

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 ClpC1 CỦA CÁC HỢP CHẤT TỪ MỘT SỐ
LOÀI XẠ KHUẨN VIỆT NAM

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

HÀ NỘI - 2024

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 ClpC1 CỦA CÁC HỢP CHẤT TỪ MỘT SỐ
LOÀI XẠ KHUẨN VIỆT NAM

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

Mã số: 9 44 01 14

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ

Người hướng dẫn 1
(Ký, ghi rõ họ tên)

Người hướng dẫn 2
(Ký, ghi rõ họ tên)

PGS.TS. Trần Thị Phương Thảo GS.TSKH. Trần Văn Sung

HÀ NỘI – 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: "Nghiên cứu chiết tách, xác định cấu trúc hoá 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 công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của PGS.TS. Trần Thị Phương Thảo và GS.TSKH. Trần Văn Sung. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày tháng năm 2024

Tác giả luận án

Huỳnh Thị Ngọc Ni

LỜI CẢM ƠN

Với lòng biết ơn chân thành và sâu sắc, tôi xin gửi đến GS. TSKH. Trần Văn Sung và PGS.TS. Trần Thị Phương Thảo đã tận tình hướng dẫn, tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong thời gian thực hiện các chuyên đề và luận án.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn đến các cán bộ nghiên cứu phòng Tổng hợp hữu cơ, các thầy cô, các nhà khoa học Viện Hóa học-Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giảng dạy, hướng dẫn tôi trong suốt thời gian thực hiện chuyên đề và luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn sự giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi của Ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Trường Đại học Phú Yên, Ban lãnh đạo Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong thời gian học tập và hoàn thành các chuyên đề và luận án.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến toàn thể gia đình, đồng nghiệp và bạn bè đã ủng hộ và động viên tôi trong suốt chặng đường dài học tập và thực hiện các chuyên đề và luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn!

Hà Nội, ngày tháng năm 2024

Tác giả luận án

Huỳnh Thị Ngọc Ni

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT	v
DANH MỤC BẢNG	vii
DANH MỤC HÌNH	viii
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN	3
1.1. Tình hình bệnh lao ở Việt Nam và thế giới – Tình hình kháng thuốc ở vi khuẩn lao	3
<i>1.1.1. Tình hình bệnh lao ở Việt Nam và thế giới</i>	<i>3</i>
<i>1.1.2. Tình trạng kháng thuốc ở vi khuẩn lao tại Việt Nam và trên thế giới</i>	<i>3</i>
1.2. Các hợp chất kháng lao được phân lập từ xạ khuẩn trên thế giới và ở Việt Nam	4
<i>1.2.1. Giới thiệu về xạ khuẩn</i>	<i>4</i>
<i>1.2.2. Các hợp chất kháng lao được phân lập từ xạ khuẩn trên thế giới</i>	<i>5</i>
1.2.2.1. Hợp chất kháng lao thuộc nhóm aminoglycoside	5
1.2.2.2. Hợp chất kháng lao thuộc nhóm nitroimidazole	6
1.2.2.3. Hợp chất kháng lao thuộc nhóm macrolide	7
1.2.2.4. Hợp chất kháng lao thuộc nhóm cyclopeptide	8
1.2.2.5. Hợp chất kháng lao thuộc nhóm diaza-anthracene	12
1.2.2.6. Hợp chất kháng lao thuộc nhóm polyketide	13
<i>1.2.3. Các hợp chất kháng lao được phân lập từ xạ khuẩn ở Việt Nam</i>	<i>13</i>
1.3. Tổng quan về một số loài xạ khuẩn là đối tượng nghiên cứu	13
<i>1.3.1. Chủng xạ khuẩn Streptomyces alboniger</i>	<i>13</i>
1.3.1.1. Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn Streptomyces alboniger	13
1.3.1.2. Các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học được phân lập từ xạ khuẩn Streptomyces alboniger	16
<i>1.3.2. Chủng xạ khuẩn Streptomyces wuyuanensis</i>	<i>18</i>
<i>1.3.3. Chủng xạ khuẩn Streptomyces aureus</i>	<i>20</i>
1.3.3.1. Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn Streptomyces aureus	20
1.3.3.2. Các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học được phân lập từ xạ khuẩn Streptomyces aureus	21
<i>1.3.4. Chủng xạ khuẩn Streptomyces spiroverticillatus</i>	<i>23</i>
1.3.4.1. Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn Streptomyces spiroverticillatus	23
1.3.4.2. Các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học được phân lập từ xạ khuẩn Streptomyces spiroverticillatus	25

1.3.5. Chứng xạ khuẩn <i>Streptomyces cyaneus</i>	26
1.3.5.1. Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn <i>Streptomyces cyaneus</i>	26
1.3.5.2. Các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học được phân lập từ xạ khuẩn <i>Streptomyces cyaneus</i>	27
1.3.6. Chứng xạ khuẩn <i>Actinoplanes missouriensis</i>	29
1.3.6.1. Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn <i>Actinoplanes missouriensis</i>	29
1.3.6.2. Các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học được phân lập từ xạ khuẩn <i>Actinoplanes missouriensis</i>	29
1.4. Tổng quan về protein ClpC1	30
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VÀ THỰC NGHIỆM.....	34
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	34
2.1.1. Xạ khuẩn thuộc chi <i>Streptomyces</i>	34
2.1.2. Xạ khuẩn hiếm thuộc chi <i>Actinoplanes</i>	34
2.2. Hoá chất, thiết bị nghiên cứu	35
2.2.1. Hoá chất	35
2.2.2. Thiết bị.....	35
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	35
2.3.1. Phương pháp thu thập và phân lập chủng xạ khuẩn	35
2.3.1.1. Phương pháp thu thập chủng xạ khuẩn.....	35
2.3.1.2. Phương pháp phân lập chủng xạ khuẩn.....	35
2.3.2. Phương pháp tạo cao chiết từ dịch nuôi cấy của các chủng xạ khuẩn	36
2.3.3. Phương pháp phân lập các hợp chất thứ cấp từ cao chiết	36
2.3.4. Phương pháp xác định cấu trúc các hợp chất thứ cấp phân lập được.	37
2.3.5. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học.....	37
2.3.5.1. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng vi khuẩn tương đồng vi khuẩn lao <i>Mycobacterium smegmatis</i>	37
2.3.5.2. Phương pháp đánh giá tác dụng ức chế protein ClpC1 của vi khuẩn lao	38
2.4. Chiết xuất và phân lập các chất từ dịch nuôi cấy của các chủng xạ khuẩn	40
2.4.1. Chiết xuất và phân lập các chất từ dịch nuôi cấy của xạ khuẩn <i>Streptomyces alboniger</i> VH19-A121	40
2.4.2. Chiết xuất và phân lập các chất từ dịch nuôi cấy của xạ khuẩn <i>Streptomyces wuyuanensis</i> VH19-A079	42
2.4.3. Chiết xuất và phân lập các chất từ dịch nuôi cấy của xạ khuẩn	

<i>Streptomyces aureus</i> VTCC43181.....	44
2.4.4. Chiết xuất và phân lập các chất từ dịch nuôi cấy của xạ khuẩn <i>Streptomyces spiroverticillatus</i> VH19-A067	46
2.4.5. Chiết xuất và phân lập các chất từ dịch nuôi cấy của xạ khuẩn <i>Streptomyces alboniger</i> VH19-A105B	47
2.4.6. Chiết xuất và phân lập các chất từ dịch nuôi cấy của xạ khuẩn <i>Streptomyces cyaneus</i> VTCC43860.....	50
2.4.7. Chiết xuất và phân lập các chất từ dịch nuôi cấy của xạ khuẩn <i>Streptomyces</i> sp. VTCC43168	51
2.4.8. Chiết xuất và phân lập các chất từ dịch nuôi cấy của xạ khuẩn <i>Actinoplanes missouriensis</i> VTCC40900.....	52
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	55
3.1. Kết quả phân lập và định danh các chủng xạ khuẩn.....	55
3.1.1. Phân lập chủng xạ khuẩn	55
3.1.2. Sàng lọc các chủng xạ khuẩn có khả năng kháng <i>Mycobacterium smegmatis</i>	57
3.1.3. Phân loại các chủng xạ khuẩn	59
3.2. Kết quả xác định cấu trúc của các chất được phân lập từ dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn	60
3.2.1. Biện luận cấu trúc hóa học các hợp chất từ xạ khuẩn <i>Streptomyces alboniger</i> VH19-A121.....	61
3.2.1.1. Chất AT.01	61
3.2.1.2. Chất AT.02	63
3.2.2. Biện luận cấu trúc hóa học hợp chất từ xạ khuẩn <i>Streptomyces wuyuanensis</i> VH19-A079	70
3.2.3. Biện luận cấu trúc hóa học các hợp chất từ xạ khuẩn <i>Streptomyces aureus</i> VTCC43181.....	71
3.2.3.1. Chất AT.04	71
3.2.3.3. Chất AT.06	74
3.2.4. Biện luận cấu trúc hóa học hợp chất từ xạ khuẩn <i>Streptomyces spiroverticillatus</i> VH19-A067.....	75
3.2.5. Biện luận cấu trúc hóa học các hợp chất từ xạ khuẩn <i>Streptomyces alboniger</i> VH19-A105B.....	76
3.2.5.1. Chất AT.08	76
3.2.5.2. Chất AT.09	80
3.2.5.3. Chất AT.10	88

3.2.5.4. <i>Chất AT.11</i>	88
3.2.6. <i>Biện luận cấu trúc hóa học hợp chất từ xạ khuẩn Streptomyces cyaneus VTCC43860</i>	90
3.2.7. <i>Biện luận cấu trúc hóa học hợp chất từ xạ khuẩn Streptomyces sp. VTCC43168</i>	92
3.2.8. <i>Biện luận cấu trúc hóa học các hợp chất từ xạ khuẩn Actinoplanes missouriensis VTCC40900</i>	93
3.2.8.1. <i>Chất AT.14</i>	93
3.2.8.2. <i>Chất AT.15</i>	94
3.3. Kết quả đánh giá hoạt tính của các chất sạch phân lập được	94
3.3.1. <i>Hoạt tính kháng chủng Mycobacterium smegmatis</i>	94
3.3.2. <i>Đánh giá hoạt tính ATPase của protein tái tổ hợp ClpC1</i>	95
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	100
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ	102
TÀI LIỆU THAM KHẢO	103
PHỤ LỤC	118

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tên tiếng Anh	Tên tiếng Việt
WHO	World Health Organization	Tổ chức y tế thế giới
HIV	Human immunodeficiency virus	Viruts gây suy giảm miễn dịch ở người
MDR	Multi-drug-resistant	Lao đa kháng thuốc
XDR	Extensively drug resistant	Lao siêu kháng thuốc
VRE	Vancomycin-resistant Enterococcus	Vì khuẩn <i>Enterococcus faecium</i> kháng vancomycin
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	Vì khuẩn <i>Staphylococcus aureus</i> kháng methicillin
NO	Oxid nitric	Oxid nitric
Gr (+)	Gram-positive bacteria	Vì khuẩn gram dương
Gr (-)	Gram-negative bacteria	Vì khuẩn gram âm
DNA	Deoxyribonucleic acid	Acid deoxyribonucleic
HL-60	Human leukemia cell line	Tế bào ung thư bạch cầu ở người
MCF-7	Human mammary adenocarcinoma cell	Tế bào ung thư vú
A549	Bronchogenic carcinoma cell lines	Tế bào ung thư phế quản
HEP-1	Hepatocellular carcinoma	Tế bào ung thư gan
HCT116	Human colorectal adenocarcinoma	Tế bào ung thư ruột kết
SNU638	Stomach cancer cells	Ung thư dạ dày
HCV	Hepatitis C virus	Virut viêm gan C
PAF	Platelet activating factor	Yếu tố hoạt hóa
MIC	Minimal inhibitory concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
MIC ₅₀	Minimal inhibitory concentration reached by 50%	Nồng độ ức chế tối thiểu đạt 50%
IC ₅₀	Inhibitory concentration 50%	Nồng độ ức chế 50% sự tăng trưởng của tế bào thử nghiệm
EC ₅₀	Effective concentration 50%	Nồng độ hiệu quả 50%
LD ₅₀	Lethal dose 50	Nồng độ làm chết 50 % số động vật thử nghiệm
TNF- α	Tumor necrosis factor- α	Yếu tố hoại tử khối u- α

EtOAc	Ethylacetate	Ethylacetate
MeOH	Methanol	Methanol
DC	Dichloromethane	Dichloromethane
A	Acetone	Acetone
DMSO	Dimethylsulfoxide	Dimethylsulfoxide
TLC	Thin Layer Chromatography	Sắc ký bản mỏng
ESI-MS	Electrospray ionization mass spectrum	Phổ khối ion hóa phun mù điện tử
ESI-HRMS	High resolution electrospray ionization mass spectrum	Phổ khối phân giải cao ion hóa phun điện tử
^1H -NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
^{13}C -NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon 13
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer	Phổ DEPT
^1H - ^1H COSY	^1H - ^1H Chemical Shift Correlation Spectroscopy	Phổ tương tác proton
HSQC	Heteronuclear SingleQuantum Coherence	Phổ tương tác dị hạt nhân qua 1 liên kết
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy	Phổ hiệu ứng Overhauser hạt nhân
ROESY	Rotational Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy	Phổ hiệu ứng Overhauser hạt nhân khung xoay
ADEP	Acyldepsipeptide	Acyldepsipeptide
PARP	Poly ADP ribose polymerase	Chất ức chế y học
ATP	Adenosin triphosphat	Adenosin triphosphat
ADP	Adenosin diphosphat	Adenosin diphosphat
Ala	Alanine	Acid amin alanin
Leu	Leucine	Acid amin leucin
Ile	Isoleucine	Acid amin isoleucin

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Sự thay đổi của <i>S. alboniger</i> ở các nhiệt độ khác nhau [39]	14
Bảng 1.2. Sự thay đổi của <i>S. alboniger</i> ở các điều kiện môi trường khác nhau [39]	14
Bảng 1.3. Hoạt tính kháng khuẩn của panamycin [41]	16
Bảng 1.4. Khoảng giới hạn một vài điều kiện môi trường đối với <i>S. wuyuanensis</i> ..	19
Bảng 1.5. Môi trường được sử dụng để phân lập <i>S. wuyuanensis</i>	19
Bảng 1.6. Đặc điểm hình thái của xạ khuẩn <i>S. aureus</i> trong các môi trường dinh dưỡng khác nhau [48]	20
Bảng 1.7. Sự thay đổi của <i>Streptomyces spiroverticillatus</i> ở các điều kiện môi trường khác nhau [55]	23
Bảng 1.8. Đặc điểm hình thái của xạ khuẩn <i>Streptomyces cyaneus</i> trong môi trường dinh dưỡng khác nhau	27
Bảng 2.1. Các chủng xạ khuẩn được phân lập từ các địa điểm thu thập khác nhau	34
Bảng 3.1. Các chủng xạ khuẩn được phân lập tại các địa điểm khác nhau	56
Bảng 3.2. Đặc điểm khuẩn lạc và kết quả hoạt tính kháng <i>M. smegmatis</i> của các chủng xạ khuẩn	58
Bảng 3.3. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của chất AT.02 và chartreusin [107]	69
Bảng 3.4. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của chất AT.03 và indole-3-carboxylic acid [108]	71
Bảng 3.5. Dữ liệu phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR của AT.04 và nocardamin [110]	73
Bảng 3.6. Dữ liệu phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR của AT.05 so với pleurone [114]	74
Bảng 3.7. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của chất AT.08 và AT.09	86
Bảng 3.8. Dữ liệu phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR của AT.11 so với 7-deoxyauramycinone [121]	89
Bảng 3.9. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của chất AT.12 và 7-acetyl-3,6-dihydroxy-8-methyl tetralone [123]	91
Bảng 3.10. Dữ liệu phổ của ^1H -NMR, ^{13}C -NMR của AT.14 so với flufuran [125] ..	93
Bảng 3.11. Hoạt tính kháng chủng <i>M. smegmatis</i> của hợp chất AT.01 và AT.02 ...	95
Bảng 3.12. Tổng kết các hợp chất phân lập được từ các chủng xạ khuẩn nghiên cứu	98

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Các thuốc lao có nguồn gốc từ xạ khuẩn thuộc khung aminoglycoside (1-10).....	6
Hình 1.2. Các hợp chất nhóm nitroimidazole có nguồn gốc từ xạ khuẩn được sử dụng làm thuốc kháng lao (11-14).....	6
Hình 1.3. Các thuốc kháng lao nhóm macrolide phân lập từ xạ khuẩn (15-19)	7
Hình 1.4. Cấu trúc của hợp chất 20 - 21	7
Hình 1.5. Cấu trúc của hợp chất 22 và 24	8
Hình 1.6. Cấu trúc của lassomycin 23	8
Hình 1.7. Cơ chế đề xuất quá trình tác động của các hợp chất thứ cấp phân lập được từ xạ khuẩn lên ClpC1 ở vi khuẩn lao [27]	9
Hình 1.8. Công thức hợp chất 25 - 27.....	10
Hình 1.9. Cấu trúc của hợp chất 28 – 34.....	11
Hình 1.10. Cấu trúc của hợp chất 35 – 36.....	12
Hình 1.11. Cấu trúc của hợp chất 37 - 40	12
Hình 1.12. Các hợp chất có hoạt tính kháng lao được phân lập từ xạ khuẩn <i>Micromonospora</i> sp ở Việt Nam (41 - 49).....	13
Hình 1.13. Hình dạng sợi nấm của <i>S. alboniger</i> trên đĩa thạch tổng hợp [39].....	14
Hình 1.14. Các hợp chất thuộc khung pamamycin (50 - 54)	16
Hình 1.15. Các hợp chất thuộc khung aminonucleoside (55 -57)	17
Hình 1.16. Công thức cấu tạo của hợp chất 58 – 70	18
Hình 1.17. Hình ảnh sợi FX61 ^T trên môi trường nuôi cấy ISP2, 28°C trong 4 tuần [45].....	18
Hình 1.18. Hình ảnh khuẩn lạc của <i>S. wuyuanensis</i>	19
Hình 1.19. Hình thái học của xạ khuẩn <i>S. aureus</i> [47]	20
Hình 1.20. Công thức cấu tạo của 71 - 75	21
Hình 1.21. Công thức cấu tạo của 76 - 80	22
Hình 1.22. Công thức cấu tạo của 81 - 82	23
Hình 1.23. Khuẩn lạc của xạ khuẩn <i>Streptomyces spiroverticillatus</i> [55]	23
Hình 1.24. Công thức cấu tạo của hợp chất 83 - 84.....	25
Hình 1.25. Con đường sinh tổng hợp của hợp chất 85.....	26
Hình 1.26. Hình ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét của xạ khuẩn <i>Streptomyces cyaneus</i> trong môi trường tinh bột nitrate agar.....	26
Hình 1.27. Công thức cấu tạo của các hợp chất anthracycline 86 - 94	28
Hình 1.28. Công thức cấu tạo của 95 - 98.....	29
Hình 1.29. Ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét của xạ khuẩn <i>Actinoplanes</i>	

<i>missouriensis</i> , 10 μ m [70].....	29
Hình 1.30. Công thức cấu tạo của hợp chất 99	30
Hình 1.31. Chuỗi amino acid của protein ClpC1 trong vi khuẩn lao <i>M. tuberculosis</i>	30
Hình 1.32. Cơ chế hoạt động của protease điều hòa ClpC1 trong vi khuẩn lao <i>M. tuberculosis</i> [76]	31
Hình 2.1. Cấu trúc của plasmid pET28b	38
Hình 2.2. Sơ đồ phân lập các chất từ dịch nuôi cấy xạ khuẩn <i>Streptomyces alboniger</i> VH19-A121	41
Hình 2.3. Sơ đồ phân lập các chất từ dịch nuôi cấy xạ khuẩn <i>Streptomyces wuyuanensis</i> (VH19-A079).....	43
Hình 2.4. Sơ đồ phân lập các chất từ dịch nuôi cấy xạ khuẩn <i>Streptomyces aureus</i> VTCC43181	44
Hình 2.5. Sơ đồ phân lập các chất từ dịch nuôi cấy xạ khuẩn <i>Streptomyces spiroverticillatus</i> VH19-A067	46
Hình 2.6. Sơ đồ phân lập các chất từ dịch nuôi cấy xạ khuẩn <i>Streptomyces alboniger</i> VH19-A105B.....	49
Hình 2.7. Sơ đồ phân lập các chất từ dịch nuôi cấy xạ khuẩn <i>Streptomyces cyaneus</i> VTCC43860	50
Hình 2.8. Sơ đồ phân lập các chất từ dịch nuôi cấy xạ khuẩn <i>Streptomyces</i> sp. VTCC43168.....	52
Hình 2.9. Sơ đồ phân lập các chất từ dịch nuôi cấy xạ khuẩn <i>Actinoplanes missouriensis</i> VTCC40900	53
Hình 3.1. Đặc điểm khuẩn lạc của một số chủng xạ khuẩn được phân lập.....	55
Hình 3.2. Ảnh minh họa khả năng kháng <i>M. smegmatis</i> của các chủng xạ khuẩn...59	
Hình 3.3. Hình ảnh khuẩn lạc của 5 chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng <i>M. smegmatis</i> cao nhất.....	60
Hình 3.4. Cấu trúc và tương tác HMBC, COSY, NOESY của hợp chất AT.01	61
Hình 3.5. Phổ ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) của chất AT.01	62
Hình 3.6. Phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) của chất AT.01	63
Hình 3.7. Cấu trúc và tương tác HMBC, COSY của hợp chất AT.02	64
Hình 3.8. Phổ HR-ESI-MS của chất AT.02	64
Hình 3.9. Phổ ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) của hợp chất AT.02	65
Hình 3.10. Phổ ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) của hợp chất AT.02 (giãn rộng).....	66
Hình 3.11. Phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) của hợp chất AT.02	66
Hình 3.12. Phổ DEPT của hợp chất AT.02 trong CDCl_3	67

Hình 3.13. Phổ COSY của hợp chất AT.02 trong $CDCl_3$	68
Hình 3.14. Phổ HMBC của hợp chất AT.02 trong $CDCl_3$	68
Hình 3.15. Cấu trúc hóa học của chất AT.03	70
Hình 3.16. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC, COSY của hợp chất AT.04	71
Hình 3.17. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất AT.04	72
Hình 3.18. Cấu trúc hóa học của hợp chất AT.05	73
Hình 3.19. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC trong hợp chất AT.06	74
Hình 3.20. Cấu trúc hóa học của hợp chất AT.07	75
Hình 3.21. Tương tác HMBC, COSY của hợp chất AT.07	76
Hình 3.22. Cấu trúc và tương tác COSY, HMBC, NOESY của hợp chất AT.08	76
Hình 3.23. Phổ 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất AT.08	77
Hình 3.24. Phổ 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) của chất AT.08 (giãn rộng).....	77
Hình 3.25. Phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất AT.08	78
Hình 3.26. Phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) của chất AT.08 (giãn rộng).....	78
Hình 3.27. Phổ HSQC của hợp chất AT.08 trong CD_3OD	79
Hình 3.28. Cấu trúc hóa học của chất AT.09	80
Hình 3.29. Phổ (-)-HR-ESI-MS của chất AT.09	80
Hình 3.30. Phổ 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) của chất AT.09	81
Hình 3.31. Phổ 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) của chất AT.09 (giãn rộng).....	81
Hình 3.32. Phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) của chất AT.09	82
Hình 3.33. Phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) của chất AT.09 (giãn rộng).....	83
Hình 3.34. Phổ DEPT của chất AT.09 trong $CDCl_3$	83
Hình 3.35. Phổ HSQC của chất AT.09 trong $CDCl_3$	84
Hình 3.36. Phổ HMBC của chất AT.09 trong $CDCl_3$	84
Hình 3.37. Phổ COSY của chất AT.09 trong $CDCl_3$	85
Hình 3.38. Phổ NOESY của chất AT.09 trong $CDCl_3$	85
Hình 3.39. Tương tác HMBC, COSY và NOESY trong hợp chất AT.09	86
Hình 3.40. Cấu trúc hóa học của chất AT.11	88
Hình 3.41. Tương tác HMBC và COSY của hợp chất AT.11	89
Hình 3.42. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC, COSY của hợp chất AT.12	90
Hình 3.43. Cấu trúc hóa học của chất AT.13	92
Hình 3.44. Cấu trúc của hợp chất AT.14	93
Hình 3.45. Cấu trúc hóa học của hợp chất AT.15	94
Hình 3.46. Các phân đoạn rửa Protein tái tổ hợp ClpC1. M: Maker; 1: phân đoạn rửa lần 3; 2: phân đoạn rửa lần 2; 3: phân đoạn rửa lần 1; 4: phân đoạn ptotein tổng số chưa qua cột; 5, 6: Phân đoạn rửa giải; I, II, III: Phân đoạn ptotein tổng số	

<i>sau khi qua cột</i>	<i>95</i>
<i>Hình 3.47. Hoạt độ thủy phân ATP của Protein tái tổ hợp ClpC1 theo nồng độ ATP</i>	<i>96</i>
<i>Hình 3.48. Hoạt độ thủy phân ATP của protein tái tổ hợp ClpC1 theo ngày.....</i>	<i>96</i>
<i>Hình 3.49. Kết quả đánh giá tác động của các hợp chất lên ATPase của ClpC1</i>	<i>97</i>

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 [1]. 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 [2]. 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 sa sút 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) [2], 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 [3]. 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

Vi khuẩn gây ra bệnh lao được Robert Koch phân lập lần đầu tiên vào năm 1882. Đây là loài vi khuẩn đại diện của chi *Mycobacterium*. Mặc dù loài *Mycobacterium tuberculosis* ước tính đã tồn tại 15- 20 nghìn năm. Tuy nhiên, căn cứ vào tính đa dạng nucleotide và khả năng đột biến, người ta thừa nhận chúng đã tiến hóa rất nhiều từ dạng nguyên thủy nhưng vẫn thuộc chi *Mycobacterium* [1].

Theo báo cáo của Tổ chức Y tế thế giới (TCYTTG-WHO Report 2021 Global Tuberculosis Control), hiện nay mặc dù đã đạt được một số thành tựu đáng kể trong công tác chống lao trong thời gian qua. Tuy nhiên bệnh lao vẫn còn là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trong các bệnh truyền nhiễm. Năm 2021, thế giới có khoảng 1.6 triệu ca tử vong và 10.6 triệu ca nhiễm lao mới [2].

Khi Tổ chức Y tế thế giới (WHO) công bố COVID-19 là “Đại dịch toàn cầu” vào cuối tháng 01/2020, đã có tác động rất lớn đến sự phát triển của toàn xã hội trên toàn cầu và Việt Nam. Đại dịch COVID-19 đã gây ảnh hưởng đến tỷ lệ phát hiện bệnh nhân lao trên thế giới trong năm 2020, đã giảm khoảng 20%. Trong đó ba nước có gánh nặng bệnh lao cao là Ấn Độ, Indonesia và Phillipine có số bệnh nhân lao phát hiện giảm khoảng 25-30% so với năm 2019. Tại Việt Nam, tỷ lệ phát hiện lao cũng đã giảm 3,1%. Tuy nhiên, việc chẩn đoán và điều trị bệnh nhân lao bị gián đoạn trong dịch bệnh Covid 19, dẫn đến số ca tử vong và lây truyền bệnh lao ra cộng đồng ngày càng tăng [2]. Theo báo cáo của WHO năm 2021, Việt Nam đứng thứ 11 trong 30 quốc gia có gánh nặng bệnh lao và bệnh lao đa kháng thuốc cao nhất thế giới. Mỗi năm có khoảng 170.000 ca mắc mới và khoảng 10.400 ca tử vong do bệnh lao ở Việt Nam [3].

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

Theo báo cáo của WHO, mỗi năm trên thế giới xuất hiện khoảng gần 500.000 trường hợp lao đa kháng thuốc, trong đó 5-7% là lao siêu kháng thuốc (kháng với tất cả các loại thuốc điều trị). Có thể nói, sự bùng phát của bệnh lao kháng thuốc cũng là mối đe dọa lớn đối với công tác phòng chống căn bệnh này trên toàn thế giới [4]. Tỷ lệ mắc bệnh lao kháng thuốc đã tăng lên đáng kể, với khoảng 8.400 bệnh nhân, trong đó có một tỉ lệ không nhỏ mắc lao đa kháng thuốc [5-7]. Chi phí điều trị bệnh lao đa kháng thuốc đắt gấp 10 lần so với bệnh lao thông thường, gây gánh nặng lớn cho bệnh nhân lao [5]. Vì vậy, bệnh lao đa kháng thuốc được xem là mối đe dọa nghiêm trọng đến sức khỏe cộng đồng. Các phương pháp điều trị

bệnh lao đa kháng thuốc (MDR) đã được các nhà nghiên cứu và các công ty dược phẩm phát triển rộng rãi. Tuy nhiên, sự lây lan của bệnh lao kháng thuốc vẫn là thách thức lớn đối với việc kiểm soát dịch bệnh. Do đó, việc tìm kiếm các loại kháng sinh mới và các thuốc hiệu quả hơn là rất cần thiết để khắc phục vấn đề này.

Nguyên nhân kháng thuốc của vi khuẩn lao là do cấu trúc tế bào của loài vi khuẩn này [1]. Cấu trúc vách tế bào và acid mycolic này làm cho vi khuẩn lao có sức chịu đựng cao, làm hư hại các hoá chất, khử nước, làm tăng khả năng kháng thuốc, và giảm hoạt động của chất kháng sinh. Nó làm cho vi khuẩn phát triển được bên trong đại thực bào và lẩn tránh hệ thống miễn dịch của chủ thể. Hiện nay, người ta đã xác định được bản đồ gen và nhiều mã gen kháng thuốc của vi khuẩn lao. Gen kháng thuốc mã hoá thông tin được vi sinh vật sử dụng để chống lại hiệu lực ức chế đặc hiệu của kháng sinh theo các cơ chế: làm giảm tính thấm của plasma membrane (màng nguyên tương); làm thay đổi đích tác động; tạo ra các isoenzym không có ái lực với kháng sinh nên bỏ qua tác động của kháng sinh; tạo ra enzym có thể biến đổi hoặc phá huỷ cấu trúc hoá học của phân tử kháng sinh.

Cho đến nay, có rất nhiều thuốc kháng lao đã và đang được nghiên cứu và sử dụng để chống lại vi khuẩn lao như isoniazid, pyrazinamid, rifamycin, ethambutol (thuốc kháng lao thế hệ 1), hay fluoroquinone, cycloserine, ethionamide, capreomycin (thuốc điều trị lao đa kháng thuốc thế hệ 2) [8], hay bedaquiline và delamanid (thuốc điều trị lao siêu kháng thuốc thế hệ 3) [9]. Tuy nhiên, các báo cáo gần đây tại một số bệnh viện cho thấy vi khuẩn lao bắt đầu kháng lại các loại thuốc mới thế hệ 3 này [10]. Do đó, tình trạng kháng thuốc ở vi khuẩn lao hiện nay đòi hỏi các nhà khoa học cần tìm ra các loại thuốc kháng lao mới và không độc hại, ít gây tác dụng phụ, tiêu diệt tận gốc vi khuẩn lao. 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. Đặc biệt, xạ khuẩn (*actinomycete*) là nguồn vi sinh vật cung cấp nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học và là nguồn cung cấp hơn một nửa số thuốc kháng sinh hiện nay [11]. Do vậy, xạ khuẩn được xem là nguồn vi sinh vật cung cấp các hợp chất kháng sinh và kháng lao để phát triển thành thuốc.

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

Xạ khuẩn (*Actinomycetes*) là vi khuẩn hiếu khí *Gram (+)*, có cấu tạo dạng sợi, phân nhánh và thuộc lớp *Actinobacteria* [12]. Các loài liên quan đến bệnh ở người và động vật bao gồm *Nocardia*, *Gordona*, *Tsukamurella*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* và *Corynebacteria*. Các chi kỵ khí có tầm quan trọng

trong y dược học bao gồm *Actinomyces*, *Arachnia*, *Rothia*, và *Bifidobacterium*. Xạ khuẩn phân bố rộng ở cả môi trường trên cạn và dưới nước, chủ yếu là trong đất, nơi chúng đóng vai trò quan trọng trong việc phân hủy các hợp chất polyme như chitin, keratin, lignocelluloses trong xác động thực vật và nấm thành các chất dễ bay hơi như geosmin [12]. Sự phân bố của xạ khuẩn phụ thuộc vào khí hậu, thành phần đất, mức độ canh tác và thảm thực vật. Trong mỗi gam đất thường có trên 1 triệu xạ khuẩn (tính theo số khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch). Xạ khuẩn có cấu trúc tế bào tương tự như vi khuẩn *Gr (+)*, toàn bộ cơ thể chỉ là một tế bào bao gồm các thành phần chính: thành tế bào, màng sinh chất, chất nguyên sinh, chất nhân và các thể ẩn nhập [12].

Có khoảng 23000 hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học được phân lập từ vi sinh vật, trong đó có 10000 hợp chất được tạo ra từ xạ khuẩn (chiếm 45%). Trong số các hợp chất đã được phân lập từ xạ khuẩn, có khoảng 7600 hợp chất được sản sinh từ loài *Streptomyces* (chiếm 34%) [12]. Các hợp chất thứ cấp này có hoạt tính sinh học như kháng khuẩn, chống oxy hóa, kháng nấm, chống ung thư, chất độc thần kinh, chống táo, chống giun sán, chống sốt rét và chống viêm. Trong đó, các hợp chất có hoạt tính kháng sinh được phân lập phần lớn từ xạ khuẩn. Hơn 80% thuốc kháng sinh được sản xuất có nguồn gốc từ xạ khuẩn [13], trong đó 50% kháng sinh có nguồn gốc từ chi *Streptomyces* [14]. Ngoài ra, một số các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học cũng được phân lập từ chủng xạ khuẩn khác như *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* và *Saccharopolyspora*.

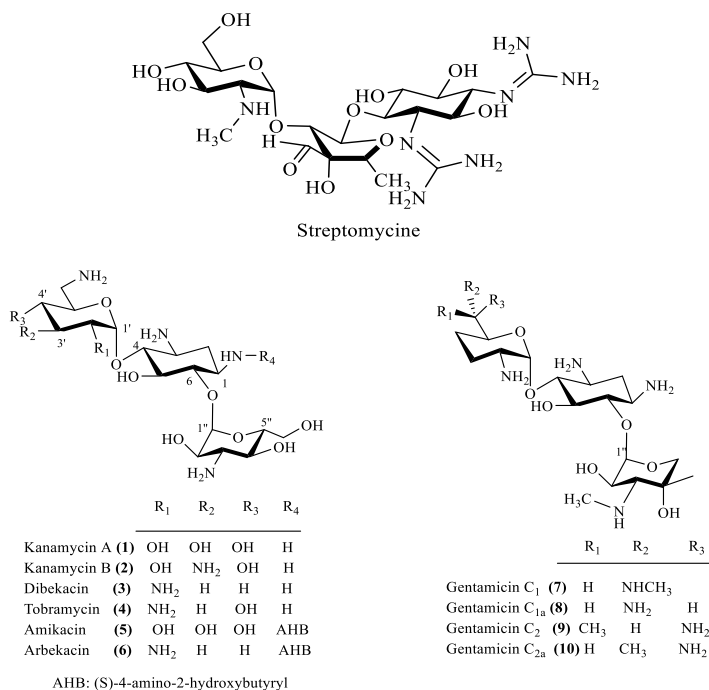
Tuy nhiên, các nghiên cứu giải trình tự bộ gen gần đây đã cho thấy rằng số lượng các hợp chất thứ cấp từ xạ khuẩn mang cụm gen sinh tổng hợp (SM-BGCs) nhiều hơn so với số lượng hợp chất thu được từ vi sinh vật khác [15]. Nói cách khác, nhiều nhóm gen sinh tổng hợp không xuất hiện trong điều kiện lên men truyền thống ở phòng thí nghiệm, hạn chế nghiêm trọng sự đa dạng hóa học của các hợp chất thứ cấp thu được từ quá trình lên men xạ khuẩn. Một số lớn các hợp chất thứ cấp đã được phân lập từ trước lại được tìm thấy nhiều lần từ xạ khuẩn, dẫn đến lãng phí về nguyên liệu và nguồn lao động [16]. Chính vì vậy, việc tìm kiếm các chiến lược mới để kích hoạt các cụm gen lặn của xạ khuẩn và tiềm năng trao đổi chất của chúng để thu được các sản phẩm tự nhiên đa dạng về cấu trúc là nhu cầu cấp thiết hiện nay của các nhà nghiên cứu [17].

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

Các loại thuốc thương mại được sử dụng để kháng lao thuộc aminoglycoside có nguồn gốc từ xạ khuẩn là streptomycine (phân lập từ chủng *Streptomyces*

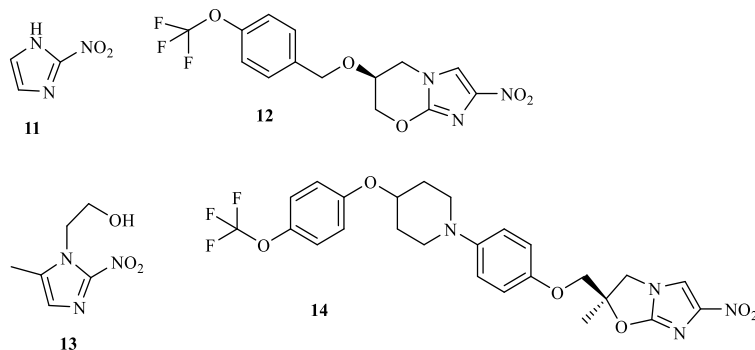
griseus), kanamycin và các dẫn xuất của nó **1 – 6** (phân lập từ chủng *S. kanamycetius*), gentamicin **7 - 10** (phân lập từ chủng *Micromonospora echinospora*) [18]. Thuốc kháng lao loại này ức chế sự tổng hợp protein của vi khuẩn lao:



Hình 1.1. Các thuốc lao có nguồn gốc từ xạ khuẩn thuộc khung aminoglycoside (**1-10**)

1.2.2.2. Hợp chất kháng lao thuộc nhóm nitroimidazole

Các hợp chất nhóm nitroimidazole phân lập từ xạ khuẩn được biết đến là có khả năng ức chế quá trình tổng hợp các mycolic acid. Mycolic acid là các acid béo bão hòa mạch dài, là thành phần quan trọng chiếm tới 60 % màng tế bào của vi khuẩn lao. Nhờ có các acid này, lớp vỏ tế bào của vi khuẩn lao trở nên trơ với các tác nhân bên ngoài, ngay cả với môi trường acid mạnh. Do vậy, vi khuẩn lao tránh được các tác nhân như thuốc kháng sinh, sự thay đổi môi trường và nhiệt độ.



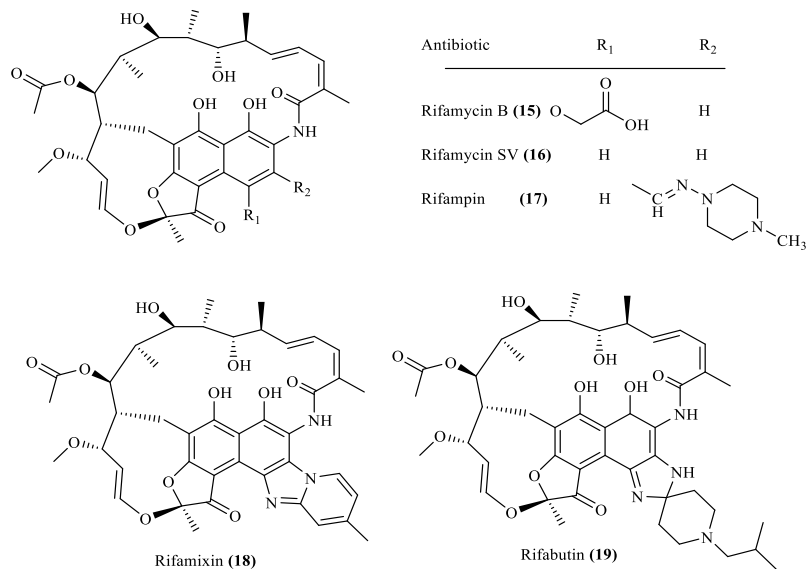
Hình 1.2. Các hợp chất nhóm nitroimidazole có nguồn gốc từ xạ khuẩn được sử dụng làm thuốc kháng lao (**11-14**)

Azomycin **11** là kháng sinh có hoạt tính kháng lao được phân lập từ chủng xạ khuẩn *S. eurocidicus*. Pretomanid **12**, metroidazole **13** và delamanid **14** là các loại

thuốc thể hệ sau được phát triển dựa trên nhóm khung nitroimidazole [19, 20].

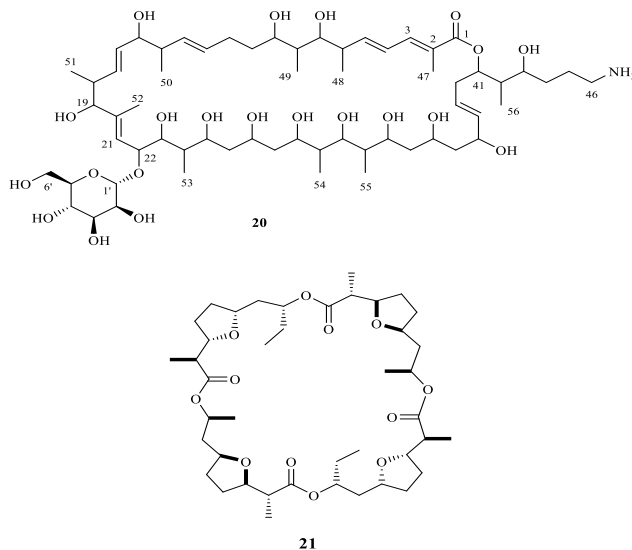
1.2.2.3. Hợp chất kháng lao thuộc nhóm macrolide

Rifamycin **15** – **19** là thuốc đặc trị kháng lao được phân lập từ chủng xạ khuẩn *S. mediterraneus*. Các dòng thuốc tổng hợp có biến đổi cấu trúc là rifamixin và rifabutin [21].



Hình 1.3. Các thuốc kháng lao nhóm macrolide phân lập từ xạ khuẩn (**15-19**)

Desertomycin G **20** là một aminopolyol polyketide chứa vòng macrolactone được phân lập từ chủng xạ khuẩn *S. althioticus* MSM3 từ mẫu rong biển ở vùng biển Cantabrian (Đông Bắc Đại Tây Dương). Hợp chất **20** có hoạt tính kháng lao đối với chủng *M. tuberculosis* H37Rv và chủng lao đa kháng thuốc *M. tuberculosis* MDR-1, MDR-2 với cùng giá trị MIC là 16 µg/mL [22].

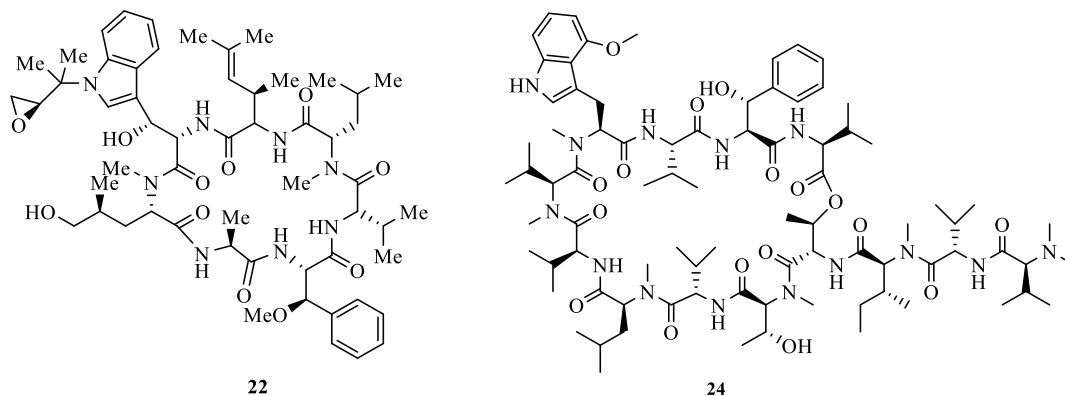


Hình 1.4. Cấu trúc của hợp chất **20** - **21**

Dinactin **21** là một macrotetrolide được phân lập từ chủng xạ khuẩn *S. puniceus* AS13. Hợp chất **21** có hoạt tính kháng lao đối với chủng *M. tuberculosis*

H37Rv với giá trị nồng độ ức chế tối thiểu MIC là 1 $\mu\text{g/mL}$ và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu MBC là 4 $\mu\text{g/mL}$. Hợp chất **21** cũng có hoạt tính kháng lao đối với chủng lao đa kháng thuốc với giá trị MIC từ 1 – 16 $\mu\text{g/mL}$. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, tương tác hiệp đồng giữa **21** với rifampicin hoặc amikacin cho thấy sự phù hợp để sử dụng kết hợp trong các phác đồ điều trị bệnh lao [23].

