N19°8'42,1"E105°41'43,1"
3	<i>Streptomyces alboniger</i> VH19-A105B	Mẫu đất	Đường lên đỉnh núi Mây Bạc, vườn quốc gia Cúc Phương, huyện Nho Quan, tỉnh Ninh Bình	N20°21'0,8"E105°36'15,7"
4	<i>Streptomyces alboniger</i> VH19-A121	Mẫu đất	Đỉnh núi Mây Bạc, vườn quốc gia Cúc Phương, huyện Nho Quan, tỉnh Ninh Bình (648 m so với mực nước biển)	N21°21'21,9"E105°36'36,2"

3 chủng xạ khuẩn *Streptomyces cyaneus* VTCC43860, *Streptomyces* sp VTCC43168, *Streptomyces aureus* VTCC43181 được nuôi cấy và được cung cấp bởi Trung tâm nguồn gen Vi sinh vật quốc gia - Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, trường Đại học Quốc Gia Hà Nội.

2.1.2. Xạ khuẩn hiếm thuộc chi *Actinoplanes*

Chủng xạ khuẩn hiếm *A. missouriensis* VTCC40900 được nuôi cấy và được cung cấp bởi Trung tâm nguồn gen Vi sinh vật quốc gia - Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, trường Đại học Quốc Gia Hà Nội.

2.2. Hoá chất, thiết bị nghiên cứu

2.2.1. Hoá chất

2.2.2. Thiết bị

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp thu thập và phân lập chủng xạ khuẩn

2.3.1.1. Phương pháp thu thập chủng xạ khuẩn

2.3.1.2. Phương pháp phân lập chủng xạ khuẩn

2.3.2. Phương pháp tạo cao chiết từ dịch nuôi cấy của các chủng xạ khuẩn

2.3.3. Phương pháp phân lập các hợp chất thứ cấp từ cao chiết

2.3.4. Phương pháp xác định cấu trúc các hợp chất thứ cấp phân lập được

2.3.5. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

2.3.8.1. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng vi khuẩn tương đồng vi khuẩn lao *Mycobacterium smegmatic*

2.3.8.2. Phương pháp đánh giá tác dụng ức chế protein ClpC1 của vi khuẩn lao

2.4. Chiết xuất và phân lập các chất từ dịch nuôi cấy của các chủng xạ khuẩn

2.4.1. Chiết xuất và phân lập các chất từ dịch nuôi cấy của xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121

Chất AT.01 (Obscurolide B_{2β}): Chất bột, màu vàng; C₁₅H₁₇NO₄; $[\alpha]_D^{27} = +20,4$ (c 0,1, CH₂Cl₂), HR-ESI-MS (*m/z*): 276,1221 (tính toán lý thuyết cho C₁₅H₁₈NO₄ 276,1236 [M+H]⁺), 298,1045 (tính toán lý thuyết cho C₁₅H₁₇NO₄Na [M+Na]⁺); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃), δ_H (ppm): 9,77 (1H, s, CHO), 7,73 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, H-3', H-5'), 6,67 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, H-2', H-6'), 5,88 (1H, dd, *J* = 15,0, 7,0 Hz, H-6), 5,64 (1H, m, H-7), 4,60 (1H, brs, C₅-OH), 4,41 (1H, m, H-3), 4,35 (1H, dd, *J* = 7,2, 3,0 Hz, H-4), 4,32 (1H, m, H-5), 3,18 (1H, dd, *J* = 18,0, 7,5 Hz, H-2a), 2,44 (1H, dd, *J* = 18,0, 3,5 Hz, H-2b), 1,74 (3H, dd, *J* = 6,5, 1,5 Hz, H-8); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃), δ_C (ppm): 190,3 (C-7'), 174,9 (C-1), 150,9

(C-1'), 132,3 (C-3', C-5'), 131,4 (C-6), 128,2 (C-7), 128,1 (C-4'), 112,6 (C-2', C-6'), 87,3 (C-4), 73,1 (C-5), 51,0 (C-3), 36,3 (C-2), 17,8 (C-8).

Chất AT.02 (Chartreusin): Chất bột màu vàng lục; $C_{32}H_{32}O_{14}$; HR-ESI-MS (m/z): 641,1876 (tính toán lý thuyết cho $C_{32}H_{33}O_{14}$ 641,1870 $[M+H]^+$). Dữ liệu phổ 1H and ^{13}C -NMR: xem bảng 3.3

2.4.2. Chiết xuất và phân lập các chất từ dịch nuôi cấy của xạ khuẩn *Streptomyces wuyuanensis* VH19-A079

Chất AT.03 (Indole-3-carboxylic acid): Bột màu vàng nhạt; $C_9H_7NO_2$; ESI-MS (m/z): 178,5 $[M-H+H_2O]$; Dữ liệu phổ 1H and ^{13}C -NMR: xem bảng 3.4.

2.4.3. Chiết xuất và phân lập các chất từ dịch nuôi cấy của xạ khuẩn *Streptomyces aureus* VTCC43181

Chất AT.04 (Nocardamin): Chất bột, không màu; $C_{27}H_{48}N_6O_9$; HR-ESI-MS (m/z): 601,3527 (tính toán lý thuyết cho $C_{27}H_{49}N_6O_9$ 601,3561 $[M+H]^+$), 623,3353 (tính toán lý thuyết cho $C_{27}H_{48}N_6O_9Na$ 623,3380 $[M+Na]^+$). Dữ liệu phổ 1H - và ^{13}C -NMR: xem bảng 3.5.

Chất AT.05 (Pleurone): Chất bột màu trắng, $C_4H_2O_4$; Phổ khối ESI-MS của hợp chất này cho pic ion phân tử tại m/z 119 $[M+Na-H_2O]^+$. Dữ liệu phổ 1H - và ^{13}C -NMR: xem bảng 3.6.