1.2.2.4. Hợp chất kháng lao thuộc nhóm cyclopeptide



Hình 1.5. Cấu trúc của hợp chất **22** và **24**

Cyclomarin A **22** là một cyclopeptide được tìm thấy từ xạ khuẩn biển *Streptomyces spp.* CNB-982. Gần đây, hợp chất này được phát hiện có hoạt tính kháng lao thông qua cơ chế tác động lên đích protein điều hòa ClpC1 của vi khuẩn lao [24]. Hợp chất **22** bao gồm 7 amino acid, trong đó có 2 amino acid cơ bản (alanin và valin), còn lại 5 amino acid không thông dụng là *N*-methylleucine, *N*-methylhydroxyleucine, β -methoxyphenylalanine, 2-amino-3,5-dimethylhex-4-enoic acid, và *N*-(1,1-dimethyl-2,3-epoxypropyl)- β -hydroxytryptophan. Hợp chất **22** cho hoạt tính kháng lại vi khuẩn lao *M. tuberculosis* trên môi trường nuôi cấy bằng thịt và trong mẫu đại thực bào của người với nồng độ ức chế tối thiểu trong khoảng từ 0,3 - 2,5 μM . Ở nồng độ 2,5 μM , cyclomarin A tiêu diệt 90 % vi khuẩn lao sau 5 ngày.



Hình 1.6. Cấu trúc của lassomycin **23**

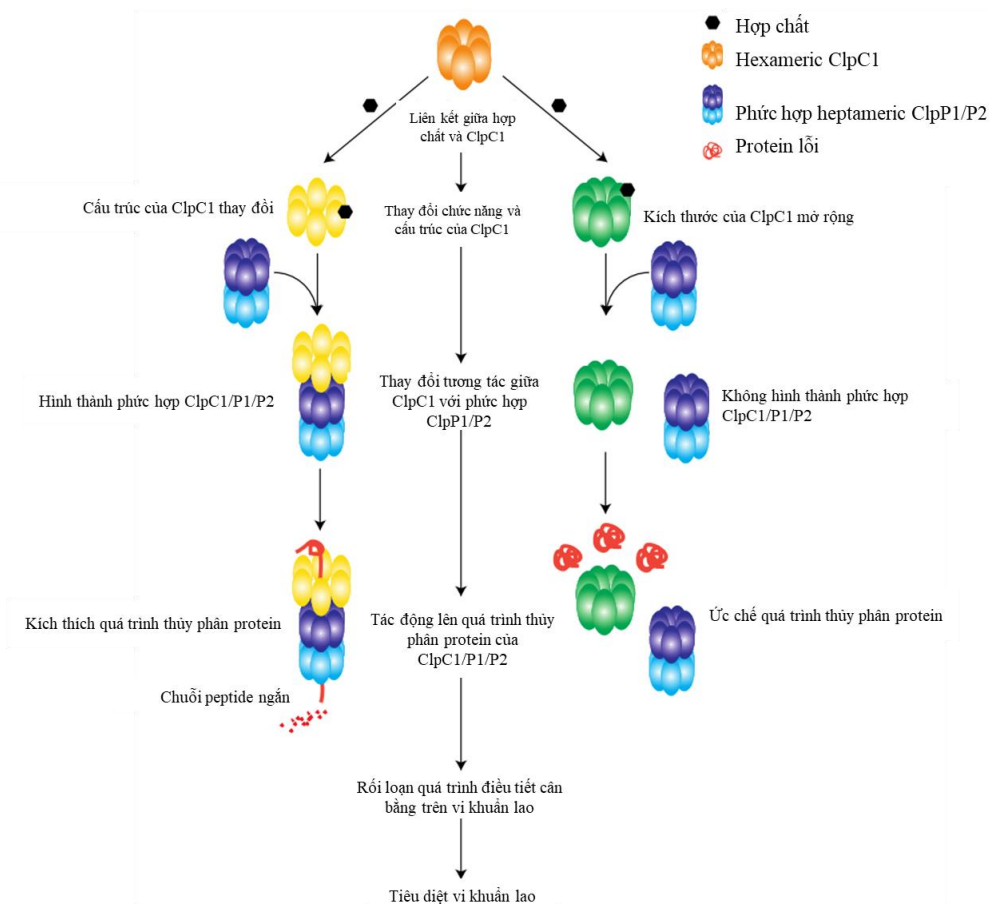
Lassomycin **23** được phân lập từ chủng xạ khuẩn *Lentzea kentuckyensis spp.* IO0009804. Hợp chất **23** bao gồm 16 amino acid và được cấu tạo bởi một mạch vòng gồm 8 amino acid đầu Nitơ (N-terminal) gắn kết với mạch thẳng bởi liên kết giữa nhóm amino của đầu Nitơ (N-terminal) amin và nhóm carboxyl của Asp8

[25].

Hợp chất **23** là một chất kháng lao có hoạt tính cao, thậm chí với các chủng lao đa kháng thuốc (MDR) hoặc kháng thuốc hoàn toàn (XDR) *M. tuberculosis* với giá trị MIC trong khoảng từ 0,41-1,65 μM . Hợp chất **23** được xác định là tác động lên hoạt độ của ATPase và làm giảm đáng kể quá trình thủy phân protein của phức chất ClpP1/P2.

Ecumicin **24** là một peptide vòng lớn được phân lập từ xạ khuẩn *Nonomurae* spp. MJM5123. Hợp chất **24** bao gồm 13 amino acid trong đó có các amino acid cơ bản và các amino acid đã bị methoxy hóa [26].

Hợp chất **24** có hoạt tính kháng lại các dòng vi khuẩn lao đa kháng thuốc và kháng thuốc hoàn toàn với giá trị MIC trong khoảng 0,16 đến 0,62 μM . Đặc biệt hợp chất **24** còn có tác dụng kháng lại vi khuẩn lao đã bị bất hoạt với nồng độ vi khuẩn nhỏ nhất là 1.5 μM . Điều này cho thấy tiềm năng giảm thời gian điều trị bệnh lao của hợp chất này. Hanki Lee và cộng sự đã nghiên cứu cơ chế tác động lên ClpC1 của ecumicin và cho thấy hợp chất này liên kết với vùng biến thiên cấu trúc (allosteric site) của ClpC1 tạo nên sự thay đổi về cấu hình, qua đó tác động lên quá trình thủy phân protein của ClpC1/CplP1/ClpP2.

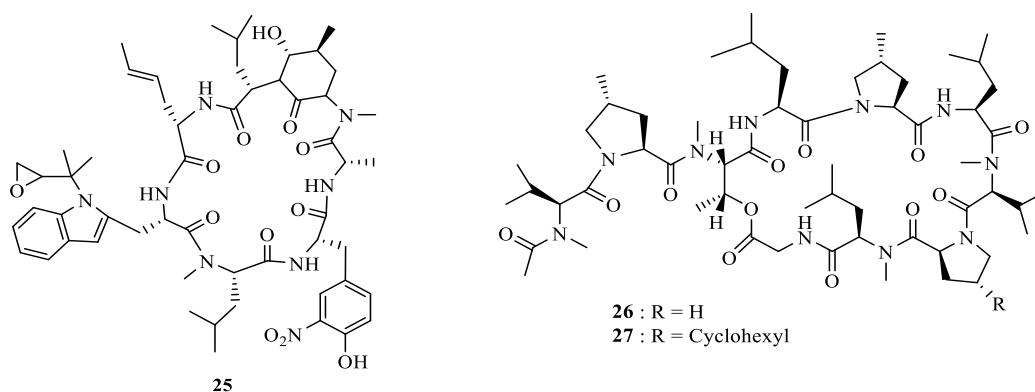


Hình 1.7. Cơ chế đề xuất quá trình tác động của các hợp chất thứ cấp phân lập được từ xạ khuẩn lên ClpC1 ở vi khuẩn lao [27]

Ba hợp chất dẫn đường có tác dụng kháng lao được phân lập từ xạ khuẩn là cyclomarin A **22**, lassomycin **23** và ecumicin **24** đều tác động lên đích ClpC1, làm thay đổi cấu trúc của ClpC1, làm giảm hoạt tính thủy phân protein của phức chất ClpC1/ClpP1/ClpP2, ngăn cản quá trình điều tiết cân bằng trên vi khuẩn lao và tiêu diệt vi khuẩn lao. Cơ chế tác động của các hợp chất này được mô tả trong hình 1.7 [27].

Rufomycin **25** được phân lập từ xạ khuẩn *Streptomyces atratus* MJM3502. Hợp chất **25** là một peptide vòng lớn chứa 7 acid amin. Hợp chất này có hoạt tính kháng mạnh trên vi khuẩn *M. tuberculosis* và *M. abscessus* với giá trị MIC lần lượt tương ứng là 0,02 μ M, 0,4 μ M. Hợp chất **25** ức chế hoạt động phân giải tế bào protein của ClpC1/P1/P2 khi không ảnh hưởng đến hoạt động ATPase của ClpC1 [28].

Griselimycin **26** được phân lập từ chủng *Streptomyces* DSM 40835 có tác dụng kháng lao với được động lực kém [29]. Tuy nhiên, dẫn xuất của griselimycin là cyclohexylgriselimycin **27** có tác dụng kháng lao cao với giá trị MIC 0,05 μ M đối với chủng lao được bao bọc trong các tế bào giống như đại thực bào (RAW264.7) [30]. Hợp chất **27** có khả năng chống lại vi khuẩn lao *M. tuberculosis* bằng cách gắn chặt vào enzyme DNA *polymerase*, sau đó ức chế sự sao chép và sửa chữa DNA của vi khuẩn [30]. Hợp chất này cũng có hoạt tính kháng lao cao ở chuột bị bệnh lao cấp tính và mãn tính, hứa hẹn sẽ kết hợp với rifampicin và pyrazinamide để rút ngắn thời gian điều trị lao [31].

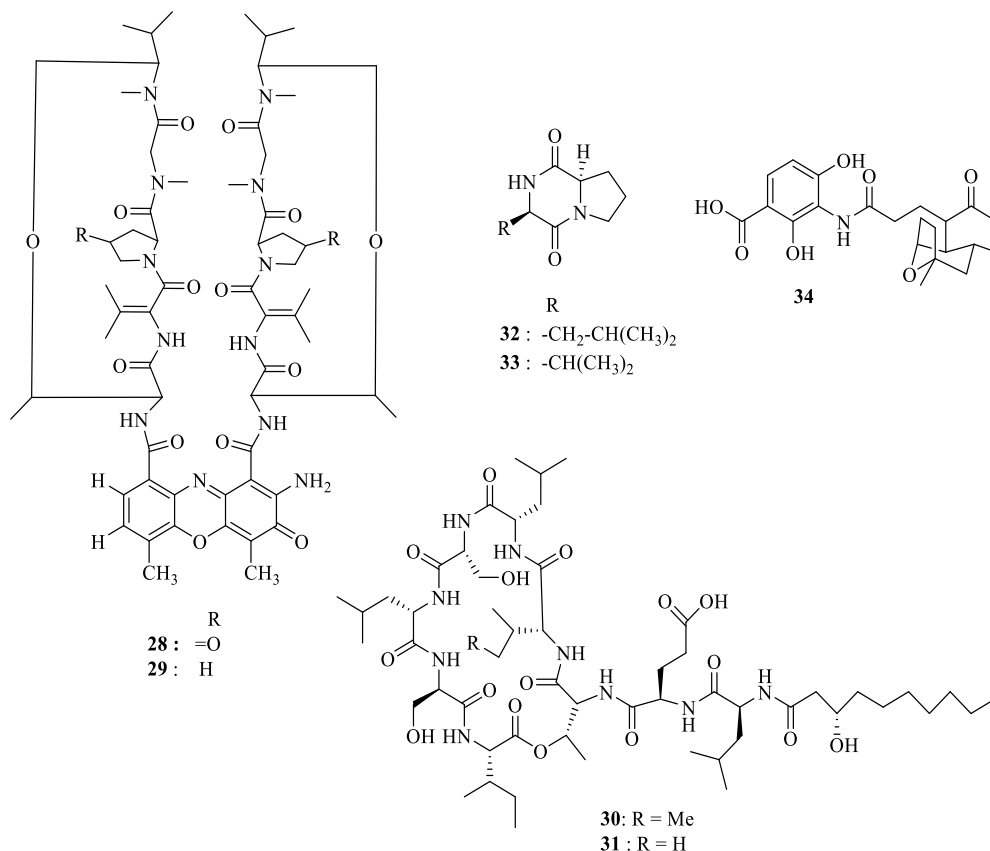


Hình 1.8. Công thức hợp chất **25** - **27**

Trong các nghiên cứu gần đây người ta đã phân lập được hai hợp chất kháng lao đáng chú ý như actinomycin X2 **28** và actinomycin D **29** được phân lập từ loài xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. MS449 [32].

Hai hợp chất dipeptide vòng là massetolide A **30** và viscosin **31** được phân lập từ xạ khuẩn biển *Pseudomonas* và xác định cấu trúc hóa học. Hai hợp chất này được tiến hành thử hoạt tính kháng lao trên chủng gây bệnh lao *Tubercle bacillus* và *M. aviumintracellulare*. Kết quả cho thấy hợp chất **30**, **31** đều thể hiện hoạt tính ức

chế đối với chủng *T. bacillus* và *M. avium-intracellulare* với giá trị MIC tương ứng là 5-10, 10-20, 2,5-5 và 5-10 $\mu\text{g/mL}$ [33].

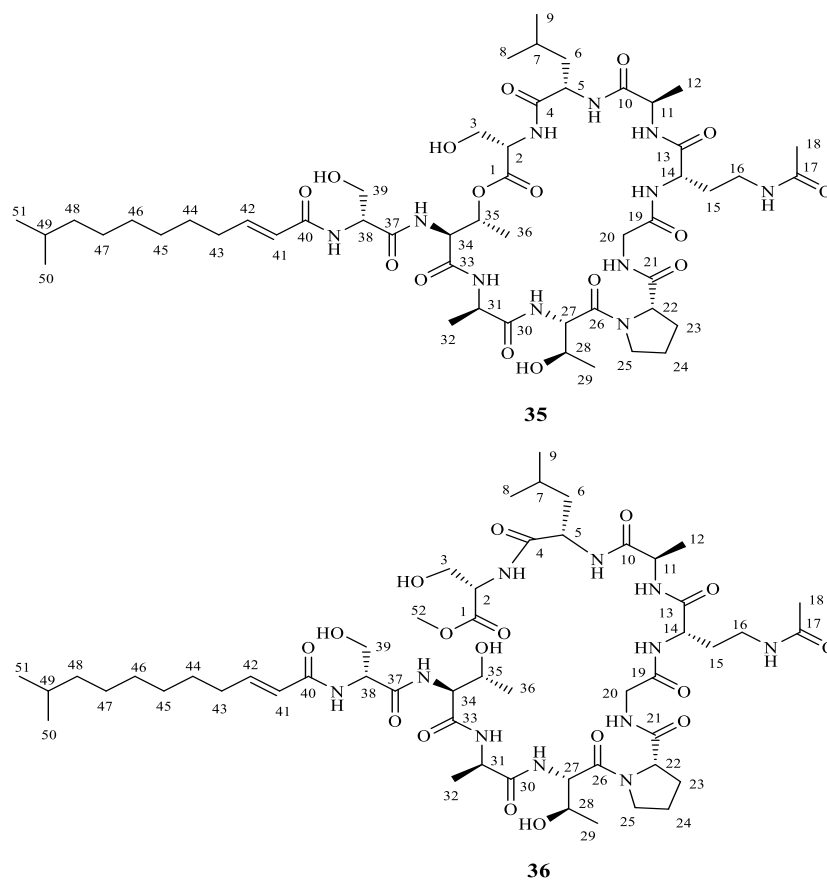


Hình 1.9. Cấu trúc của hợp chất 28 – 34

Từ loài xạ khuẩn biển LS247 có đặc tính tương đồng với chủng *S. puniceus* đã phân lập hai hợp chất peptide vòng là cyclo-D-Pro-D-Leu 32 và cyclo-D-Pro-D-Val 33. Hai hợp chất này thể hiện hoạt tính kháng lao đối với chủng *T. bacillus* với giá trị MIC tương ứng là 7,1 và 18,5 $\mu\text{g/mL}$ [34]. Hợp chất platensimycin 34 đã được phân lập trong quá trình sàng lọc về loài xạ khuẩn biển *S. platensis*. Kết quả cho thấy hợp chất này rất có tiềm năng nghiên cứu ứng dụng trong y dược do có hoạt tính rất mạnh đối với các chủng khuẩn gram (+) với phổ rất rộng [34].

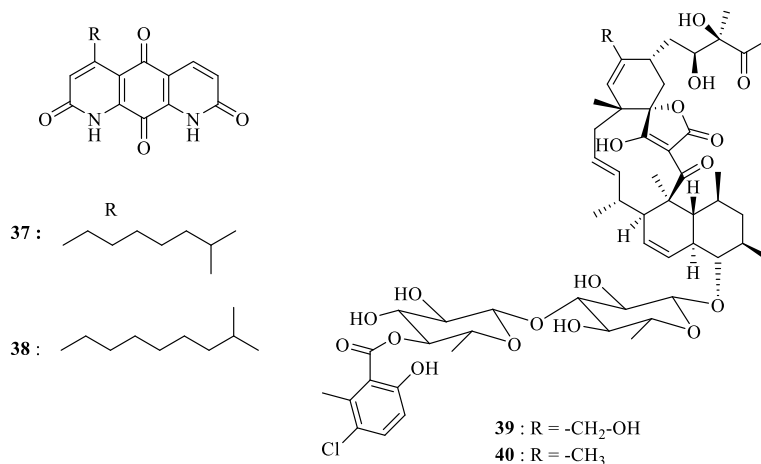
Trong quá trình tìm kiếm các nonribosomal peptide có hoạt tính sinh học từ xạ khuẩn biển, nhóm nghiên cứu đã phân lập được hai hợp chất nonribosomal peptide mới là taeanamide A 35 và taeanamide B 36 từ xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. AMD43 được phân lập từ bờ biển Anmyeondo phía tây của Hàn Quốc [35]. Nhóm nghiên cứu đã làm sáng tỏ cấu trúc hoá học, đánh giá hoạt tính sinh học và con đường sinh tổng hợp của hai nonribosomal peptide này. Hai hợp chất này thể hiện hoạt tính kháng lao trung bình đối với chủng *M. tuberculosis* mc² 6230 với giá trị MIC₅₀ (nồng độ ức chế tối thiểu 50%) lần lượt tương ứng là $27 \pm 0,03 \mu\text{M}$, $63 \pm 0,05 \mu\text{M}$ (đối chứng dương là bedaquiline với giá trị MIC₅₀ là $0,4 \pm 0,01 \mu\text{M}$). Ngoài ra, hợp chất 36 còn thể hiện hoạt tính gây độc tế bào mạnh đối với

dòng ung thư phổi ở người (A549), ung thư ruột kết (HCT116), ung thư vú (MCF-7, MDA-MB-231), ung thư gan (SK-HEP-1) và ung thư dạ dày (SNU638) với giá trị IC_{50} từ 0,26 - 1,13 μM [35].



Hình 1.10. Cấu trúc của hợp chất 35 – 36

1.2.2.5. Hợp chất kháng lao thuộc nhóm diaza-anthracene



Hình 1.11. Cấu trúc của hợp chất 37 - 40

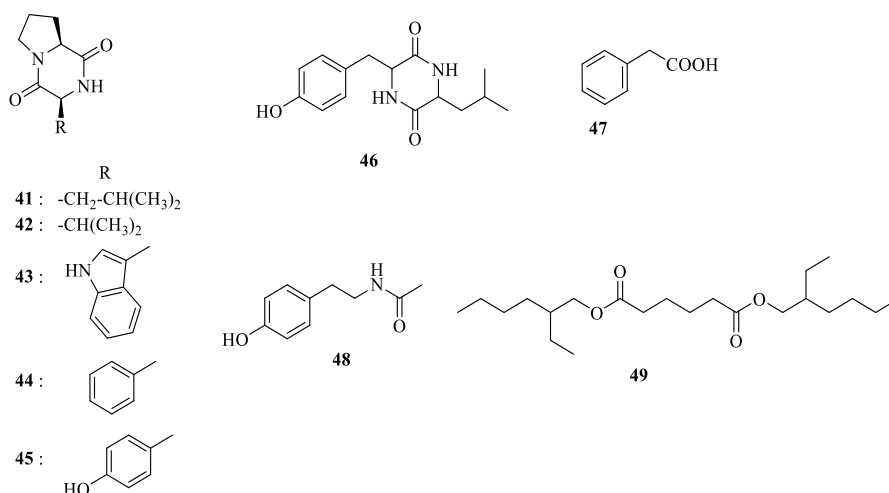
Hai hợp chất là diazaquinomycin H **37** và diazaquinomycin J **38** được phân lập từ chủng *Actinomyces* có nguồn gốc từ bùn hồ Michigan. Hai hợp chất này thể hiện hoạt tính kháng lao đối với chủng *M. tuberculosis* H37Rv tương ứng giá trị MIC lần lượt là 0,04 và 0,07 $\mu g/mL$ [36].

1.2.2.6. Hợp chất kháng lao thuộc nhóm polyketide

Hai hợp chất là phocoenamicin B **39** và phocoenamicin C **40** được phân lập từ dịch chiết acetone của chủng xạ khuẩn *Micromonospora* sp CA-214671 có nguồn gốc từ trầm tích biển ở quần đảo Canary, Tây Ban Nha. Hai hợp chất này thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định đối với chủng *Staphylococcus aureus* kháng methicillin (MRSA) với giá trị MIC từ 4 đến 64 $\mu\text{g/mL}$ và 16 đến 32 $\mu\text{g/mL}$ đối với *M. tuberculosis* H37Rv. Ngoài ra, hai hợp chất này cũng có hoạt tính đối với *B. subtilis* và *M. bovis*, tuy nhiên, ở nồng độ dưới 128 $\mu\text{g/mL}$, hai hợp chất này không có hoạt tính đối với *M. bovis* và vi khuẩn *Enterococcus faecium* kháng vancomycin (VRE) [37].

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

Qua nghiên cứu tài liệu cho thấy ở Việt Nam hiện nay chỉ có một nhóm nghiên cứu về việc phân lập các hợp chất thứ cấp có tác dụng kháng lao từ xạ khuẩn [38]. Nhóm tác giả đã phân lập được 9 hợp chất thứ cấp từ chủng xạ khuẩn biển *Micromonospora* sp. (G043), trong đó có 6 chất là cyclodipeptide. Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định cho thấy chất **43**, **46**, **47** có hoạt tính kháng vi khuẩn Gram (-) *Escherichia coli* với MIC lần lượt là 128, 32 và 32 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả thử hoạt tính kháng lao của các chất **41** - **46**, **48** và **49** trên vi khuẩn lao *M. tuberculosis* H37Rv cho thấy chỉ có chất **49** thể hiện hoạt tính kháng lao với giá trị MIC = 46 $\mu\text{g/mL}$. Phép thử hoạt tính kháng lao được thực hiện tại trường Đại học UIC – Chicago.



Hình 1.12. Các hợp chất có hoạt tính kháng lao được phân lập từ xạ khuẩn *Micromonospora* sp ở Việt Nam (**41** - **49**)

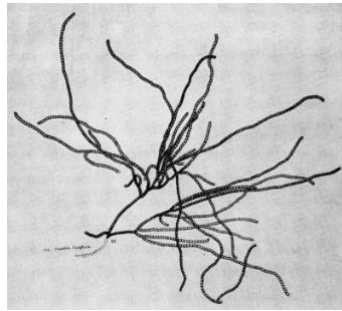
1.3. Tổng quan về một số loài xạ khuẩn là đối tượng nghiên cứu

1.3.1. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger*

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

Streptomyces alboniger thuộc chi *Streptomyces* và lần đầu tiên được phân

lập từ đất sỏi bởi nhóm nghiên cứu Porter và cộng sự phía Bắc, Peoria, Illinois, Mỹ [39]. Sắc tố hòa tan màu đen được hình thành trên một số môi trường như thạch asparagine dextrose và không sản sinh sắc tố trên môi trường gelatin và một số chất hữu cơ khác. Bào tử màu trắng được hình thành trên một số loại thạch nhất định. Sinh trưởng tốt trên môi trường tổng hợp chứa nguồn carbon mannitol. Trong môi trường thạch asparagine dextrose, khuẩn lạc từ không màu phát triển thành màu vàng, tới màu đen và cuối cùng tạo thành bào tử có màu trắng. Các khuẩn lạc được phát triển trong điều kiện tối ưu sẽ tạo ra sợi nấm khí sinh màu trắng. Nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển là 28-32°C [39]. Hình thái học được xác định bằng kính hiển vi cho thấy các tế bào có độ cao 135 inch và phân nhánh không đều, bào tử có hình bầu dục (Hình 1.13) [39].



Hình 1.13. Hình dạng sợi nấm của *S. alboniger* trên đĩa thạch tổng hợp [39]

Bảng 1.1. Sự thay đổi của *S. alboniger* ở các nhiệt độ khác nhau [39]

Nhiệt độ	Độ tăng trưởng	Sợi nấm kí sinh		Sắc tố hòa tan	Màu sắc bề mặt	Màu sắc tương phản
24°C	+	-		Đen	Trên đen, dưới vàng	Đen
28°C	+	Trắng		Đen	Đen	Đen
32°C	+	Màu trắng nhẹ		Hơi đen	Thay đổi từ trắng, vàng, nâu	Thay đổi từ vàng đến nâu
37°C	+	-		-	Trắng	Trắng

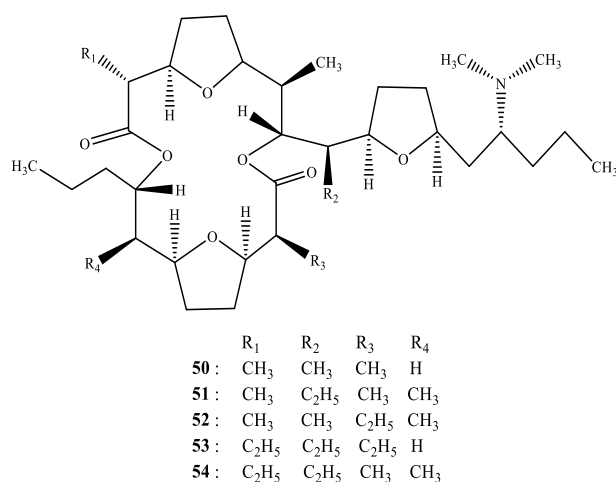
Bảng 1.2. Sự thay đổi của *S. alboniger* ở các điều kiện môi trường khác nhau [39]

Môi trường	Lượng tăng trưởng	Sợi nấm kí sinh và màu sắc bào tử	Sắc tố hòa tan	Nhận xét
Asparagine dextrose dịch chiết thịt, agar	Tốt	Bào tử kém, màu trắng	Màu đen	Khuẩn lạc ở 48 giờ có màu vàng không có sắc tố; sắc tố bắt đầu xuất hiện ở ngày thứ 8.

Acid asparagine dextrose dịch chiết thịt, agar	Kém	Không màu	Không màu	Các khuẩn lạc ẩm và không màu.
Gelatin	Trung bình	Sợi nấm khí sinh màu trắng	Màu vàng nhạt	Hóa lỏng từ nhẹ đến tốt; 30 mm ở 36 ngày.
Tinh bột Waksman, agar	Tốt	Màu trắng hoặc màu ô liu nhạt (Ridgway)	Màu đen	Vùng thủy phân 4-5 mm trong 14 ngày; không màu, trong suốt.
Agar Emerson	Tốt	Màu trắng xuất hiện sau 2 tuần	Không màu	Đảo ngược màu vàng thành màu nâu.
Agar Czapek	Kém	Màu trắng	Không màu ở ngày thứ 12	Đảo ngược thành màu trắng.
Khoai tây	Rất tốt	Nhiều sợi nấm khí sinh màu trắng	Đen, xanh lục đen điển hình	Khuẩn lạc ẩm và màu vàng, sau đó trở thành màu trắng với sợi nấm khí sinh; bề mặt khuẩn lạc không màu.
Calcium malate	Tốt	Màu trắng	Không màu, ngoại trừ 1 tháng	Đảo ngược thành màu trắng xám.
Nutrient agar	Kém	Không màu	Không màu	Các khuẩn lạc, ẩm mịn, và sau đó có màu của môi trường.
Glucose agar	Kém	Không màu	Không màu	Khuẩn lạc ẩm, mịn và có màu của môi trường.
Sữa Litmus	Kém – không có pellicle	Màu trắng	Màu sữa trong ở phần trên của lớp nước	Vòng sinh trưởng màu trắng ở trên, sau đó màu xanh lục vàng đến nâu vàng nhạt và màu trắng ở dưới.
Dextrose Krinsky, agar	Trung bình tới tốt	Sợi nấm khí sinh màu trắng	Màu xám đen	Đảo ngược thành màu xám đen.
Dextrose khoai tây, agar	Tốt tới rất tốt	Nhiều sợi nấm khí sinh màu trắng	Sắc tố màu nâu nhạt đã được nhìn thấy ở 1 tháng.	Đảo ngược thành màu nâu nhạt; bề mặt khuẩn lạc không màu.
Agar Bennett	Tốt	Màu trắng đến màu xám nhạt	Màu nâu đen	Đảo ngược thành màu nâu sẫm.
Cellulose (giấy lọc trong dung dịch Czapek)	Không màu	-	-	-

Cà rốt	Rất tốt	Màu trắng	Không màu	-
Bột ngô ướt	Tốt	Sợi nấm khí sinh màu trắng	Màu đen	Sợi nấm phát triển nhiều nhưng bào tử kém.
Maltose Sabouraud, agar	Rất tốt	Màu trắng	Màu đen	Sợi nấm khí sinh hình thành khoảng 2 tuần.

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



Hình 1.14. Các hợp chất thuộc khung pamamycin (50 - 54)

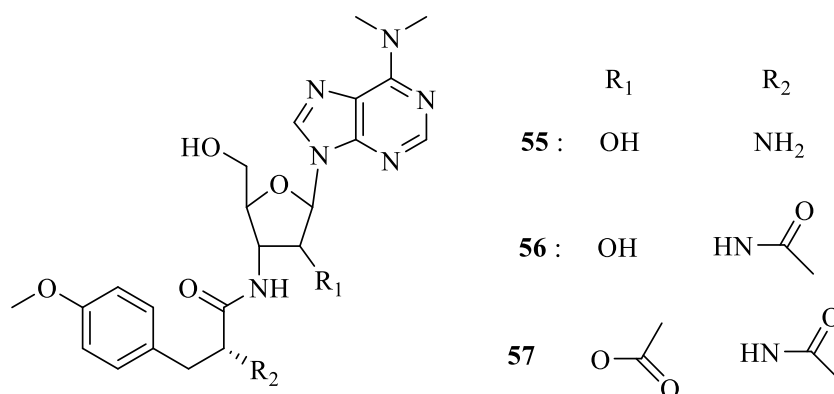
Năm dẫn xuất của pamamycin (50 - 54) được phân lập từ chủng xạ khuẩn *S. alboniger*. Cấu trúc của các pamamycin được đặc trưng bởi một vòng macrolide 16 cạnh với mạch nhánh chứa dimethyl-amino [40]. Hợp chất này thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh đối với chủng *Cochliobolus miyabeanus* và *Diaporthe citri* IFO 6443, hoạt tính trung bình đối với chủng *Bacillus subtilis* ATCC 6633 và *B. cereus* [41].

Bảng 1.3. Hoạt tính kháng khuẩn của panamycin [41]

Chủng vi sinh vật	Giá trị MIC (µg/mL)
<i>Alternaria kikuchiana</i>	25
<i>A. mali</i>	12,5
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275	25
<i>Candida albicans</i> 3147	25
<i>Cochliobolus miyabeanus</i>	1,56
<i>Diaporthe citri</i> IFO 6443	1,56
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp.FO-1	12,5
<i>Gibberella fujikuroi</i>	6,25
<i>Rhizoctonia solani</i>	12,5
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	12,5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	3,13
<i>B. cereus</i>	3,13

<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	6,25
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	25
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	6,25

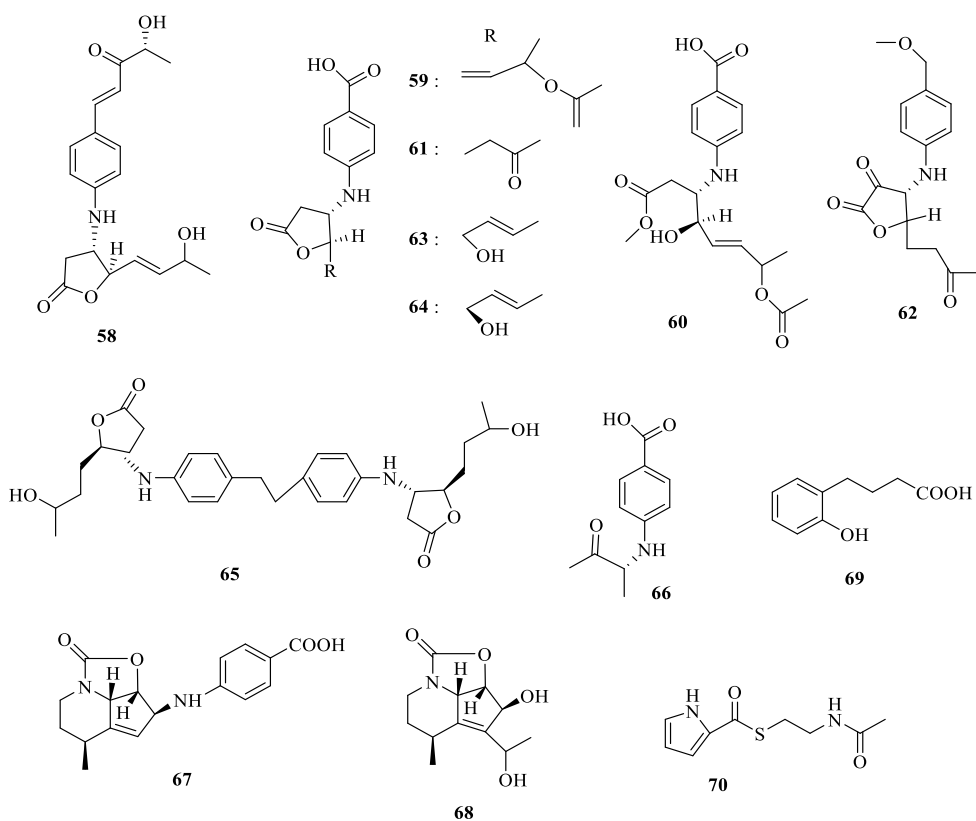
Từ chủng xạ khuẩn *S. alboniger* NRRL B-1832 đã phân lập được ba hợp chất kháng sinh thuộc khung aminonucleoside là puromycin A-C **55-57** [42]. Trong đó, hợp chất **55** lần đầu tiên được phân lập vào năm 1952 [43]. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào trên hai dòng tế bào ung thư ở người HL60 và NB4 cho thấy hợp chất **55** thể hiện hoạt tính mạnh ứng với giá trị IC_{50} lần lượt là 0,11 và 0,03 μM , hợp chất **56** và **57** không thể hiện hoạt tính [42]. Điều này cho thấy vai trò quan trọng của nhóm amine tự do trong hợp chất puromycin đối với hoạt tính gây độc tế bào.



Hình 1.15. Các hợp chất thuộc khung aminonucleoside (**55-57**)

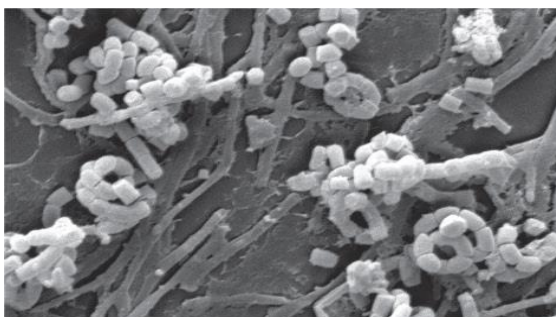
Từ xạ khuẩn *S. alboniger* YIM20533 có nguồn gốc từ mẫu đất ở Tây Tạng, Trung Quốc đã phân lập được 13 hợp chất. Trong đó, hợp chất **67-68** thuộc khung streptazolin, hợp chất **58 - 64** thuộc khung obscurolide hiếm với một pentanone được thế ở vòng benzen và hợp chất **65** với cấu trúc khung obscurolide dimer hiếm gặp [44]. Hợp chất **58** thể hiện hoạt tính kháng viêm thông qua tác động ức chế sản sinh oxid nitric (NO) trong các đại thực bào và hoạt động chống đông máu trên tiểu cầu. Hợp chất **67** thể hiện hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase [44].

Như vậy, qua các tài liệu đã công bố cho thấy việc nghiên cứu các hợp chất thứ cấp từ nguồn xạ khuẩn trên thế giới đã đạt được nhiều thành tựu quan trọng. Tuy nhiên, các nghiên cứu trong lĩnh vực này tại Việt Nam chưa được triển khai nhiều, trong khi nước ta được đánh giá là một trong các quốc gia có sự đa dạng sinh học phong phú. Cho đến nay, chưa có công trình nào trong nước công bố về các hợp chất thứ cấp phân lập từ chủng xạ khuẩn *S. alboniger*. Đây là một chủng có tiềm năng hoạt tính kháng sinh và kháng ung thư, đáng được quan tâm nghiên cứu.



Hình 1.16. Công thức cấu tạo của hợp chất 58 – 70

1.3.2. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces wuyuanensis*



Hình 1.17. Hình ảnh sợi FX61^T trên môi trường nuôi cấy ISP2, 28°C trong 4 tuần [45]

Streptomyces wuyuanensis là một loài thuộc chi *Streptomyces*. *S. wuyuanensis* được phân lập lần đầu tiên vào năm 2013, trong mẫu đất tại tỉnh Vụ Nguyên, thuộc vùng Nội Mông, Trung Quốc [45]. Ban đầu, các nhà khoa học phát hiện ra *S. wuyuanensis* là Xuefang Zhang đã gọi chúng là khuẩn dạng sợi FX61^T sau khi quan sát hình ảnh của chủng này dưới kính hiển vi điện tử (Hình 1.17). Sau quá trình nghiên cứu bằng phương pháp đa pha, ông đã thấy tất cả đặc điểm hình thái và hóa học của chủng này tương đồng với các đặc điểm của chi *Streptomyces*. Vì vậy, ông đã quyết định đặt tên cho chủng FX61^T theo địa điểm mà chủng này được phát hiện tại tỉnh Vụ Nguyên (Wuyan), là *S. wuyuanensis*.



Hình 1.18. Hình ảnh khuẩn lạc của *S. wuyuanensis*

Giải trình tự gen 16s DNA của FX61^T và so sánh với các cơ sở dữ liệu của GenBank, kết quả cho thấy, trình tự có sự khác biệt rõ ràng với *E.coli*, và có sự liên kết về mặt phát sinh chủng loại với các chủng thuộc chi *Streptomyces*. Đây là chủng vi khuẩn Gram (+), hô hấp hiếu khí và không có khả năng di chuyển. Chúng phát triển thành các dạng sợi xoắn dài, trơn nhẵn. Khi nuôi cấy khuẩn lạc, *S. wuyuanensis* có màu sắc khuẩn ty cơ chất màu trắng đến vàng, nâu, còn màu sắc của khuẩn ty khí sinh lại có màu trắng đến xám.

Các đặc điểm về môi trường nuôi cấy chủng *S. wuyuanensis* được thể hiện qua Bảng 1.4.

Bảng 1.4. Khoảng giới hạn một vài điều kiện môi trường đối với *S. wuyuanensis* [45]

Điều kiện	Khoảng giới hạn	Điều kiện tối ưu
Nhiệt độ (°C)	15 - 40	28
pH	4,0 – 12,0	6,0 – 8,0
NaCl (%)	0 - 9	

Trong một số môi trường dinh dưỡng khác nhau dưới đây, sự phát triển của *S. wuyuanensis* cũng khác nhau (Bảng 1.5).

Qua nghiên cứu tài liệu cho thấy hiện nay chưa có công trình nào công bố về điều kiện sinh tổng hợp và phân lập các hợp chất thứ cấp từ chủng xạ khuẩn *S. wuyuanensis* ở Việt Nam cũng như trên thế giới. Vì vậy, việc nghiên cứu sinh khối chủng xạ khuẩn *S. wuyuanensis* thu tại vườn Quốc gia Cát Bà, Hải Phòng và phân lập các hợp chất thứ cấp từ chủng này là điều cần thiết, có ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn, nhằm góp phần tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính sinh học lý thú từ xạ khuẩn để ứng dụng trong ngành y dược và đời sống.

Bảng 1.5. Môi trường được sử dụng để phân lập *S. wuyuanensis* [45]

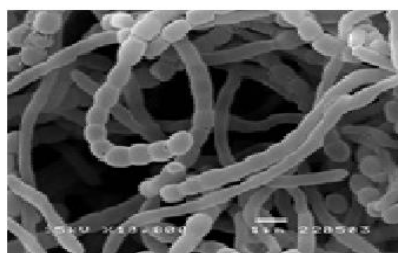
Môi trường thạch	Màu sắc khuẩn ty khí sinh	Màu sắc khuẩn ty cơ chất	Khả năng phát triển
Czapek's	Xám	Trắng	Tốt
Khoai tây	Xám	Vàng	Tốt
Nutrient	-	Vàng	Tốt

ISP 2	Xám	Vàng	Tốt
ISP 3	Xám	Trắng hơi vàng	Tốt
ISP 4	Vàng nhạt	Vàng	Tốt
ISP 5	Vàng nhạt	Vàng	Kém

1.3.3. *Chủng xạ khuẩn Streptomyces aureus*

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

Xạ khuẩn *Streptomyces aureus* là một loài xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces*. Cũng giống với đặc điểm hình thái của các chủng xạ khuẩn *Streptomyces* khác, xạ khuẩn *S. aureus* có dạng hình sợi, tế bào hình xoắn ốc giống như các nhánh bên của sợi nấm [46]. Bào tử có dạng hình cầu hay hình bầu dục, đường kính trung bình 0,9µm, chiều rộng 0,9µm, chiều dài 1,2µm [46]. Xạ khuẩn *S. aureus* sống trong môi trường đất, được nuôi cấy ở nhiệt độ tối ưu là 28°C và không phát triển ở 50°C. Đặc điểm hình thái của xạ khuẩn *S. aureus* khác nhau tùy thuộc vào môi trường dinh dưỡng khác nhau (Bảng 1.6).



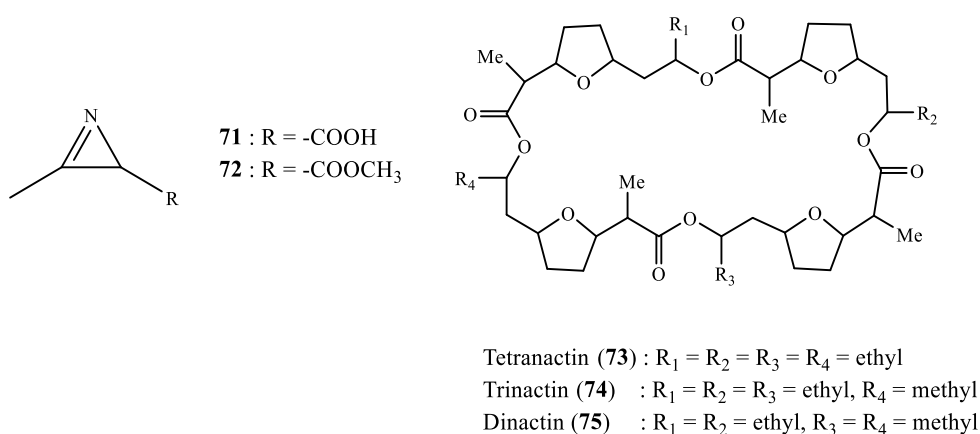
Hình 1.19. Hình thái học của xạ khuẩn *S. aureus* [47]

Bảng 1.6. *Đặc điểm hình thái của xạ khuẩn S. aureus trong các môi trường dinh dưỡng khác nhau* [48]

Môi trường	Khả năng phát triển	Màu sắc khuẩn ty khí sinh	Sắc tố hoà tan
Sucrose nitrate, agar	Kém	Màu kem	-
Glycerol malate, agar	Tốt, màu kem	Màu trắng vàng	Màu nâu nhạt
Glucose-asparagine, agar	Tốt, màu vàng nhạt	Màu trắng vàng	Màu vàng nhạt
Glycerol-asparagine, agar	Tốt	Màu vàng nhạt	Màu nâu vàng nhạt
Nutrient agar	Tốt	Màu vàng da bò	Màu nâu vàng nhạt
Agar Bennett	Rất tốt	Màu xám vàng	Màu nâu vàng đậm
Tinh bột, agar	Trung bình, không màu	Màu trắng vàng	Màu cam vàng nhạt
Khoai tây	Tốt, màu nâu vàng	Màu nâu xám nhạt	-
Nitrate	Keo tụ	-	-
Gelatin agar	Tăng trưởng bề mặt vừa phải	Màu trắng	Màu nâu

Sữa Litmus	Tốt	-	-
Peptone tinh bột, thịt bò, agar	Tốt	Màu nâu vàng nhạt	Màu nâu vàng đậm
Dextrin casein digest agar	Chuỗi bào tử dạng lượn sóng, màu nâu vàng	Màu trắng nâu	Màu nâu vàng đậm
Cellulose-asparagine	Không màu		

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



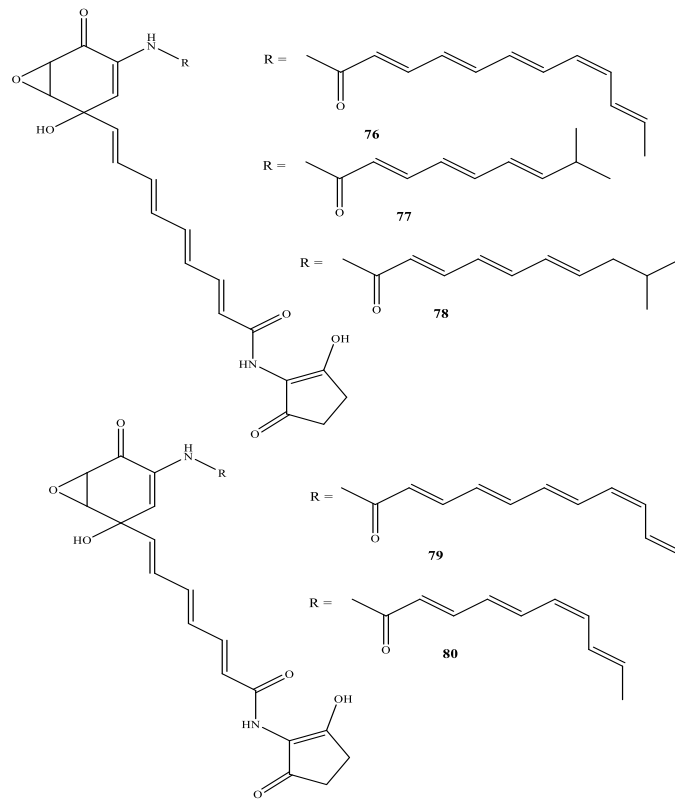
Hình 1.20. Công thức cấu tạo của **71** - **75**

Hợp chất alkaloid gồm azirinomycin **71** và 3-methyl-2H-azirine-2-carboxylic acid **72** được phân lập từ chủng xạ khuẩn *S. aureus*. Hợp chất **72** thể hiện hoạt tính kháng sinh phổ rộng trong ống nghiệm đối với chủng vi khuẩn Gr (+) và Gr (-) [46, 49]. Hợp chất **71** thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh đối với chủng *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* và *Streptococcus faecalis*. Ngược lại, hợp chất 3-methyl-2H-azirine-2-carboxylic acid thể hiện hoạt tính kháng khuẩn yếu đối với chủng *S. aureus* và *S. faecalis*.

Các hợp chất kháng sinh thuộc khung macrotetrolide gồm tetranactin **73**, dinactin **74** và trinactin **75** được phân lập từ chủng xạ khuẩn *S. aureus* [50]. Hợp chất **73** có hoạt tính ức chế sự phát triển của vi khuẩn Gr (+) và nấm phytopathogenic. Tuy nhiên, vùng ức chế tăng trưởng rất nhỏ (<12mm) trong phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch với liều lượng là 200µg/đĩa. Vùng ức chế tăng trưởng nhỏ bởi hợp chất tetranactin không tan trong nước. Độc tính của hợp chất **73** đối với chuột bạch với giá trị LD₅₀ > 300 mg/kg (đối với đường tiêm) và > 15000 mg/kg (đối với đường uống) [48].

Ngoài ra, hợp chất **73** còn có tác dụng ức chế sự tăng sinh của tế bào lympho ở người và tạo ra các tế bào độc tố [51]. Hợp chất này cũng có khả năng làm tăng nồng độ Na⁺ nội bào trong tế bào lympho và ức chế sự hấp thu Ca²⁺ [52]. Do đó, tác

dụng ức chế hệ miễn dịch của hợp chất **73** có liên quan đến thuộc tính ionophore của nó [51].

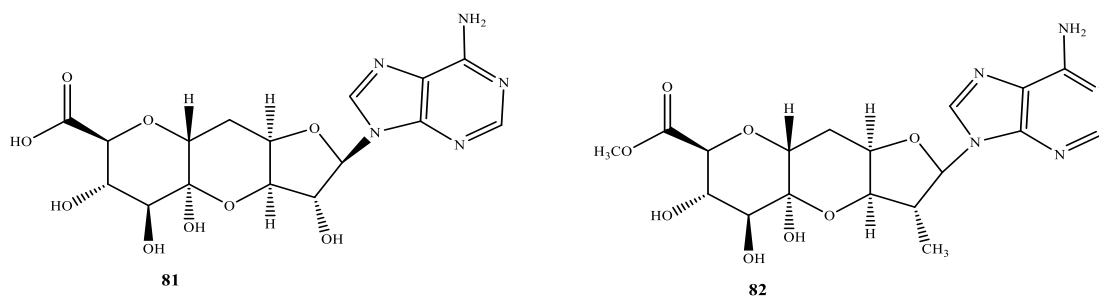


Hình 1.21. Công thức cấu tạo của **76 - 80**

Năm 2014, nhóm kháng sinh manumycin được phân lập từ chủng xạ khuẩn *S. aureus* SOK1/5-04 bao gồm colabomycin E-G **76** – **78** và hợp chất dinorlabomycin A **79**, dinorlabomycin E **80** được phân lập từ chủng đột biến *S. aureus* SOK1/5-04 colC3C4C5 [53]. Hợp chất **76** có hoạt tính ức chế giải phóng IL-1 β trong tế bào đại thực bào THP-1 ở nồng độ từ 0,25 μ M đến ngưỡng ức chế ở nồng độ 0,5 μ M do đó cho thấy hợp chất **76** là một chất kháng viêm tiềm năng [53].

Năm 2022, chủng xạ khuẩn *S. aureus* SPRI-371 được phân lập từ môi trường đất ở tỉnh Giang Tô, Trung Quốc [54]. Các dẫn xuất adenosine là aureonuclemycin A **81**, aureonuclemycin B **82** được phân lập từ chủng xạ khuẩn này. Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn *in vivo* cho thấy hợp chất aureonuclemycin A có hoạt tính trị liệu cao đối với bệnh cháy lá do vi khuẩn hại lúa, bệnh thối nõn ở cam, quýt và hiệu quả tốt hơn khi sử dụng kết hợp giữa hợp chất **81** và **82**. Các thí nghiệm cho thấy rằng, việc sử dụng kết hợp giữa hợp chất **81** 150 gai/ha với hợp chất **82** 75 gai/ha đạt hiệu quả điều trị trên 85% đối với bệnh cháy lá, bệnh rầy nâu, bệnh lùn sọc lá gây ra do vi khuẩn hại lúa. Hiệu quả điều trị của việc sử dụng kết hợp giữa hợp chất **81** và **82** còn cao hơn thuốc trừ sâu thương mại với liều lượng thấp hơn. Ngoài ra, hợp chất aureonuclemycin có tính ổn định tốt, an toàn, độc tính thấp (độc tính cấp ở chuột với giá trị LD₅₀ > 5000 mg/kg thể trọng). Do đó, việc kết hợp giữa hợp chất

81 và **82** là sự thay thế lý tưởng cho thuốc trừ sâu thương mại vì chi phí sản xuất công nghiệp thấp, liều lượng điều trị thấp và hiệu quả điều trị tốt [54].

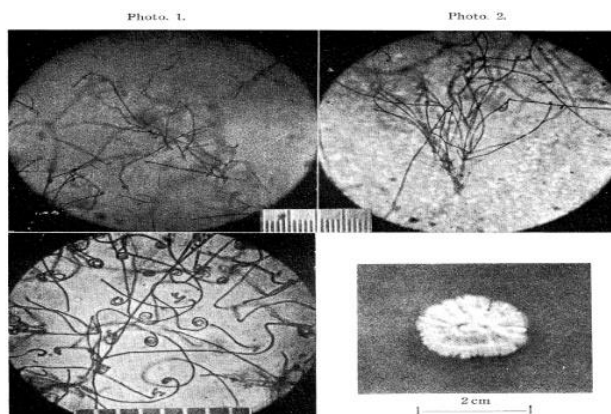


Hình 1.22. Công thức cấu tạo của **81** - **82**

1.3.4. Chứng xạ khuẩn *Streptomyces spiroverticillatus*

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

Xạ khuẩn *Streptomyces spiroverticillatus* lần đầu được phân lập trong môi trường đất ở thành phố Higashinoshiro (tỉnh Akita) và ở ga Kuchian (Hokkaido), Nhật Bản vào tháng 7 năm 1955 [55]. Xạ khuẩn *Streptomyces spiroverticillatus* có dạng hình sợi, khuẩn ty khí sinh dài, màu trắng, rộng 0,8 μ và khuẩn ty cơ chất không phân nhánh, chiều dài 0,6 μ . Bào tử có dạng hình cầu, chiều dài 0,8 μ , chuỗi bào tử dài, xoắn ốc, đường kính xoắn ốc khoảng 5-8 μ , đôi khi gợn sóng.



Hình 1.23. Khuẩn lạc của xạ khuẩn *Streptomyces spiroverticillatus* [55]

Bảng 1.7. Sự thay đổi của *Streptomyces spiroverticillatus* ở các điều kiện môi trường khác nhau [55]

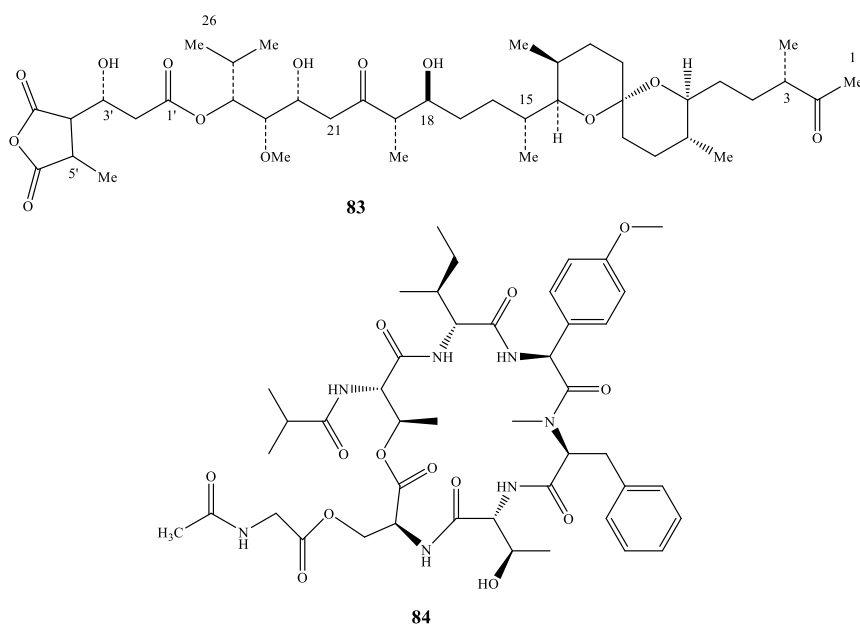
Môi trường	Khả năng phát triển	Màu sắc khuẩn ty khí sinh	Màu sắc khuẩn ty cơ chất	Sắc tố hoà tan
Peptone khoai tây, glycerine, agar	Tốt, đặc	Màu trắng	Thay đổi từ màu vàng cam đến màu vàng da bò	Thường không có, đôi khi màu nâu nhạt
Nước canh, agar	Trung bình	-	Thay đổi từ màu vàng đậm đến màu vàng nhạt	-
Nutrient agar	Rất tốt, đặc	-	Thay đổi từ màu	Có thể là màu

			vàng đến màu vàng da bò	nâu nhạt
Peptone glucose, agar (Waksman's B)	Rất tốt	Màu trắng hoặc trắng nâu	Thay đổi từ màu cam vàng đậm đến màu hổ phách	Thay đổi từ màu cam vàng đậm tới màu nâu nhạt
Glucose broth	Trung bình	Màu trắng	Thay đổi từ màu vàng đậm đến không màu	-
Tinh bột, agar (Waksman's A)	Tốt	Màu trắng hoặc màu trắng nâu hoặc màu trắng hồng	Thay đổi từ màu cam nhạt đến màu nâu nhạt, màu vàng	-
Glucose asparagine agar (Krainsky's)	Rất tốt	Màu trắng hoặc màu trắng nâu	Màu cam vàng nhạt	-
Ca-malate agar (Glycerine ammonium agar)	Rất tốt, đặc	Màu trắng	Thay đổi từ màu cam vàng nhạt đến màu cam vàng đậm, màu nâu nhạt	-
Sucrose ammonium, agar (Czapek's modified)	Kém	Màu trắng	Thay đổi từ không màu đến màu cam vàng nhạt	-
Agar tổng hợp (Czapek's)	Nghèo	Màu trắng	Thay đổi từ không màu đến màu nâu nhạt, màu cam vàng đậm	-
Agar thường	Kém	Màu trắng hoặc màu trắng nâu	Thay đổi từ không màu đến màu nâu nhạt	-
Khoai tây	Rất tốt, đặc	Màu trắng hoặc màu trắng nâu	Thay đổi từ màu nâu nhạt đến màu nâu, màu nâu vàng nhạt	Màu nâu
Cà rốt	Tốt	Màu trắng	Thay đổi từ màu cam vàng nhạt đến màu nâu nhạt, màu nâu	Màu nâu nhạt
Trứng	Nghèo	Màu trắng	Thay đổi từ không màu đến màu nâu nhạt	-

Sữa không kem	Tốt	Màu xám nâu	Thay đổi từ màu vàng đến màu cam càng đậm	Màu cam vàng nhạt
Gelatin	Kém	-	-	-
Agar tyrosine	Tốt	Màu trắng hoặc màu trắng nâu	Màu nâu nhạt, đôi khi không màu	

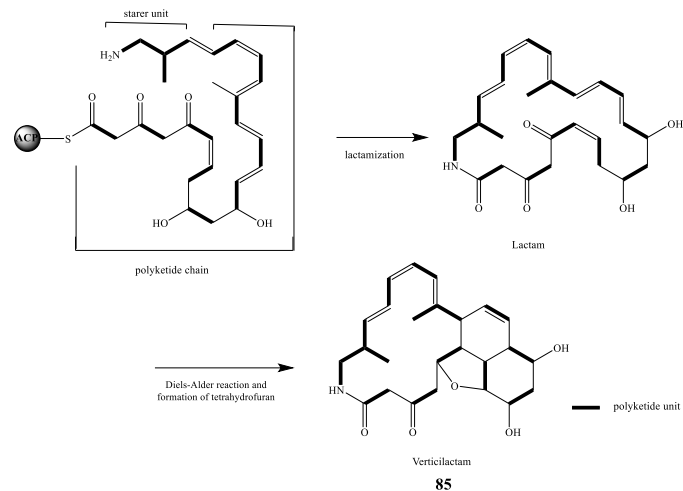
1.3.4.2. Các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học được phân lập từ xạ khuẩn Streptomyces spiroverticillatus

Vào năm 1987, từ xạ khuẩn *Streptomyces spiroverticillatus* có nguồn gốc từ môi trường đất ở Trung Quốc phân lập được hợp chất tautomycin **83** [56]. Hợp chất **83** có hoạt tính kháng nấm đối với chủng *Sclerotinia sclerotiorum* và nó cũng gây ra sự thay đổi hình thái của tế bào bạch cầu K562 ở người. Hơn nữa, người ta thấy rằng hợp chất **83** còn có khả năng ức chế protein-serine/threonine phosphatase (PP) type 1 và 2A với giá trị IC_{50} lần lượt tương ứng là 22, 32 nM, trong khi hợp chất này ức chế PP2B ở nồng độ cao ứng với giá trị $IC_{50} > 10 \mu M$ [57]. Ngoài ra, hợp chất **83** ức chế sự phát triển của tế bào ung thư tuyến giáp thể tuỷ thông qua ức chế enzyme glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) [58].



Hình 1.24. Công thức cấu tạo của hợp chất **83** - **84**

Hợp chất xanthostatin **84** được phân lập từ xạ khuẩn *Streptomyces spiroverticillatus* [59]. Hợp chất này có hoạt tính kháng khuẩn đối với *Xanthomonas oryzae* và *Xanthomonas citri* với giá trị MIC lần lượt tương ứng là 2 và 4 $\mu g/mL$.

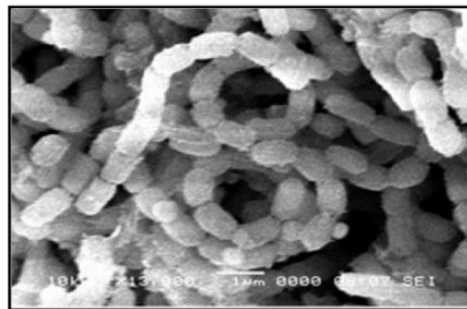


Hình 1.25. Con đường sinh tổng hợp của hợp chất **85**

Một hợp chất thuộc khung macrolactam là verticilactam **85** được phân lập từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces spiroverticillatus* JC-8444 [60]. Hợp chất **85** là hợp chất với một đơn vị β -ketoamide đặc trưng trong vòng 16-polyketide macrolactam. Hợp chất **85** có hoạt tính kháng nấm đối với chủng *Escherichia coli* HO-141, *Magnaporthe oryzae* và hoạt tính gây độc tế bào đối với tế bào ung thư bạch cầu HL-60 ở người. Tuy nhiên, hợp chất này không có hoạt tính sinh học ở nồng độ lên đến 50 $\mu\text{g/mL}$. Ngoài ra, hợp chất **85** còn thể hiện hoạt tính kháng ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* 3D7 ứng với giá trị IC_{50} là 12 μM [61].

1.3.5. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces cyaneus*

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



Hình 1.26. Hình ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét của xạ khuẩn *Streptomyces cyaneus* trong môi trường tinh bột nitrate agar

Xạ khuẩn *Streptomyces cyaneus* có hình sợi, chuỗi bào tử có hình xoắn ốc, bào tử có màu xám hoặc đỏ, bề mặt bào tử nhẵn. Khuẩn ty cơ chất có màu nâu vàng và sắc tố khuếch tán có màu hơi vàng nâu đến màu nâu [62]. Xạ khuẩn *Streptomyces cyaneus* có thể thủy phân pectin, tinh bột, lipid và cellulose, nhưng không thủy phân lecithin, protein và enzyme catalase. Xạ khuẩn *Streptomyces cyaneus* có thể sử dụng nguồn carbon như maltose, fructose, rhamnose, lactose, raffinose, mannitol và xylose. Xạ khuẩn *Streptomyces cyaneus* tăng trưởng vừa

phải trên arabinose, natri axetat, sucrose, glucose, *L*-asparagin, *L*-leucine, *L*-cystiene và glycine. Xạ khuẩn *Streptomyces cyaneus* phát triển tốt ở nồng độ NaCl trên 0,5% đến 5%, nhưng không tăng trưởng khi có mặt của 6% NaCl, chúng tăng trưởng tốt ở điều kiện nhiệt độ từ 20 đến 40°C và giá trị pH từ 5 đến 9 [62].

Bảng 1.8. Đặc điểm hình thái của xạ khuẩn Streptomyces cyaneus trong môi trường dinh dưỡng khác nhau

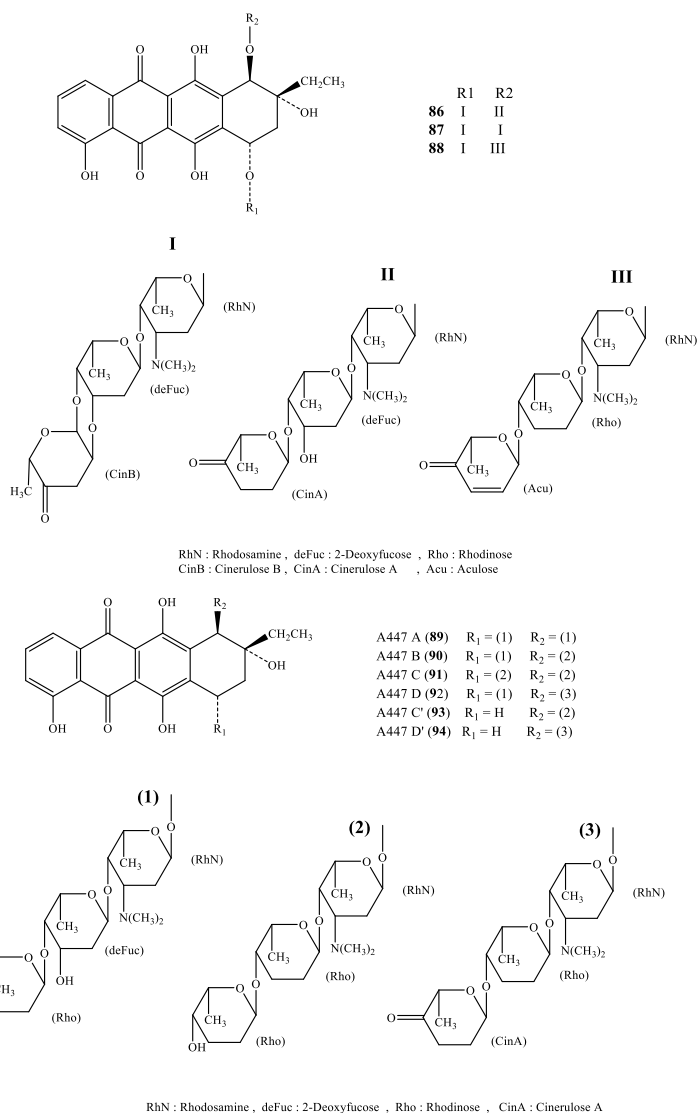
Môi trường	Khả năng phát triển	Màu sắc khuẩn ty khí sinh	Màu sắc khuẩn ty cơ chất	Sắc tố khuếch tán
ISP1	-	-	-	-
ISP2	-	-	-	-
ISP3	Tốt	Màu đỏ	Màu nâu vàng nhạt	Màu nâu vàng
ISP4	Tốt	Màu xám	Màu nâu nhạt	Màu vàng nhạt
ISP5	Trung bình	Màu đỏ	Màu nâu vàng nhạt	Màu đỏ cam đậm
ISP6	Trung bình	Màu xám nhạt	Màu nâu vàng	Màu nâu đậm
ISP7	Tốt	Màu xám nhạt	Màu vàng nhạt	Màu nâu đậm
Tinh bột nitrate agar	Tốt	Màu xám nhạt	Màu nâu vàng nhạt	Màu nâu vàng

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

Hợp chất anthracycline gồm ditrisarubicin A **86**, ditrisarubicin B **87** và ditrisarubicin C **88** được phân lập từ môi trường nuôi cấy của chủng xạ khuẩn *Streptomyces cyaneus* MG344-hF49 [63]. Các hợp chất này đều có hoạt tính ức chế sự phát triển đối với vi khuẩn Gr (+). Ngoài ra, các hợp chất anthracycline còn có hoạt tính gây độc tế bào đối với tế bào bạch cầu L-1210 và ức chế tổng hợp RNA với giá trị LD₅₀ trong khoảng 5-10 mg/kg qua đường tiêm [63].

Xạ khuẩn *Streptomyces cyaneus* A447 được phân lập từ mẫu đất ở đảo Hachijyo, Tokyo, Nhật Bản. Từ dịch chiết acetone của chủng xạ khuẩn *Streptomyces cyaneus* A447 phân lập được các hợp chất anthracycline gồm A447 A-D (**89** - **94**) [64]. Hợp chất **89** và **90** được xác định là cosmonycin C và cosmonycin D [65, 66]. Hợp chất **91** và **92** thể hiện hoạt tính ức chế tế bào bạch cầu P388 ở chó với giá trị IC₅₀ tương ứng là 2,9 và 1,4 ng/mL [64]. Hợp chất **89** thể hiện hoạt tính ức chế hoạt động của STAT3 (bộ chuyển đổi và hoạt hoá yếu tố phiên mã 3) thông qua sự ức chế biểu hiện của các protein trong STAT3 bao gồm cyclin D1, Bcl-xL, Survivin, Mcl-1 và VEGF trong tế bào MDA-MB-468. Nghiên cứu chỉ ra rằng hợp chất **89** gây ra sự tích tụ trong giai đoạn G₀ – G₁ của chu kỳ tế bào và gây ra quá trình chết tế bào thông qua phân cắt PARP và hoạt hóa caspase-3. Do đó,

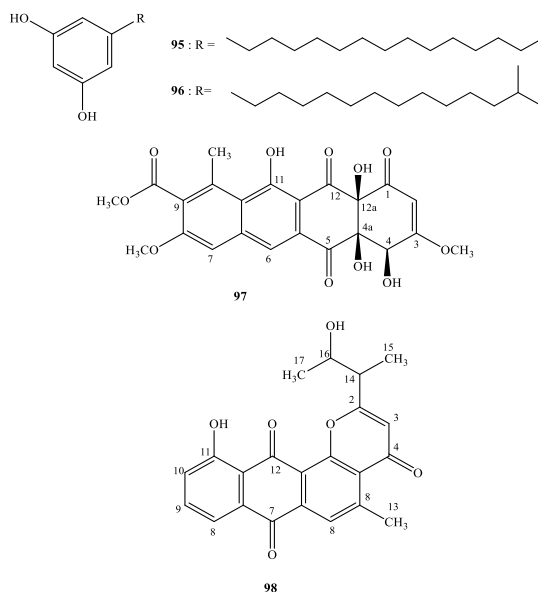
hợp chất **89** được coi là một ứng cử viên tiềm năng cho việc biến đổi con đường STAT3 [67].



Hình 1.27. Công thức cấu tạo của các hợp chất anthracycline **86 - 94**

Hợp chất adipostatin A-B **95 - 96** được phân lập từ môi trường nuôi cấy chủng xạ khuẩn *Streptomyces cyaneus* 2299-SV1 [68]. Hợp chất adipostatin này có hoạt tính ức chế enzyme glycerol-3-phosphate dehydrogenase với giá trị IC_{50} lần lượt là 4,1 và 4,5 μM . Các hợp chất này có khả năng ngăn chặn sự tích lũy chất béo trong tế bào 3T3-L1.

Từ môi trường nuôi cấy của chủng xạ khuẩn *Streptomyces cyaneus* 1763 phân lập được hai hợp chất là AH-1763 Ia **97** và AH-1763 IIa **98** [62]. Hợp chất **97** được cho là tetracenomycin (1,4,4a,5,12,12a-hexahydro - 4, 4a, 11, 12a-tetrahydroxy-3,8-dimethoxy-9-methoxycarbonyl-10-methyl-1,5,12-trioxonaphthacene) [69]. Hợp chất **98** thể hiện hoạt tính ức chế tăng sinh đối với virus trong tế bào Vero với giá trị EC_{50} là 2,1 $\mu\text{g/mL}$ trong khi giá trị IC_{50} là 15,2 $\mu\text{g/mL}$ ức chế sự phát triển của tế bào. Ngoài ra, hợp chất **98** còn có hoạt tính kháng khuẩn đối với vi khuẩn *Gr* (+).

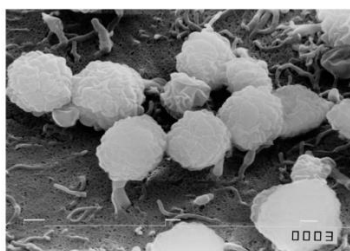


Hình 1.28. Công thức cấu tạo của 95 - 98

1.3.6. Chứng xạ khuẩn *Actinoplanes missouriensis*

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

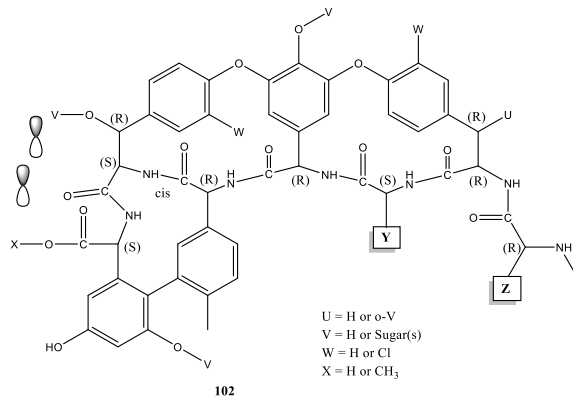
Xạ khuẩn *Actinoplanes missouriensis* lần đầu được phân lập từ môi trường đất ở Hamilton, Missouri, Hoa Kỳ và được Couch mô tả đầu tiên [70]. Màu sắc của khuẩn ty cơ chất là màu cá hồi trên môi trường thạch Czapek, không hình thành khuẩn ty khí sinh. Trong môi trường thạch Czapek, xạ khuẩn *Actinoplanes missouriensis* tạo ra sắc tố hoà tan màu hoa oải hương nhạt [70]. Các bào tử có hình cầu (1-1,2 μM) sắp xếp thành các cuộn không đều trong nang bào tử. Các cuống sinh bào tử có dạng hình cầu với đường kính 6 đến 14 μM (hình 1.29) [70]. Xạ khuẩn *Actinoplanes missouriensis* phát triển tốt ở điều kiện nhiệt độ 28°C.



Hình 1.29. Ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét của xạ khuẩn *Actinoplanes missouriensis*, 10 μm [70]

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

Hợp chất actaplanin (A4696) **99** được phân lập từ chủng xạ khuẩn *Actinoplanes missouriensis* ATCC 23342 [71, 72]. Cấu trúc của hợp chất **99** gồm phức hợp giữa glycopeptide với amino acid thơm và đường glucose, mannose, rhamnose. Các đơn vị hợp phần của hợp chất actaplanin thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với vi khuẩn *Bacillus subtilis*.



Hình 1.30. Công thức cấu tạo của hợp chất 99

1.4. Tổng quan về protein ClpC1

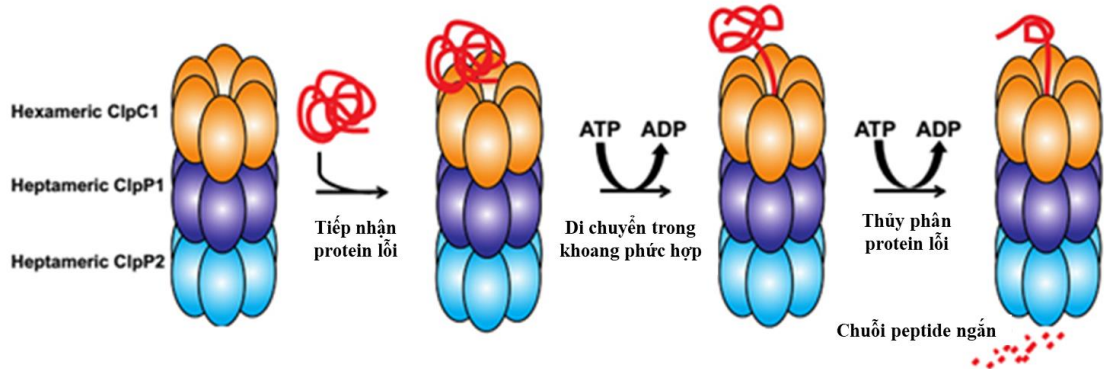
Protein Clp đóng vai trò quan trọng trong quá trình gây bệnh và sống sót của nhiều loài vi khuẩn gây bệnh nói chung và vi khuẩn lao nói riêng [73]. Protein Clp của vi khuẩn lao *M. tuberculosis* chứa hai thành phần có hoạt tính protease (ClpP1 và ClpP2) và hai thành phần có hoạt tính ATPase (ClpC1 và ClpX). Một điều khác biệt ở vi khuẩn lao *M. tuberculosis* so với các vi khuẩn khác, ClpC1 có trình tự bảo toàn cao và khi ClpC1 kết hợp với phức hợp ClpP để đảm nhiệm vai trò chaperon (protein bảo vệ) trong tế bào [74]. ClpC1 là một protein có 848 amino acid. Các monomer protein của ClpC1 có 5 cấu trúc xoắn riêng biệt bao gồm: cấu trúc xoắn N-terminal (từ đoạn 3-153), cấu trúc xoắn lớn D1 (từ đoạn 154-350), cấu trúc xoắn nhỏ D1 (từ đoạn 351-464), cấu trúc xoắn lớn D2 (từ 465-722) và xoắn nhỏ D2 (từ 723-848) [75].



Hình 1.31. Chuỗi amino acid của protein ClpC1 trong vi khuẩn lao *M. tuberculosis*

ClpC1 sẽ tiếp nhận ra các protein lỗi như một cơ chất (cơ chất), bẻ lại cấu trúc gập của protein và chuyển chúng vào trong khoang protease được tạo bởi hệ phức hợp ClpP1/P2 dưới tác động của các ATPase. Cuối cùng, hệ phức hợp heptameric sẽ thủy phân các protein lỗi thành các chuỗi peptit ngắn (10-15 amino

acid) và tiếp tục bị thủy phân bởi các peptidase của tế bào [76]. Vì vậy, sự thủy phân protein trong tế bào sẽ giảm hoặc dừng hoàn toàn nếu protein ClpC1 mất hoạt tính [77, 78]. Do đó, protein ClpC1 đã trở thành mục tiêu quan trọng trong quá trình tìm kiếm và sàng lọc các tác nhân chống lại vi khuẩn lao một cách an toàn và hiệu quả.



Hình 1.32. Cơ chế hoạt động của protease điều hòa ClpC1 trong vi khuẩn lao *M. tuberculosis* [76]

Do đặc điểm của *M. tuberculosis* là sinh trưởng và phát triển chậm, cũng như dễ lây truyền nên trong nhiều nghiên cứu, các nhà khoa học lựa chọn nghiên cứu protein ClpC1 từ vi khuẩn lao thông qua biểu hiện protein tái tổ hợp ClpC1. Vi khuẩn *Escherichia coli* được sử dụng để tái tổ hợp protein ClpC1 trong các phòng thí nghiệm có độ an toàn sinh học không cao [79]. Nghiên cứu của nhiều nhà khoa học cho thấy, nhiệt độ được sử dụng để tái tổ hợp protein ClpC1 thường là 30°C [80] hoặc 37°C [75, 81]. Điều này chứng minh khoảng nhiệt độ từ 30°C đến 37°C là khoảng nhiệt độ tối ưu để tái tổ hợp protein ClpC1.

Hầu hết các loại kháng sinh phổ biến hiện nay đều được phát hiện nhờ khả năng can thiệp vào quá trình tổng hợp các đại phân tử như DNA, RNA, lipid, protein và peptidoglycan của vi khuẩn khi chúng đang nhân bản trong môi trường tăng trưởng tổng hợp ở phòng thí nghiệm. Các mục tiêu khác của kháng sinh được phát hiện bằng phương pháp này bao gồm quá trình cân bằng nội môi, truyền tín hiệu, sản xuất yếu tố gây độc ... Trong đó, mạng lưới cân bằng protein (bao gồm các chaperone tham gia vào quá trình gấp và duy trì cấu trúc protein, các protease tham gia vào quá trình phân hủy protein) đặc biệt thu hút các nhà khoa học do ảnh hưởng của nó tới nồng độ của hàng trăm protein khác. Trong trường hợp mạng lưới cân bằng protein không thể hoạt động một cách bình thường, sự tấn công của hệ thống miễn dịch vật chủ có thể làm hỏng hệ thống protein của *M. tuberculosis* một cách dễ dàng và cuối cùng là tiêu diệt vi khuẩn. Vì vậy, đối với vi khuẩn *M. tuberculosis*, hai thành phần chính của phức hợp protease thuộc họ protease Clp

được đặc biệt chú trọng là ClpC1 và phức hợp ClpP1P2 [28].

Các peptide mạch vòng tiêu diệt các chủng *M. tuberculosis* kháng thuốc bằng cách liên kết với vùng tận cùng N của ClpC, hoạt hóa quá trình thủy phân ATP và tách sự thủy phân này khỏi sự phân hủy của phức hợp ClpCP [82]. Các hợp chất peptide mạch vòng được phân lập từ xạ khuẩn như cyclomarin A, lassomycin và ecumicin,... cho thấy hoạt tính kháng lao mạnh đối với *M. tuberculosis* trong thử nghiệm *in vitro* [83-85]. Các peptide vòng này có các đặc tính như độc tính thấp, ái lực liên kết và tính chọn lọc cao. Kết quả nghiên cứu cho thấy các peptide mạch vòng trên nhắm đích vào protease ClpC1 theo các cơ chế khác nhau [83-85]. Ecumicin là một kháng sinh tự nhiên tiềm năng trong việc tiêu diệt các chủng *M. tuberculosis* một cách hiệu quả. Trong các thí nghiệm *in vitro*, ecumicin làm tăng hoạt tính ATPase của ClpC1 lên vài lần trong khi hoạt động phân hủy protein bị suy giảm. Lassomycin, một peptide mạch vòng được tổng hợp bằng con đường ribosome ở xạ khuẩn, cũng là một kháng sinh tự nhiên khác có khả năng tiêu diệt *M. tuberculosis* một cách hiệu quả. Mặc dù có cấu trúc khác với ecumicin, lassomycin cũng kích thích hoạt động thủy phân ATP của ClpC1 [86]. Cyclomarin A liên kết với đuôi N của protease ClpC1 của *M. tuberculosis* và ảnh hưởng đến hoạt động của nó một cách không xác định. Tương tự như lassomycin và ecumicin, sự liên kết của cyclomarin A với ClpC1 làm tăng cường hoạt động thủy phân ATP của nó. Điều này làm tăng cường độ phân hủy cơ chất, cũng như làm giảm tính chọn lọc của phức hợp protease, gây ra sự phân hủy protein không kiểm soát dẫn đến sự chết tế bào [86].

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. Đất nước Việt Nam trải dài trên 3600 km với địa hình khí hậu, thổ

những đa dạng, phong phú từ vùng núi cao, vùng đầm lầy, ngập mặn, vùng ven biển chính là nguồn cung cấp các chủng xạ khuẩn có khả năng sản sinh ra các hợp chất kháng lao có hoạt tính cao. Tuy nhiên, các nghiên cứu về các hợp chất kháng lao từ xạ khuẩn ở Việt Nam hiện nay còn rất ít được nghiên cứu. 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*

Từ 26 mẫu đất và trầm tích được thu thập ở các địa điểm khác nhau tại rừng ngập mặn xã Phù Long - Hải Phòng, vườn quốc gia Cát Bà - Hải Phòng, suối Yên - chùa Hương - Hà Nội, hồ Quan Sơn - Hà Nội, vườn quốc gia Cúc Phương - Ninh Bình và rừng ngập mặn Quỳnh Lương - Nghệ An, chúng tôi tiến hành nghiên cứu 4 chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng *M. smegmatis* mạnh nhất được phân lập từ các địa điểm khác nhau.

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

Sử dụng các dung môi có độ phân cực khác nhau như: *n*-hexan 99% (Trung Quốc), dichloromethane (Trung Quốc), ethylacetat 99,5% (Trung Quốc), acetone 99% (Trung Quốc), methanol 96% (Việt Nam), ethanol 96% (Việt Nam). Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng silica gel Merck 60 F254. Sắc ký cột được tiến hành với silica gel cỡ hạt 40-63 μm , dianion HP-20, RP-18 và sephadex LH-20 (Aldrich). TLC được hiện màu bằng thuốc thử vanillin/ H_2SO_4 , hơi nóng ở 80-100°C và thuốc thử Dragendorff.

2.2.2. Thiết bị

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR được ghi bằng máy Bruker Avance 500 MHz (Đức) và máy Bruker Avance III 600 MHz (Đức) tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phổ khối ESI-MS được đo trên máy Agilent LC-MSD-Trap SL tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và máy AMD 402 (Đức).

Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS được đo trên máy FT-ICR-MS Varian (USA), tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Độ quay cực được đo trên thiết bị Jasco P-2000 Polarimeter serial A060161232, Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Máy cắt quay chân không của hãng Buchi Thụy Sĩ, máy sấy, bể siêu âm, dụng cụ thủy tinh, đèn tử ngoại để soi bản mỏng (UV Bloblock) bước sóng $\lambda = 254$ nm và 360 nm, các loại cột sắc ký với kích cỡ khác nhau.

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

Mẫu chủng xạ khuẩn được thu thập ở các vùng miền khác nhau, địa hình khác nhau (cửa biển, cửa sông, mẫu đất đá, sỏi.. trong rừng) với các độ sâu lấy mẫu khác nhau. Tọa độ tại mỗi điểm lấy mẫu được ghi nhận trên máy định vị GPS. Các thông tin khác như nhiệt độ, độ ẩm, độ mặn, độ sâu cũng được đo bằng các máy chuyên dụng. Các mẫu được đựng riêng lẻ trong ống falcon 50 mL khử trùng và bảo quản lạnh trong thời gian vận chuyển về phòng thí nghiệm.

2.3.1.2. Phương pháp phân lập chủng xạ khuẩn

Mẫu được để khô tự nhiên trong 2-3 ngày và nghiền nhỏ. Lấy 1 gam mẫu và pha loãng tới nồng độ 10^{-3} , 10^{-4} trong nước cất đã vô trùng, sau đó trải lên đĩa Petri chứa hai môi trường khác nhau là NaST21 (dung dịch A: 750 mL nước biển khử trùng, K_2HPO_4 1g, Bactogar 16g; dung dịch B: 250 mL nước biển khử trùng,

KNO₃ 1g, MgSO₄ 1g, CaCl₂.2H₂O 1g, FeCl₃ 0,2g, MgSO₄.7H₂O 0,1g) và HV (Humic acid 1g, CaCO₃ 0,02 g, FeSO₄.7H₂O 0,01g, KCl 1,7 g, MgSO₄.7H₂O 0,05g, Na₂HPO₄ 0,5g, vitamin nhóm B 5mL, Agar 16g, nước cất 1L, pH 7). Cả hai môi trường được bổ sung acid nalidixic 20mg/L và cycloheximide 50 mg/L. Đĩa phân lập được ủ ở 28-30°C trong 14 đến 21 ngày. Khuẩn lạc được ria lên môi trường YS (Cao nấm men 2g, tinh bột 10g, nước cất 1L) và giữ lạnh sâu ở -80°C [87].