Chất AT.06 (Halolitoralin A): Chất rắn, màu trắng; $C_{27}H_{48}N_6O_6$; HR-ESI-MS (m/z): 553,3730 (tính toán lý thuyết cho $C_{27}H_{49}N_6O_6$ 553,3714 $[M+H]^+$), 575,3548 (tính toán lý thuyết cho $C_{27}H_{48}N_6O_6Na$ 575,3533 $[M+Na]^+$). 1H -NMR (δ_H , J , 500 MHz, CD_3OD): 3,57-3,54 (2H, m, α -H của Leu¹ & Leu²), 3,50 (1H, d, J = 3,5 Hz, α -H của Ile), 3,43 (3H, d, J = 4,5 Hz, α -H của Ala¹, Ala² & Ala³), 1,97-1,95 (1H, m, β -H của Ile), 1,83-1,77 (2H, m, γ -H của Leu¹ & Leu²), 1,83-1,59 (4H, m, β -H của Leu¹ & Leu²), 1,66-1,59 (2H, m, γ -H của Ile), 1,08-1,07 (3H, d, J = 7.0 Hz, β -H của Ala³), 1,05-1,01 (9H, m, β -H của Ala¹ & Ala², β' -H của Ile), 1,00-0,96 (15H, m, δ -H của Leu¹ & Leu², δ -H của Ile); ^{13}C -NMR (δ_C , J , 125 MHz, CD_3OD):

175,2 (C=O, Leu¹ & Leu²), 174,5 (C=O, Ala), 174,0 (C=O, Ile), 61,8 (α -C, Ala¹, Ala² & Ala³), 60,9 (α -C, Ile), 54,7 (α -C, Leu¹ & Leu²), 41,8 (β -C, Leu¹ & Leu²), 37,7 (β -C, Ile), 25,9 (γ -C, Ile), 25,8 (γ -C, Leu¹ & Leu²), 23,2 (δ -C, Leu²), 22,0 (δ -C, Leu¹), 19,1 (β -C, Ala³), 17,7 (β -C, Ala¹ & Ala²), 15,6 (β' -C, Ile), 12,2 (δ -C, Ile).

2.4.4. Chiết xuất và phân lập các chất từ dịch nuôi cấy của xạ khuẩn *Streptomyces spiroverticillatus* VH19-A067

Chất AT.07 ((6Z)-15-methyl-6-hexadecenoic acid): Chất rắn, màu hồng nhạt; C₁₇H₃₂O₂; HR-ESI-MS (m/z): 267,2335 (tính toán lý thuyết cho C₁₇H₃₁O₂ 267,2324 [M-H]⁻). ¹H-NMR (δ_H , J , 600 MHz, CD₃OD): 5,36 (2H, m, H-6, H-7), 2,30 (2H, m, H-2), 2,06 (4H, m, H-5, H-8), 1,61 (2H, m, H-3), 1,54 (1H, m, H-15), 1,34 (2H, m, H-4), 1,33 – 1,31 (10H, m, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13), 1,20 (2H, m, H-14), 0,91 (6H, m, H-16, H-17); ¹³C-NMR (δ_C , J , 125 MHz, CD₃OD): 177,8 (C-1), 130,8 (C-6, C-7), 40,2 (C-14), 35,0 (C-2), 33,0 (C-9, C-12), 30,7 (C-4), 28,5 (C-10, C-11), 29,1 (C-15), 28,1 (C-5), 26,1 (C-3), 23,7 (C-13), 23,0 (C-16, C-17).

2.4.5. Chiết xuất và phân lập các chất từ dịch nuôi cấy của xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A105B

Chất AT.08 (Cardoltriene): dạng dầu, màu nâu; C₂₁H₃₀O₂; HR-ESI-MS (m/z): 313,2196 (tính toán lý thuyết cho C₂₁H₂₉O₂ 313,2168 [M-H]⁻). Dữ liệu phổ ¹H NMR và ¹³C-NMR: xem bảng 3.7.

Chất AT.09 (Cardoltriene M): dạng dầu, màu nâu; C₃₆H₄₇NO₅; HR-ESI-MS (m/z): m/z 596,3325 (tính toán lý thuyết cho C₃₆H₄₇NO₅Na 596,3352 [M+Na]⁺), 572,3406 (tính toán lý thuyết cho C₃₆H₄₆NO₅ 572,3376 [M-H]⁻). Dữ liệu phổ ¹H NMR và ¹³C-NMR: xem bảng 3.7.

Chất AT.10 (Chartreusin): Phổ NMR của hợp chất **SH.03** trùng với hợp chất **SA.02**.

Chất AT.11 (7-deoxyauramycinone): Chất rắn, màu cam; C₂₁H₁₈O₇; HR-ESI-MS (m/z): 382,1053 (tính toán lý thuyết cho C₂₁H₁₈O₇

382,1059 [M]). Dữ liệu phổ ^1H NMR và ^{13}C -NMR: xem bảng 3.8.

2.4.6. Chiết xuất và phân lập các chất từ dịch nuôi cấy của xạ khuẩn *Streptomyces cyaneus* VTCC43860

Chất AT.12 (7-acetyl-3,6-dihydroxy-8-methyl tetralone): Dạng bột, màu trắng; $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{O}_4$; HR-ESI-MS (m/z): 235,0960 (tính toán lý thuyết cho $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{O}_4$ 235,0970 $[\text{M}+\text{H}]^+$), 257,0783 (tính toán lý thuyết cho $\text{C}_{36}\text{H}_{47}\text{NO}_5\text{Na}$ 257,0790 $[\text{M}+\text{Na}]^+$), 233,0827 (tính toán lý thuyết cho $\text{C}_{36}\text{H}_{46}\text{NO}_5$ 233,0814 $[\text{M}-\text{H}]^-$). Dữ liệu phổ ^1H NMR và ^{13}C -NMR: xem bảng 3.9.

2.4.7. Chiết xuất và phân lập các chất từ dịch nuôi cấy của xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VTCC43168

Chất AT.13 (Valin): Chất rắn, màu trắng; $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$; ESI-MS (m/z): 115,8 $[\text{M}-\text{H}]^-$. ^1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz), δ_{H} (ppm), J (Hz): 3,32-3,40 (1H, m, H-2), 2,27 (1H, m, H-3), 1,08 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, H-4), 1,03 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, H-5); ^{13}C -NMR (δ_{C} , J , 125 MHz, CD_3OD): 180,3 (C-1), 61,8 (C-2), 31,0 (C-3), 19,3 (C-4), 17,7 (C-5).

2.4.8. Chiết xuất và phân lập các chất từ dịch nuôi cấy của xạ khuẩn *Actinoplanes missouriensis* VTCC40900

Chất AT.14 (Flufuran): Tinh thể hình kim; $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4$, ESI-MS: $m/z = 140,7$ $[\text{M}-\text{H}]^-$. ^1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ_{H} : 7,95 (1H, s, H-2), 6,51 (1H, s, H-4), 4,42 (2H, s, H-7); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ_{C} : 177,2 (C-6), 170,2 (C-5), 147,4 (C-3), 141,0 (C-2), 110,6 (C-4), 61,2 (C-7).

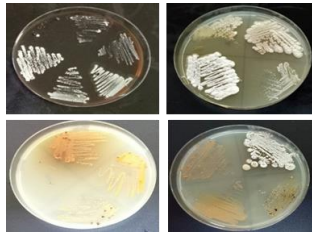
Chất AT.15 (Trehalose): Chất rắn màu trắng; $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, ESI-MS: $m/z = 364,9$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. ^1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ_{H} 5,14 (2H, d, $J = 3,5$ Hz), 3,84 (6H, m), 3,70 (2H, m), 3,49 (2H, dd, $J = 10,0, 3,5$ Hz), 3,33 (2H, m); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ_{C} 95,0 (C-1), 74,6 (C-3), 73,8 (C-2), 73,2 (C-5), 71,9 (C-4), 62,6 (C-6).

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập và định danh các chủng xạ khuẩn

3.1.1. Phân lập chủng xạ khuẩn

Từ 26 mẫu đất, trầm tích thu được từ các vùng dọc khu vực miền Bắc tới miền Trung, Việt Nam, chúng tôi đã phân lập được 181 chủng khác nhau về đặc tính khuẩn lạc như màu sắc, kích thước khuẩn lạc, cấu trúc hệ sợi, sự phát triển của khuẩn ty, sự tiết sắc tố... Trong tổng số 181 chủng xạ khuẩn phân lập được có 135 chủng thuộc chi *Streptomyces* chiếm 74,6% và 46 chủng thuộc nhóm xạ khuẩn hiếm chiếm 25,4%.



Hình 3.1. Đặc điểm khuẩn lạc của một số chủng xạ khuẩn được phân lập

3.1.2. Sàng lọc các chủng xạ khuẩn có khả năng kháng *Mycobacterium smegmatis*

Các chủng xạ khuẩn được sàng lọc hoạt tính kháng *Mycobacteria smegmatis* bằng phương pháp khuếch tán kháng sinh trên đĩa thạch. Kết quả cho thấy trong số 181 chủng xạ khuẩn có 14 chủng (chiếm 7,7%) có khả năng ức chế *M. smegmatis* (thể hiện trong phần phụ lục PL1).

Các chủng VH19-A002, VH19-A067 và VH19-A079 cho thấy hoạt tính kháng *M. smegmatis* tương đương với đường kính vòng kháng khuẩn là 9 mm, trong khi chủng VH19-A105B có hoạt tính kháng *M. smegmatis* yếu hơn với đường kính vòng kháng khuẩn là 8 mm. Chủng VH19-A121 là chủng có hoạt tính mạnh nhất với đường kính vòng kháng khuẩn là 11 mm.

3.1.3. Phân loại các chủng xạ khuẩn

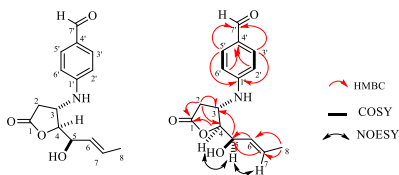
Các chủng có hoạt tính kháng *M. smegmatis* mạnh nhất là VH19-

A002, VH19-A067, VH19-A079, VH19-A105B, VH19-A121 được phân loại dựa trên màu sắc của khuẩn ty cơ chất, hình dạng khuẩn lạc, khả năng sinh sắc tố, hình thái chuỗi bào tử, trình tự 16S rDNA và được thực hiện bởi Thạc sĩ Vũ Hà Phương, khoa Sinh học, trung tâm nghiên cứu khoa học sự sống, Đại học Khoa học Tự nhiên-Đại học Quốc gia Hà Nội. Bằng cách phân tích dữ liệu trên, xạ khuẩn VH19-A002, VH19-A067, VH19-A079, VH19-A105B và VH19-A121 được phân loại lần lượt là *Streptomyces avidinii* VH19-A002, *Streptomyces spiroverticillatus* VH19-A067, *Streptomyces wuyanensis* VH19-A079, *Streptomyces alboniger* VH19-A105B và *Streptomyces alboniger* VH19-A121

3.2. Kết quả xác định cấu trúc của các chất được phân lập từ dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn

3.2.1. Biện luận cấu trúc hóa học các hợp chất từ xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121

3.2.1.1. Chất AT.01



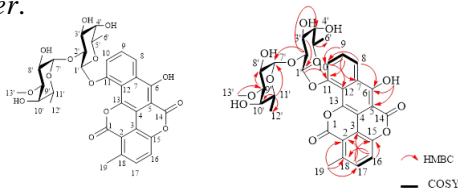
Hình 3.4. Cấu trúc và tương tác HMBC, COSY, NOESY của hợp chất AT.01

Hợp chất **AT.01** được phân lập dưới dạng chất rắn, màu vàng. Dữ liệu phổ của **AT.01** phù hợp với dữ liệu phổ của obscurolide B_{2β}. Do đó, hợp chất **AT.01** được xác định là obscurolide B_{2β}. Đây là lần đầu tiên hợp chất này phân lập từ *Streptomyces alboniger*.