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

Các chủng xạ khuẩn nuôi cấy trên môi trường thạch sau 5 – 7 ngày được cấy vào bình tam giác 1000 mL chứa 350 ml môi trường YS, lắc ở 160 vòng/phút, 28 – 30°C. Sau 72 giờ nuôi cấy, dịch xạ khuẩn không tạp nhiễm, có mật độ $25 - 30 \times 10^6$ tế bào/mL được làm giống gốc cho hệ thống lên men 50 lít. Lượng giống ban đầu bơm vào với tỷ lệ 2,5 - 3% (v/v). Môi trường lên men phải đảm bảo đã được khử vô trùng và làm nguội trước khi tiếp giống. Sau khi tiếp giống, hệ thống lên men bắt đầu được vận hành, các thông số: tốc độ sục khí, tốc độ khuấy và nhiệt độ trong hệ thống lên men được đảm bảo theo đúng yêu cầu. Động học của quá trình thay đổi mật độ tế bào của các chủng xạ khuẩn trong hệ thống lên men 50 lít được theo dõi chặt chẽ trong suốt quá trình lên men. Sau quá trình lên men 144 giờ, dịch nuôi cấy xạ khuẩn được thu nhận (50L) được tiến hành ly tâm 10000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng, thu được phần dịch nước và phần tế bào. Phần dịch nước được chiết với EtOAc, sau đó cô quay thu được cao chiết EtOAc [88]. Phần tế bào được ngâm chiết trong methanol/nước (cồn/nước) theo tỉ lệ 9:1 (3 x 4h x 1 L), sau đó tiến hành ly tâm 10000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng để loại bỏ cặn. Dịch chiết thu được được tiến hành cất loại dung môi thu được cao chiết methanol (cao chiết cồn). Các hợp chất thứ cấp sản sinh từ chủng xạ khuẩn khác nhau sẽ có mức độ hòa tan trong các dung môi khác nhau. Việc lựa chọn dung môi chiết xuất dựa vào tham khảo tài liệu và khảo sát lượng nhỏ các dịch chiết tổng để thu được hiệu suất chiết cao nhất. Tùy theo từng chủng xạ khuẩn mà lựa chọn dung môi phù hợp để chiết các hợp chất đạt hiệu suất cao nhất.

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

Tách và tinh chế các chất sạch từ các cao chiết bằng phương pháp sắc ký cột kết hợp với sắc ký lớp mỏng, sắc ký lớp mỏng điều chế với các hệ dung môi thích hợp. Sắc ký cột gồm sắc ký cột thường và sắc ký cột nhanh (flash chromatography) sử dụng silica gel (Merck). Đối với các chất phân cực mạnh sử dụng sắc ký rửa phân tử Sephadex LH-20, sắc ký cột pha đảo RP-18 hoặc nhựa trao đổi ion Dianion. Trong hầu hết các trường hợp cần chạy cột lặp lại nhiều lần hoặc dùng phương pháp kết tinh phân đoạn, kết tinh lại để tinh chế chất. Kiểm tra độ tinh khiết

của các chất cũng như theo dõi quá trình tách chất trên cột bằng sắc kí lớp mỏng (TLC) với hệ dung môi thích hợp. Cụ thể:

- Phương pháp tách và tinh chế các chất kém phân cực: sử dụng các hệ dung môi (*n*-hexan/EtOAc, *n*-hexan/DC...) làm dung môi rửa giải cho các hệ sắc ký cột silica gel, lựa chọn các dung môi phù hợp, lặp lại sắc ký cột nhiều lần.

- Phương pháp tách và tinh chế các chất có độ phân cực trung bình: sử dụng các hệ dung môi (DC/MeOH, EtOAc/DC, DC/acetone,...) làm dung môi rửa giải cho các hệ sắc ký cột silica gel, pha đảo Rp, Sephadex..., lặp lại sắc ký cột nhiều lần.

- Phương pháp tách và tinh chế các chất có độ phân cực mạnh: sử dụng các dung môi có độ phân cực mạnh (MeOH/H₂O, acetone/H₂O, 100% MeOH,...) làm dung môi rửa giải cho các hệ sắc ký cột dianion, Rp, Sephadex.

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

Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ dịch nuôi cấy chủng vi sinh vật được xác định bằng cách sử dụng kết hợp các phương pháp phổ hiện đại như phổ khối phân giải thường và phân giải cao (ESI-MS, HR-ESI-MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (¹H- NMR, ¹³C- NMR, DEPT) và hai chiều (COSY, HSQC, HMBC, NOESY, ROESY).

2.3.5. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

2.3.5.1. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng vi khuẩn tương đồng vi khuẩn lao *Mycobacterium smegmatis*

Mycobacterium smegmatis là một loại vi khuẩn thuộc ngành *Actinobacteria* và chi *Mycobacterium* và lần đầu tiên được phân lập vào năm 1884 bởi Lustgarten [89]. *Mycobacterium smegmatis* có hơn 2000 gen tương đồng với *M. tuberculosis* và có cùng cấu trúc tế bào đặc biệt của *M. tuberculosis* và các loài vi khuẩn khác. Hơn nữa, *Mycobacterium smegmatis* là "chủng phát triển nhanh" và không gây bệnh. Mặt khác, việc nghiên cứu vi khuẩn lao *M. tuberculosis* cần điều kiện về thời gian và cơ sở hạ tầng phức tạp do đó, các nhà nghiên cứu sử dụng *Mycobacterium smegmatis* làm mô hình cho việc nghiên cứu các loài *Mycobacteria* [90].

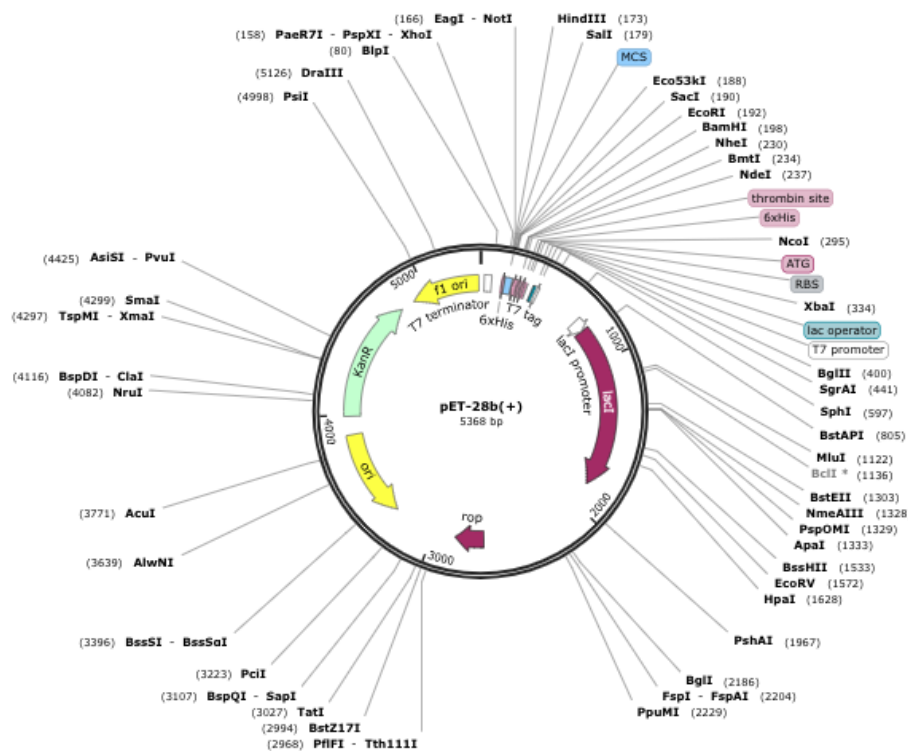
Các chủng xạ khuẩn được nuôi trên môi trường thạch YS trong 7 ngày ở 30°C, chủng vi khuẩn *Mycobacterium smegmatis* KCTC 9108 được nuôi trên môi trường 219 lỏng (g/L: pepton – 10, cao nấm men – 5, cao malt – 5, casamino acid – 5, cao thịt bò – 2, glycerol – 2, tween 80 – 50 mg, MgSO₄.7H₂O – 1) ở 30°C trong 24 giờ. Dịch nuôi vi khuẩn được bổ sung vào môi trường 219 thạch đã khử trùng với tỷ lệ 1% và đổ ra đĩa petri. Các thỏi thạch chứa xạ khuẩn có kích thước 5 mm được đặt lên đĩa. Với các mẫu thử hoạt tính là dịch tách chiết thì tiến hành tạo các lỗ

trên đĩa thạch kiểm định bằng ống nhựa và nhỏ 50µl mẫu vào các lỗ. Ủ đĩa ở 30°C trong 24 giờ. Hoạt tính kháng khuẩn được xác định bằng đường kính vòng vô khuẩn trên đĩa thạch [91, 92].

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

- Biểu hiện và tinh sạch protein tái tổ hợp ClpC1

Plasmid pET28b là một vector phổ biến thường được sử dụng trong tổng hợp protein tái tổ hợp [93]. Cấu trúc của plasmid này được thiết kế để tối ưu hóa việc biểu hiện protein ở hệ thống vi khuẩn *Escherichia coli* [93].



Hình 2.1. Cấu trúc của plasmid pET28b

Plasmid pET28b chứa nhiều yếu tố quan trọng [93, 94]:

+ **Nhiệt độ cảm:** Plasmid này chứa một nhiệt độ cảm, thường là một gen như cI857, cho phép kiểm soát sự biểu hiện của gen được chèn vào plasmid. Nhiệt độ cảm này cho phép người dùng điều chỉnh mức độ biểu hiện của protein trong vi khuẩn, thông qua sự điều chỉnh nhiệt độ môi trường.

+ **Các điểm neo antibiotic:** Plasmid pET28b thường chứa các điểm neo antibiotic, như điểm kháng kháng sinh kanamycin hoặc tetracycline, để chọn lọc vi khuẩn chứa plasmid sau khi tiến hành biến đổi.

+ **Vùng dính kèm:** Plasmid này cũng chứa vùng dính kèm (multiple cloning site - MCS) để thuận tiện cho việc chèn gen của protein cần biểu hiện vào plasmid. Vùng này thường có nhiều điểm cắt cho phép lựa chọn enzyme phù hợp để chèn DNA.

+ Promoter mạnh: Plasmid pET28b thường sử dụng một promoter mạnh như T7 promoter để kích hoạt việc biểu hiện gen được chèn vào plasmid. Promoter này được điều chỉnh bởi hệ thống kiểm soát như nhiệt độ cảm, giúp kiểm soát mức độ biểu hiện của protein.

Với cấu trúc linh hoạt và các yếu tố quan trọng như vậy, plasmid pET28b là công cụ hữu ích trong tổng hợp protein tái tổ hợp, cho phép nghiên cứu viên và các nhà khoa học điều chỉnh và kiểm soát quá trình biểu hiện protein một cách chính xác và hiệu quả [93].

Plasmid pET28b có chứa trình tự protein ClpC1 được biến nạp vào tế bào *Escherichia coli* BL21 (DE3) khả biến theo phương pháp của Sambrook et al., 2001 [95]. Dịch tăng sinh từ khuẩn lạc đơn của chủng này được bổ sung theo tỷ lệ 1/100 (thể tích:thể tích) vào môi trường LB (Tryptone 10g, cao nấm men 5g, NaCl 10g, pH=7) dịch thể có kanamycin (nồng độ cuối 50 $\mu\text{L/mL}$) và được cảm ứng bằng 1 mM IPTG (isopropyl01-thio- β -D galactopyranoside-Sigma) khi OD_{600 nm} của dịch nuôi cấy đạt giá trị 0,3 – 0,4 ở các nhiệt độ khảo sát. Cấn tế bào thu sau ly tâm được hòa tan trong dung dịch đệm phản ứng (5mM Imidazole, 0,5M NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7,9) và dịch thu sau khi siêu âm (B. Braun Braun-sonic 2000U) được sử dụng làm mẫu để: i) kiểm tra mức độ biểu hiện của protein ClpC1; ii) lọc qua màng 0,45 μm lấy 10 mL làm mẫu tinh sạch qua cột sắc ký ái lực (cột His Trap HP 5mL, GE Healthcare Life Sciences). Protein ClpC1 được rửa giải khỏi cột bằng dung dịch đệm rửa giải (1 M Imidazole, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,9).

- Điện di protein SDS – PAGE

Điện di SDS – PAGE 12% với marker SM 0431 (Fermentas) theo phương pháp của Laemmli (1970) được sử dụng để đánh giá mức độ biểu hiện và tinh sạch của protein ClpC1 tái tổ hợp [96]. Sau điện di bản gel được nhuộm bằng Coomassie Brilliant Blue và tẩy qua đêm. Hình ảnh các băng trên bản gel được quan sát bằng máy ImageQuant LAS 500.

- Đánh giá hoạt độ ATPase và khảo sát ảnh hưởng của một số chất đến hoạt độ ATPase của ClpC1

Hoạt độ thủy phân ATP-ase của ClpC1 được xác định bằng cách đo mức độ phospho được giải phóng bởi ClpC1 (bằng cách sử dụng đường chuẩn được xây dựng trên nồng độ phosphate tự do) khi sử dụng thuốc thử BIOMOL Green (Enzo life Science, Farmingdale, NY) [28]. Cụ thể là, ClpC1 sau khi tinh sạch được ủ với ATP (100 μM) ở 37°C, 1 giờ trong đệm phản ứng (100 mM Tris, 200 mM KCl, 8 mM, pH 7,5) với thể tích cuối cùng là 50 μL . Hỗn hợp phản ứng sau khi bổ sung 100 μL thuốc thử BIOMOL Green được ủ thêm 30 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó

được đo ở bước sóng 620nm bằng máy BIO-RAD Benchmark Plus. Hoạt độ ATP-ase của ClpC1 tái tổ hợp được xem là 100% khi hoạt độ này được xác định ngay sau khi tinh sạch và khi không bổ sung dịch chiết tổng từ xạ khuẩn. Hoạt độ ATP-ase của ClpC1 tái tổ hợp tại các thời điểm khác (1-11 ngày sau khi tinh sạch) hoặc khi bổ sung các dịch chiết tổng từ xạ khuẩn được đánh giá và so sánh với hoạt độ ban đầu này. Các dịch tách chiết từ xạ khuẩn được làm khô, hoàn nguyên trong DMSO và được thử nghiệm ở nồng độ cuối cùng là 0,02 và 0,2 mg/mL. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần và phương pháp thống kê được sử dụng là phương pháp Student T-test.

Các thí nghiệm để đánh giá tác dụng ức chế protein ClpC1 của vi khuẩn lao được thực hiện tại Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, trường Đại học Quốc Gia Hà Nội.

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

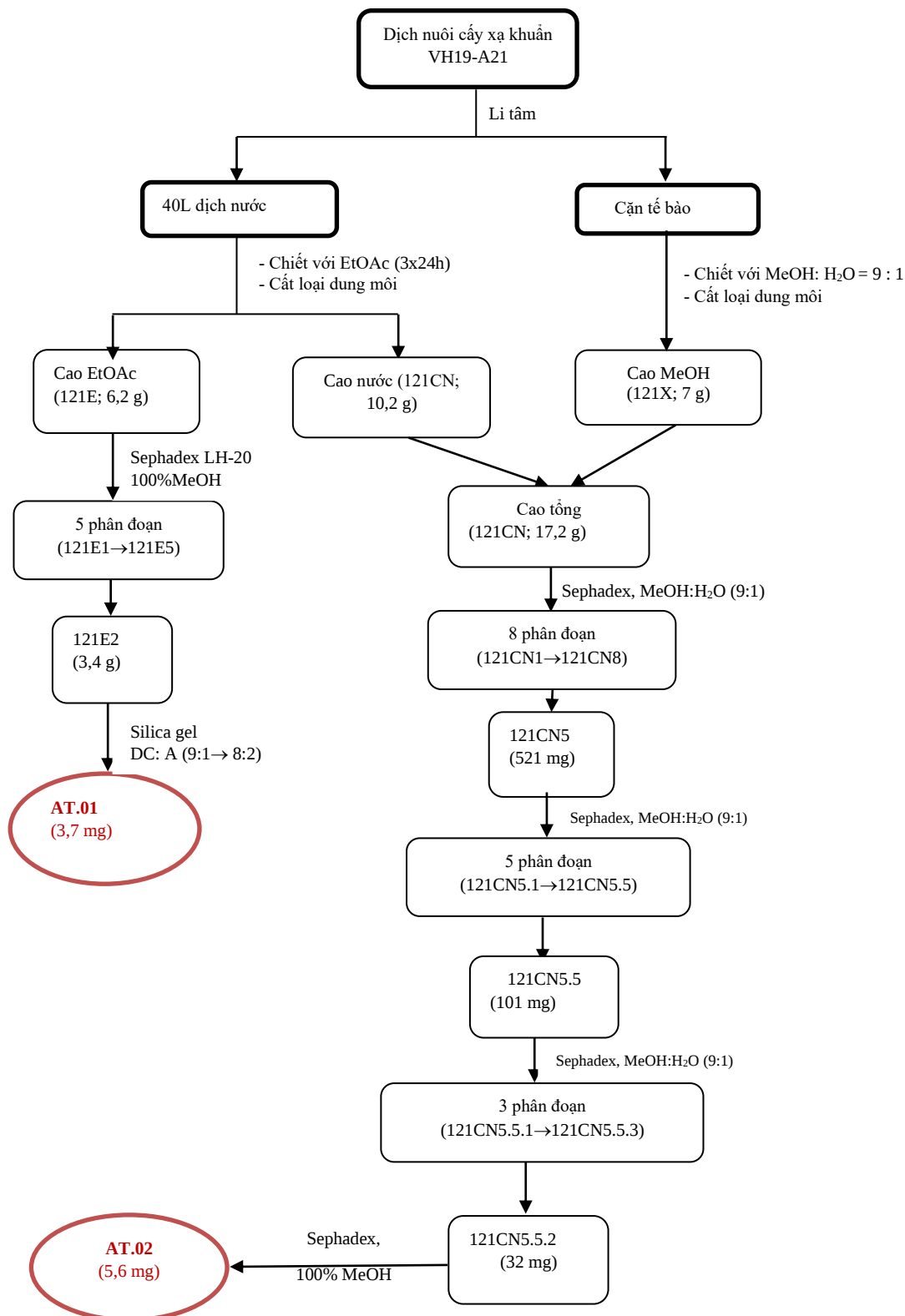
Dịch nuôi cấy thu được sau khi nhân giống chủng xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A121 (50 L) được tiến hành ly tâm 10000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng. Tách riêng dịch nước và tế bào. Phần dịch nước (40 L) được chiết với EtOAc (3 x 4h x 20 L) thu được dịch chiết EtOAc. Gộp các dịch chiết EtOAc và cất loại dung môi thu được cao chiết EtOAc ký hiệu là 121E (6,2 g). Phần dịch nước còn lại sau khi chiết với EtOAc được cô quay thu được cao nước ký hiệu là 121CN (10,2 g).

Phần tế bào được ngâm chiết trong methanol/nước theo tỉ lệ 9:1 (3 x 4h x 1 L), sau đó tiến hành ly tâm 10000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng để loại bỏ cặn. Dịch chiết thu được được tiến hành cất loại dung môi thu được cao chiết methanol ký hiệu là 121X (7,0g).

Cao chiết EtOAc 121E (6,2 g) được đưa lên cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải 100% methanol thu được 5 phân đoạn (121E.1 - 121E.5). Phân đoạn 121E.2 (30 mg) được tiến hành chạy sắc ký cột silica gel với hệ dung môi CH₂Cl₂/Acetone (9:1 đến 8:2) thu được chất sạch **AT.01** (3,7 mg).

Khảo sát cao nước 121CN và cao chiết methanol 121X bằng sắc ký bản mỏng cho thấy sự giống nhau giữa hai cao chiết. Gộp hai cao chiết này thu được 17,2 gam (ký hiệu là 121CN). Cao chiết 121CN (17,2 g) được đưa lên cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là methanol:nước (tỉ lệ 9:1) thu được 8 phân đoạn (121CN1 đến 121CN8). Phân đoạn 121CN5 (521 mg) được tiến hành chạy sắc ký cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là methanol/nước (9:1) thu được 5 phân

đoạn (121CN.5.1 đến 121CN.5.5). Phân đoạn 121CN5.5 (101 mg) được tiếp tục tinh chế bằng sắc ký cột sephadex LH-20 (Methanol/nước 9:1) thu được 3 phân đoạn (121CN5.5.1-121CN5.5.3). Phân đoạn 121CN5.5.2 (32 mg) được tinh chế lần nữa trên cột sephadex LH-20 (100% methanol) thu được chất sạch **AT.02** (5,6 mg).



Hình 2.2. Sơ đồ phân lập các chất từ dịch nuôi cấy 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] 298,1055); 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; C₃₂H₃₂O₁₄; ESI-MS (m/z): 639,1 [M-H]⁻; HR-ESI-MS (m/z): 641,1876 (tính toán lý thuyết cho C₃₂H₃₃O₁₄ 641,1870 [M+H]⁺). Dữ liệu phổ ¹H and ¹³C 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

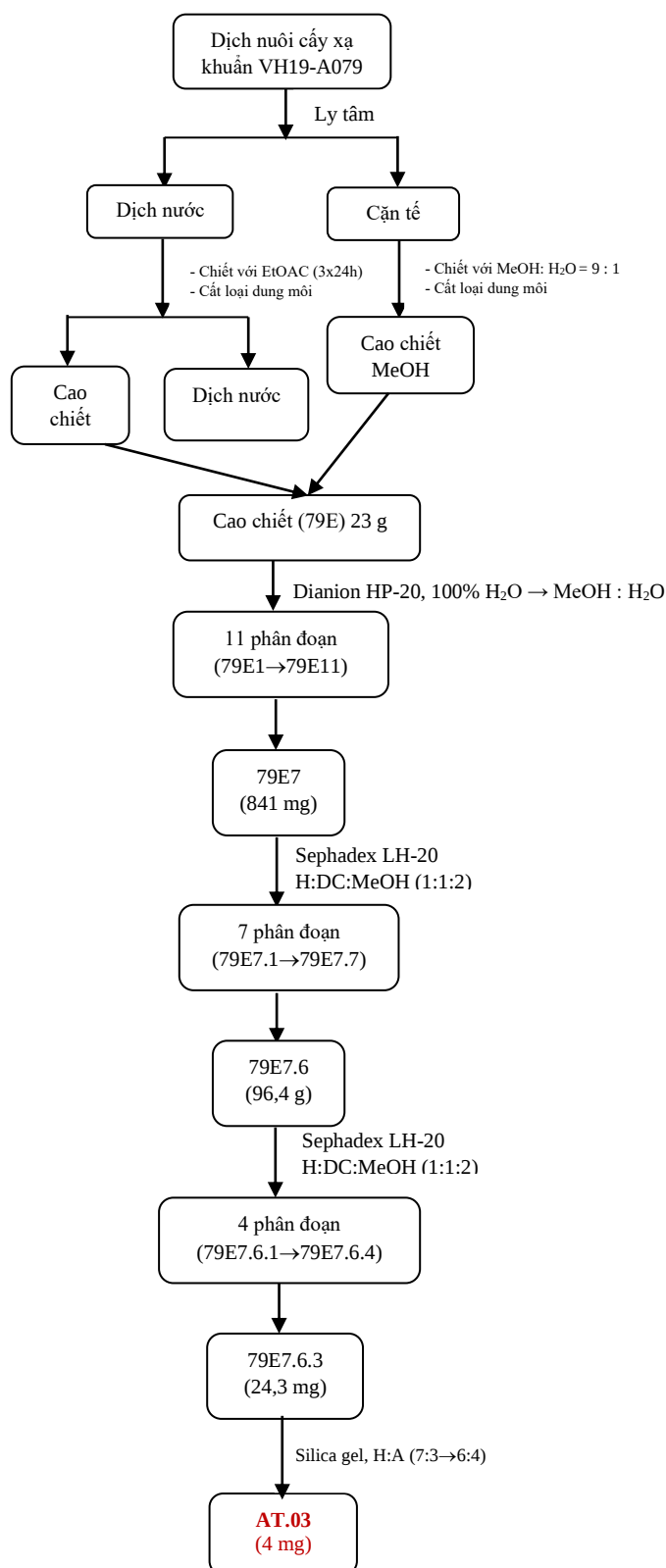
Sau quá trình lên men, dịch nuôi cấy (50 L) xạ khuẩn *Streptomyces wuyuanensis* VH-A079 được tiến hành ly tâm 10000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng để tách riêng dịch nước và cặn tế bào. Phần dịch nước (40 L) được chiết với EtOAc (3 × 4 h × 20 L), cất loại dung môi thu được cao chiết EtOAc.

Phần cặn tế bào sau khi được ly tâm được chiết với methanol : nước theo tỉ lệ 9:1 (3 x 4h x 1 L), sau đó tiến hành ly tâm 10000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng để loại bỏ cặn. Dịch chiết thu được được tiến hành cất loại dung môi thu được cao chiết methanol.

Khảo sát cao chiết ethyl acetate và methanol bằng sắc ký bản mỏng với nhiều hệ dung môi, so sánh thấy sự giống nhau giữa hai cao chiết nên gộp hai cao chiết lại được 23 gam cao tổng. Từ 23 gam cặn chiết 79E được tách bằng sắc ký cột với Diaion HP-20, hệ dung môi lần lượt là 100% H₂O → MeOH : H₂O (2:8 → 3:7 → 5:5) → 100% MeOH thu được 11 phân đoạn, 79E.1 → 79E.11.

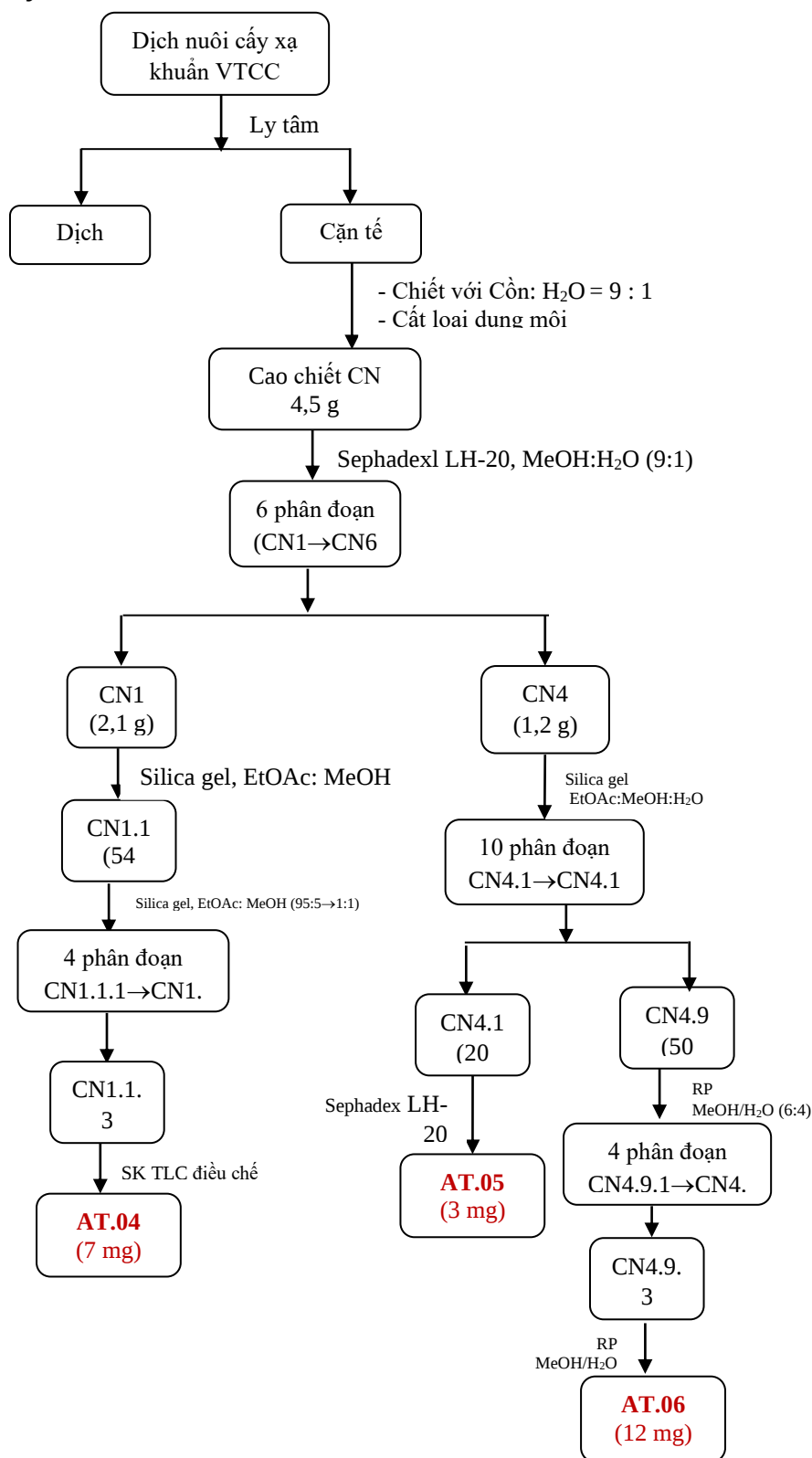
Phân đoạn 79E.7 (841 mg) được tiến hành chạy sắc ký cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là *n*-hexan:CH₂Cl₂:MeOH (1:1:2) thu được 7 phân đoạn, 79E.7.1 → 79E.7.7. Phân đoạn 79E.7.6 (96,4 mg) được tinh chế trên cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là *n*-hexan:CH₂Cl₂:MeOH (1:1:2) thu được 4 phân đoạn, 79E.7.6.1 → 79E.7.6.4. Phân đoạn 79E.7.6.3 (24,3 mg) được tinh chế trên cột silica gel với dung môi là *n*-hexan:acetone (7:3 → 6:4) thu được chất sạch **AT.03** (4 mg).

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.



Hình 2.3. Sơ đồ phân lập các chất từ dịch nuôi cấy xạ khuẩn *Streptomyces wuyuanensis* (VH19-A079)

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



Hình 2.4. Sơ đồ phân lập các chất từ dịch nuôi cấy xạ khuẩn *Streptomyces aureus* VTCC43181

Sinh khối thu được từ xạ khuẩn *Streptomyces aureus* VTCC 43181 được ly

tâm, tách riêng phần dịch nước ra khỏi phần cặn tế bào. Phần tế bào sau khi được ly tâm được chiết với cồn : nước (9:1). Phần dịch chiết được cất loại dung môi, thu được phần cao chiết cồn ký hiệu là CN.

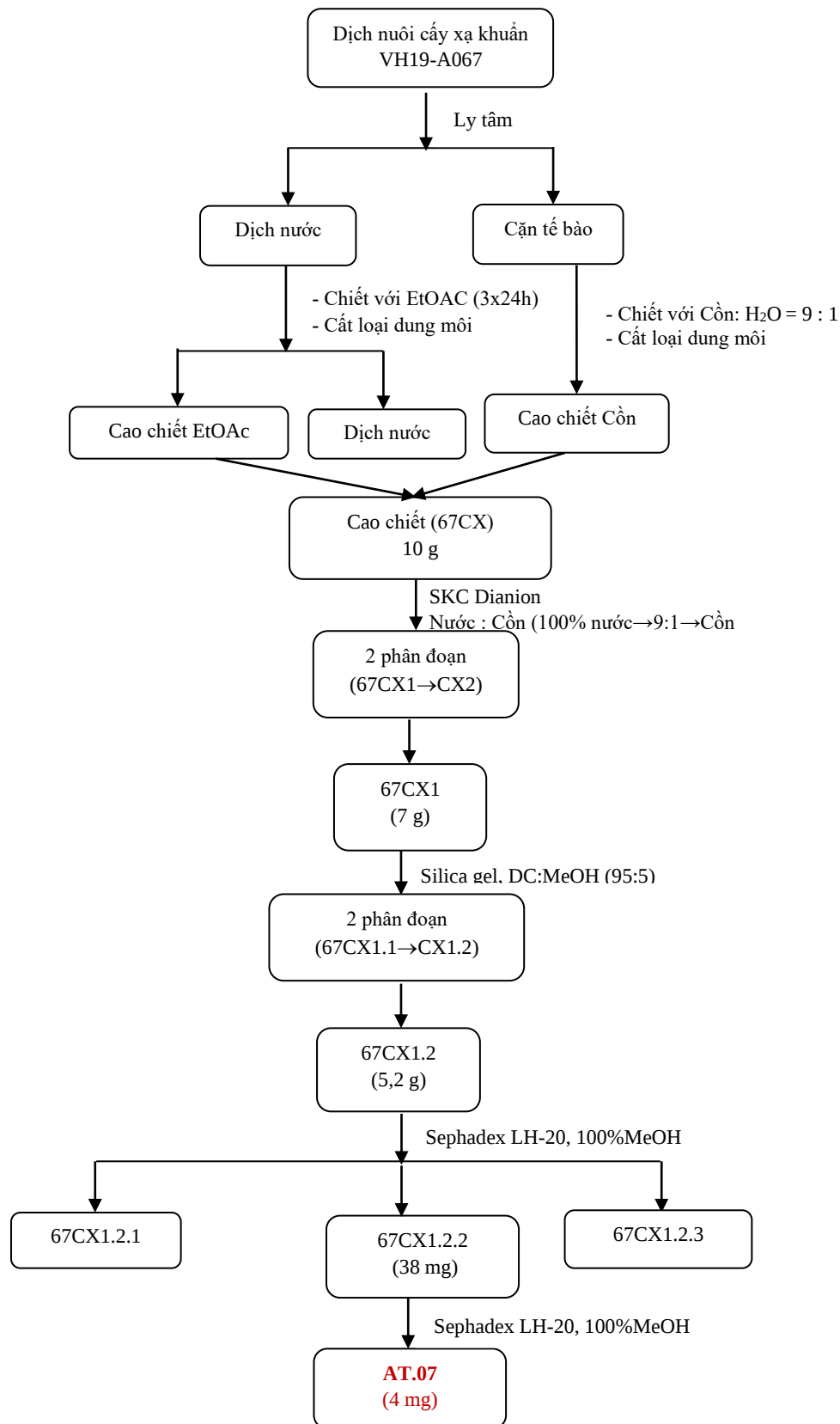
Từ 4,5 g cao chiết CN được tiến hành chạy sắc ký cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là methanol/nước (9:1) thu được 6 phân đoạn, CN1 → CN6. Phân đoạn CN1 (2,1 g) trên cột sắc ký silica gel với hệ dung môi EtOAc/MeOH (95:5 → 1:1) thu được 3 phân đoạn, CN1.1 → CN1.3. Tinh chế phân đoạn CN1.1 (54 mg) trên cột silica gel với hệ dung môi EtOAc/MeOH (95:5 → 1:1) thu được 4 phân đoạn, CN1.1.1 → CN1.1.4. Tinh chế phân đoạn CN1.1.3 (24 mg) bằng sắc ký bản mỏng điều chế thu được chất sạch **AT.04** (7 mg). Phân đoạn CN4 (1,2 g) được tinh chế trên cột silica gel với hệ dung môi EtOAc/MeOH/H₂O (9:1:0,1) thu được 10 phân đoạn, CN4.1 → CN4.10. Tinh chế phân đoạn CN4.1 (20 mg) bằng cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là methanol thu được chất sạch **AT.05** (3 mg). Tinh chế phân đoạn CN4.9 (50 mg) trên cột RP với hệ dung môi MeOH/H₂O (6:4) thu được 4 phân đoạn, CN4.9.1 → CN4.9.4. Phân đoạn CN4.9.3 (37 mg) được tinh chế bằng cột RP với hệ dung môi MeOH/H₂O (6:4) thu được chất sạch **AT.06** (12 mg).

Chất AT.04 (Nocardamin): Chất bột, không màu; C₂₇H₄₈N₆O₉; HR-ESI-MS (*m/z*): 601,3527 (tính toán lý thuyết cho C₂₇H₄₉N₆O₉ 601,3561 [M+H]⁺), 623,3353 (tính toán lý thuyết cho C₂₇H₄₈N₆O₉Na 623,3380 [M+Na]⁺). Dữ liệu phổ ¹H- và ¹³C NMR: xem bảng 3.5.

Chất AT.05 (Pleurone): Chất bột màu trắng, C₄H₂O₄; Phổ khối ESI-MS của hợp chất này cho pic ion phân tử tại *m/z* 119 [M+Na-H₂O]⁺. Dữ liệu phổ ¹H- và ¹³C NMR: xem bảng 3.6.

Chất AT.06 (Halolitoralin A): Chất rắn, màu trắng; C₂₇H₄₈N₆O₆; HR-ESI-MS (*m/z*): 553,3730 (tính toán lý thuyết cho C₂₇H₄₉N₆O₆ 553,3714 [M+H]⁺), 575,3548 (tính toán lý thuyết cho C₂₇H₄₈N₆O₆Na 575,3533 [M+Na]⁺). ¹H-NMR (δ_H, *J*, 500 MHz, CD₃OD): 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); ¹³C-NMR (δ_C, *J*, 125 MHz, CD₃OD): 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 xạ khuẩn *Streptomyces spiroverticillatus* VH19-A067



Hình 2.5. Sơ đồ phân lập các chất từ dịch nuôi cấy xạ khuẩn *Streptomyces spiroverticillatus* VH19-A067

Sau quá trình lên men, dịch nuôi cấy (50L) xạ khuẩn *Streptomyces spiroverticillatus* VH19-A067 được tiến hành ly tâm 10000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng để tách riêng dịch nước và cặn tế bào. Phần dịch nước (40 L) được chiết với EtOAc (3 x 4h x 20 L) và cất loại dung môi thu được cao chiết EtOAc.

Phần cặn tế bào được ngâm chiết trong cồn/nước theo tỉ lệ 9:1 (3 x 4h x 1 L), sau đó tiến hành ly tâm 10000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng để loại bỏ cặn. Dịch chiết thu được được tiến hành cất loại dung môi thu được cao chiết cồn.

Khảo sát cao chiết ethyl acetate và cao chiết cồn bằng sắc ký bản mỏng với nhiều hệ dung môi, so sánh thấy sự giống nhau giữa hai cao chiết nên gộp hai cao chiết lại được 10 gam cao tổng. Từ 10 gam cao chiết 67CX được tách bằng sắc ký cột với Dianion, hệ dung môi lần lượt là 100% H₂O → H₂O : cồn (9:1 → 8:2 → 5:5) → 100% cồn thu được 2 phân đoạn, 67CX1 và 67CX2. Phân đoạn 67CX1 (7 g) được tiến hành chạy sắc ký cột silica gel với hệ dung môi là CH₂Cl₂ : MeOH (95:5) thu được 2 phân đoạn, 67CX1.1 và 67CX1.2. Phân đoạn 67CX1.2 (5,2 g) được tiến hành chạy sắc ký cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là methanol thu được 3 phân đoạn, 67CX1.2.1 → 67CX1.2.3. Tinh chế phân đoạn 67CX1.2.2 (38 mg) bằng cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là methanol thu được chất sạch **AT.07** (4 mg).

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

Sau quá trình lên men, dịch nuôi cấy (50 L) xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A105B được tiến hành ly tâm 10000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng để tách riêng dịch nước và cặn tế bào. Phần dịch nước (40 L) được chiết với EtOAc (3 x 4h x 20 L) và cất loại dung môi thu được cao chiết EtOAc.

Phần cặn tế bào sau khi được ly tâm, được chiết với methanol : nước theo tỉ lệ 9:1 (3 x 4h x 1 L), sau đó tiến hành ly tâm 10000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng để loại bỏ cặn. Dịch chiết thu được được tiến hành cất loại dung môi thu được cao

chiết MeOH.

Khảo sát cao chiết ethyl acetate và methanol bằng sắc ký bản mỏng với nhiều hệ dung môi, so sánh thấy sự giống nhau giữa hai cao chiết nên gộp hai cao chiết lại được 10 gam cao tổng. Từ 10 gam cao chiết 105E được tách bằng sắc ký cột với chất hấp phụ Dianion, hệ dung môi lần lượt là 100% H₂O → MeOH : H₂O (2:8 → 3:7 → 5:5) → 100% MeOH thu được 7 phân đoạn, 105E.1 → 105E.7. Phân đoạn 105E.6 (150 mg) được tiến hành chạy sắc ký cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là methanol thu được 3 phân đoạn, 105E.6.1 → 105E.6.3. Phân đoạn 105E.6.3 (45 mg) được tinh chế trên cột silica gel với hệ dung môi là CH₂Cl₂:MeOH (100:5) thu được 3 phân đoạn, 105E.6.3.1 → 105E.6.3.3. Phân đoạn 105E.6.3.2 (18 mg) được tinh chế trên cột silica gel với hệ dung môi là CH₂Cl₂:MeOH (100:5) thu được chất sạch **AT.11** (10 mg).

Phân đoạn 105E.7 (521 mg) được tiến hành chạy sắc ký cột silica gel với hệ dung môi là CH₂Cl₂:Acetone (99:1) thu được 6 phân đoạn, 105E.7.1 → 105E.7.6. Phân đoạn 105E.7.1 (91 mg) được tinh chế trên cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là methanol thu được chất sạch **AT.08** (6 mg). Phân đoạn 105E.7.2 (33 mg) được tinh chế trên cột Sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là methanol thu được 2 phân đoạn, 105E.7.2.1 → 105E.7.2.2. Tinh chế phân đoạn 105E.7.2.2 (12 mg) bằng sắc ký bản mỏng điều chế thu được chất sạch **AT.09** (4,5 mg).

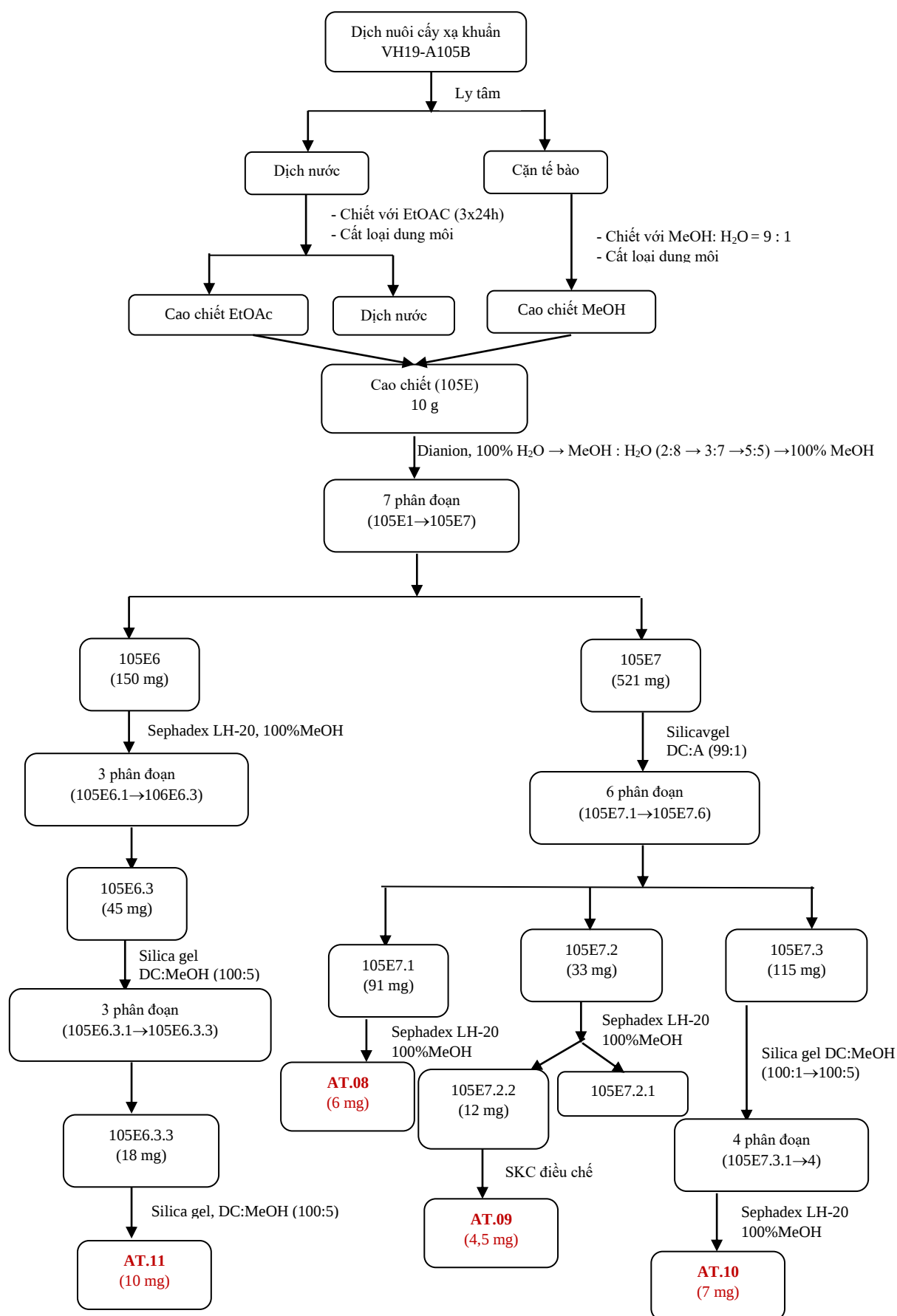
Phân đoạn 105E.7.3 (115 mg) được tinh chế bằng cột silica gel với hệ dung môi là CH₂Cl₂:MeOH (100:1 → 100:5) thu được 4 phân đoạn, 105E.7.3.1 → 105E.7.3.4. Tinh chế phân đoạn 105E.7.3.2 (45 mg) bằng cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là methanol thu được chất sạch **AT.10** (7 mg).