3.2.1.2. Chất AT.02

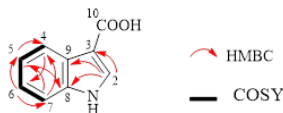
Hợp chất **AT.02** được phân lập dưới dạng bột, màu vàng lục. Hợp chất **AT.02** được xác định là chartreusin, một benzonaphthopyranone glycoside đã được phân lập và xác định trước đây từ *Streptomyces*

chartreusis. Đây là lần đầu tiên chartreusin được phân lập từ loài *Streptomyces alboniger*.



Hình 3.7. Cấu trúc và tương tác HMBC, COSY của hợp chất AT.02

3.2.2. Biện luận cấu trúc hóa học hợp chất từ xạ khuẩn *Streptomyces wuyuanensis* VH19-A079



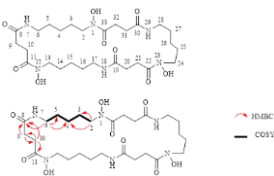
Hình 3.15. Cấu trúc hóa học của chất AT.03

Hợp chất **AT.03** được phân lập dưới dạng bột màu vàng nhạt. Kết hợp dữ liệu phổ NMR, MS và so sánh với tài liệu tham khảo, hợp chất **AT.03** được xác định là indole-3-carboxylic acid.

3.2.3. Biện luận cấu trúc hóa học các hợp chất từ xạ khuẩn *Streptomyces aureus* VTCC43181

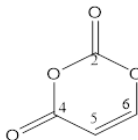
3.2.3.1. Chất AT.04

Hợp chất **AT.04** được phân lập dưới dạng bột không màu. Kết hợp dữ liệu phổ NMR, MS và so sánh với tài liệu tham khảo cho phép xác định hợp chất **AT.04** là nocardamin, một vòng trimer vòng của N-hydroxy-N'-succinylcadaverine.



Hình 3.16. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC, COSY của hợp chất AT.04

3.2.3.2. Chất AT.05

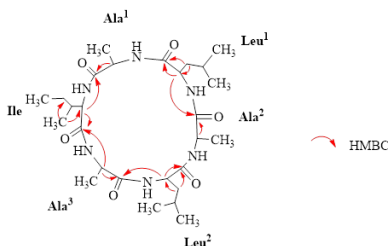


Hình 3.18. Cấu trúc hóa học của hợp chất AT.05

Chất AT.05 được phân lập dưới dạng bột màu trắng. Kết hợp các dữ liệu phổ (Bảng 3.6) và so sánh với tài liệu tham khảo cho phép kết luận chất AT.05 là pleurone (4H-1,3-dioxine-2,4-dione) ứng với công thức phân tử là $C_4H_2O_4$.

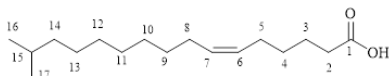
3.2.3.3. Chất AT.06

Hợp chất AT.06 được phân lập dưới dạng chất rắn, màu trắng. Kết hợp phổ NMR, HR-ESI-MS và so sánh với tài liệu tham khảo, hợp chất AT.06 được xác định là halolitoralin A, một hexapeptide vòng gồm Ala (x3), Leu (x2) và Ile.



Hình 3.19. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC trong hợp chất AT.06

3.2.4. Biện luận cấu trúc hóa học hợp chất từ xạ khuẩn *Streptomyces spiroverticillatus* VH19-A067



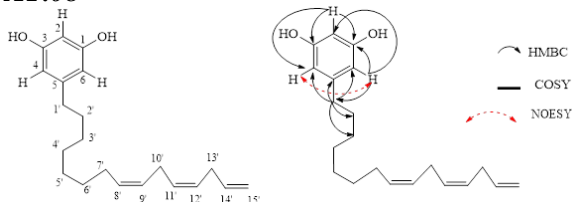
Hình 3.20. Cấu trúc hóa học của hợp chất AT.07

Hợp chất AT.07 được phân lập dưới dạng chất rắn, màu hồng nhạt. Kết hợp phân tích các dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo cho phép xác định cấu trúc của hợp chất AT.07 là (6Z)-15-methyl-6-

hexadecenoic acid.

3.2.5. Biện luận cấu trúc hóa học các hợp chất từ xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A105B

3.2.5.1. Chất AT.08

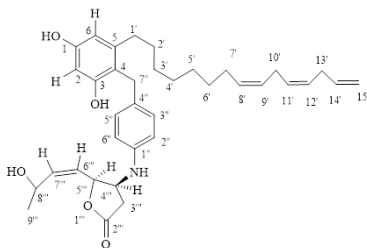


Hình 3.22. Cấu trúc và tương tác COSY, HMBC, NOESY của hợp chất AT.08

Hợp chất **AT.08** được phân lập ở dạng dầu, màu nâu. Kết hợp dữ liệu phổ NMR, HR-ESI-MS và so sánh với tài liệu tham khảo, hợp chất **AT.08** được xác định là cardoltriene.

3.2.5.2. Chất AT.09

Hợp chất **AT.09** được phân lập ở dạng dầu, màu nâu. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS cho tín hiệu pic ion giả phân tử tại m/z 596,3325 (tính toán lý thuyết cho $C_{36}H_{47}NO_5Na$ 596,3352 $[M+Na]^+$), 572,3406 (tính toán lý thuyết cho $C_{36}H_{46}NO_5$ 572,3376 $[M-H]^-$) cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **AT.09** là $C_{36}H_{47}NO_5$.