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.

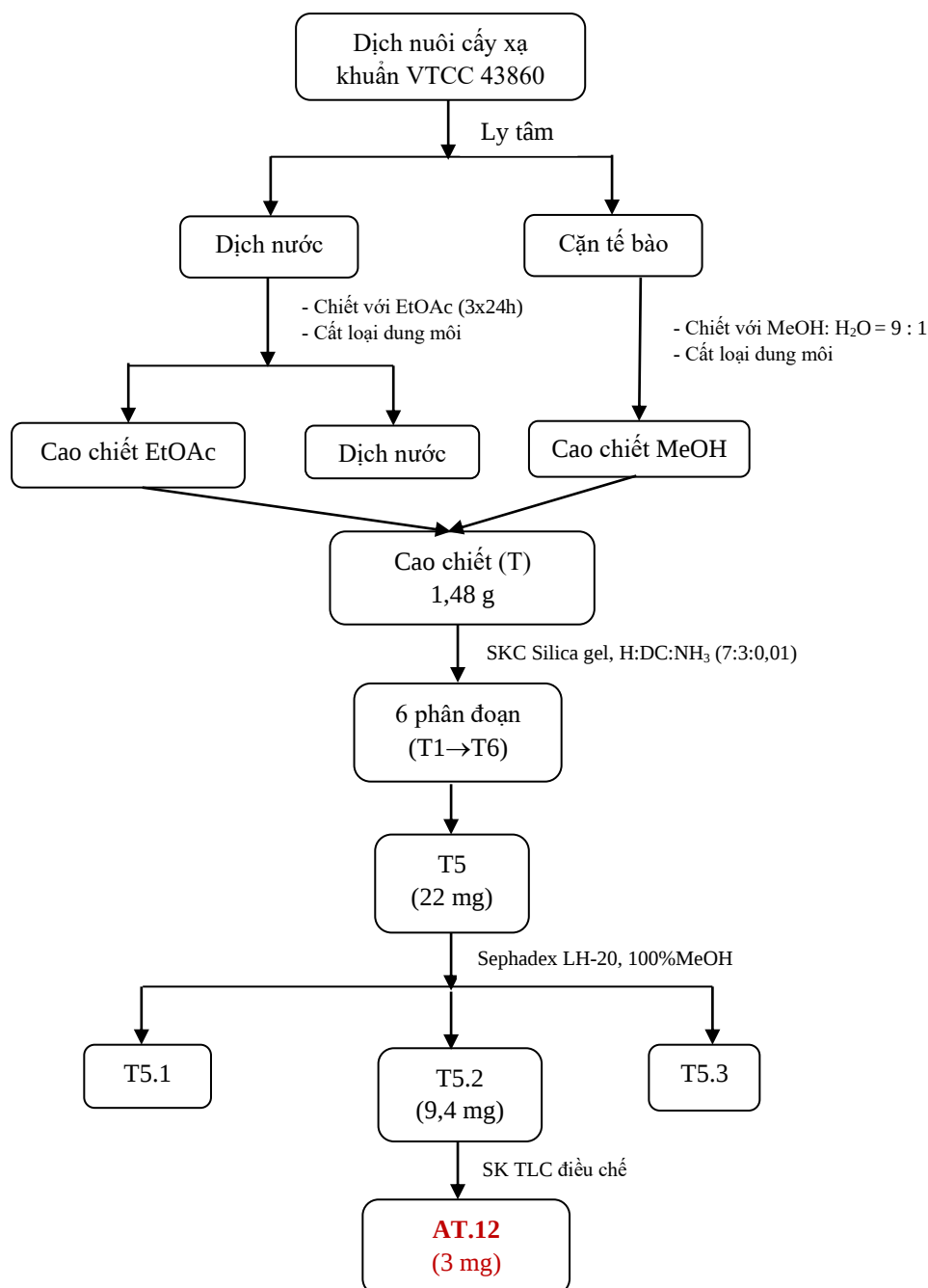
Chất AT.10 (Chartreusin): Phổ NMR của hợp chất **AT.10** trùng với hợp chất **AT.02**.

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 ¹³C NMR: xem bảng 3.8.



Hình 2.6. Sơ đồ phân lập các chất từ dịch nuôi cấy xạ khuẩn *Streptomyces alboniger* VH19-A105B

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



Hình 2.7. Sơ đồ phân lập các chất từ dịch nuôi cấy xạ khuẩn *Streptomyces cyaneus* VTCC43860

Sinh khối thu được từ xạ khuẩn *Streptomyces cyaneus* VTCC43860 được tiến hành ly tâm để tách riêng dịch nước và cặn tế bào. Phần dịch nước (40 L) được chiết với EtOAc, cất loại dung môi thu được cao chiết EtOAc. Phần cặn tế bào sau khi được ly tâm, được chiết với methanol : nước (9:1) thu được cao chiết MeOH.

Khảo sát cao chiết EtOAc và MeOH bằng sắc ký bản mỏng với nhiều hệ dung môi, so sánh thấy sự giống nhau giữa hai cao chiết nên gộp hai cao chiết lại

được 1,48 gam cao tổng. Từ 1,48 g cao chiết VTCC43860 được tiến hành chạy sắc ký cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan:CH₂Cl₂:NH₃=7:3:1% với độ phân cực tăng dần thu được 6 phân đoạn, T1 – T6. Phân tách phân đoạn T5 (22 mg) trên cột sắc ký sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là methanol thu được 3 phân đoạn, T5.1 – T5.3. Phân đoạn T5.2 (9,4 mg) được tinh chế bằng sắc ký bản mỏng điều chế thu được chất sạch **AT.12** (3 mg).

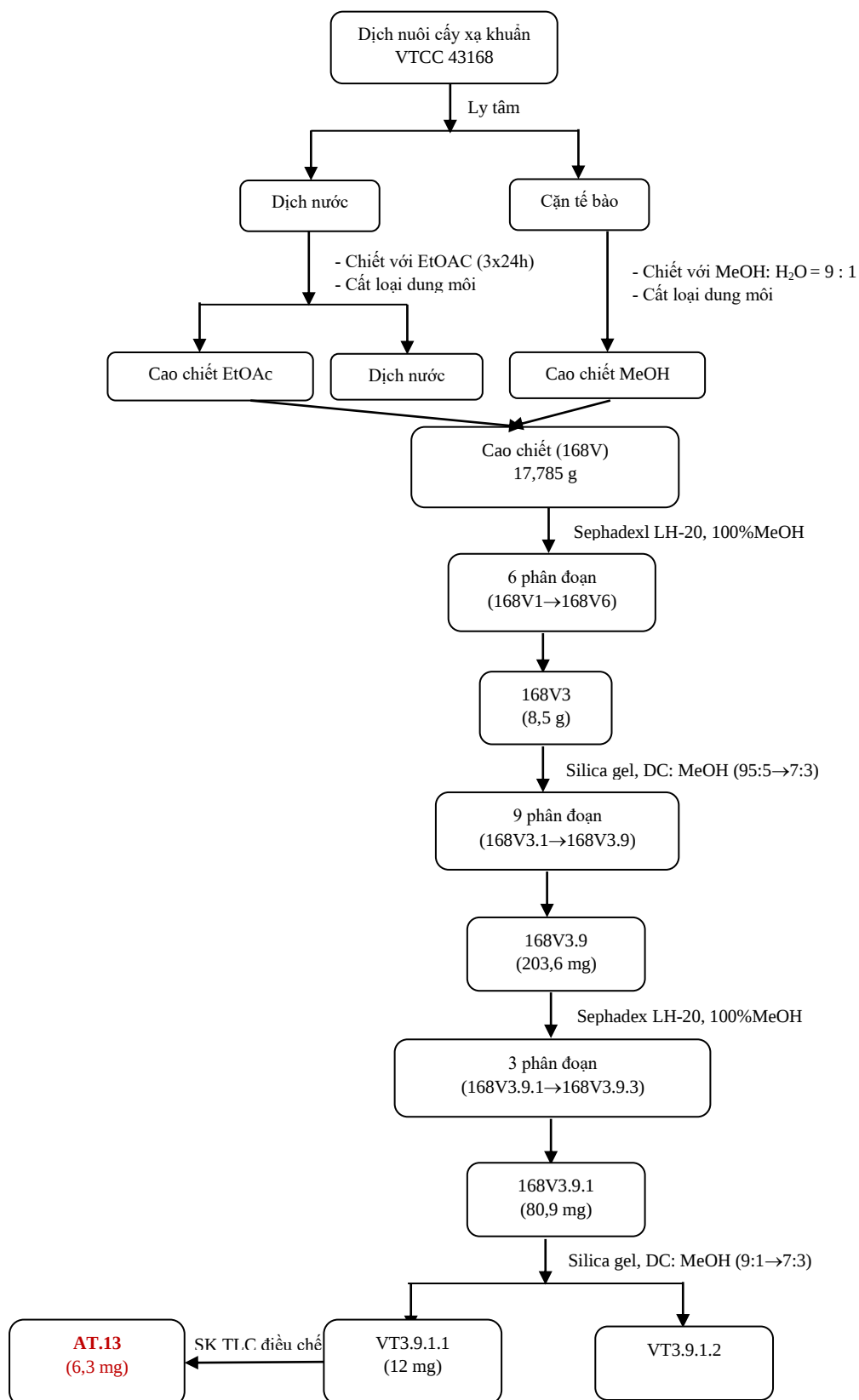
Chất AT.12 (7-acetyl-3,6-dihydroxy-8-methyl tetralone): Dạng bột, màu trắng; C₁₃H₁₅O₄; HR-ESI-MS (*m/z*): 235,0960 (tính toán lý thuyết cho C₁₃H₁₅O₄ 235,0970 [M+H]⁺), 257,0783 (tính toán lý thuyết cho C₃₆H₄₇NO₅Na 257,0790 [M+Na]⁺), 233,0827 (tính toán lý thuyết cho C₃₆H₄₆NO₅ 233,0814 [M-H]⁻). Dữ liệu phổ ¹H-NMR và ¹³C 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

Sinh khối thu được từ xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VTCC43168 được tiến hành ly tâm, tách riêng phần dịch nước ra khỏi phần cặn tế bào. Phần cặn tế bào sau khi được ly tâm, được chiết với methanol : nước (9:1). Phần dịch chiết sẽ được cất loại dung môi, thu được phần cao chiết methanol. Phần dịch nước được chiết với ethyl acetate, sau đó được cô quay để loại dung môi thu được phần cặn còn lại là cao chiết ethyl acetate.

Khảo sát cao chiết ethyl acetate và methanol bằng sắc ký bản mỏng với nhiều hệ dung môi, so sánh thấy sự giống nhau giữa hai cao chiết nên gộp hai cao chiết lại được 17,785 gam cao tổng. Từ 17,785 gam cao chiết 168V được tiến hành chạy sắc ký cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là methanol thu được 6 phân đoạn, 168V1 → 168V6. Phân tách phân đoạn 168V3 (8,5 g) trên cột sắc ký silica gel với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH (95:5 → 7:3) thu được 9 phân đoạn, 168V3.1 → 168V3.9. Tinh chế phân đoạn 168V3.9 (203,6 mg) trên sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là methanol thu được 3 phân đoạn, 168V3.9.1 → 168V3.9.3. Tinh chế phân đoạn 168V3.9.1 (80,9 mg) bằng cột sắc ký silica gel với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH (9:1 → 7:3) thu được 2 phân đoạn 168V3.9.1.1, 168V3.9.1.2. Phân đoạn 168V3.9.1.1 (12 mg) được tinh chế bằng sắc ký bản mỏng điều chế thu được chất sạch **AT.13** (6,3 mg).

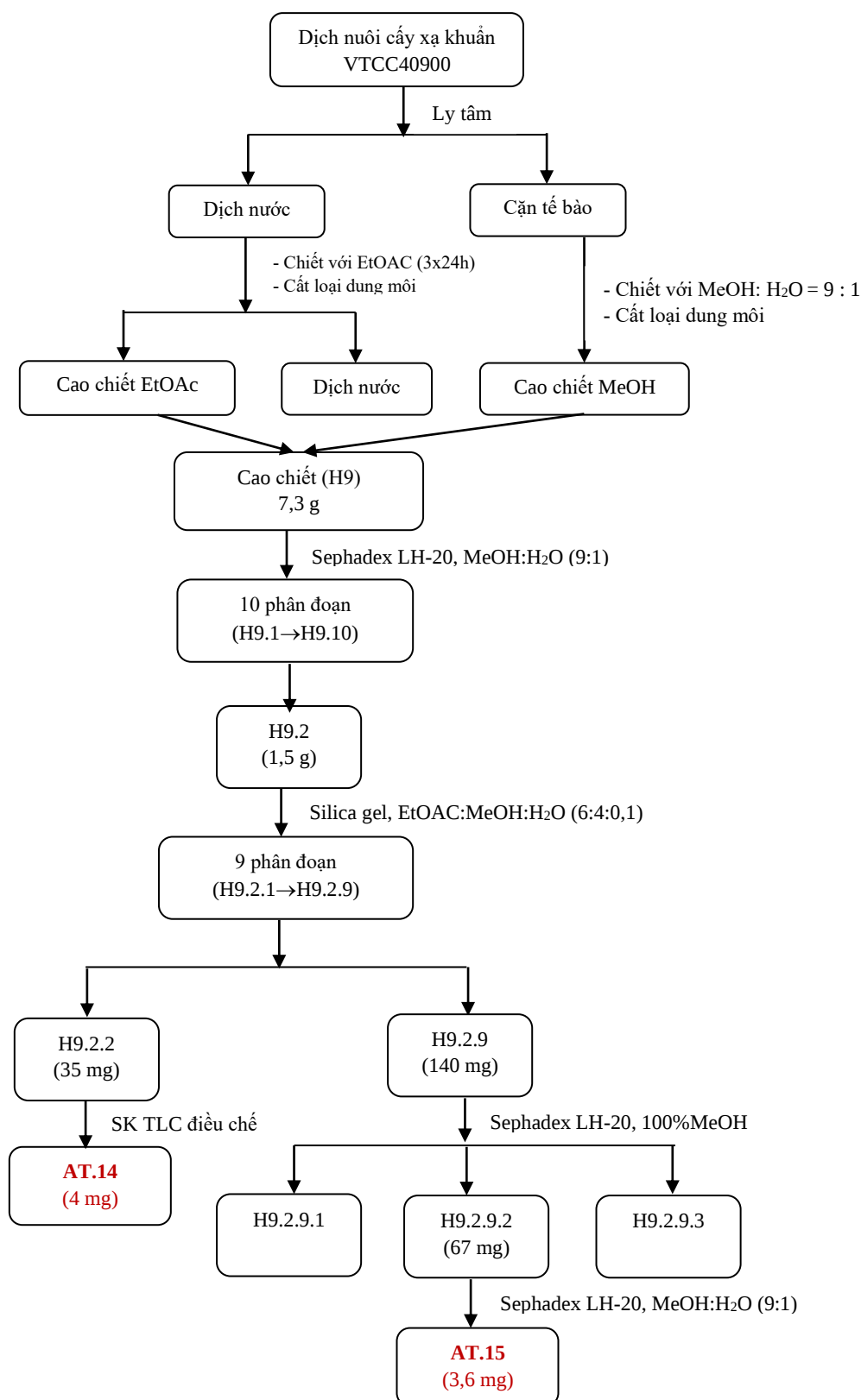
Chất AT.13 (Valin): Chất rắn, màu trắng; C₅H₁₁NO₂; ESI-MS (*m/z*): 115,8 [M-H]⁻. ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz), δ_H (ppm), *J* (Hz): 3,32-3,40 (1H, m, H-2), 2,27 (1H, m, H-3), 1,08 (3H, d, *J* = 7,0 Hz, H-4), 1,03 (3H, d, *J* = 7,0 Hz, H-5); ¹³C-NMR (δ_C, *J*, 125 MHz, CD₃OD): 180,3 (C-1), 61,8 (C-2), 31,0 (C-3), 19,3 (C-4), 17,7 (C-5).



Hình 2.8. Sơ đồ phân lập các chất từ dịch nuôi cấy xạ khuẩn *Streptomyces* sp.

VTCC43168

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



Hình 2.9. Sơ đồ phân lập các chất từ dịch nuôi cấy xạ khuẩn *Actinoplanes missouriensis* VTCC40900

Sau quá trình lên men, dịch nuôi cấy (50 L) chủng xạ khuẩn *Actinoplanes missouriensis* VTCC40900 được tiến hành ly tâm để tách riêng dịch nước và cặn tế

bào. Phần dịch nước (40 L) được chiết với ethyl acetate ($3 \times 4 \text{ h} \times 20 \text{ L}$), cất loại dung môi thu được cao chiết EtOAc. Phần cặn tế bào sau khi được ly tâm, được chiết với methanol : nước (9:1) và cất loại dung môi thu được cao chiết methanol.

Khảo sát cao chiết ethyl acetate và methanol bằng sắc ký bản mỏng với nhiều hệ dung môi, so sánh thấy sự giống nhau giữa hai cao chiết nên gộp hai cao chiết lại được 7,3 gam cao tổng ký hiệu là H9. Từ 7,3 gam cao chiết H9 được tiến hành chạy sắc ký cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là methanol/nước (9:1) thu được 10 phân đoạn, H9.1 $\rightarrow$ H9.10. Phân tách phân đoạn H9.2 (1,5 g) trên cột silica gel với dung môi là EtOAc:MeOH:H₂O (6:4:0,1) thu được 9 phân đoạn, H9.2.1 $\rightarrow$ H9.2.9. Phân đoạn H9.2.2 (35 mg) được tinh chế bằng sắc ký bản mỏng điều chế thu được chất sạch **AT.14** (4 mg). Phân đoạn H9.2.9. (140 mg) được tinh chế bằng cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là methanol thu được 3 phân đoạn, H9.2.9.1 $\rightarrow$ H9.2.9.3. Tinh chế phân đoạn H9.2.9.2 (67 mg) bằng cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là methanol/nước (9:1) thu được chất sạch **AT.15** (3,6 mg).

Chất AT.14 (Flufuran): Tinh thể hình kim; C₆H₆O₄, ESI-MS: $m/z = 140,7$ [M-H]⁻. ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ_{H} : 7,95 (1H, s, H-2), 6,51 (1H, s, H-4), 4,42 (2H, s, H-7); ¹³C-NMR (CD₃OD, 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; C₁₂H₂₂O₁₁, ESI-MS: $m/z = 364,9$ [M+Na]⁺. ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ_{H} 5,14 (2H, d, $J = 3,5 \text{ Hz}$), 3,84 (6H, m), 3,70 (2H, m), 3,49 (2H, dd, $J = 10,0, 3,5 \text{ Hz}$), 3,33 (2H, m); ¹³C-NMR (CD₃OD, 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).

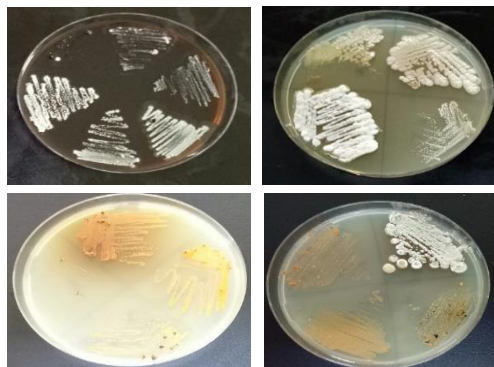
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

3.1.1. Phân lập chủng xạ khuẩn

26 mẫu đất và trầm tích được thu thập từ các vùng dọc khu vực miền Bắc tới miền Trung, Việt Nam, cụ thể:

- Rừng ngập mặn Phù Long, huyện Cát Hải, thành phố Hải Phòng thu được 3 mẫu bùn, 2 mẫu đất và 2 mẫu lá mục (tổng cộng 7 mẫu).
- Vườn quốc gia Cát Bà, huyện Cát Hải, thành phố Hải Phòng thu được 2 mẫu lá mục, 2 mẫu đất và 1 mẫu bùn (tổng cộng 5 mẫu).
- Trên đỉnh núi Mây Bạc, Vườn quốc gia Cúc Phương, huyện Nho Quan, tỉnh Ninh Bình thu được 2 mẫu đất.
- Đường lên đỉnh núi Mây Bạc, Vườn quốc gia Cúc Phương, huyện Nho Quan, tỉnh Ninh Bình thu được 3 mẫu đất.
- Ngã ba sông Đáy và sông Vạc, xã Thường Kiếm, huyện Kim Sơn, tỉnh Ninh Bình thu được 1 mẫu đất.
- Rừng ngập mặn huyện Kim Sơn, tỉnh Ninh Bình thu được 3 mẫu đất.
- Rừng ngập mặn Quỳnh Lương, xã Quỳnh Lương, huyện Quỳnh Lưu, tỉnh Nghệ An thu được 2 mẫu đất.
- Hồ Quan Sơn, huyện Mỹ Đức, Hà Nội thu được 2 mẫu đất
- Suối Yến, chùa Hương, huyện Mỹ Đức, Hà Nội thu được 1 mẫu đất.



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

Đề phân lập xạ khuẩn hiệu quả, các mẫu đất, trầm tích được phơi khô 2-3 ngày để giảm thiểu các đối tượng không mong muốn như nấm mốc, vi khuẩn. Đồng thời, kháng sinh nalidixic acid và cycloheximide cũng được bổ sung thêm để ức chế sự phát triển của vi khuẩn và nấm. Từ 26 mẫu đất, trầm tích thu được, 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... Kết quả chi tiết được thể hiện trên bảng 3.1 và hình 3.1. Các chủng sau khi làm sạch được lưu giữ

trong glycerol ở -20°C hoặc -80°C .

Bảng 3.1. Các chủng xạ khuẩn được phân lập tại các địa điểm khác nhau

Địa điểm phân lập	Kí hiệu chủng xạ khuẩn	Số lượng chủng phân lập	Nguồn gốc
Rừng ngập mặn Phù Long, huyện Cát Hải, thành phố Hải Phòng	VH19-A001, VH19-A002	2	Mẫu bùn
	VH19-A008 đến VH19-A010	3	
	VH19-A012	1	
	VH19-A073 đến VH19-A076	4	
	VH19-A110 đến VH19-A120	11	
	VH19-A129 đến VH19-A131	3	
	VH19-A159 đến VH19-A162	4	
	VH19-A003 đến VH19-A007	5	Mẫu đất
	VH19-A013 đến VH19-A018	6	
	VH19-A147 đến VH19-A151	5	
	VH19-A163 đến VH19-A166	4	
	VH19-A071, VH19-A072	2	Lá mục
Vườn quốc gia Cát Bà, huyện Cát Hải, thành phố Hải Phòng	VH19-A029 đến VH19-A035	7	Mẫu bùn
	VH19-A019, VH19-A020	2	
	VH19-A042 đến VH19-A055	14	Mẫu đất
	VH19-A167, VH19-A168	2	
	VH19-A011	1	Lá mục
	A021 - A028	8	
	VH19-A036	1	
	VH19-A038 đến VH19-A041	4	
Trên đỉnh núi Mây Bạc, vườn quốc gia Cúc	VH19-A101 đến	9	Mẫu đất

Phương, huyện Nho Quan, tỉnh Ninh Bình (648 m cách mực nước biển)	VH19-A109		
	VH19-A121 đến VH19-A128	8	
	VH19-A132 đến VH19-A135	4	
Đường lên đỉnh núi Mây Bạc, vườn quốc gia Cúc Phương, huyện Nho Quan, tỉnh Ninh Bình	VH19-A037	1	Mẫu đất
	VH19-A056 đến VH19-A059	4	
	VH19-A083 đến VH19-A100	18	
Ngã ba sông Đáy và sông Vạc, xã Thường Kiềm, huyện Kim Sơn, tỉnh Ninh Bình	VH19-A064 đến VH19-A067	4	Mẫu đất
	VH19-A152 đến VH19-A154	3	
Rừng ngập mặn huyện Kim Sơn, tỉnh Ninh Bình	VH19-A060 đến VH19-A063	4	Mẫu đất
	VH19-A068 đến VH19-A070	3	
	VH19-A136 đến VH19-A146	11	
	VH19-A155 đến VH19-A158	4	
	VH19-A177 đến VH19-A179	3	
Rừng ngập mặn Quỳnh Lương, xã Quỳnh Lương, huyện Quỳnh Lưu, tỉnh Nghệ An	VH19-A077 đến VH19-A082	6	Mẫu đất
	VH19-VH19 đến VH19-A180	1	
Hồ Quan Sơn, huyện Mỹ Đức, Hà Nội	VH19-A169 đến VH19-A176	8	Mẫu đất
Suối Yến, chùa Hương, huyện Mỹ Đức, Hà Nội	VH19-A181	1	Mẫu đất

Đánh giá sơ bộ về hình thái xạ khuẩn cho thấy 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%. Nghiên cứu cho thấy rằng các chủng xạ khuẩn hiếm hầu hết được tìm thấy ở khu vực rừng ngập mặn Phù Long và vườn quốc gia Cát Bà, nơi các mẫu bùn và lá mục cho số lượng xạ khuẩn đáng kể hơn so với trong đất.

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

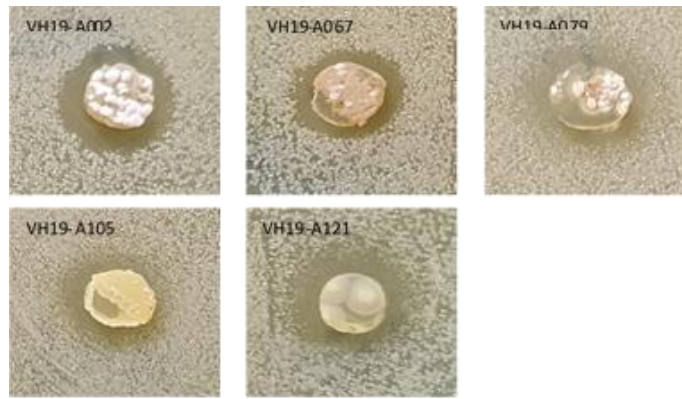
Các chủng xạ khuẩn được sàng lọc hoạt tính kháng *Mycobacteria smegmatis*

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). Trong đó, các chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng *M. smegmatis* mạnh nhất là VH19-A002 (từ rừng ngập mặn Phù Long), VH19-A067 (từ ngã ba sông Đáy và sông Vạc), VH19-A079 (từ rừng ngập mặn Quỳnh Lương), VH19-A105B (từ đường lên đỉnh núi Mây Bạc) và VH19-A121 (từ đỉnh núi Mây Bạc). Vị trí lấy mẫu (vĩ độ và kinh độ), màu sắc khuẩn lạc, hình dạng bào tử và đường kính vòng kháng khuẩn (mm) của các chủng VH19-A002, VH19-A067, VH19-A079, VH19-A105B và VH19-A121 được trình bày trong Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Đặc điểm khuẩn lạc và kết quả hoạt tính kháng M. smegmatis của các chủng xạ khuẩn

Kí hiệu mẫu	Tên chủng	Địa điểm phân lập	Vĩ độ	Kinh độ	Màu sắc khuẩn lạc	Hình dạng bào tử	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
VH19-A002	<i>Streptomyces avidinii</i>	Rừng ngập mặn Phù Long, huyện Cát Hải, thành phố Hải Phòng	N20°48'35''	E106°55'47,2''	Màu trắng, dạng bột,	Thẳng, linh động	9
VH19-A067	<i>Streptomyces spiroverticillatus</i>	Ngã ba sông Đáy và sông Vạc, xã Thường Kiêm, huyện Kim Sơn, tỉnh Ninh Bình	N20°3'0,8''	E106°6'52,8''	Màu nâu nhạt, dạng bột	Xoắn ốc	9
VH19-A079	<i>Streptomyces wuyuanensis</i>	Rừng ngập mặn Quỳnh Lương, xã Quỳnh Lương, huyện Quỳnh Lưu, tỉnh Nghệ An	N19°8'42,1''	E105°41'43,1''	Màu nâu nhạt, dạng bột	Xoắn ốc	9
VH19-A105B	<i>Streptomyces alboniger</i>	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''	Màu nâu, dạng bột	Thẳng, linh động	8
VH19-A121	<i>Streptomyces alboniger</i>	Trên đỉnh núi Mây Bạc, vườn quốc gia Cúc Phương, huyện Nho Quan, tỉnh Ninh Bình (648 m cách mực nước biển)	N21°21'21,9''	E105°36'36,2''	Màu nâu nhạt, dạng bột	Thẳng, linh động	11

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 (Hình 3.2).



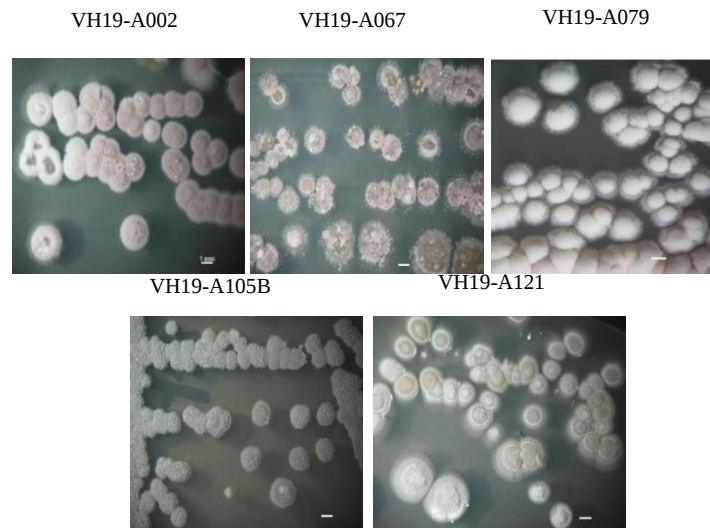
Hình 3.2. Ảnh minh họa khả năng kháng *M. smegmatis* của các chủng xạ khuẩn

Chủng VH19-A105B và VH19-A121 đều có địa điểm lấy mẫu là Vườn Quốc gia Cúc Phương nhưng địa điểm thu mẫu ở vị trí thấp hơn (trên đường lên đỉnh Mây Bạc) do đó hoạt tính kháng khuẩn của chủng VH19-A121 cao hơn rất nhiều. Điều này có thể được giải thích là do chủng VH19-A121 được phân lập ở vùng ít được khám phá (trên đỉnh núi cao), nơi môi trường sinh thái chưa bị ảnh hưởng nhiều bởi hoạt động của con người. Các tài liệu trước đây đã báo cáo rằng nhiều xạ khuẩn được phát hiện từ môi trường sống ít được khám phá hoặc môi trường bất thường là nguồn sản xuất các chất chuyển hóa có hoạt tính tiềm năng [97]. Xạ khuẩn sống ở những vùng như vậy có thể tạo ra bộ gen lớn với nhiều yếu tố phiên mã có khả năng đáp ứng với các môi trường cụ thể [98, 99]. Do đó, các chất chuyển hóa thứ cấp do các sinh vật này tạo ra cũng như hoạt tính sinh học đó có thể tăng lên [100].

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 (Hình 3.3, Bảng 3.2). Tất cả các chủng đều thuộc chi *Streptomyces*, được biết đến như là nguồn hứa hẹn để khám phá các loại thuốc chống lao. Trong số 5 chủng trên, *Streptomyces wuyanensis* VH19-A079 được phát hiện lần đầu tiên ở tỉnh Wuyan, Trung Quốc vào năm 2013 và cho đến nay vẫn chưa được nghiên cứu về hoạt tính sinh học và các hợp chất thứ cấp [45]. Đây là lần đầu tiên *Streptomyces wuyanensis* được nghiên cứu về hoạt tính

kháng khuẩn đối với *M. smegmatis*. *Streptomyces avidinii* VH19-A002, *Streptomyces spiroverticillatus* VH19-A067, *Streptomyces alboniger* VH19-A105B được phát hiện có chứa các hợp chất kháng khuẩn, kháng sinh và chống ung thư [61, 101-103].



Hình 3.3. Hình ảnh khuẩn lạc của 5 chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng *M. smegmatis* cao nhất

Nghiên cứu của chúng tôi đã lần đầu tiên báo cáo về hoạt tính kháng *M. smegmatis* của *Streptomyces avidinii* và *Streptomyces spiroverticillatus*. *Streptomyces alboniger* được chú ý nhờ khả năng phân lập được hợp chất acyldepsipeptide (ADEP), một chất kháng lao tiềm năng [104]. *Streptomyces alboniger* VH19-A121 lần đầu tiên được phân lập vào năm 1954 từ các mẫu đất ở Illinois, Mỹ [39] và có hoạt tính gây độc tế bào trên nhiều dòng tế bào ung thư [105]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, *Streptomyces alboniger* VH19-A121 là chủng có hoạt tính kháng *Mycobacteria smegmatis* mạnh nhất. Từ các chủng này đã phân lập được các hợp chất pamamycin, một loại kháng sinh kháng nhiều loại vi khuẩn gây bệnh, bao gồm *Mycobacteria smegmatis* và *Mycobacteria phlei* [106].

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

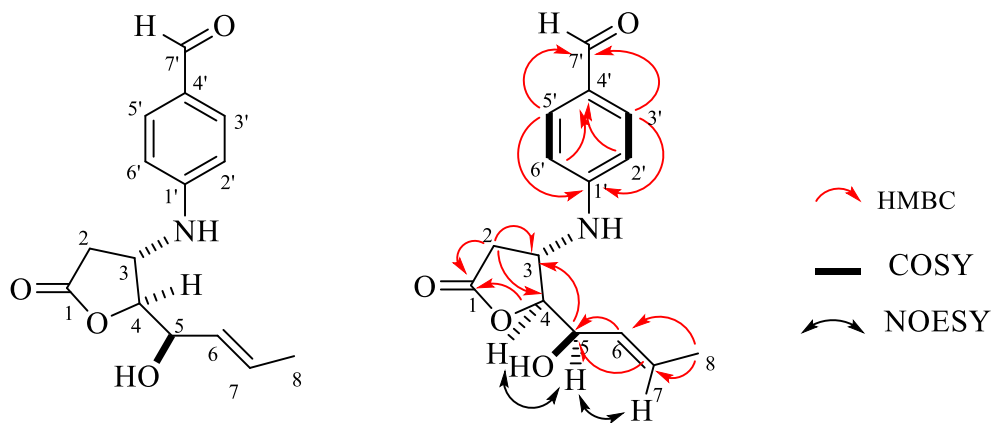
Từ kết quả đánh giá hoạt tính kháng chủng *M. smegmatis* trên, chúng tôi lựa chọn các chủng có hoạt tính mạnh nhất *Streptomyces spiroverticillatus* VH19-A067, *Streptomyces wuyanensis* VH19-A079, *Streptomyces alboniger* VH19-A105B, *Streptomyces alboniger* VH19-A121 để phân lập các hợp chất. Chủng xạ khuẩn VH19-A002 *Streptomyces avidinii* sau khi được nhân giống và lên men chứa nhiều

tạp chất và không chứa các chất tiềm năng có thể tách chiết và phân lập. Vì vậy chúng tôi không tiến hành chiết tách các hợp chất thứ cấp từ chủng này.

Ngoài ra ba chủng *Streptomyces aureus* VTCC43181, *Streptomyces cyaneus* VTCC43860, *Streptomyces* sp. VTCC43168 và *Actinoplanes missouriensis* VTCC40900 được chúng tôi lựa chọn từ ngân hàng chủng giống của Viện vi sinh vật và Công nghệ sinh học-Đại học Quốc gia Hà Nội để lên men và chiết tách các hợp chất thứ cấp. Các chủng này được lựa chọn trên cơ sở tham khảo tài liệu cho thấy có hoạt tính kháng khuẩn tiềm năng. Bản mỏng TLC của các chủng này cũng cho thấy có chứa nhiều hợp chất thứ cấp có khả năng phân lập và chiết tách.

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

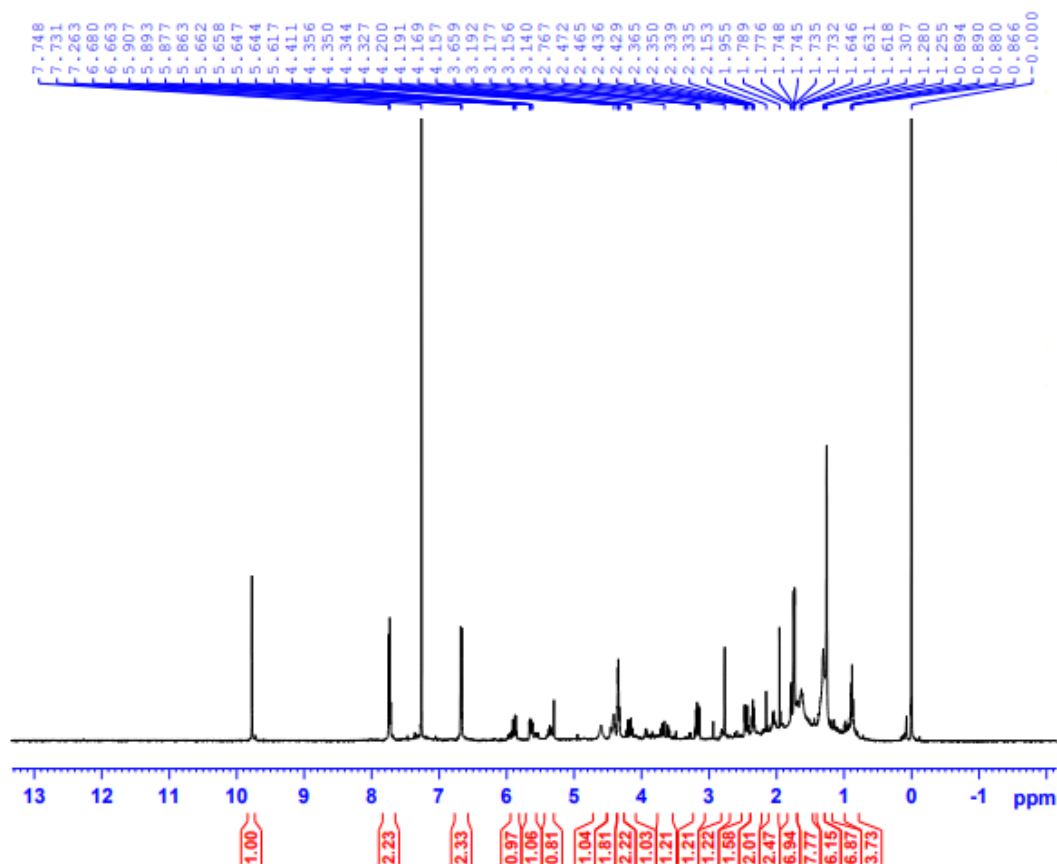


Hình 3.4. Cấu trúc và tương tác HMBC, COSY, NOESY của hợp chất AT.01

Hợp chất AT.01 được phân lập dưới dạng chất rắn, màu vàng. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS của hợp chất này cho pic ion giả phân tử tại m/z 276,1221 (tính toán lý thuyết cho $C_{15}H_{18}NO_4$ 276,1236 $[M+H]^+$) và 298,1045 (tính toán lý thuyết cho $C_{15}H_{17}NO_4Na$ 298,1055 $[M+Na]^+$), tương ứng với công thức phân tử là $C_{15}H_{17}NO_4$.

Dữ liệu phổ NMR của chất AT.01 cho thấy tín hiệu đặc trưng của obscurolide chứa khung butyrolactone. Phổ 1H -NMR xuất hiện bốn tín hiệu của proton vòng butyrolactone tại δ_H 2,44 (1H, dd, $J = 18,0, 3,5$ Hz, H-2b), 3,18 (1H, dd, $J = 18,0, 7,5$ Hz, H-2a), 4,35 (1H, m, H-4) and 4,41 (1H, m, H-3). Sự hiện diện của vòng thơm thế ở vị trí para được xác định bởi tín hiệu tại δ_H 6,67 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2', H-6'), 7,73 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3', H-5'). Ngoài ra, hai tín hiệu proton olefin có cấu hình *E* (trans) tại δ_H 5,88 (1H, dd, $J = 15,0, 7,0$ Hz, H-6) và 5,64 (1H, m, H-7). Tín hiệu của proton methyl tại δ_H 1,74 (3H, d, $J = 6,5, 1,5$ Hz, H-8), một tín hiệu proton tại δ_H 4,60 (1H, brs, C5-OH) và một tín hiệu của nhóm aldehyde tại

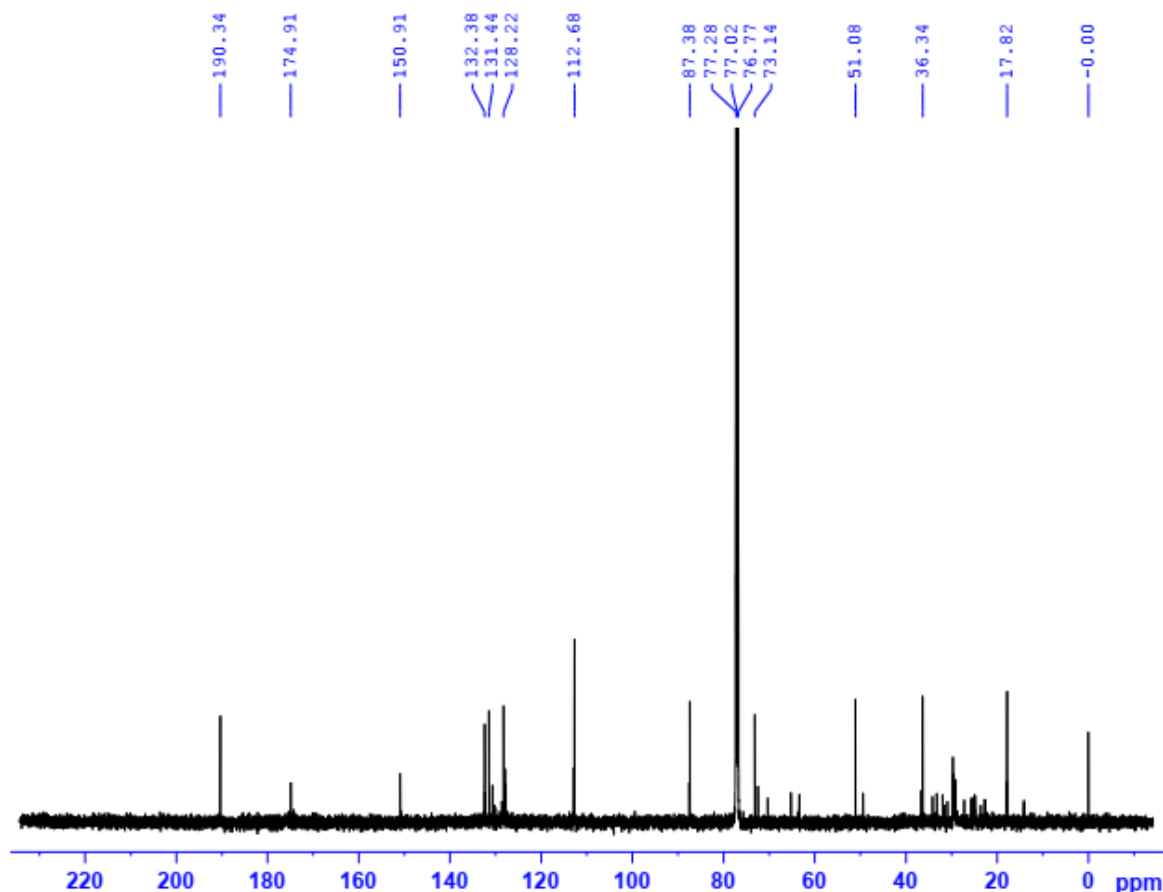
δ_H 9,77 (1H, s, CHO) cũng được quan sát thấy.



Hình 3.5. Phổ ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) của chất **AT.01**

Phổ ^{13}C -NMR xuất hiện một tín hiệu của nhóm aldehyde carbonyl liên hợp tại δ_C 190,3 (C-7'), một nhóm lactone carbonyl tại δ_C 174,9 (C-1), một oximethine carbon (δ_C 73,1, C-5), một nhóm oximethine tại δ_C 87,3 (C-4), một nhóm methylene tại δ_C 36,3 (C-2) và một methyl carbon tại δ_C 17,8 (C-8), cùng với hai olefin carbon tại δ_C 131,4 (C-6), 128,2 (C-7) và carbon vòng thơm trong khoảng từ δ_C 112,6-150,9 ppm. Cấu trúc cuối cùng của **AT.01** được khẳng định bằng phổ hai chiều (COSY, HSQC, HMBC và NOESY). Nhóm aldehyde liên kết với vòng thơm tại C-4' được chứng minh bằng tương tác trong HMBC giữa H-3', H-5' (δ_H 7,73) đến C-7' (δ_C 190,3) và C-1' (δ_C 150,9). Việc gán các nguyên tử carbon và proton trong vòng butyrolactone được xác nhận bởi các tương tác trong phổ COSY giữa H-2a (δ_H 3,18) và H-2b (δ_H 2,44)/H-3 (δ_H 4,41) và H-4 (δ_H 4,35), cũng như tương tác trong phổ HMBC giữa H-2a (δ_H 3,18) và H-2b (δ_H 2,44) với C-1 (δ_C 174,9), C-3 (δ_C 51,1) và C-4 (δ_C 87,4). Tương tác COSY giữa H-4 (δ_H 4,35)/H-5 (δ_H 4,32); H-5 (δ_H 4,32)/H-6 (δ_H 5,88); H-6 (δ_H 5,88)/H-7 (δ_H 5,64); H-7 (δ_H 5,64)/H-8 (δ_H 1,74), và tương tác HMBC giữa H-6 (δ_H 5,88) và H-7 (δ_H 5,64)/C-5 (δ_C 73,1); H-8 (δ_H 1,74)/C-6 (δ_C 131,4) và C-7 (δ_C 128,2); H-5 (δ_H 4,32)/C-3 (δ_C 51,1) cho phép xác định cấu trúc của obscurolide.

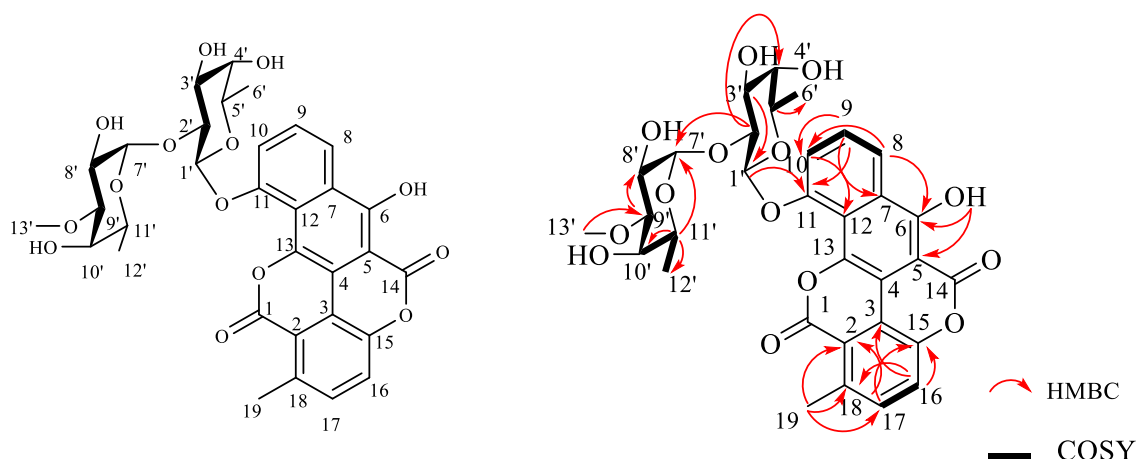
Cấu hình *trans* tại vị trí C-6 and C-7 được xác định dựa trên hằng số tương tác lớn ($J = 15.0$ MHz) giữa H-6 and H-7. Tương tác NOESY giữa H-5 (δ_H 4.32)/H-7 (δ_H 5.64) cho phép xác định proton H-5 ở vị trí α . Do đó, nhóm hydroxyl tại C-5 được định hướng ở vị trí β . Cấu hình tương đối của H-3 and H-4 được xác định là *trans* dựa vào tương tác NOESY giữa H-4 (δ_H 4.35)/H-5 (δ_H 4.32). Dữ liệu phổ của **AT.01** phù hợp với dữ liệu phổ của obscurolide B_{2 β} [44]. Do đó, hợp chất **AT.01** được xác định là obscurolide B_{2 β} . Các hợp chất obscurolide thuộc một trong những lớp chất ức chế phosphodiesterases và được phân lập từ nhiều loài thuộc chi *Streptomyces*. Obscurolide B_{2 β} lần đầu tiên được phân lập từ *Streptomyces vitidocbtomogenes* năm 1993 [107]. Đây là lần đầu tiên hợp chất này phân lập từ *Streptomyces alboniger*.



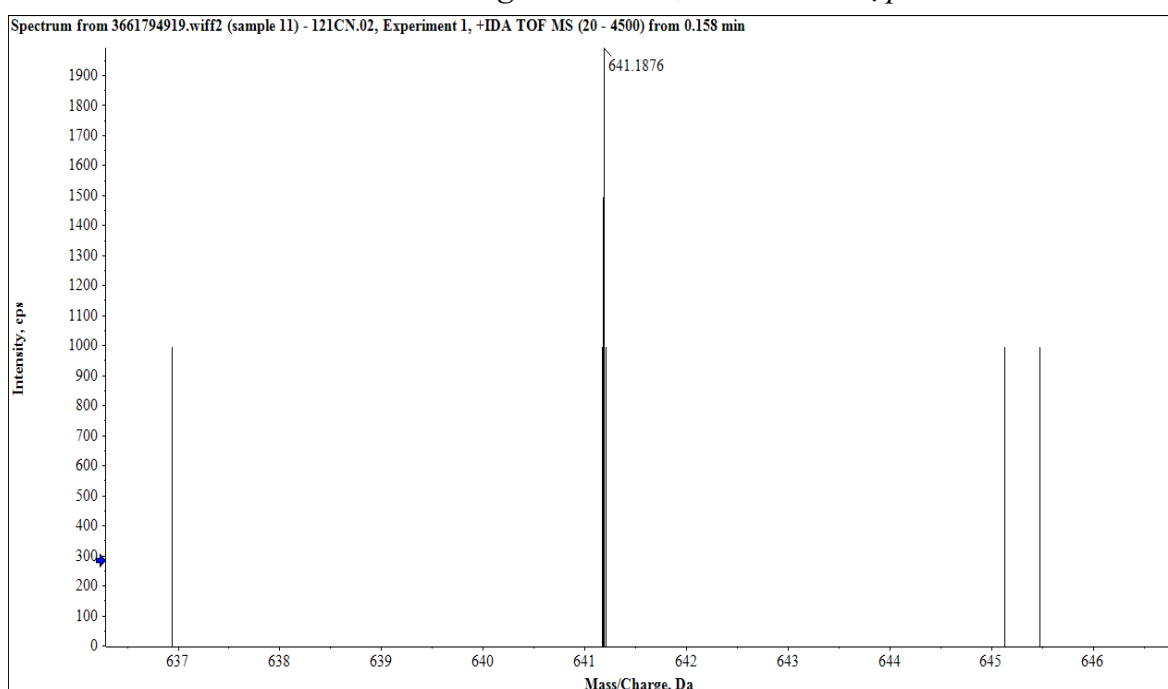
Hình 3.6. Phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) của chất **AT.01**

3.2.1.2. Chất **AT.02**

Hợp chất **AT.02** được phân lập dưới dạng bột, màu vàng lục. Công thức phân tử của hợp chất **AT.02** được xác định là $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$ qua pic ion giả phân tử trong phổ khối thường (ESI-MS) và phổ khối phân giải cao (HR-ESI-MS) tại m/z 639,1 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 641,1876 (tính toán lý thuyết cho $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{O}_{14}$ 641,1870 $[\text{M}+\text{H}]^+$).



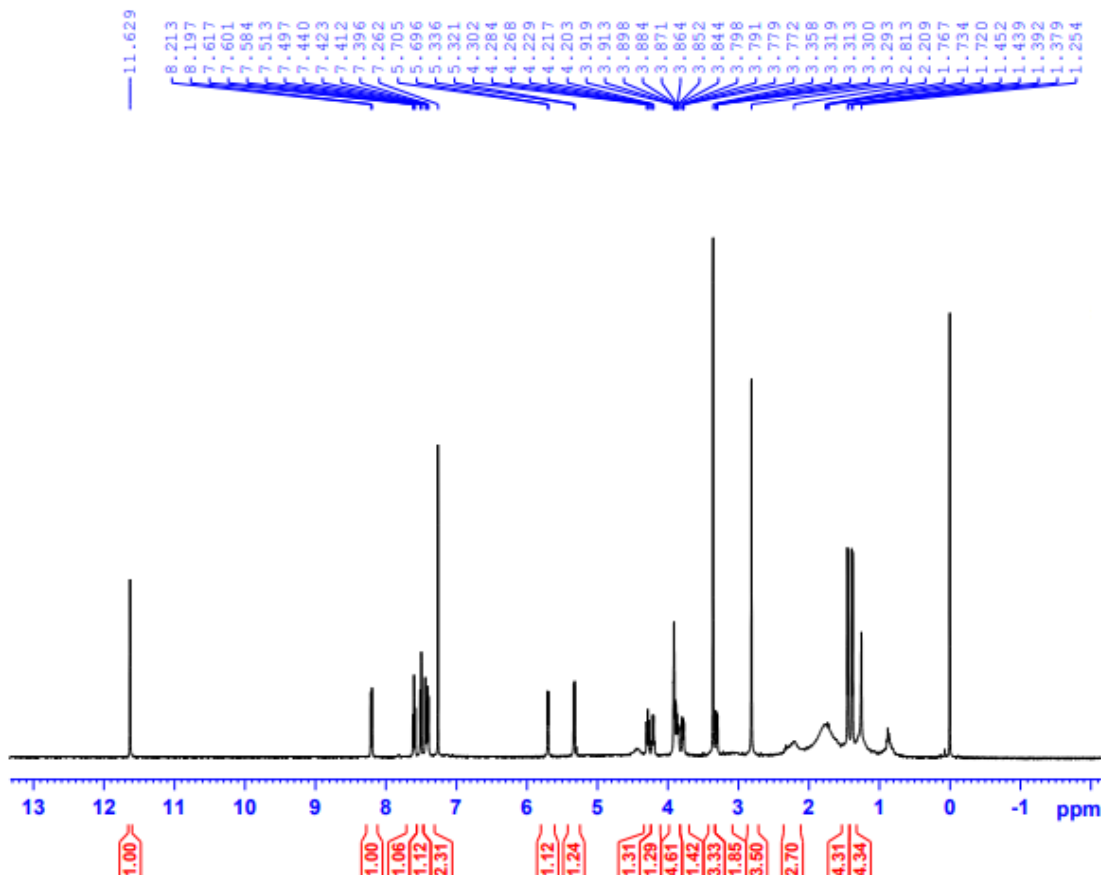
Hình 3.7. Cấu trúc và tương tác HMBC, COSY của hợp chất **AT.02**



Hình 3.8. Phổ HR-ESI-MS của chất **AT.02**

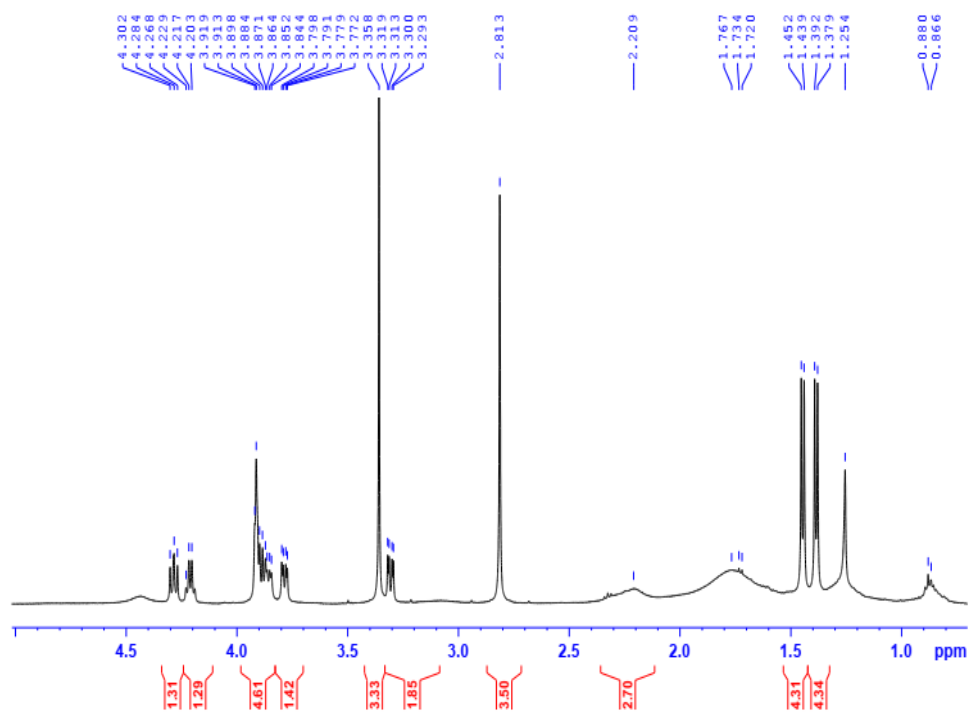
Phân tích phổ NMR cho phép xác định cấu trúc của hợp chất **AT.02** gồm một hệ vòng thơm trong đó có hai đơn vị cấu trúc δ -lactone và một mạch đường disaccharide. Phổ ^1H -NMR của **AT.02** cho thấy có năm tín hiệu proton vòng thơm tại δ_{H} 7,41 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-10), 7,44 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-17), 7,51 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-16), 8,19 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-8) và 7,61 (1H, t, $J = 8,0$ Hz, H-9). Ngoài ra, xuất hiện tín hiệu của nhóm methyl gắn vào vòng thơm tại δ_{H} 2,81 (3H, s, H-19) và một tín hiệu singlet của nhóm hydroxyl tại δ_{H} 11,63 (C₆-OH). Trong vùng đường, xuất hiện tín hiệu của hai đơn vị monosaccharide bao gồm 10 tín hiệu của proton oxymethine tại δ_{H} 3,30 (1H, dd, $J = 10,0, 3,0$ Hz, H-9'), 3,78 (1H, m, H-4'), 3,84 (1H, m, H-8'), 3,87 (1H, m, H-10'), 3,88 (1H, m, H-3'), 4,27 (1H, m, H-2'), 5,70 (1H, d, $J = 4,5$ Hz, H-7'), 5,33 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1'), 4,22 (1H, m, H-11'), 3,92 (1H, m, H-5'), cùng với hai tín hiệu của methyl proton tại δ_{H} 1,44 (3H, d, $J =$

6,5 Hz, H-6'), 1,38 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-12'), và một methoxy proton tại δ_H 3,36 (3H, s, H-13').

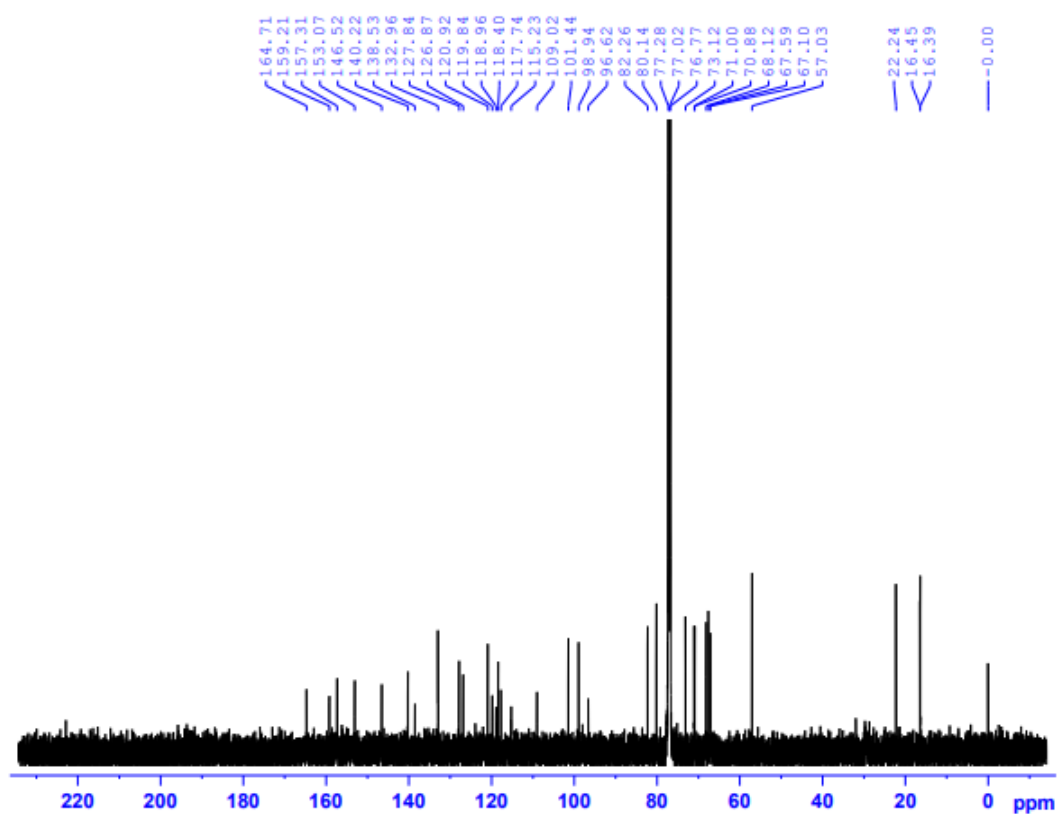


Hình 3.9. Phổ 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) của hợp chất **AT.02**

Phổ ^{13}C -NMR của chất **AT.02** cho thấy 32 tín hiệu carbon bao gồm một aglycone thơm và một disaccharide. Mười một tín hiệu của carbon thơm bậc 3 tại δ_C 96,6 (C-5), 109,0 (C-4), 117,7 (C-2), 119,0 (C-12), 119,8 (C-3), 126,9 (C-7), 138,5 (C-13), 140,2 (C-18), 146,5 (C-15), 153,1 (C-11), 157,3 (C-6), năm methine carbon trong vòng thơm tại δ_C 115,2 (C-10), 118,4 (C-8), 120,9 (C-16), 127,8 (C-9), 133,0 (C-17), cùng với hai lactone carbonyl liên hợp tại δ_C 159,2 (C-1), 164,7 (C-14) và một methyl carbon tại δ_C 22,2 (C-19) được xác định thuộc phần aglycone. Ngoài ra, 10 tín hiệu của methine carbon gắn với oxy tại δ_C 67,1 (C-11'), 67,6 (C-8'), 68,1 (C-10'), 70,9 (C-5'), 71,0 (C-3'), 73,1 (C-4'), 80,1 (C-9'), 82,3 (C-2'), 98,9 (C-1', C-anomer), 101,4 (C-7', C-anomer), hai methyl carbon tại δ_C 16,5 (C-12'), 16,4 (C-6') và một nhóm methoxy tại δ_C 57,0 (C-13') được gán cho đơn vị đường. So sánh phổ 1H và phổ ^{13}C -NMR của đơn vị đường với tài liệu được báo cáo cho thấy cấu trúc của chất **AT.02** bao gồm hai monosaccharide là D-fucose and D-digitalose.



Hình 3.10. Phổ ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) của hợp chất **AT.02** (giãn rộng)

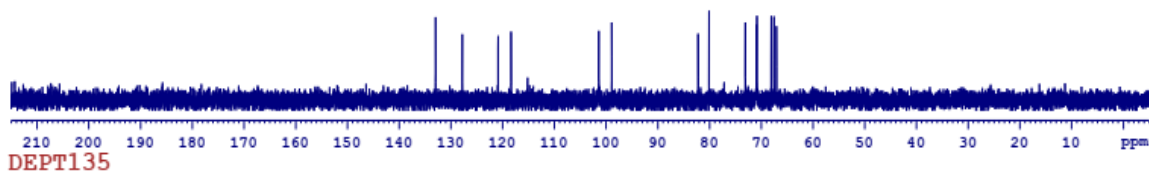


Hình 3.11. Phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) của hợp chất **AT.02**

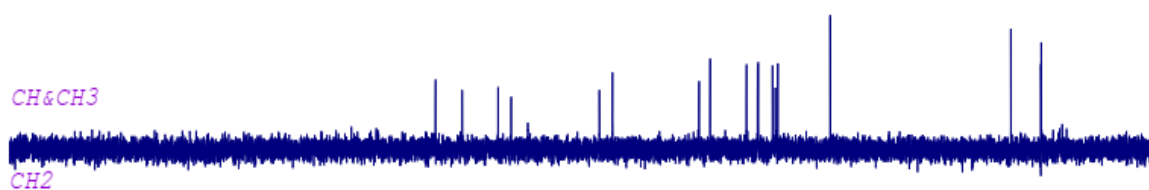
Việc gán các nguyên tử carbon và proton trong chất **AT.02** cũng được xác nhận bằng phổ 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC và NOESY). Tương tác COSY giữa H-8 (δ_{H} 8,19)/H-9 (δ_{H} 7,61); H-9 (δ_{H} 7,61)/H-10 (δ_{H} 7,41); H-16 (δ_{H} 7,51)/H-17

(δ_H 7,44), cũng như tương tác HMBC giữa H-8 (δ_H 8,19) với C-6 (δ_C 157,3) và C-10 (δ_C 115,2); H-9 (δ_H 7,61) với C-7 (δ_C 126,9), C-10 (δ_C 115,2) và C-11 (δ_C 153,1); H-10 (δ_H 7,41) với C-12 (δ_C 119,0) và C-8 (δ_C 118,4); H-16 (δ_H 7,51) với C-3 (δ_C 119,8), C-15 (δ_C 119,8) và C-18 (δ_C 140,2); H-17 (δ_H 7,44) với C-2 (δ_C 117,7) và C-15 (δ_C 146,5) cho phép xác định vị trí của các proton trong hệ vòng thơm với hai đơn vị δ -lactone liên hợp. Ngoài ra, tương tác HMBC giữa H-19 (δ_H 2,81)/C-2 (δ_C 117,7), C-18 (δ_C 140,2) và C-17 (δ_C 133,0), cùng với tương tác của proton trong nhóm hydroxyl C₆-OH (δ_H 11,63)/C-6 (δ_C 96,6) và C-5 (δ_C 109,0) cho phép xác định vị trí của nhóm methyl và hydroxyl trong đơn vị aglycone như trong hình 3.14.

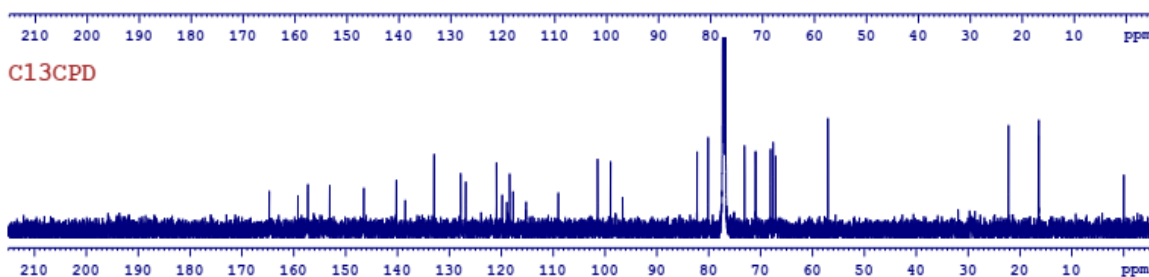
DEPT90



DEPT135



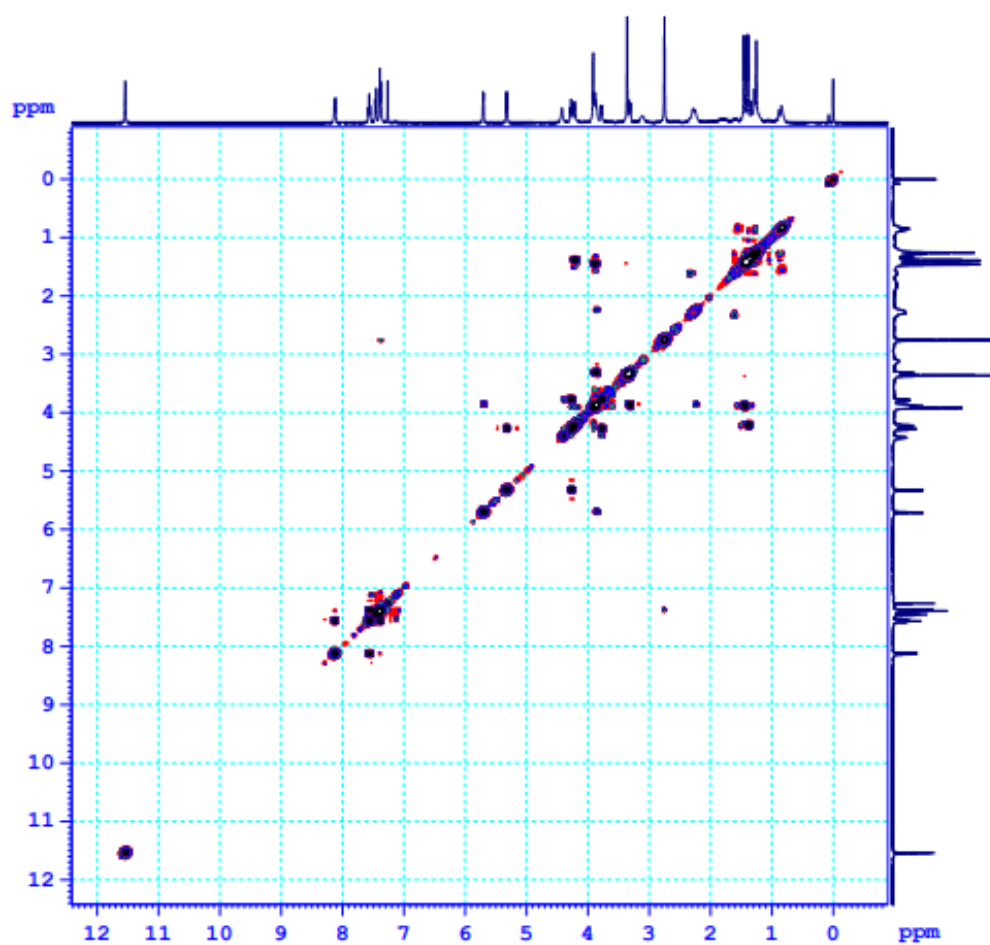
CH2



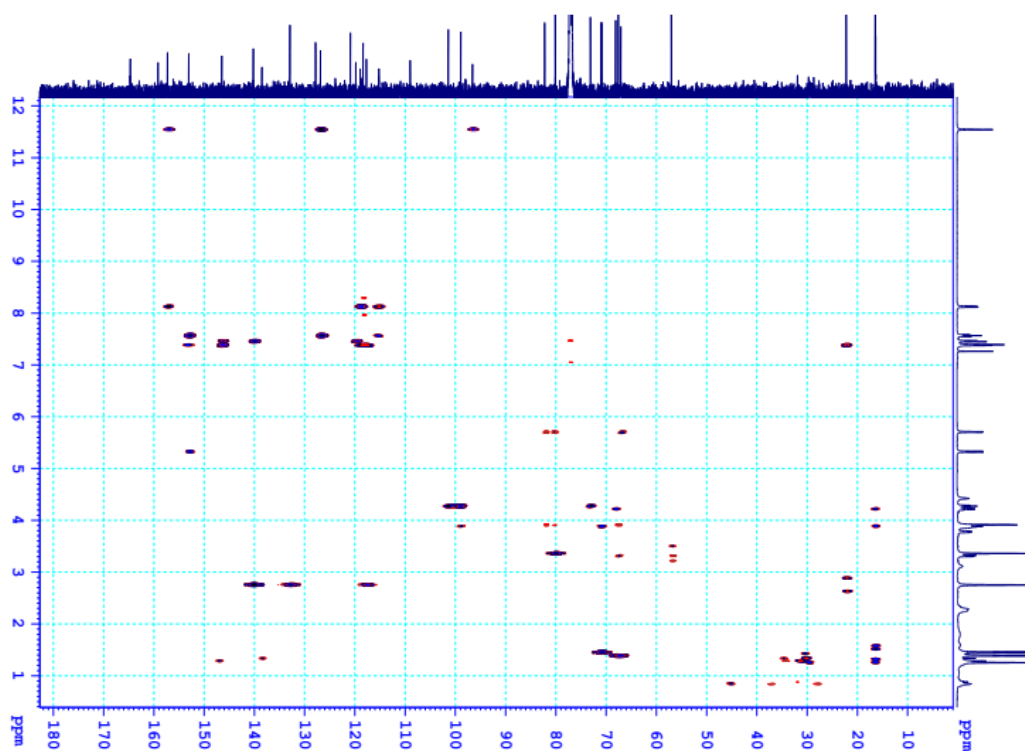
C13CPD

Hình 3.12. Phổ DEPT của hợp chất AT.02 trong CDCl₃

Các liên kết trong đơn vị đường cũng được xác định thông qua tương tác COSY giữa H-1' (δ_H 5,33)/H-2' (δ_H 4,27); H-2' (δ_H 4,27)/H-3' (δ_H 3,88); H-3' (δ_H 3,88)/H-4' (δ_H 3,78); H-5' (δ_H 3,92)/H-6' (δ_H 1,44); H-7' (δ_H 5,70)/H-8' (δ_H 3,84); H-8' (δ_H 3,84)/H-9' (δ_H 3,30); H-9' (δ_H 3,30)/H-10' (δ_H 3,87); H-10' (δ_H 3,87)/H-11' (δ_H 4,22); H-11' (δ_H 4,22)/H-12' (δ_H 1,38). Đơn vị D-digitalose được gắn vào vị trí C-2' của D-fucose được chứng minh qua tương tác trong phổ HMBC giữa H-2' (δ_H 5,33) với C-7' (δ_C 101,4). Phần đường được liên kết với aglycone tại vị trí C-1' được chứng minh bởi tương tác HMBC giữa H-1' (δ_H 5,33) với C-11 (δ_C 153,1).



Hình 3.13. Phổ COSY của hợp chất AT.02 trong CDCl₃



Hình 3.14. Phổ HMBC của hợp chất AT.02 trong CDCl₃

Dữ liệu phổ ^1H and ^{13}C -NMR của hợp chất **AT.02** được trình bày ở Bảng 3.3 và được so sánh với số liệu trong tài liệu tham khảo cho phép xác định hợp chất **AT.02** là chartreusin, một benzonaphthopyranone glycoside đã được phân lập và xác định trước đây từ *Streptomyces chartreusis* [108]. Đây là lần đầu tiên chartreusin được phân lập từ loài *Streptomyces alboniger*.

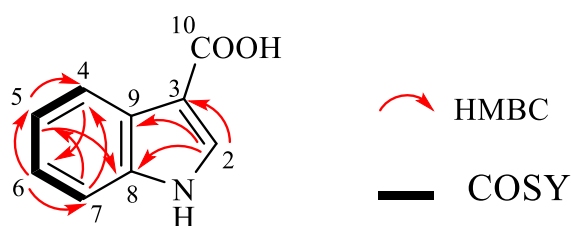
Bảng 3.3. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của chất **AT.02** và chartreusin [108]

C	AT.02		Chartreusin [108]	
	δ_{H} (ppm) ^a	δ_{C} (ppm) ^b	δ_{H} (ppm) ^c	δ_{C} (ppm) ^d
1		159,2		159,0
2		117,7		117,5
3		119,8		120,1
4		109,0		108,9
5		96,6		97,4
6		157,3		155,9
7		126,9		126,6
8	8,19 (d, $J = 8,0$ Hz)	118,4	8,09 (d, $J = 8,4$ Hz)	116,8
9	7,61 (t, $J = 8,0$ Hz)	127,8	7,75 (t, $J = 8,4$ Hz)	128,9
10	7,41 (d, $J = 8,0$ Hz)	115,2	7,54 (d, $J = 8,4$ Hz)	114,9
11		153,1		154,6
12		119,0		118,4
13		138,5		139,1
14		164,7		164,3
15		146,5		146,7
16	7,51 (d, $J = 8,5$ Hz)	120,9	7.67 (d, $J = 8,3$ Hz)	121,3
17	7,44 (d, $J = 8,5$ Hz)	133,0	7.63 (d, $J = 8,3$ Hz)	133,5
18		140,2		139,0
19	2,81 (s)	22,2	2,81 (s)	22,2
1'	5,33 (d, $J = 7,5$ Hz)	98,9	5,40 (d, $J = 7,7$ Hz)	100,2
2'	4,27 (m)	82,3	3,98 (m)	78,4
3'	3,88 (m)	71,0	3,67 (m)	71,8
4'	3,78 (m)	73,1	3,65 (m)	72,5
5'	3,92 (m)	70,9	3,96 (m)	70,7
6'	1,44 (d, $J = 6,5$ Hz)	16,4	1,00 (d, $J = 6,4$ Hz)	17,0
7'	5,70 (d, $J = 4,5$ Hz)	101,4	5,44 (d, $J = 4,0$ Hz)	99,9
8'	3,84 (m)	67,6	3,39 (m)	67,4

9'	3,30 (dd, $J = 10,0$; 3,0 Hz)	80,1	3,10 (dd, $J = 10,1$; 3,1 Hz)	80,3
10'	3,87 (m)	68,1	3,63 (m)	67,9
11'	4,22 (m)	67,1	4,26 (q, $J = 6,2$ Hz)	66,3
12'	1,38 (d, $J = 6,5$ Hz)	16,5	1,23 (d, $J = 6,2$ Hz)	16,9
13'	3,36 (s)	57,0	3,15 (s)	56,4
6-OH	11,63 (s)			

^a500 MHz, CDCl₃; ^b125 MHz, CDCl₃; ^c400 MHz, DMSO-*d*₆; ^d100 MHz, DMSO-*d*₆

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. Phổ ESI-MS cho pic ion giả phân tử tại m/z 178,5 $[M-H+H_2O]^-$. Trên phổ ¹H-NMR xuất hiện 5 tín hiệu proton của vòng thơm tại vị trí δ_H 8,15 (1H, dd, $J = 6,6$, 1,8 Hz, H-4), 8,03 (1H, d, $J = 3,0$ Hz, H-2), 7,51 (1H, dd, $J = 7,2$, 0,6 Hz, H-7), 7,21 (1H, m, H-6), 7,19 (1H, m, H-5), và một tín hiệu tại vị trí δ_H 10,94 (1H, s, NH). Phổ ¹³C-NMR cho thấy 8 tín hiệu carbon thơm tại δ_C 137,8 (C-8), 132,7 (C-2), 127,4 (C-9), 123,2 (C-6), 122,0 (C-5), 121,9 (C-4), 112,8 (C-7), 108,6 (C-3) và 1 tín hiệu nhóm carboxylic tại δ_C 166,1 (C-10). Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **AT.03** cho thấy các tín hiệu đặc trưng của indole carboxylic acid.

Việc gán phổ cộng hưởng từ proton và carbon-13 dựa trên phổ hai chiều COSY, HSQC, HMBC và NOESY. Trên phổ COSY cho thấy tương tác giữa H-4 (δ_H 8,15)/H-5 (δ_H 7,19); H-5 (δ_H 7,19)/H-6 (δ_H 7,21); H-6 (δ_H 7,21)/H-7 (δ_H 7,51), cũng như tương tác trên phổ HMBC giữa H-2 (δ_H 8,03) với C-3 (δ_C 108,6), C-9 (δ_C 127,4) và C-8 (δ_C 137,8); H-4 (δ_H 8,15) với C-6 (δ_C 123,2); H-7 (δ_H 7,51) với C-4 (δ_C 121,9) và C-5 (δ_C 122,0); H-6 (δ_H 7,21) với C-4 (δ_C 121,9), C-5 (δ_C 122,0) và C-7 (δ_C 112,8); H-5 (δ_H 7,19) với C-4 (δ_C 121,9), C-7 (δ_C 112,8) và C-8 (δ_C 137,8) đã xác định vị trí của các proton trong vòng indole.

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 [109]. Hợp chất này lần đầu tiên được phân lập từ chủng *Streptomyces wuyuanensis*. Hợp chất indole-3-carboxylic

acid thể hiện hoạt tính kháng khuẩn, chống ung thư và hoạt tính kháng oxy hóa [110].

Bảng 3.4. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của chất AT.03 và indole-3-carboxylic acid [109]

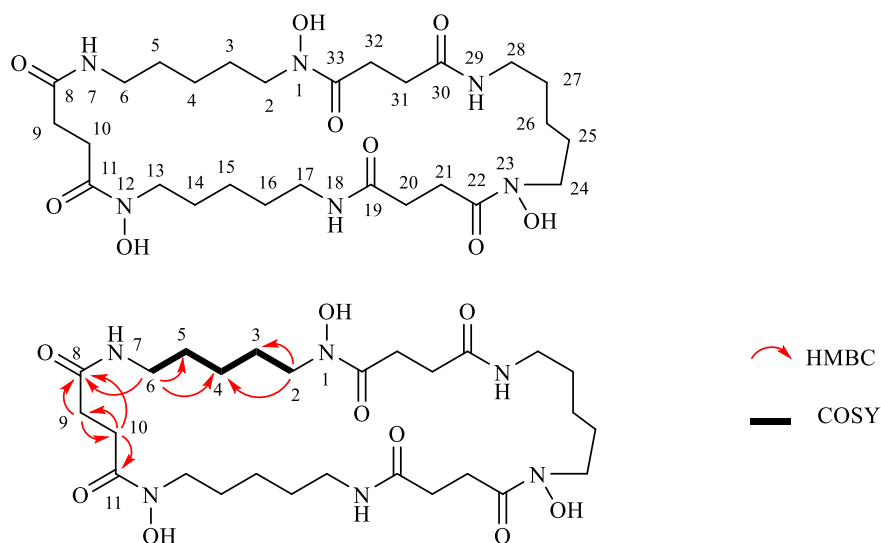
C	AT.03		Indole-3-carboxylic acid [109]	
	δ_{H} (ppm) ^a	δ_{C} (ppm) ^b	δ_{H} (ppm) ^c	δ_{C} (ppm) ^d
1				
2	8,03 (d, $J = 3,0$)	132,7	7,94 (s)	133,4
3		108,6		108,7
4	8,15 (dd, $J = 6,6, 1,8$ Hz)	121,9	8,06 (dd, $J = 7,7, 1,3$ Hz)	122,0
5	7,19 (m)	122,0	7,16 (ddd, $J = 7,7, 7,7, 1,3$ Hz)	122,4
6	7,21 (m)	123,2	7,19 (ddd, $J = 7,7, 7,7, 1,3$ Hz)	123,6
7	7,51 (dd, $J = 7,2, 0,6$ Hz)	112,8	7,43 (ddd, $J = 7,7, 7,7, 1,3$ Hz)	112,9
8		137,8		138,2
9		127,4		127,6

^a600 MHz, Acetone- d_6 ; ^b125 MHz, Acetone- d_6 ; ^c500 MHz, CD_3OD ; ^d125 MHz, CD_3OD

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

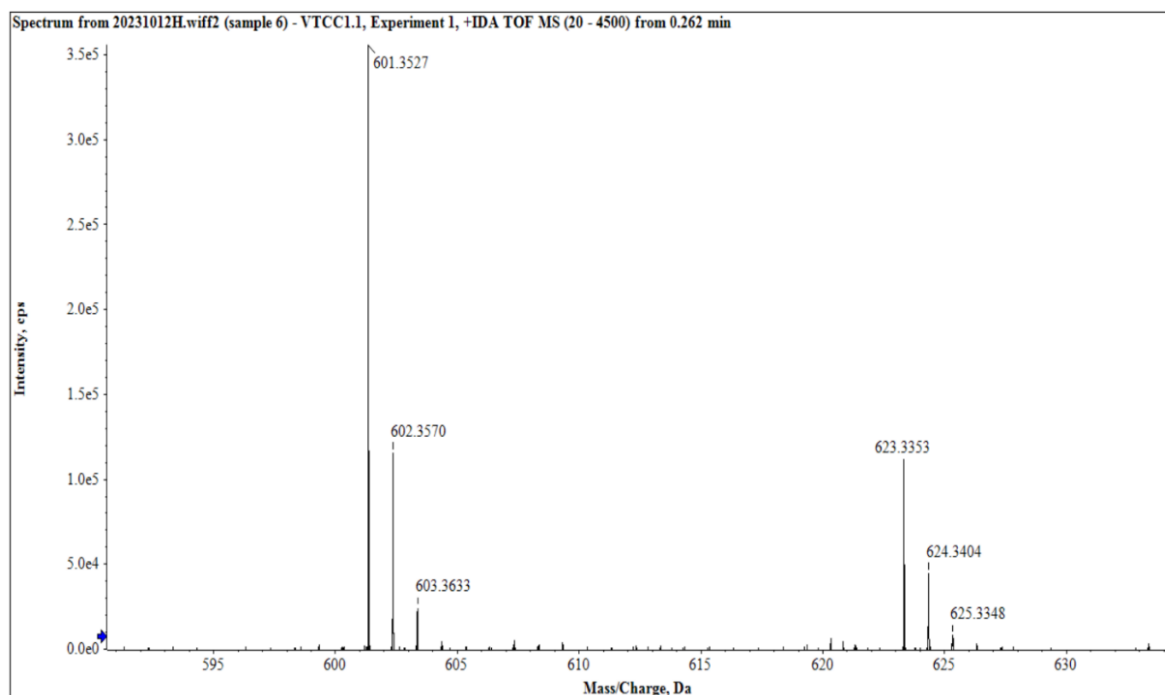
3.2.3.1. Chất AT.04

Hợp chất **AT.04** được phân lập dưới dạng bột không màu. Phổ HR-ESI-MS của **AT.04** cho thấy pic ion giả phân tử tại m/z 601,3527 (tính toán lý thuyết cho $\text{C}_{27}\text{H}_{49}\text{N}_6\text{O}_9$ 601,3561 $[\text{M}+\text{H}]^+$), 623,3353 (tính toán lý thuyết cho $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_9\text{Na}$ 623,3380 $[\text{M}+\text{Na}]^+$).



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

Trên phổ ^1H -NMR xuất hiện 7 tín hiệu của methylene proton tại δ_{H} 3,62 (6H, t, $J = 6,5$ Hz, H-2, H-13, H-24), 3,19 (6H, t, $J = 6,5$ Hz, H-6, H-17, H-28), 2,79 (6H, t, $J = 6,5$ Hz, H-9, H-20, H-31), 2,49 (6H, t, $J = 6,5$ Hz, H-10, H-21, H-32), 1,65 (6H, m, H-3, H-14, H-25), 1,53 (6H, m, H-5, H-16, H-27), 1,35 (6H, m, H-4, H-15, H-26). Phổ ^{13}C -NMR cho thấy 7 tín hiệu của methylene carbon tại δ_{C} 49,1 (C-2), 40,1 (C-6), 28,9 (C-9), 31,6 (C-10), 29,7 (C-5), 27,1 (C-3), 24,6 (C-4) và hai carbonyl carbon tại δ_{C} 174,7 (C-8), 174,5 (C-11). Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **AT.04** cho thấy tín hiệu đặc trưng của vòng macrocyclic hydroxamate.



Hình 3.17. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **AT.04**

Việc gán các tín hiệu proton và carbon trong chất **AT.04** đã được xác định bằng phổ 2D NMR (COSY, HSQC và HMBC). Tương tác COSY giữa H-6 (δ_{H} 3,19)/H-5 (δ_{H} 1,53); H-5 (δ_{H} 1,53)/H-4 (δ_{H} 1,35); H-4 (δ_{H} 1,35)/H-3 (δ_{H} 1,65); H-3 (δ_{H} 1,65)/H-2 (δ_{H} 3,62), cùng với tương tác HMBC giữa H-2 (δ_{H} 3,62) với C-3 (δ_{C} 27,1) và C-4 (δ_{C} 24,6); H-6 (δ_{H} 3,19) với C-4 (δ_{C} 24,6), C-5 (δ_{C} 29,7) và C-8 (δ_{C} 174,7); H-9 (δ_{H} 2,79) với C-8 (δ_{C} 174,7), C-10 (δ_{C} 31,6) và C-11 (δ_{C} 174,5); H-10 (δ_{H} 2,49) với C-8 (δ_{C} 174,7) và C-9 (δ_{C} 28,9) cho phép xác định vị trí của các proton trong vòng macrocyclic.