Hình 3.28. Cấu trúc hóa học của chất AT.09

Phổ 1H -NMR xuất hiện 6 tín hiệu của vòng thơm tại δ_H 6,98 (2H, d, $J = 8,5$, H-3'', H-5''), 6,47 (2H, dd, $J = 8,5$, 3,0, H-2'', H-6''), 6,29 (1H, m, H-6), 6,22 (1H, *br s*, H-2), 9 tín hiệu proton olefin tại δ_H 5,88 (1H, m, H-

7'''), 5,83 (1H, m, H-14'), 5,73 (1H, m, H-6'''), 5,42 (1H, m, H-12'), 5,41 (1H, m, H-11'), 5,36 (1H, m, H-8'), 5,34 (1H, m, H-9'), 5,04 (2H, m, H-15') và 11 tín hiệu của nhóm methylene ứng với δ_{H} 3,86 (2H, s, H-7''), 2,96 (1H, m, H-3''')a), 2,40 (1H, d, $J = 3,5$, H-3''')b), 2,82 (2H, m, H-13'), 2,77 (2H, m, H-10'), 2,50 (2H, t, $J = 7,5$, H-1'), 2,02 (2H, m, H-7'), 1,48 (2H, m, H-2'), 1,27 (8H, m, H-3', H-4', H-5', H-6'). Ngoài ra, trên phổ $^1\text{H-NMR}$ còn cho thấy 2 tín hiệu của nhóm methine tại δ_{H} 4,79 (1H, m, H-5'''), 3,97 (1H, m, H-4''') và 1 tín hiệu của nhóm methyl tại δ_{H} 1,25 (3H, m, H-9''').

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ xuất hiện 12 tín hiệu carbon của vòng thơm ứng với δ_{C} 155,5 (C-3), 154,8 (C-1), 144,1 (C-5), 143,8 (C-1''), 130,3 (C-4''), 129,1 (C-3'', C-5''), 117,1 (C-4), 114,1 (C-2'', C-6''), 108,8 (C-6), 101,0 (C-2), 8 carbon olefin tại δ_{C} 138,5 (C-7'''), 136,9 (C-14'), 130,9 (C-8'), 129,3 (C-12'), 127,6 (C-9'), 126,9 (C-11'), 124,6 (C-6'''), 114,7 (C-15'), 11 tín hiệu nằm trong vùng ankyr no ứng với δ_{C} 33,5 (C-1'), 31,0 (C-2', C-13'), 30,0 (C-3', C-4', C-5', C-6'), 27,2 (C-7'), 25,6 (C-10'), 23,2 (C-9'''). Ngoài ra, phổ $^{13}\text{C-NMR}$ còn cho thấy tín hiệu của nhóm methylene tại δ_{C} 35,3 (C-3'''), 2 nhóm methine tại δ_{C} 84,7 (C-5'''), 55,5 (C-4''') và 1 nhóm lacton carbonyl tại δ_{C} 174,9 (C-2'''). So sánh dữ liệu phổ ^1H và $^{13}\text{C-NMR}$ với dữ liệu của **AT.08** cho thấy cấu trúc của hợp chất **AT.08** và **AT.09** tương tự nhau.

Sự gán kết các tín hiệu phổ ^1H và $^{13}\text{C-NMR}$ được khẳng định dựa trên các tương tác xuất hiện trên phổ HSQC, COSY và HMBC. Phổ COSY cũng cho thấy sự phù hợp với sự gán kết như trên khi xuất hiện các tương tác của các proton trong vòng thơm giữa H-2'' (δ_{H} 6,47)/H-3'' (δ_{H} 6,98); H-6'' (δ_{H} 6,47)/H-5'' (δ_{H} 6,98) và tương tác của các proton trong nhóm allyl giữa H-15' (δ_{H} 5,04)/H-14' (δ_{H} 5,83); H-12' (δ_{H} 5,42)/H-13' (δ_{H} 2,82); H-13' (δ_{H} 2,82)/ H-14' (δ_{H} 5,83); H-11' (δ_{H} 5,41)/H-10' (δ_{H} 2,77); H-9' (δ_{H} 5,34)/H-10' (δ_{H} 2,77); H-7' (δ_{H} 2,02)/H-8' (δ_{H} 5,36), H-6' (δ_{H} 1,27); H-1' (δ_{H} 2,50)/H-2' (δ_{H} 1,48); H-2' (δ_{H} 1,48)/H-3' (δ_{H} 1,27); H-7''' (δ_{H} 5,88)/H-

8''' (δ_H 4,34), H-6''' (δ_H 5,73); H-8''' (δ_H 4,34)/H-9''' (δ_H 1,25); H-3''' (δ_H 2,96)/H-4''' (δ_H 3,97); H-4''' (δ_H 3,97)/H-5''' (δ_H 4,79); H-5''' (δ_H 4,79)/H-6''' (δ_H 5,73).

Trên phổ HMBC xuất hiện tương tác giữa H-1' (δ_H 2,50) với C-4 (δ_C 117,1), C-5 (δ_C 144,1), C-6 (δ_C 108,8); H-2 (δ_H 6,22) với C-4 (δ_C 117,1); H-6 (δ_H 6,29) với C-2 (δ_C 101,0), C-4 (δ_C 117,1), C-1' (δ_C 33,5), cho thấy mạch nhánh allyl liên kết với vòng thơm tại vị trí C-5. Vị trí thế của mạch nhánh phenyl vào vòng phenolic ở vị trí C-4 được xác định dựa vào tương tác giữa H-7'' (δ_H 3,86) với C-3 (δ_C 155,3), C-5 (δ_C 144,1); H-5'' (δ_H 6,98) với C-1'' (δ_C 143,8), C-3'' (129,1), C-7'' (29,6); H-3'' (δ_H 6,98) với C-1'' (δ_C 143,8), C-5'' (129,1); H-2'' (δ_H 6,47) với C-6'' (δ_C 114,1) trong phổ HMBC. Tương tác NOESY giữa H-2'' (δ_H 6,47)/H-4''' (δ_H 3,97), H-5''' (δ_H 4,79); H-4''' (δ_H 3,97)/H-5''' (δ_H 4,79); H-5''' (δ_H 4,79)/H-6''' (δ_H 5,73), H-7''' (δ_H 5,88); H-6''' (δ_H 5,73)/H-7''' (δ_H 5,88); H-8' (δ_H 5,36)/H-9' (δ_H 5,34)'; H-11' (δ_H 5,41)'/H-12' (δ_H 5,42)' cho phép xác định cấu hình tương đối của hợp chất **AT.09** như trong hình 3.39.

Dữ liệu phổ ^1H and ^{13}C -NMR của hợp chất **AT.09** được trình bày ở Bảng 3.7. Từ các dữ liệu phổ được trình bày ở trên có thể kết luận chất **AT.09** là chất mới và được đặt tên là cardoltriene M.

*Bảng 3.7. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của chất **AT.08** và **AT.09***

C	AT.08		AT.09		Cardoltriene	
	δ_H (ppm) ^a	δ_C (ppm) ^b	δ_H (ppm) ^c	δ_C (ppm) ^d	δ_H (ppm) ^e	δ_C (ppm) ^f
1		159,3		154,8		156,4
2	6,09 (1H, m)	100,9	6,22 (1H, br s)	101,0	6,17 (1H, br s)	100,2
3		159,3		155,3		156,4
4	6,14 (1H, d, $J = 2,5$ Hz)	107,9		117,1	6,24 (1H, d, $J = 1,8$ Hz)	108,1
5		146,3		144,1		146,2
6	6,14 (1H, d, $J = 2,5$)	107,9	6,29 (1H, m)	108,8	6,24 (1H, d, $J = 1,8$)	108,1

	Hz)				Hz)	
1'	2,45 (2H, t, $J = 7,5$ Hz)	36,9	2,50 (2H, t, $J = 7,5$ Hz)	33,5	2,44 (2H, t, $J = 7,7$ Hz)	35,8
2'	1,56 (2H, m)	32,4	1,48 (2H, m)	31,0	1,53 (2H, m)	31,0
3'	1,30 (2H, m)	30,4	1,27 (2H, m)	30,0	1,28 (2H, m)	29,6
4'	1,30 (2H, m)	30,8	1,27 (2H, m)	30,0	1,28 (2H, m)	29,4
5'	0,93 (2H, m)	23,0	1,27 (2H, m)	30,0	1,28 (2H, m)	29,3
6'	1,32 (2H, m)	23,7	1,27 (2H, m)	30,0	1,28 (2H, m)	29,2
7'	2,08 (2H, m)	28,1	2,02 (2H, m)	27,2	2,03 (2H, q, $J = 6,6$ Hz)	27,2
8'	5,35 (1H, m)	130,2	5,36 (1H, m)	130,9	5,37 (1H, m)	130,4
9'	5,34 (1H, m)	130,2	5,34 (1H, m)	127,6	5,37 (1H, m)	129,3
10'	2,81 (2H, m)	26,4	2,77 (2H, m)	25,6	2,80 (2H, m)	25,6
11'	5,40 (1H, m)	127,8	5,41 (1H, m)	126,9	5,37 (1H, m)	127,6
12'	5,42 (1H, m)	128,7	5,42 (1H, m)	129,3	5,37 (1H, m)	126,8
13'	2,83 (2H, m)	32,3	2,82 (2H, m)	31,0	2,80 (2H, m)	31,5
14'	5,83 (1H, m)	137,9	5,83 (1H, m)	136,9	5,82 (1H, ddt, $J = 17,1$ 10,3, 6,2 Hz)	136,8
15'	5,02 (1H, m) 4,96 (1H, m)	115,0	5,04 (1H, m)	114,7	5,05 (1H, dq, $J = 17,1$ 1,6 Hz) 4,98 (1H, dq, $J = 10,3$, 1,6 Hz)	114,7
1''				143,8		
2''			6,47 (1H, dd, $J =$ 8,5, 3,0 Hz)	114,1		
3''			6,98 (1H, d, $J = 8,5$ Hz)	129,1		
4''				130,3		
5''			6,98 (1H, d, $J = 8,5$	129,1		

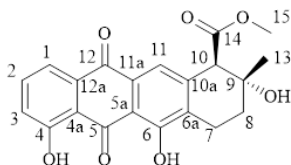
			Hz)			
6''			6,47 (1H, dd, $J = 8,5, 3,0$ Hz)	114,1		
7''			3,86 (2H, s)	29,6		
1'''						
2'''				174,9		
3'''			2,96 (1H, m) 2,40 (1H, d, $J = 3,5$ Hz)	35,2		
4'''			3,97 (1H, m)	55,5		
5'''			4,79 (1H, m)	84,7		
6'''			5,73 (1H, m)	124,6		
7'''			5,88 (1H, m)	138,5		
8'''			4,34 (1H, m)	67,5		
9'''			1,25 (3H, m)	23,2		

^a500 MHz, CD₃OD; ^b125 MHz, CD₃OD; ^c500 MHz, CDCl₃; ^d125 MHz, CDCl₃; ^e300 MHz, CDCl₃; ^f100 MHz CDCl₃

3.2.5.3. Chất AT.10

Hợp chất **AT.10** được phân lập dưới dạng bột, màu vàng lục. Dựa vào phổ NMR cho thấy cấu trúc của hợp chất **AT.10** trùng với hợp chất **AT.02** là chartreusin.

3.2.5.4. Chất AT.11

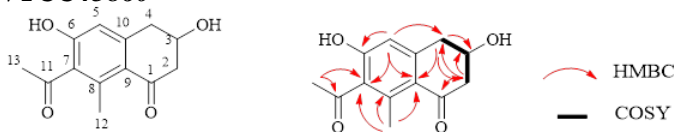


Hình 3.40. Cấu trúc hóa học của chất AT.11

Hợp chất **AT.11** được phân lập dưới dạng chất rắn, màu cam. Kết hợp dữ liệu phổ NMR, MS và so sánh với tài liệu tham khảo cho phép xác

định chất **AT.11** là 7-deoxyauramycinone (9-epi-7-deoxy-nogalamycinone).

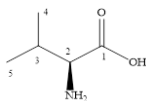
3.2.6. Biện luận cấu trúc hóa học hợp chất từ xạ khuẩn *Streptomyces cyaneus* VTCC43860



Hình 3.42. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC, COSY của hợp chất **AT.12**

Hợp chất **AT.12** được phân lập dưới dạng bột, màu trắng. Dựa vào việc phân tích phổ NMR, MS và so sánh với tài liệu tham khảo cho phép kết luận hợp chất **AT.12** là 7-acetyl-3,6-dihydroxy-8-methyl tetralone.