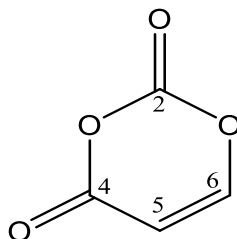
Kết hợp dữ liệu phổ NMR, MS và so sánh với tài liệu tham khảo cho phép xác định hợp chất **AT.04** là nocardamin, một vòng trimer vòng của N-hydroxy-N'-succinylcadaverine [111, 112]. Nocardamin là một hydroxamate siderophore và lần đầu tiên được phân lập từ chủng *Nocardia* [113]. Hợp chất này có hoạt tính siderophore (tạo phức với sắt) và hoạt tính chống sốt rét [111].

Bảng 3.5. Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của **AT.04** và nocardamin [111]

Vị trí	AT.04		Nocardamin [111]	
	δ_{H} (ppm) ^a	δ_{C} (ppm) ^b	δ_{H} (ppm) ^c	δ_{C} (ppm) ^d
1, 12, 23			9,6 (br s)	
2, 13, 24	3,62 (t, $J = 6,5$ Hz)	49,1	3,46 (t, $J = 6,9$ Hz)	46,8
3, 14, 25	1,65 (m)	27,1	1,51 (m)	25,8
4, 15, 26	1,35 (m)	24,6	1,20 (m)	23,1
5, 16, 27	1,53 (m)	29,7	1,37 (m)	28,6
6, 17, 28	3,19 (t, $J = 6,5$ Hz)	40,1	3,00 (m)	38,3
7, 18, 29			7,72 (br t)	
8, 19, 30		174,7		172,0
9, 20, 31	2,79 (t, $J = 6,5$ Hz)	28,95	2,28 (t, $J = 6,3$ Hz)	30,0
10, 21, 32	2,49 (t, $J = 6,5$ Hz)	31,6	2,58 (m)	27,5
11, 22, 33		174,5		171,4

^a500 MHz, CD_3OD ; ^b125 MHz, CD_3OD ; ^c500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$; ^d125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$

3.2.3.2. Chất **AT.05**

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

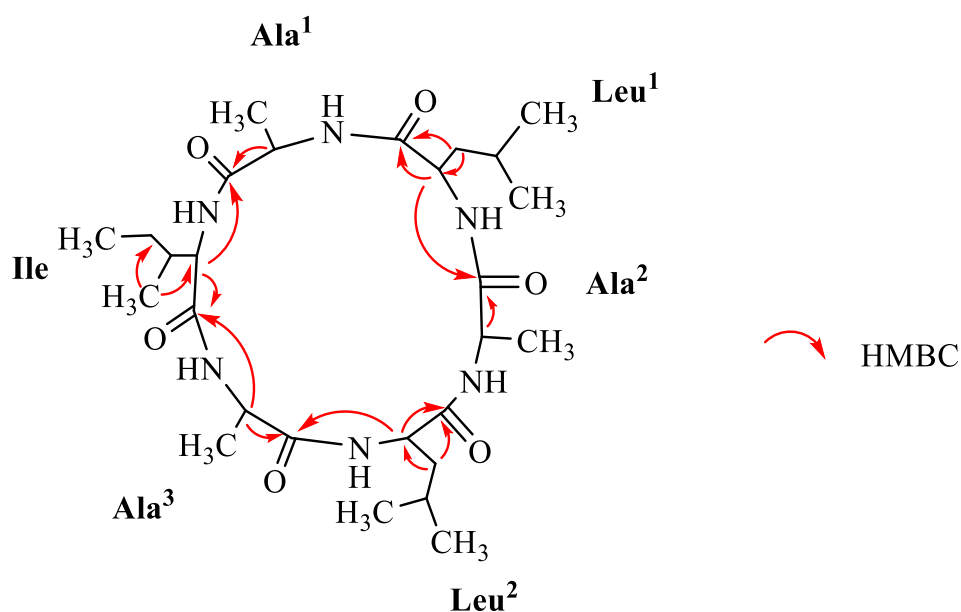
Chất **AT.05** được phân lập dưới dạng bột màu trắng. Phổ khối ESI-MS của hợp chất này cho pic ion giả phân tử tại m/z 119 $[\text{M}+\text{Na}-\text{H}_2\text{O}]^+$. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ xuất hiện hai tín hiệu của proton olefin tại δ_{H} 5,43 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz; H-5); 7,39 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz; H-6). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ xuất hiện tín hiệu của hai nhóm carbonyl tại δ_{C} 164,4 (C-4); 151,7 (C-2) và 2 tín hiệu của 2 carbon olefin tại δ_{C} 100,0 (C-5); 142,6 (C-6). Từ các thông tin trên, cho thấy chất **AT.05** có cấu trúc vòng lactone gồm 4 nguyên tử carbon và 2 nguyên tử oxi. 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 $\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_4$ [114]. Hợp chất pleurone có hoạt tính kháng oxi hóa và hoạt tính ức chế bạch cầu [114]. Ngoài ra, pleurone có hoạt tính ức chế enzym HCV NS3 protease với giá trị IC_{50} là $78.9 \mu\text{M}$ [115]. Hợp chất này được xem là chất có tiềm năng trong phát triển thuốc kháng HCV (vi rút viêm gan C) [115].

Bảng 3.6. Dữ liệu phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR của **AT.05** so với *pleurone* [115]

Vị trí	AT.05		Pleurone [115]	
	δ_{H} (ppm) ^a	δ_{C} (ppm) ^b	δ_{H} (ppm) ^c	δ_{C} (ppm) ^d
2		151,7		151,5
4		164,4		164,3
5	5,43 (d, $J = 8,0$ Hz)	100,0	5,44 (d, $J = 7,6$ Hz)	100,2
6	7,39 (d, $J = 8,0$ Hz)	142,6	7,38 (d, $J = 7,6$ Hz)	142,2

^a500 MHz, DMSO- d_6 ; ^b125 MHz, DMSO- d_6 ; ^c400 MHz, DMSO- d_6 ; ^d100 MHz, DMSO- d_6

3.2.3.3. Chất **AT.06**



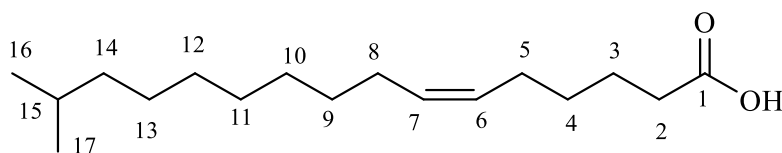
Hình 3.19. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC trong hợp chất **AT.06**

Hợp chất **AT.06** được phân lập dưới dạng chất rắn, màu trắng. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS cho tín hiệu pic ion giả phân tử tại m/z 553,3730 (tính toán lý thuyết cho $\text{C}_{27}\text{H}_{49}\text{N}_6\text{O}_6$ 553,3714 $[\text{M}+\text{H}]^+$), 575,3548 (tính toán lý thuyết cho $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_6\text{Na}$ 575,3533 $[\text{M}+\text{Na}]^+$). Trên phổ ^1H -NMR xuất hiện 10 tín hiệu proton tại δ_{H} 3,57-3,54 (2H, m, α -H của Leu^1 & Leu^2), 3,50 (1H, d, $J = 3,5$ Hz, α -H của Ile), 3,43 (3H, d, $J = 4,5$ Hz, α -H của Ala^1 , Ala^2 & Ala^3), 1,97-1,95 (1H, m, β -H của Ile), 1,83-1,77 (2H, m, γ -H của Leu^1 & Leu^2), 1,83-1,59 (4H, m, β -H của Leu^1 & Leu^2), 1,66-1,59 (2H, m, γ -H của Ile), 1,08-1,07 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, β -H của Ala^3), 1,05-1,01 (9H, m, β -H của Ala^1 & Ala^2 , β' -H of Ile), 1,00-0,96 (15H, m, δ -H của Leu^1 & Leu^2 , δ -H của Ile).

Phổ ^{13}C -NMR cho thấy tín hiệu của 9 nhóm methyl, 3 nhóm methylene, 9 nhóm methin và 6 nhóm carbonyl tại δ_{C} 175,2 (C=O, Leu), 174,5 (C=O, Ala), 174,0 (C=O, Ile). Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **AT.06** cho thấy tín hiệu đặc trưng của

vòng hexapeptide. Trình tự sắp xếp các gốc amino acid trong hợp chất **AT.06** được xác định bằng phổ HMBC. Tương tác giữa H- α (Ala) (δ_H 3,43) với C=O (Ala) (δ_C 174,5) và C=O (Leu) (δ_C 175,2); H- β (Ala) (δ_H 1,08-1,01) với C- α (Ala) (δ_C 61,8); H- α (Leu) (δ_H 3,57-3,54) với C=O (Ala) (δ_C 174,5) và C=O (Leu) (δ_C 175,2); H- β (Leu) (δ_H 3,57-3,54) với C=O (Leu) (δ_C 175,2) và C- α (Leu) (δ_C 54,7); H- α (Ile) (δ_H 3,50) với C=O (Ala) (δ_C 174,5) và C=O (Ile) (δ_C 174,0), H- β' (Ile) (δ_H 1,05-1,01) với C- α (Ile) (δ_C 60,9) và C- γ (Ile) (δ_C 25,9). Sự kết nối giữa các phân tử amino acid được khẳng định qua phổ -IDA TOF MS/MS tại m/z 340 [Ala-Leu-Ala-Leu - CO] $^-$, 255 [Ala-Leu-Ala] $^-$, 227 [Ala-Leu-Ala - CO] $^-$. 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 [116, 117]. Halolitoralin A được phân lập từ xạ khuẩn biển *Halobacillus litoralis* YS3106 (Biển Hoàng Hải, Trung Quốc) [116]. Hợp chất này thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh, hoạt tính chống giun sán và hoạt tính chống ung thư yếu [116].

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

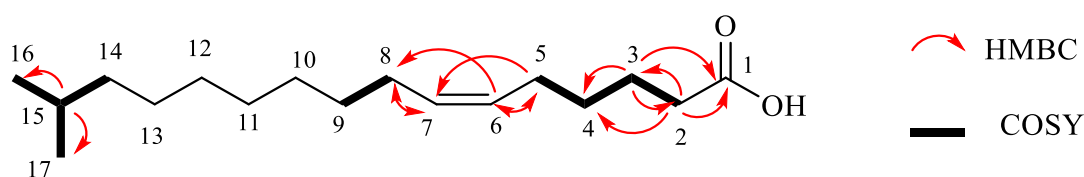


Hình 3.20. Cấu trúc hóa học của hợp chất **AT.07**

Hợp chất **AT.07** được phân lập dưới dạng chất rắn, màu hồng nhạt. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS cho tín hiệu pic ion giả phân tử tại m/z 267,2335 (tính toán lý thuyết cho $C_{17}H_{31}O_2$ 267,2324 [M-H] $^-$) cho phép xác định công thức phân tử là $C_{17}H_{32}O_2$. Trên phổ 1H -NMR xuất hiện tín hiệu của hai proton olefin tại δ_H 5,36 (2H, m, H-6, H-7), 11 tín hiệu proton của nhóm methylen tại δ_H 2,30 (2H, m, H-2), 2,06 (4H, m, H-5, H-8), 1,61 (2H, m, H-3), 1,34 (2H, m, H-4), 1,33 (2H, m, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13), 1,20 (2H, H-14), một tín hiệu của nhóm methine tại δ_H 1,54 (1H, m, H-15) và 2 nhóm methyl tại δ_H 0,91 (6H, m, H-16, H-17).

Phổ ^{13}C -NMR xuất hiện 17 tín hiệu trong đó một tín hiệu carbon của nhóm carboxylic acid tại δ_C 177,8 (C-1), tín hiệu của hai carbon olefin tại δ_C 130,8 (C-6, C-7), một tín hiệu của methin carbon tại δ_C 29,1 (C-15), 10 tín hiệu methylen carbon tại δ_C 40,2 (C-14), 35,0 (C-2), 33,0 (C-9, C-12), 30,7 (C-4), 28,5 (C-10, C-11), 28,1 (C-5), 26,1 (C-3), 23,7 (C-13) và tín hiệu của hai methyl carbon tại δ_C 23,0 (C-16, C-17). Việc gán các số liệu phổ NMR được xác định dựa trên cơ sở kết hợp phân tích dữ liệu phổ hai chiều HSQC, COSY, NOESY và HMBC.

Tương tác COSY giữa H-2 (δ_H 2,30)/H-3 (δ_H 1,61); H-3 (δ_H 1,61)/H-4 (δ_H 1,34); H-4 (δ_H 1,34)/H-5 (δ_H 2,06); H-8 (δ_H 2,06)/H-9 (δ_H 1,31); H-14 (δ_H 1,34)/H-15 (δ_H 1,54); H-15 (δ_H 1,54)/H-16, H-17 (δ_H 0,91). Phổ HMBC xuất hiện tương tác giữa H-2 (δ_H 2,30) với C-1 (δ_C 177,8), C-3 (δ_C 26,1) và C-4 (δ_C 30,7); H-3 (δ_H 1,61) với C-1 (δ_C 177,8), C-2 (δ_C 35,0) và C-4 (δ_C 30,7); H-5, H-8 (δ_H 2,06) với C-6, C-7 (δ_C 130,8); H-6, H-7 (δ_H 5,36) với C-5, C-8 (δ_C 28,1); H-15 (δ_H 1,54) với C-16, C-17 (23,0). Tương tác NOESY giữa H-6 (δ_H 5,36)/H-7 (δ_H 5,36) cho phép xác định cấu trúc tương đối của **AT.07**. 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 [118].

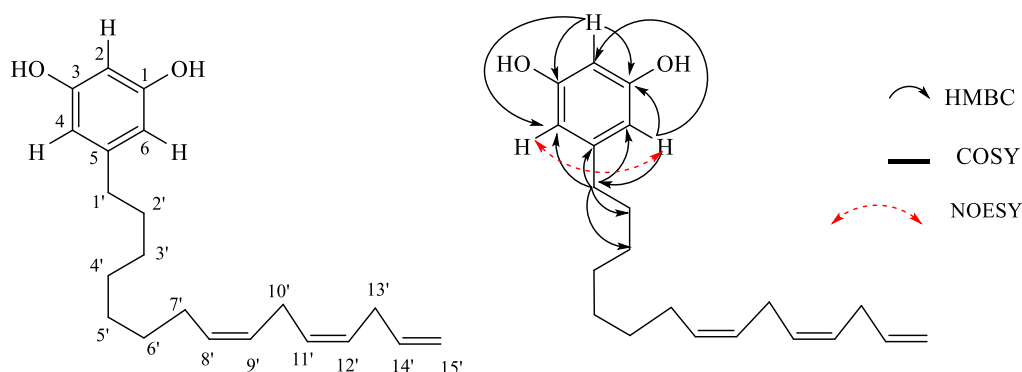


Hình 3.21. Tương tác HMBC, COSY của hợp chất **AT.07**

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

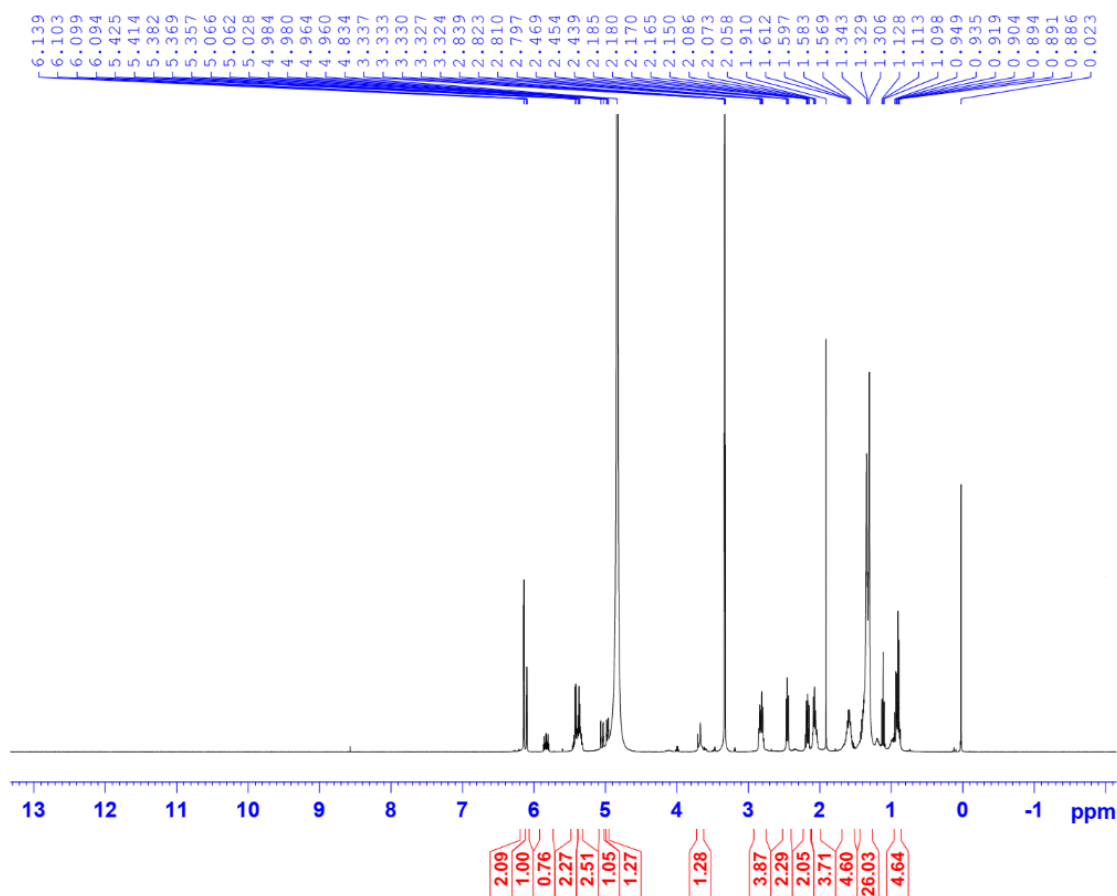
3.2.5.1. Chất **AT.08**

Hợp chất **AT.08** 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 313,2196 (tính toán lý thuyết cho $C_{21}H_{29}O_2$ 313,2168 $[M-H]^-$).

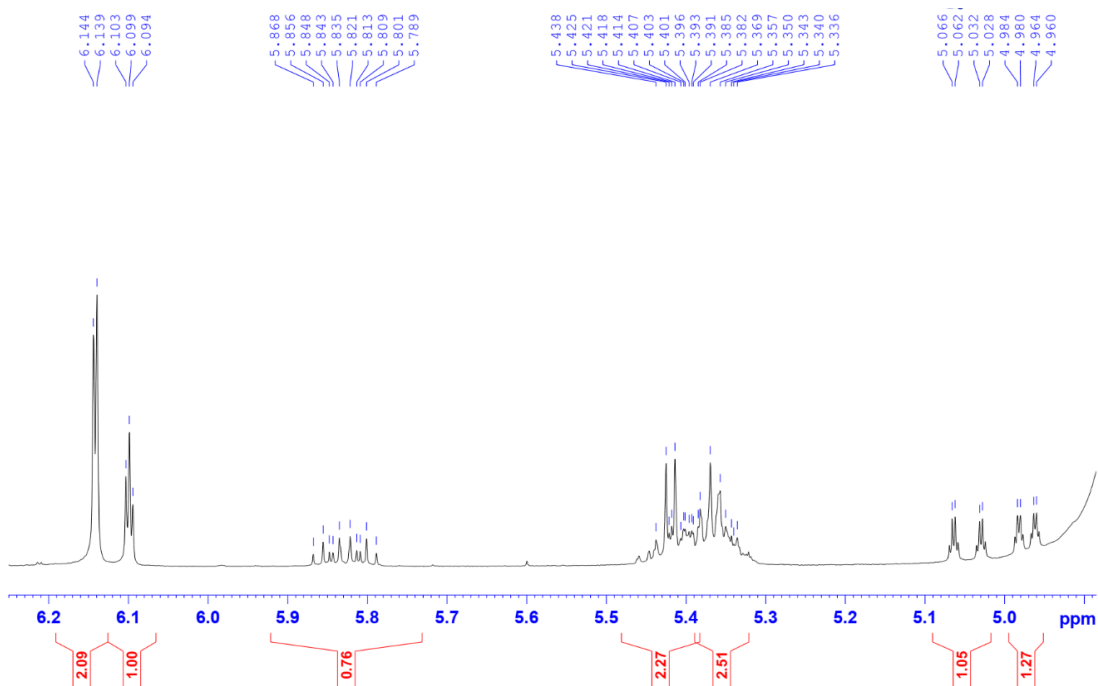


Hình 3.22. Cấu trúc và tương tác COSY, HMBC, NOESY của hợp chất **AT.08**

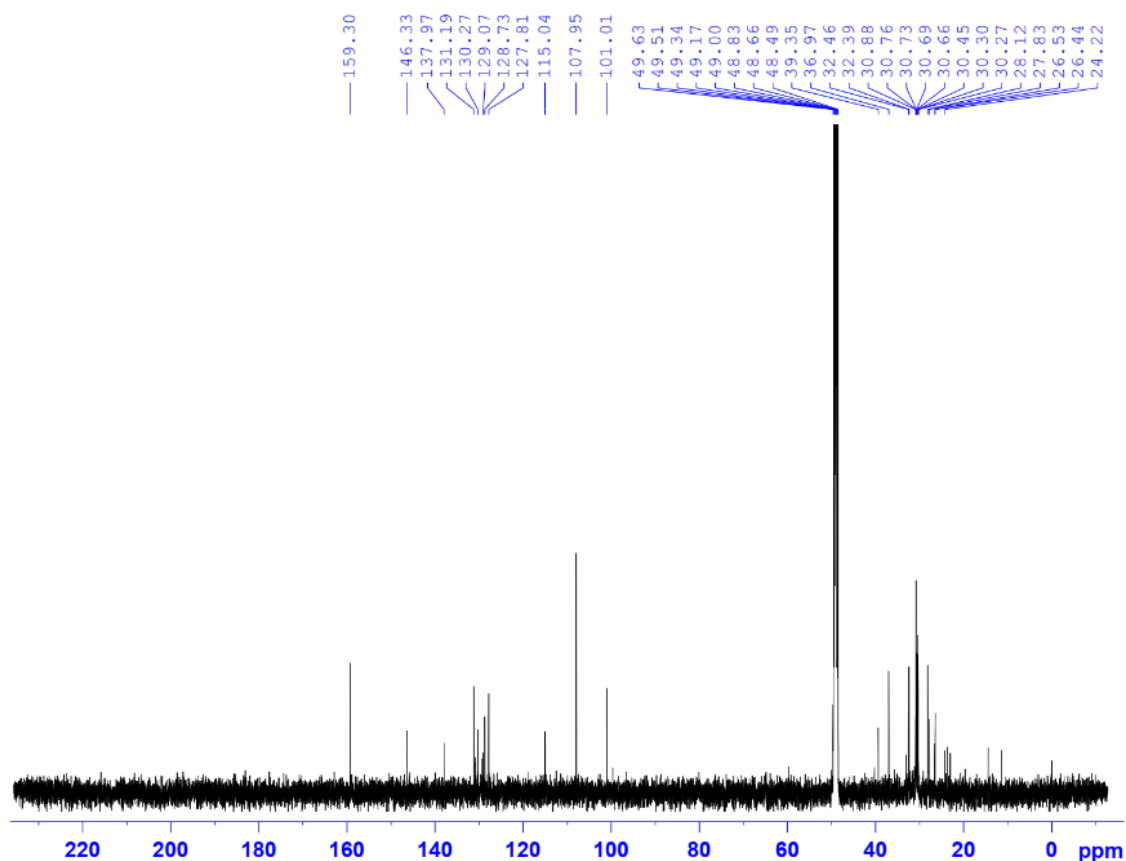
Phổ 1H -NMR xuất hiện 3 tín hiệu của vòng thơm tại δ_H 6,14 (2H, d, $J = 2,5$ Hz, H-4, H-6), 6,09 (1H, m, H-2) cho thấy vòng thơm với 3 nhóm thế ở các vị trí 1,3,5; 7 tín hiệu proton olefin tại δ_H 5,83 (1H, m, H-14'), 5,42 (1H, m, H-12'), 5,40 (1H, m, H-11'), 5,35 (1H, m, H-8'), 5,34 (1H, m, H-9'), 5,02 (1H, m, H-15'a), 4,96 (1H, m, H-15'b), và 9 tín hiệu của nhóm methylene ứng với δ_H 2,83 (2H, m, H-13'), 2,81 (2H, m, H-10'), 2,45 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, H-1'), 2,08 (2H, m, H-7'), 1,56 (2H, m, H-2'), 1,32 (2H, m, H-6'), 1,30 (4H, m, H-3', H-4'), 0,93 (2H, m, H-5').



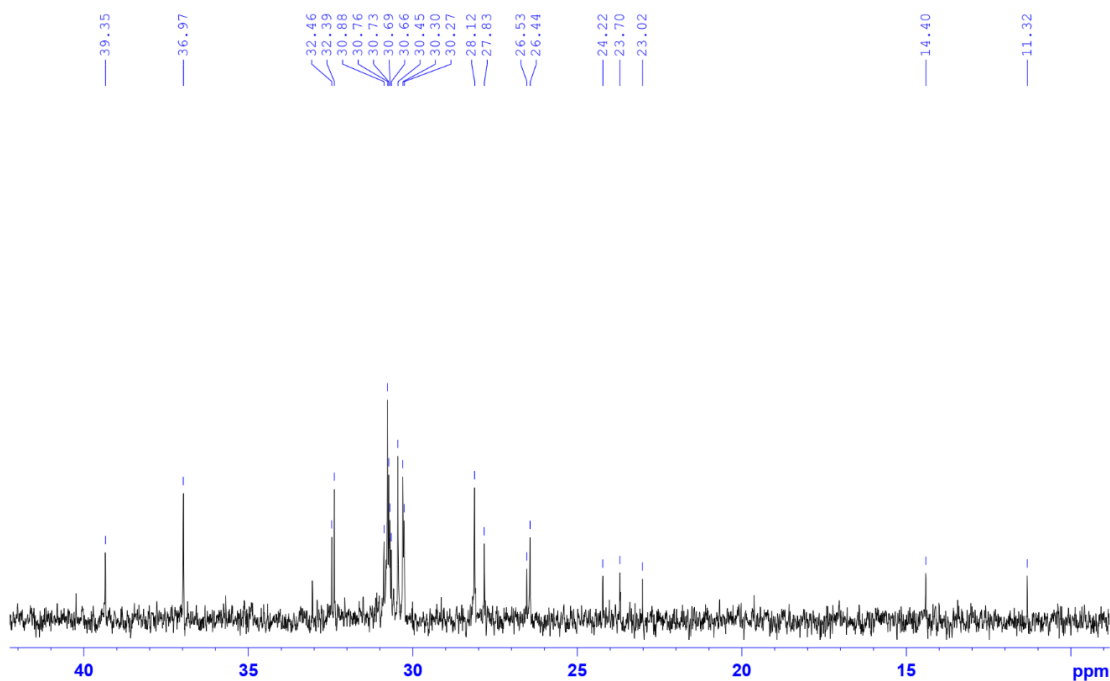
Hình 3.23. Phổ ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **AT.08**



Hình 3.24. Phổ ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) của chất **AT.08** (giãn rộng)



Hình 3.25. Phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất AT.08



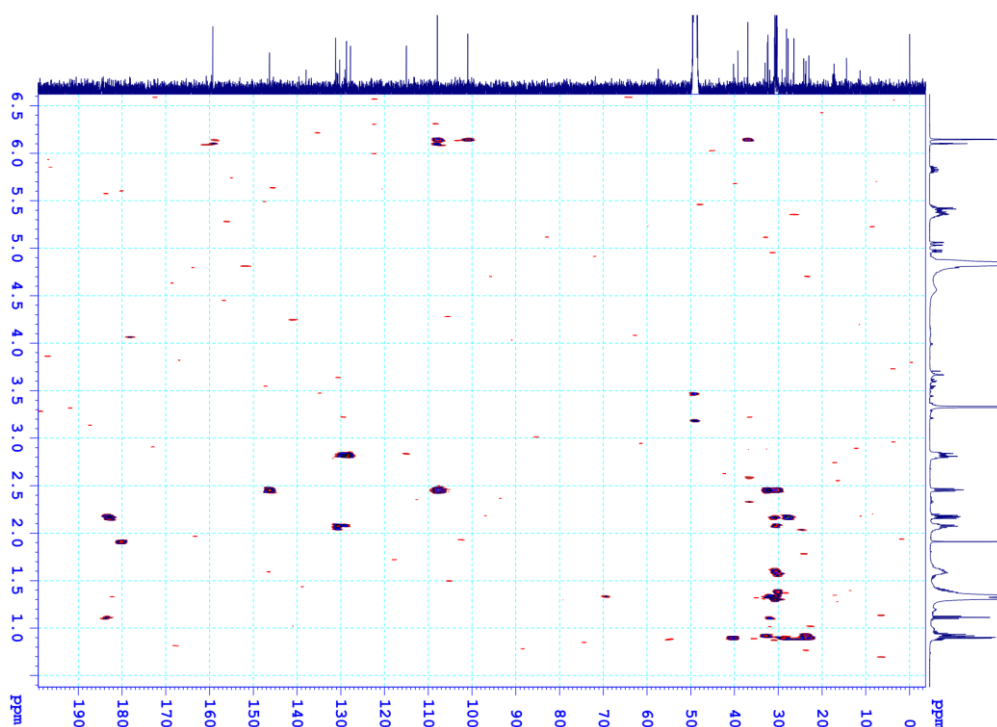
Hình 3.26. Phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) của chất AT.08 (giãn rộng)

Phổ ^{13}C -NMR xuất hiện 6 tín hiệu carbon của vòng thơm ứng với δ_{C} 159,3 (C-1, C-3), 146,3 (C-5), 107,9 (C-4, C-6), 100,9 (C-2), 6 carbon olefin tại δ_{C} 137,9 (C-14'), 130,2 (C-8', C-9'), 128,7 (C-12'), 127,8 (C-11'), 115,0 (C-15') và 9 tín

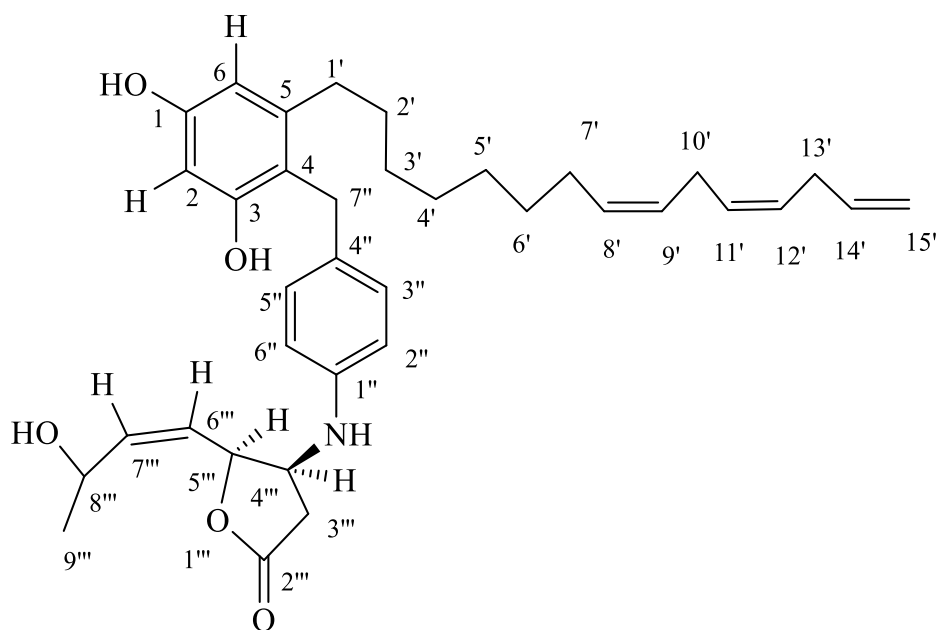
hiệu nằm trong vùng ankyr ứng với δ_C 36,9 (C-1'), 32,3 (C-13'), 31,4 (C-2'), 30,8 (C-4'), 30,4 (C-3'), 23,7 (C-6'), 23,0 (C-5'), 28,1 (C-7'), 26,4 (C-10'). Việc gán các tín hiệu dựa trên cơ sở kết hợp với dữ liệu phổ COSY, HSQC, HMBC và NOESY.

Dữ liệu phổ COSY chỉ ra tương tác của các proton trong nhóm allyl giữa H-15' (δ_H 5,02)/H-14' (δ_H 5,83); H-12' (δ_H 5,42)/H-13' (δ_H 2,83); H-7' (δ_H 2,08)/H-8' (δ_H 5,35), H-6' (δ_H 1,32); H-1' (δ_H 2,45)/H-2' (δ_H 1,56); H-6' (δ_H 1,32)/H-5' (δ_H 0,93); H-5' (δ_H 0,93)/H-4' (δ_H 1,30). Vị trí của nhóm ankyr cũng được xác định dựa vào tương tác trên phổ HMBC giữa H-7' (δ_H 2,08) với C-8', C-9' (δ_C 130,2); H-10' (δ_H 2,81) với C-11' (δ_C 127,8), C-12' (δ_C 128,7); H-5' (δ_H 0,93) với C-16' (δ_C 23,7), H-6' (δ_H 1,32) với C-4' (δ_C 30,8); H-4' (δ_H 1,30) với C-3' (δ_C 30,4). Ngoài ra, trên phổ HMBC còn xuất hiện tương tác giữa H-1' (δ_H 2,45) với C-4, C-6 (δ_C 107,9), C-5 (δ_C 146,3), C-2' (δ_C 32,4), C-3' (δ_C 30,4); H-2 (δ_H 6,09) với C-1, C-3 (δ_C 159,3), C-4 (δ_C 107,9); H-6 (δ_H 6,14) với C-1 (δ_C 159,3), C-2 (δ_C 100,9), C-4 (δ_C 107,9), C-1' (δ_C 36,9), cho thấy nhóm allyl liên kết với vòng thơm tại vị trí C-5. Phổ NOESY cũng cho thấy tương tác giữa H-4 (δ_H 6,14)/H-6 (δ_H 6,14); H-1' (δ_H 2,45)/H-2' (δ_H 1,56), H-8' (δ_H 5,35)/H-9' (δ_H 5,34); H-11' (δ_H 5,40)/H-12' (δ_H 5,42)' cho phép xác định cấu hình tương đối của hợp chất **AT.08**.

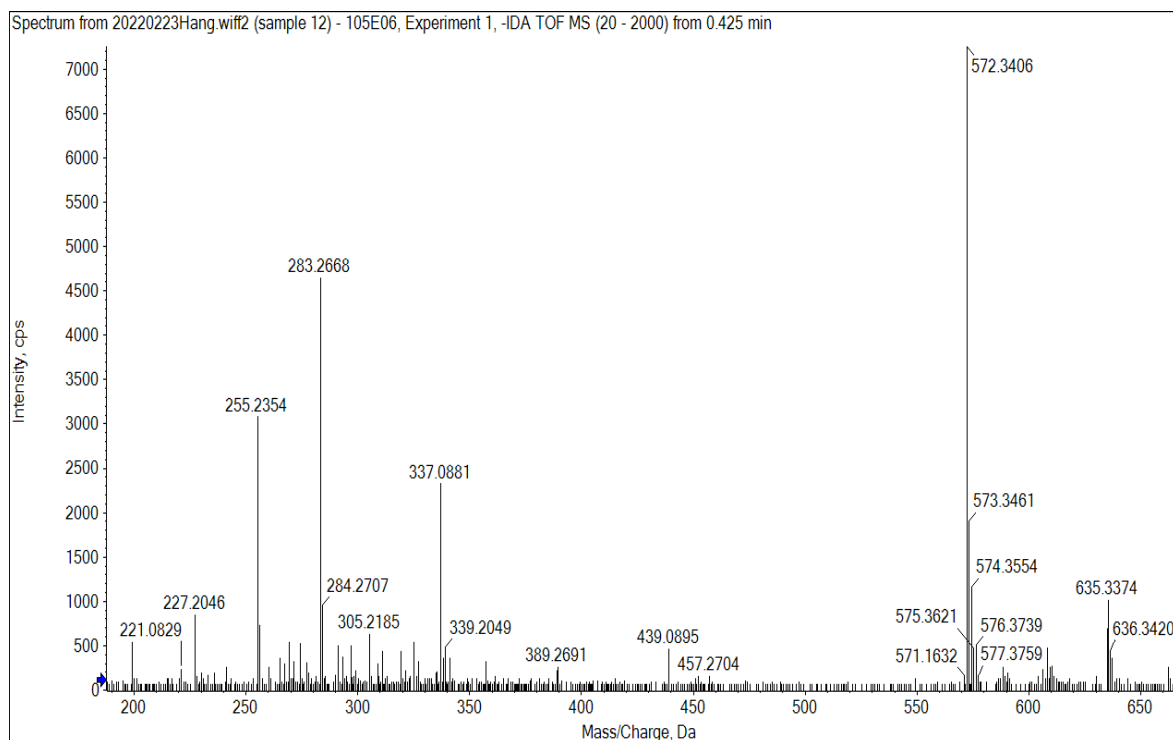
Kết hợp dữ liệu phổ NMR, HR-ESI-MS và so sánh với tài liệu tham khảo, hợp chất **AT.08** được xác định là cardoltriene [119]. Hợp chất này có hoạt tính chống sốt rét tốt ($IC_{50} = 5,69 \mu M$) và hoạt tính chống côn trùng đối với chủng *Leishmania amazonensis* [120, 121].

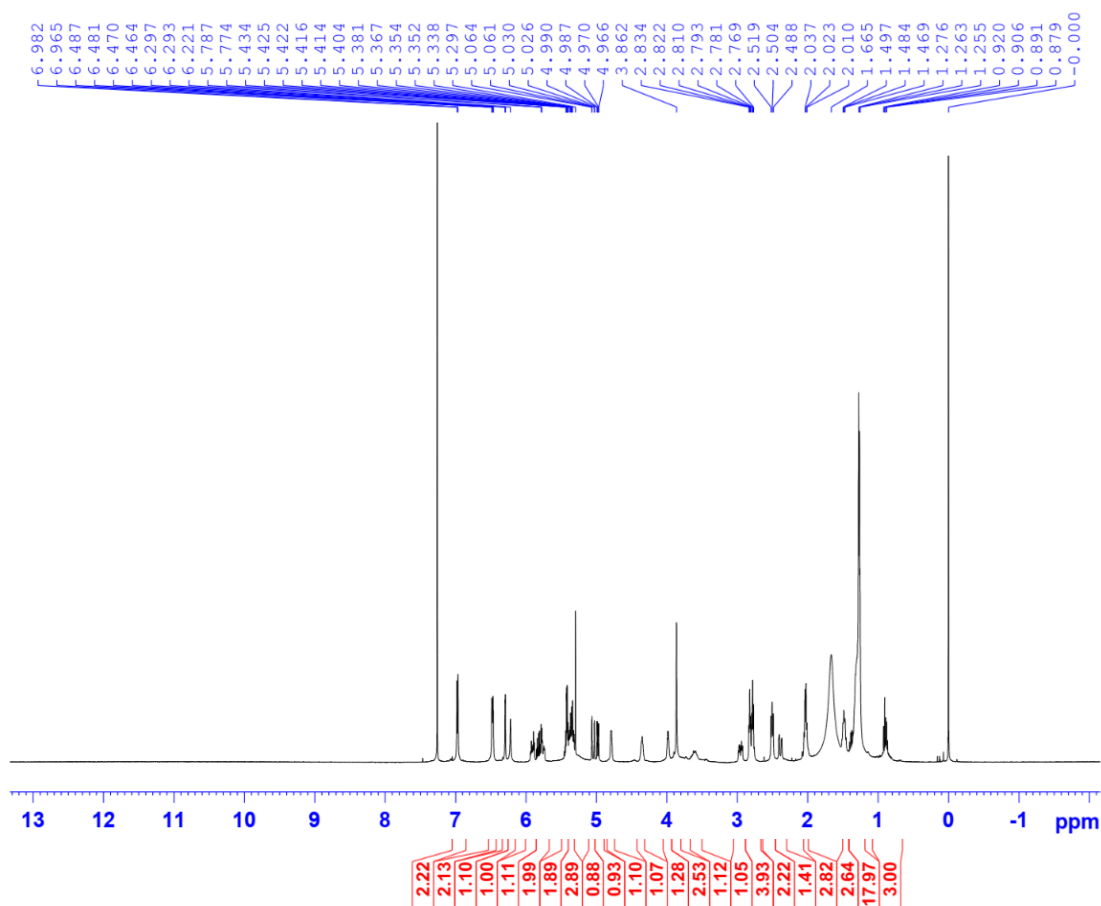


Hình 3.27. Phổ HMBC của hợp chất **AT.08** trong CD_3OD

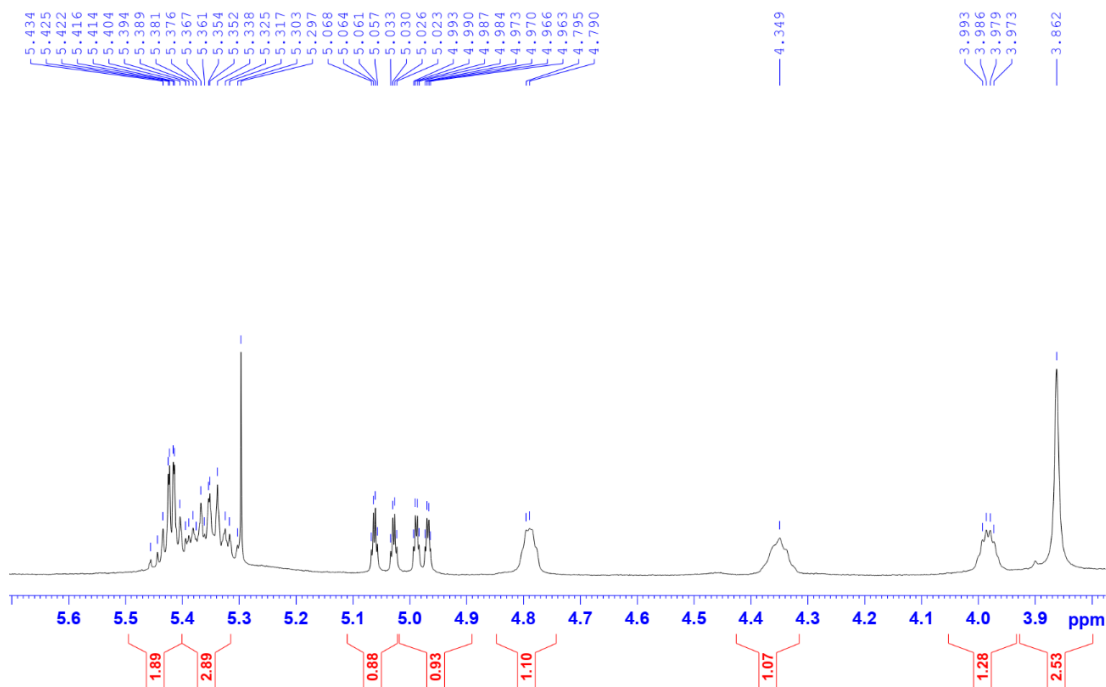
3.2.5.2. Chất **AT.09**Hình 3.28. Cấu trúc hóa học của chất **AT.09**

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 3.29. Phổ (-)-HR-ESI-MS của chất **AT.09**



Hình 3.30. Phổ ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) của chất AT.09

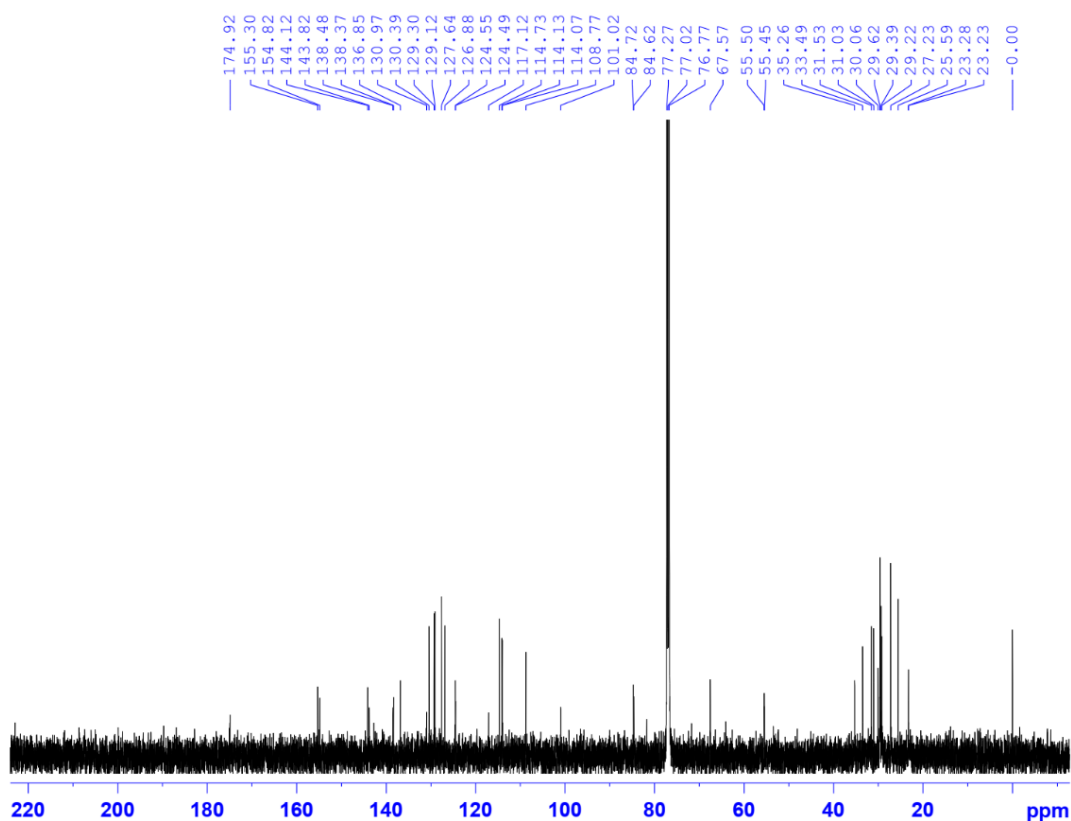


Hình 3.31. Phổ ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) của chất AT.09 (giãn rộng)

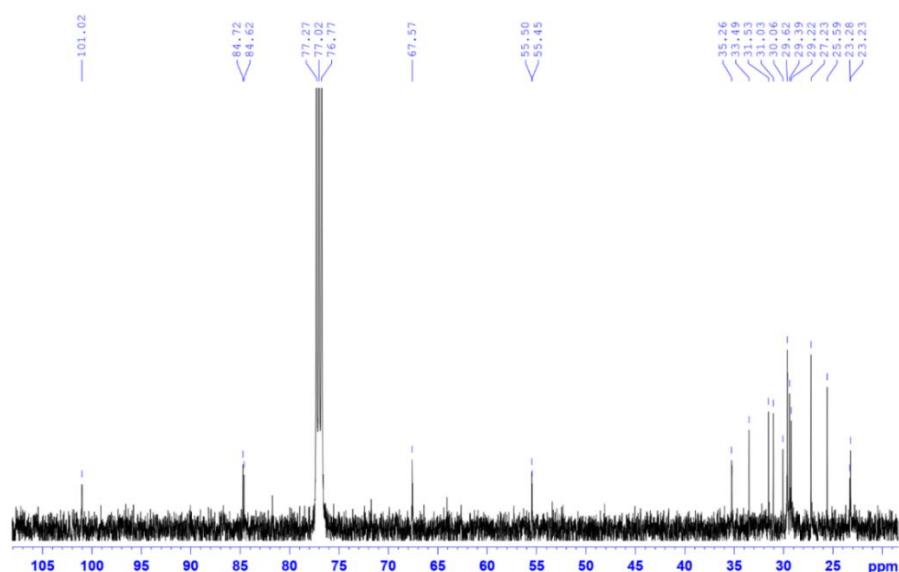
Phổ ^1H -NMR xuất hiện 6 tín hiệu của vòng thơm tại δ_{H} 6,98 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3'', H-5''), 6,47 (2H, dd, $J = 8,5, 3,0$ Hz, H-2'', H-6''), 6,29 (1H, m, H-6), 6,22 (1H, br s, H-2), 9 tín hiệu proton olefin tại δ_{H} 5,88 (1H, m, H-7'''), 5,83 (1H,

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, $J = 7,5$ Hz, 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 1H -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}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}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 lactone carbonyl tại δ_C 174,9 (C-2'''). So sánh dữ liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR với dữ liệu của **AT.08** cho thấy cấu trúc của hợp chất **AT.08** và **AT.09** tương tự nhau.