3.2.7. Biện luận cấu trúc hóa học hợp chất từ xạ khuẩn *Streptomyces sp.* VTCC43168

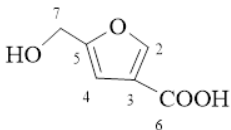


Hình 3.43. Cấu trúc hóa học của chất **AT.13**

Hợp chất **AT.13** được phân lập dưới dạng chất rắn, màu trắng. Trên cơ sở phân tích dữ liệu phổ trên cho phép kết luận chất **AT.13** là valin (Acid 2-amino-3-methylbutanoic).

3.2.8. Biện luận cấu trúc hóa học các hợp chất từ xạ khuẩn *Actinoplanes missouriensis* VTCC40900

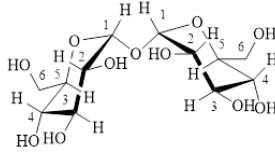
3.2.8.1. Chất **AT.14**



Hình 3.44. Cấu trúc của hợp chất **AT.14**

Hợp chất **AT.14** được phân lập dưới dạng tinh thể hình kim, không màu. Phổ NMR của chất **AT.14** hoàn toàn trùng khớp với 5-hydroxymethylfuran-3-carboxylic acid hay flufuran.

3.2.8.2. Chất AT.15



Hình 3.47. Cấu trúc hóa học của hợp chất AT.15

Hợp chất AT.15 được phân lập dưới dạng chất rắn, màu trắng. Kết hợp các dữ liệu phổ NMR, phổ MS (m/z 364,9 $[M+Na]^+$) và so sánh với tài liệu tham khảo cho phép kết luận chất AT.15 là trehalose.

3.3. Kết quả đánh giá hoạt tính của các chất sạch phân lập được

3.3.1. Hoạt tính kháng khuẩn *Mycobacterium smegmatis*

Hợp chất AT.01 và AT.02 được đánh giá về hoạt tính kháng khuẩn đối với chủng *M. smegmatis*. Kết quả cho thấy hợp chất AT.02 thể hiện hoạt tính kháng *M. smegmatis* mạnh với đường kính vòng vô khuẩn là 15 mm, trong khi hợp chất AT.01 không thể hiện hoạt tính kháng *M. smegmatis*. Chartreusin được báo cáo là có hoạt tính kháng khuẩn tiềm năng đối với chủng *Mycobacterium tuberculosis* 607 và *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Tuy nhiên, đây là lần đầu tiên hợp chất chartreusin được phân lập từ *Streptomyces alboniger* và có hoạt tính kháng khuẩn đối với *M. smegmatis*.

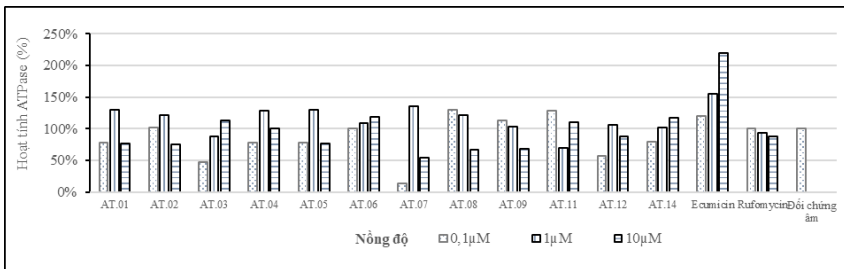
3.3.2. Đánh giá hoạt tính ATPase của protein tái tổ hợp ClpC1

Kết quả thí nghiệm cho thấy các protein ClpC1 sau khi được tổng hợp đều nằm trong màng tế bào, chỉ được thu lại sau quá trình phá màng tế bào bằng sóng siêu âm. Protein tái tổ hợp ClpC1 có trọng lượng phân tử xấp xỉ 93,5 kDa.

Hoạt độ thủy phân ATP của tế bào được xác định bằng phương pháp đo lượng phosphate (Pi) giải phóng ra. Kết quả cho thấy, ATP bắt đầu tăng dần tốc độ thủy phân tại nồng độ 10 μ M và thể hiện đầy đủ chức năng thủy phân. Sau khi tinh sạch, protein tái tổ hợp ClpC1 được tiến hành kiểm tra

tính ổn định của hoạt tính thủy phân ATP. Sau ngày thứ 7, hoạt độ ATPase không còn ổn định.

Ecumicin và rufomycin được sử dụng làm chất đối chứng dương trong nghiên cứu này. Chúng tôi đã thử nghiệm các nồng độ khác nhau của các hợp chất **AT.01**, **AT.02**, **AT.03**, **AT.04**, **AT.05**, **AT.06**, **AT.07**, **AT.08**, **AT.09**, **AT.11**, **AT.12**, **AT.14** (0.1 μM , 1.0 μM và 10.0 μM) và quan sát hoạt động của enzyme ATPase của protein ClpC1. Kết quả cho thấy, hoạt tính của ATPase tăng dần theo nồng độ của hợp chất **AT.03**, **AT.06** và **AT.14**, do vậy, các hợp chất này có khả năng ảnh hưởng đến quá trình thủy phân ATP của protein ClpC1 tương tự như ecumicin, tuy nhiên với hoạt độ phân giải ATP thấp hơn. Đối với hai chất **AT.08** (Cardoltriene), **AT.09** (Cardoltriene M), khi tăng nồng độ thì hoạt tính của ATPase giảm dần, do vậy, hai hợp chất này có khả năng ảnh hưởng đến quá trình thủy phân ATP của protein ClpC1 tương tự như rufomycin, tuy nhiên với hoạt độ phân giải ATP cao hơn. Với tác dụng làm giảm đến gần 50% hoạt tính thủy phân ATP tại nồng độ 10 μM của hai chất **AT.08**, **AT.09** cho thấy là hai trong số các chất có tiềm năng cao trong kháng vi khuẩn lao thông qua con đường tác động đến protein ClpC1 theo hướng giảm hoạt độ ATPase trong khi các chất **AT.03**, **AT.06** và **AT.14** làm tăng hoạt độ ATPase của protein ClpC1. Tuy nhiên, cần có các nghiên cứu sâu hơn về cơ chế và vị trí tác động của các hợp chất này lên protein tái tổ hợp ClpC1 của vi khuẩn lao.



Hình 3.52. Kết quả đánh giá tác động của các hợp chất lên ATPase của ClpC1

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

➤ Kết luận

1. Đã phân lập được 181 chủng xạ khuẩn khác nhau từ 26 mẫu đất và trầm tích được thu thập từ các vùng dọc khu vực miền Bắc tới miền Trung, Việt Nam và sàng lọc hoạt tính kháng chủng *M. smegmatis* là chủng tương đồng với vi khuẩn lao *M. tuberculosis* của 181 chủng xạ khuẩn này. Kết quả cho thấy các chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng *M. smegmatis* mạnh nhất là *S. avidinii* VH19-A002 (từ rừng ngập mặn Phù Long), *S. spiroverticillatus* VH19-A067 (từ ngã ba sông Đáy và sông Vạc), *S. wuyanensis* VH19-A079 (từ rừng ngập mặn Quỳnh Lương), *S. alboniger* VH19-A105B (từ đường lên đỉnh núi Mây Bạc) và *S. alboniger* VH19-A121 (từ đỉnh núi Mây Bạc).

2. Đã tiến hành nghiên cứu phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 14 hợp chất từ dịch sinh khối của các chủng xạ khuẩn bằng các phương pháp phổ hiện đại như HR-ESI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HSQC, HMBC, COSY, NOESY, cụ thể như sau:

+ 2 chất từ chủng *S. alboniger* VH19-A121 là obscurolide B_{2p} (**AT.01**) thuộc khung obscurolide, chartreusin (**AT.02**) thuộc khung benzonaphthopyranone glycoside.

+ 1 chất từ chủng *S. wuyanensis* VH19-A079 là indole-3-carboxylic acid (**AT.03**) thuộc khung indole carboxylic acid.

+ 3 chất từ chủng *S. aureus* VTCC43181 là nocardamin (**AT.04**) thuộc hợp chất cyclopeptide, pleurone (**AT.05**) thuộc khung lacton, halolitoralin A (**AT.06**) thuộc hợp chất cyclopeptide.

+ 1 chất từ chủng *S. spiroverticillatus* VH19-A067 là (6Z)-15-methyl-6-hexadecenoic acid (**AT.07**) thuộc hợp chất carboxylic acid.

+ 3 chất từ chủng *S. alboniger* VH19-A105B là cardoltriene (**AT.08**) thuộc hợp chất polyphenol, cardoltriene M (**AT.09**, chất mới) thuộc hợp chất polyphenol, 7-deoxyauramycinone (**AT.11**) thuộc khung anthraquinone. Trong đó có 1 chất mới được đặt tên là cardoltriene M (**AT.09**).

+ 1 chất từ chủng *S. cyaneus* VTCC43860 là 7-acetyl-3,6-dihydroxy-8-methyl tetralone (**AT.12**) thuộc khung tetralone.

+ 1 chất từ chủng *Streptomyces* sp. VTCC43168 là valin (**AT.13**) thuộc hợp chất amino acid.

+ 2 chất từ chủng *A. missouriensis* VTCC40900 là flufuran (**AT.14**) thuộc khung furan, trehalose (**AT.15**) thuộc khung glycoside.

3. Các hợp chất **AT01** và **AT02** đã được đánh giá hoạt tính kháng chủng *M. smegmatis*, trong đó hợp chất **AT02** thể hiện hoạt tính mạnh hơn chất đối chứng dương rufomycin, với đường kính kháng khuẩn là 15 mm. Hợp chất **AT01** không thể hiện hoạt tính.

4. Mười hai hợp chất (**AT.01, AT.02, AT.03, AT.04, AT.05, AT.06, AT.07, AT.08, AT.09, AT.11, AT.12, AT.14**) được đánh giá khả năng tác động lên hoạt tính ATPase của protein tái tổ hợp ClpC1. Đây là lần đầu tiên các hợp chất này được đánh giá khả năng tác động lên quá trình thủy phân ATP của protein ClpC1, một protein điều tiết quan trọng của vi khuẩn lao *M. tuberculosis*. Kết quả cho thấy có 5 hợp chất là indole-3-carboxylic acid (**AT.03**), halolitoralin A (**AT.06**), flufuran (**AT.14**), cardoltriene (**AT.08**) và cardoltriene M (**AT.09**) có tác dụng ức chế protein ClpC1 thông qua quá trình thủy phân ATP của protein ClpC1. Kết quả nghiên cứu cho thấy các hợp chất phân lập được từ các xạ khuẩn nghiên cứu đã tác động tới protein ClpC1 của vi khuẩn lao. Trong đó, chất cardoltriene (**AT.08**) và cardoltriene M (**AT.09**) được xem là hai trong số các chất có tiềm năng cao trong kháng vi khuẩn lao thông qua con đường tác động đến protein ClpC1.

➤ Kiến nghị

- Tiếp tục nghiên cứu các chủng xạ khuẩn đã phân lập được cũng như điều kiện nuôi cấy chủng xạ khuẩn nhằm tìm kiếm các hợp chất mới có hoạt tính kháng khuẩn và kháng lao mà trong khuôn khổ luận án chưa có điều kiện thực hiện.

- Có những nghiên cứu tiếp theo, sâu hơn về cơ chế và vị trí tác động của các hợp chất như indole-3-carboxylic acid (**AT.03**), halolitoralin A (**AT.06**), flufuran (**AT.14**), cardoltriene (**AT.08**) và cardoltriene M (**AT.09**) đến protein tái tổ hợp ClpC1.

- Nghiên cứu quy trình phân lập và nuôi cấy lượng lớn các chủng xạ khuẩn (*S. spiroverticillatus* VH19-A067, *S. wuyanensis* VH19-A079, *S. alboniger* VH19-A105B và *S. alboniger* VH19-A121) nhằm tìm kiếm các hợp chất kháng lao mới phục vụ cho y dược học.