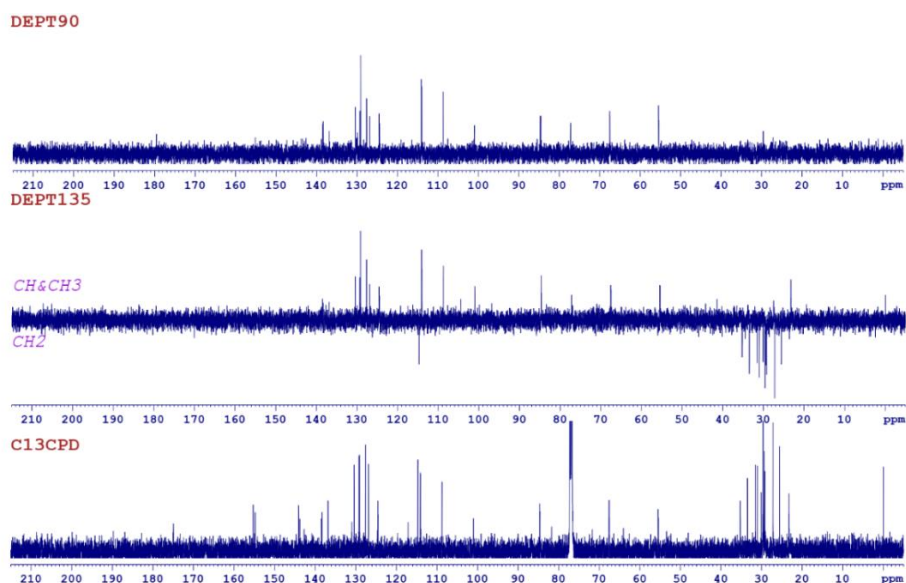


Hình 3.32. Phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) của chất **AT.09**

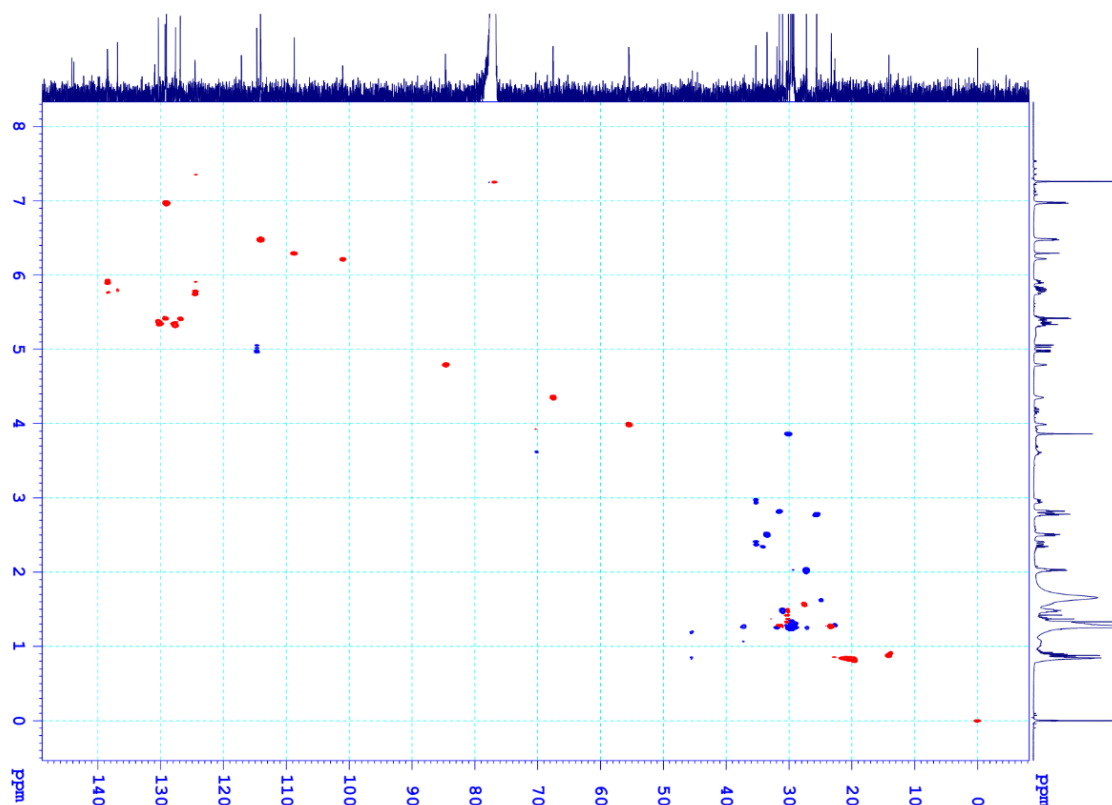


Hình 3.33. Phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) của chất **AT.09** (giãn rộng)

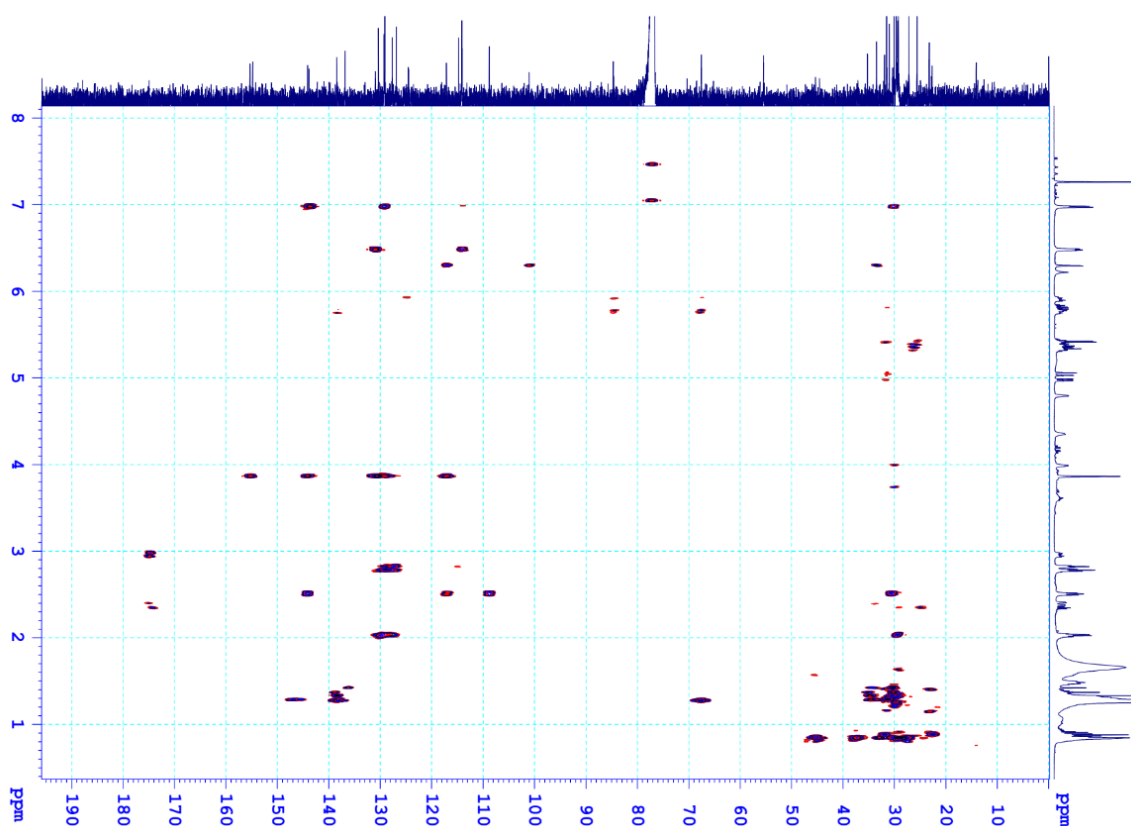
Sự gán kết các tín hiệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR được khẳng định dựa trên các tương tác xuất hiện trên phổ HSQC, COSY và HMBC. Phổ COSY cũng cho thấy sự phù hợp với sự gán kết như trên khi xuất hiện các tương tác của các proton trong vòng thơm giữa H-2'' (δ_{H} 6,47)/H-3'' (δ_{H} 6,98); H-6'' (δ_{H} 6,47)/H-5'' (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).



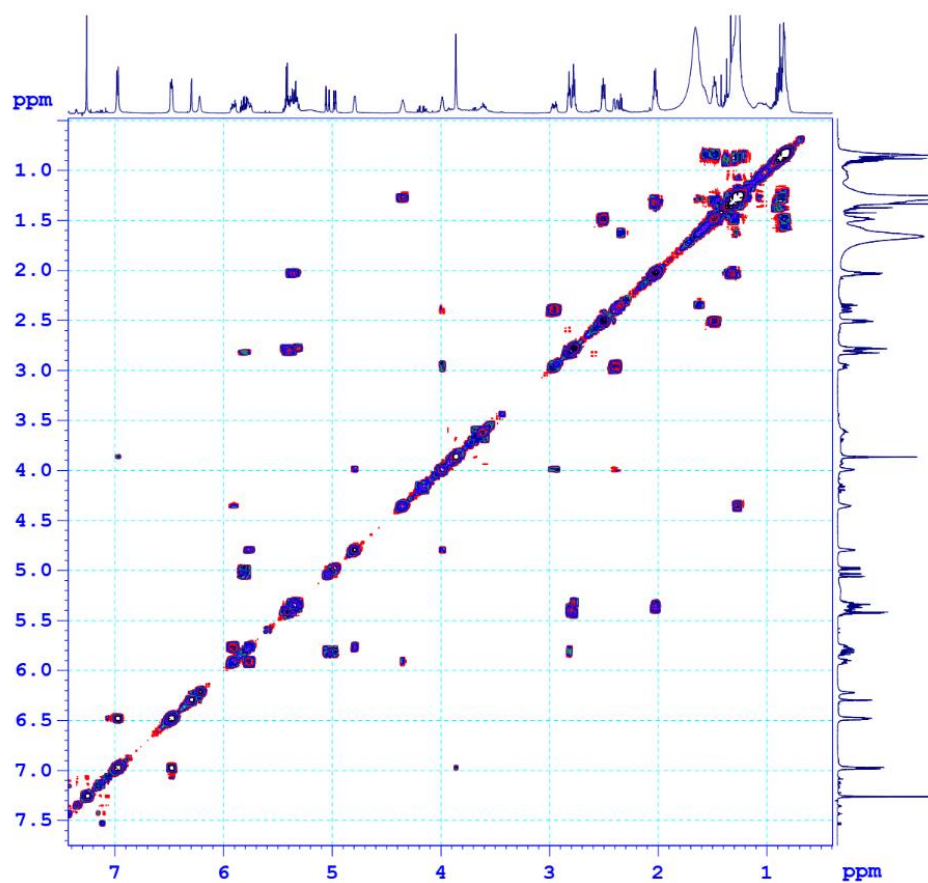
Hình 3.34. Phổ DEPT của chất **AT.09** trong CDCl_3



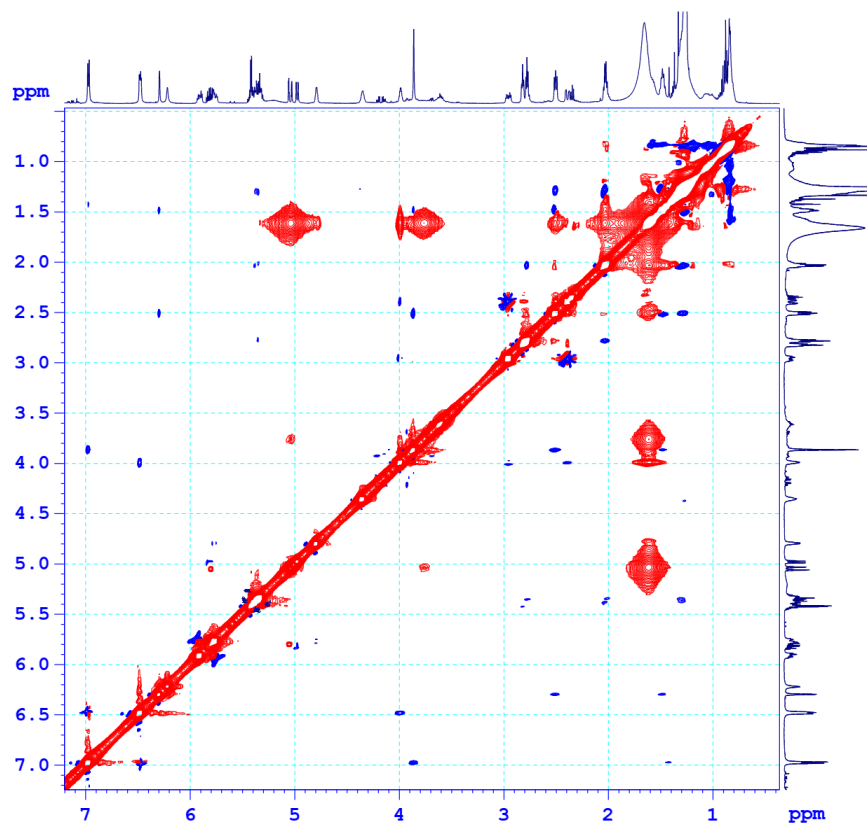
Hình 3.35. Phổ HSQC của chất AT.09 trong CDCl₃



Hình 3.36. Phổ HMBC của chất AT.09 trong CDCl₃



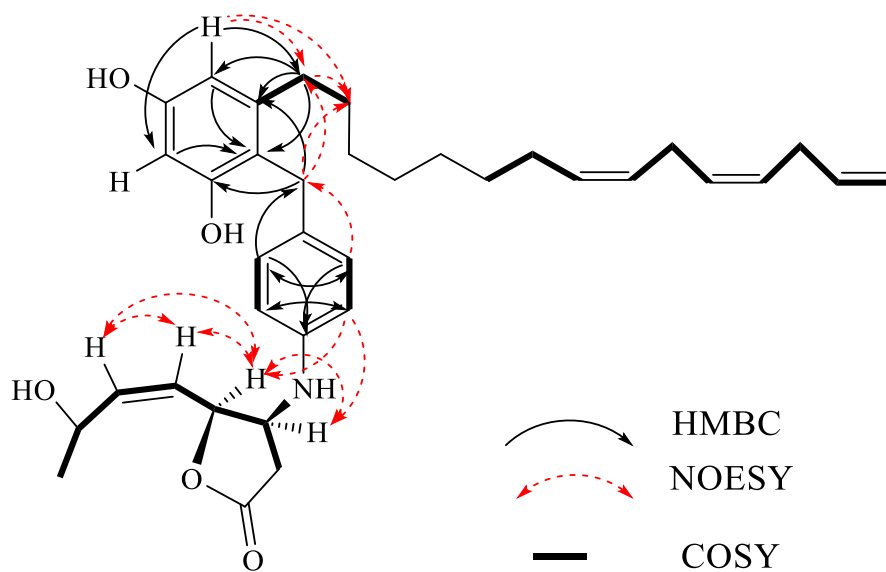
Hình 3.37. Phổ COSY của chất AT.09 trong CDCl₃



Hình 3.38. Phổ NOESY của chất AT.09 trong CDCl₃

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.



Hình 3.39. Tương tác HMBC, COSY và NOESY trong hợp chất **AT.09**

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

C	AT.08		AT.09		Cardoltriene [119]	
	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, $J = 2,5$ Hz)	107,9	6,29 (1H, m)	108,8	6,24 (1H, d, $J = 1,8$ Hz)	108,1

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, $J = 8,5$ Hz)	129,1		
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

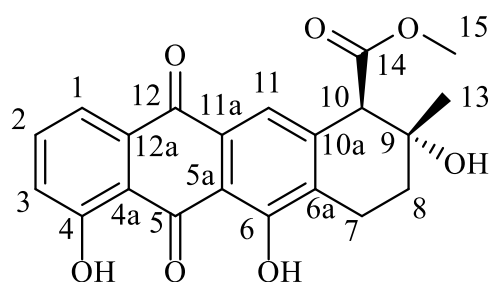
3.2.5.3. Chất **AT.10**

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**

Hợp chất **AT.11** được phân lập dưới dạng chất rắn, màu cam. Công thức phân tử của hợp chất **AT.11** là C₂₁H₁₈O₇ được xác nhận qua pic ion giả phân tử tại m/z 382,1053 (tính toán lý thuyết cho C₂₁H₁₈O₇ 382,1059 [M]) trong phổ khối HR-ESI-MS.

Phổ ¹H-NMR xuất hiện 2 tín hiệu proton của nhóm hydroxyl tại δ_H 12,09 (1H, s), 12,51 (1H, s), tín hiệu proton của vòng thơm tại δ_H 7,83 (1H, dd, $J = 7,5, 1,0$ Hz, H-1), 7,67 (1H, t, $J = 8,0$ Hz, H-2), 7,64 (1H, s, H-11), 7,28 (1H, dd, $J = 8,0, 1,0$ Hz, H-3). Ngoài ra, xuất hiện 2 tín hiệu singlet của nhóm methyl tại δ_H 3,48 (3H, s, H-15), 1,42 (3H, s, H-13) và 5 tín hiệu proton của vòng no tại δ_H 3,91 (1H, s, H-10), 3,06 (1H, ddd, $J = 19,0, 6,5, 3,0$ Hz, H-7a), 2,90 (1H, m, H-7b), 2,32 (1H, m, H-8a), 1,92 (1H, m, H-8b).

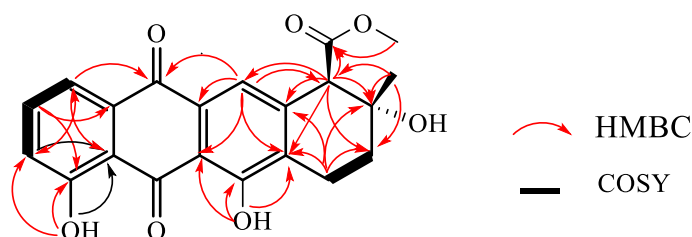


Hình 3.40. Cấu trúc hóa học của chất **AT.11**

Phổ ¹³C-NMR xuất hiện 21 tín hiệu carbon, trong đó hai tín hiệu carbonyl của vòng quinon tại δ_C 192,8 (C-5), 181,6 (C-12), một tín hiệu carbonyl của ester tại δ_C 171,6 (C-14), 12 tín hiệu carbon của vòng thơm tại δ_C 162,5 (C-4), 161,0 (C-6), 142,0 (C-10a), 137,1 (C-2), 133,7 (C-6a), 133,6 (C-12a), 130,7 (C-11a), 124,5 (C-3), 121,1 (C-11), 119,9 (C-1), 115,9 (C-4a), 113,6 (C-5a), bốn tín hiệu carbon của vòng no tại δ_C 69,6 (C-9), 57,5 (C-10), 30,8 (C-8), 20,1 (C-7) và hai tín hiệu methyl carbon tại δ_C 52,5 (C-15), 27,4 (C-13). Dữ liệu NMR cho thấy xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của hợp chất anthraquinone. Điều này cũng được xác nhận qua tương tác

COSY và HMBC. Tương tác COSY giữa H-1 (δ_H 7,83)/H-2 (δ_H 7,67); H-2 (δ_H 7,67)/H-3 (δ_H 7,28); H-8a (δ_H 2,32)/H-7a (δ_H 3,06); H-8b (δ_H 1,92)/H-7b (δ_H 2,90). Phổ HMBC xuất hiện các tương tác giữa H-1 (δ_H 7,83) với C-3 (δ_C 124,5), C-4a (δ_C 115,9) và C-12 (δ_C 181,6); H-2 (δ_H 7,67) với C-4 (δ_C 162,5) và C-12a (δ_C 133,6); H-3 (δ_H 7,28) với C-1 (δ_C 119,9) và C-4a (δ_C 115,9); H-7a (δ_H 3,06) với C-6a (δ_C 133,7), C-8 (δ_C 30,8) và C-9 (δ_C 69,6); H-7b (δ_H 2,90) với C-6a (δ_C 133,7), C-8 (δ_C 30,8) và C-10a (δ_C 142,0); H-10 (δ_H 3,91) với C-6a (δ_C 133,7), C-8 (δ_C 30,8), C-9 (δ_C 69,6), C-10a (δ_C 142,0), C-11 (δ_C 121,1) và C-14 (δ_C 171,6); H-11 (δ_H 7,64) với C-5a (δ_C 113,6), C-6a (δ_C 133,7), C-10 (δ_C 57,5), C-11a (δ_C 130,7) và C-12 (δ_C 181,6); H-13 (δ_H 1,42) với C-9 (δ_C 69,6), C-10 (δ_C 57,5) và C-8 (δ_C 30,8); H-15 (δ_H 3,48) với C-14 (δ_C 171,6). Ngoài ra, tương tác giữa 4-OH (δ_H 12,09) với C-3 (δ_C 124,5), C-4 (δ_C 162,5) và C-4a (δ_C 115,9); 6-OH (δ_H 12,51) với C-5a (δ_C 113,6), C-6 (δ_C 161,0) và C-6a (δ_C 133,7) cho thấy hai nhóm hydroxyl được gắn vào vòng thơm tại vị trí C-4 và C-6. Cấu trúc tương đối của hợp chất **AT.11** được xác định qua tương tác trong phổ NOESY giữa H-1 (δ_H 7,83)/H-2 (δ_H 7,67); H-2 (δ_H 7,67)/H-3 (δ_H 7,28); H-8a (δ_H 2,32)/H-7a (δ_H 3,06); H-8b (δ_H 1,92)/H-7b (δ_H 2,90); H-8a (δ_H 2,32)/H-13 (δ_H 1,42); H-10/H-11 (δ_H 7,64), H-13 (δ_H 1,42).

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 [122]). Hợp chất này có hoạt tính kháng khuẩn đối với chủng *Bacillus subtilis*, *Streptomyces viridochromogene*, *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli* với giá trị MIC khoảng 20 $\mu\text{g/mL}$ [123].



Hình 3.41. Tương tác HMBC và COSY của hợp chất **AT.11**

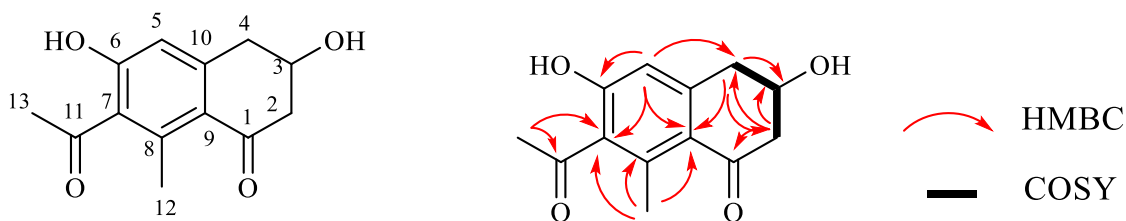
Bảng 3.8. Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của **AT.11** so với 7-deoxyauramycinone [122]

Vị trí	AT.11		7-deoxyauramycinone [122]	
	δ_H (ppm) ^a	δ_C (ppm) ^b	δ_H (ppm) ^c	δ_C (ppm) ^d
1	7,83 (dd, $J = 7,5, 1,0$ Hz)	119,9	7,80 (dd, $J = 7,5, 1,1$ Hz)	120,2
2	7,67 (t, $J = 8,0$ Hz)	137,1	7,66 (dd, $J = 8,4, 7,4$ Hz)	137,3
3	7,28 (dd, $J = 8,0, 1,0$ Hz)	124,5	7,27 (dd, $J = 8,4, 1,1$ Hz)	124,8

4		162,5		162,7
4-OH	12,09 (s)		12,08 (s)	
4a		115,9		116,2
5		192,8		193,1
5a		113,6		113,8
6		161,0		161,2
6-OH	12,51 (s)		12,50 (s)	
6a		133,7		133,8
7	3,06 (ddd, $J = 19,0, 6,5, 3,0$ Hz) 2,90 (m)	20,1	3,03 (ddd, $J = 19,1, 6,7, 3,0$ Hz) 2,86 (ddd, $J = 18,7, 10,3, 6,9$ Hz)	20,4
8	2,32 (m) 1,92 (m)	30,8	2,31 (m) 1,90 (ddd, $J = 13,4, 6,7, 1,1$ Hz)	31,1
9		69,6		69,9
10	3,91 (s)	57,5	3,89 (s)	57,7
10a		142,0		142,2
11	7,64 (s)	121,1	7,62 (s)	121,4
11a		130,7		131,0
12		181,6		181,9
12a		133,6		134,0
13	1,42 (s)	27,4	1,40 (s)	27,7
14		171,6		171,9
15	3,48 (s)	52,5	3,73 (s)	52,8

^a500 MHz, CDCl₃; ^b125 MHz, CDCl₃; ^c600 MHz, CDCl₃; ^d150 MHz, CDCl₃

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. Công thức phân tử của hợp chất này là C₁₃H₁₄O₄ được xác định qua pic ion giả phân tử tại m/z

235,0960 (tính toán lý thuyết cho $C_{13}H_{15}O_4$ 235,0970 $[M+H]^+$), 257,0783 (tính toán lý thuyết cho $C_{13}H_{14}O_4Na$ 257,0790 $[M+Na]^+$), 233,0827 (tính toán lý thuyết cho $C_{13}H_{13}O_4$ 233,0814 $[M-H]^-$) trong phổ HR-ESI-MS.

Phổ 1H -NMR xuất hiện một tín hiệu proton của vòng thơm tại δ_H 6,73 (1H, s, H-5), một tín hiệu của nhóm oxymethine tại δ_H 4,42 (1H, m, H-3), hai tín hiệu proton methylene tại δ_H 3,18 (1H, dd, $J = 16,5, 4,0$ Hz, H-4a), 2,98 (1H, dd, $J = 16,5, 7,5$ Hz, H-4b), 2,95 (1H, dd, $J = 15,5, 3,0$ Hz, H-2a), 2,72 (1H, dd, $J = 15,5, 3,0$ Hz, H-2b) và hai nhóm methyl tại δ_H 2,77 (3H, s, H-12), 2,62 (3H, s, H-13). Trên phổ ^{13}C -NMR cho thấy hai tín hiệu của nhóm carbonyl tại δ_C 207,0 (C-11), 196,3 (C-1), 6 tín hiệu carbon vòng thơm tại δ_C 162,0 (C-6), 147,5 (C-10), 144,9 (C-8), 130,5 (C-7), 125,0 (C-9), 116,2 (C-5), một tín hiệu carbon oximethin tại δ_C 65,8 (C-3), hai carbon methylen tại δ_C 49,3 (C-2), 39,7 (C-4) và hai tín hiệu nhóm methyl tại δ_C 32,7 (C-13), 22,5 (C-12).

Sự gán kết các tín hiệu phổ 1H và ^{13}C -NMR được khẳng định dựa trên các tương tác xuất hiện trên phổ HSQC, COSY và HMBC. Phổ COSY cho thấy tương tác giữa H-2b (δ_H 2,72)/H-3 (δ_H 4,42); H-3 (δ_H 4,42)/H-4a (δ_H 3,18), H-4b (δ_H 2,98). Tương tác HMBC giữa H-2a (δ_H 2,95) với C-3 (δ_C 65,8) và C-4 (δ_C 39,7); H-2b (δ_H 2,72) với C-1 (δ_C 196,3), C-3 (δ_C 65,8) và C-4 (δ_C 39,7); H-4b (δ_H 2,98) với C-2 (δ_C 49,3), C-3 (δ_C 65,8) và C-9 (δ_C 125,0); H-5 (δ_H 6,73) với C-4 (δ_C 39,7), C-6 (δ_C 162,0) và C-9 (δ_C 125,0); H-12 (δ_H 2,77) với C-8 (δ_C 144,9) và C-9 (δ_C 125,0); H-13 (δ_H 2,62) với C-11 (δ_C 207,0). Ngoài ra, tương tác giữa H-5 (δ_H 6,73) với C-7 (δ_C 130,5); H-12 (δ_H 2,77) với C-7 (δ_C 130,5) và H-13 (δ_H 2,62) với C-7 (δ_C 130,5) cho thấy nhóm acetyl chỉ được gán ở vị trí C-7. Dữ liệu phổ NMR cho thấy các tín hiệu đặc trưng của khung tetralone. 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 [124]. Hợp chất này đã được phân lập từ xạ khuẩn *Micromonospora* sp. SA246 và có hoạt tính ức chế quá trình peroxy hóa lipid với giá trị IC_{50} là 1,89 $\mu g/mL$ [124].

Bảng 3.9. Dữ liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR của chất AT.12 và 7-acetyl-3,6-dihydroxy-8-methyl tetralone [124]

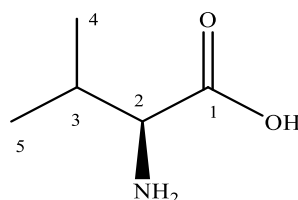
C	AT.12		7-acetyl-3,6-dihydroxy-8-methyl tetralone [124]	
	δ_H (ppm) ^a	δ_C (ppm) ^b	δ_H (ppm) ^c	δ_C (ppm) ^d
1		196,3		197,3
2	2,95 (1H, dd, $J = 15,5, 3,0$ Hz) 2,72 (1H, dd, $J = 15,5, 3,0$ Hz)	49,3	2,71 (1H, dd, $J = 16,0, 3,6$ Hz) 2,45 (1H, dd, $J = 16,0, 6,8$ Hz)	49,2
3	4,42 (1H, m)	65,8	4,15 (1H, m)	64,9

4	3,18 (1H, dd, $J = 16,5, 4,0$ Hz) 2,98 (1H, dd, $J = 16,5, 7,5$ Hz)	39,7	3,03 (1H, dd, $J = 16,0, 3,6$ Hz) 2,77 (1H, dd, $J = 16,0, 6,8$ Hz)	39,9
5	6,73 s	116,2	6,60 s	113,8
6		162,0		157,1
7		130,5		130,9
8		144,9		137,7
9		125,0		123,4
10		147,5		145,5
11		207,0		205,7
12	2,77 s	22,5	2,29 s	18,5
13	2,62 s	32,7	2,36	32,4

^a500 MHz, CDCl₃; ^b125 MHz, CDCl₃; ^cDMSO-*d*₆; ^dDMSO-*d*₆

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

Hợp chất **AT.13** được phân lập dưới dạng chất rắn, màu trắng. Công thức phân tử của hợp chất được xác định là C₅H₁₁NO₂ dựa vào pic ion giả phân tử tại m/z 115,8 [M-H]⁻ trên phổ (-)-ESI-MS. Phổ ¹H-NMR của chất **AT.13** xuất hiện một tín hiệu proton methine gắn với nhóm chức amin tại δ_H 3,32-3,40 (1H, m, H-2), một tín hiệu proton methine tại δ_H 2,27 (1H, m, H-3) và hai tín hiệu proton methyl tại δ_H 1,08 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, H-4), 1,03 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, H-5).



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

Phổ ¹³C-NMR và DEPT của chất **AT.13** xuất hiện 5 tín hiệu, bao gồm hai tín hiệu carbon methine với δ_C 61,8 (C-2), 31,0 (C-3), hai tín hiệu carbon methyl với δ_C 19,3 (C-4), 17,7 (C-5) và 1 tín hiệu của nhóm carboxyl với δ_C 180,3 (C-1).

Trên cơ sở phân tích dữ liệu phổ trên cho phép kết luận chất **AT.13** là valin (Acid 2-amino-3-methylbutanoic) [125]. Valin là một amino acid thiết yếu, tham gia quá trình tổng hợp protein.

Bảng 3.10. Dữ liệu phổ ¹H và ¹³C-NMR của chất **AT.13** và valin [125]

C	AT.13		Valin [125]
	δ_H (ppm) ^a	δ_C (ppm) ^b	δ_C (ppm) ^c
1		180,3	175,2
2	3,32-3,40 (1H, m)	61,8	61,2
3	2,27 (1H, m)	31,0	29,8

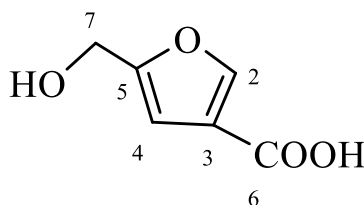
4	1,08 (3H, d, $J = 7,0$ Hz)	19,3	19,0
5	1,03 (3H, d, $J = 7,0$ Hz)	17,7	17,8

^a500 MHz, CD_3OD ; ^b125 MHz, CD_3OD ; ^c600 MHz, D_2O

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

Hợp chất **AT.14** được phân lập dưới dạng tinh thể hình kim, không màu. Phổ khối ESI-MS của hợp chất **AT.14** cho pic ion giả phân tử tại m/z 140,7 $[M-H]^+$. Trên phổ 1H -NMR xuất hiện hai tín hiệu tại δ_H 7,95 (1H, s, H-2), 6.51 (1H, s, H-4) và một nhóm oximethylen tại δ_H 4,42 (2H, s, H-7). Phổ ^{13}C -NMR xuất hiện tín hiệu của một nhóm carbonyl tại δ_C 177,2 (C-6); tín hiệu của bốn carbon vòng thơm tại δ_C 170,2 (C-5), 147,4 (C-3), 141,0 (C-2) và 110,6 (C-4); và một carbon oximethylen tại δ_C 61,2 (C-7). So sánh với tài liệu tham khảo, cho phép kết luận chất **AT.14** là dẫn xuất của vòng furan [126]. Phổ NMR của chất **AT.14** hoàn toàn trùng khớp với 5-hydroxymethylfuran-3-carboxylic acid hay flufuran. Flufuran được phân lập lần đầu tiên từ chủng nấm *Polyporus arcularius* [126]. Flufuran thể hiện hoạt tính kháng nấm đối với chủng *Phytophthora cinnamomi* và *P. nicotianae*. Hợp chất này còn thể hiện hoạt tính ức chế enzyme monoamine oxidase (MAO), một enzym có liên quan đến các bệnh về thần kinh như trầm cảm, parkison [127, 128].



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

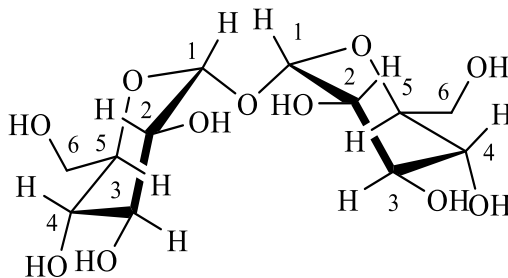
Bảng 3.11. Dữ liệu phổ của 1H -NMR, ^{13}C -NMR của **AT.14** so với flufuran [126]

C	AT.14		Flufuran [126]	
	δ_H (ppm) ^a	δ_C (ppm) ^b	δ_H (ppm) ^a	δ_C (ppm) ^b
2	7,95 (1H, s)	141,0	7,94 (1H, s)	141,0
3		147,4		147,4
4	6,51 (1H, s)	110,6	6,49 (1H, br t; $J = 0,5$ Hz)	110,8
5		170,2		170,4
6		177,2		176,9
7	4,42 (2H, s)	61,2	4,40 (2H, br d; $J = 0,5$ Hz)	61,2

^a500 MHz, CD_3OD ; ^b125 MHz, CD_3OD

3.2.8.2. Chất **AT.15**

Hợp chất **AT.15** được phân lập dưới dạng chất rắn, màu trắng. Phổ khối ESI-MS của hợp chất này cho pic ion giả phân tử tại m/z 364,9 $[M+Na]^+$. Trên phổ 1H -NMR của chất **AT.15** cho thấy tín hiệu proton anomer tại δ_H 5,14 (d, $J = 3,5$ Hz) với hằng số tương tác nhỏ (3.5 Hz), cho thấy đây là một đường α -glucoside. Ngoài ra, các tín hiệu proton của đường glucose được quan sát thấy tại δ_H 3,84 (m), 3,70 (m), 3,49 (dd, $J = 10,0, 3,5$ Hz), 3,33 (m). Phổ ^{13}C -NMR xuất hiện các tín hiệu carbon tại 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). 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 [129]. Trehalose là một disaccharide bao gồm hai phân tử đường α -glucoside qua liên kết α,α -1,1-glycoside [129]. Trehalose được sinh ra trong quá trình sinh tổng hợp của *M. smegmatis* và *M. tuberculosis*. Trehalose rất cần thiết cho sự phát triển và tồn tại của vi khuẩn [129].



Hình 3.45. Cấu trúc hóa học của hợp chất **AT.15**

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

3.3.1. Hoạt tính kháng chủng *Mycobacterium smegmatis*

Hợp chất **AT.01** và **AT.02** được đánh giá về hoạt tính kháng khuẩn đối với chủng *M. smegmatis*. Do *M. smegmatis* có tính an toàn, không gây bệnh và thân thiện với môi trường nên vi khuẩn này được sử dụng thay thế cho vi khuẩn lao *M. tuberculosis* trong nghiên cứu của chúng tôi [130-132]. Không giống với các loài vi khuẩn *Mycobacterium* khác, *M. smegmatis* phát triển rất nhanh trong phòng thí nghiệm nuôi cấy tế bào và không sống ở động vật có vú [130-132]. Do đó, vi khuẩn này không gây bệnh cho người [130-132]. Ngoài ra, *M. smegmatis* chứa các trình tự gen tương đồng với vi khuẩn lao *M. tuberculosis* [130, 131]. Đó đó, *M. smegmatis* được sử dụng rộng rãi trong các xét nghiệm hoạt tính kháng khuẩn [133-140]. 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* (Bảng 3.12). Chartreusin được báo cáo là có hoạt tính kháng khuẩn tiềm năng đối với chủng *Mycobacterium tuberculosis* 607 và *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv [80]. 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*.

Bảng 3.12. Hoạt tính kháng khuẩn M. smegmatis của hợp chất AT.01 và AT.02

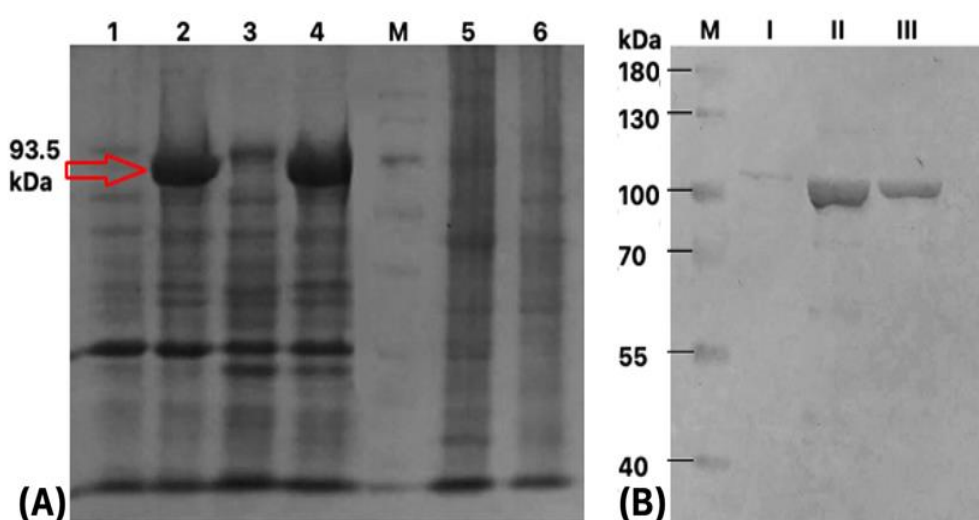
Hợp chất	<i>M. smegmatis</i> *
AT.01	0
AT.02	15 ± 1,0
Rufomycin	12 ± 1,0

*: Đường kính vòng vô khuẩn (mm)

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

Việc tinh sạch protein tái tổ hợp bằng cột tinh sạch Ni-TED được thực hiện nhanh chóng, dễ dàng và phù hợp với các thí nghiệm tổng hợp protein trong quy mô phòng thí nghiệm [141]. 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.

Điều này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu từ trước đến nay đã chỉ ra ClpC1 là một dạng protein nội bào đảm nhiệm chức năng quan trọng trong việc kiểm duyệt và loại bỏ các protein hoặc phân tử không còn cần thiết, giúp duy trì sự ổn định và hoạt động hiệu quả của các protein khác trong tế bào vi khuẩn. Protein tái tổ hợp ClpC1 có trọng lượng phân tử xấp xỉ 93,5 kDa (hình 3.46).

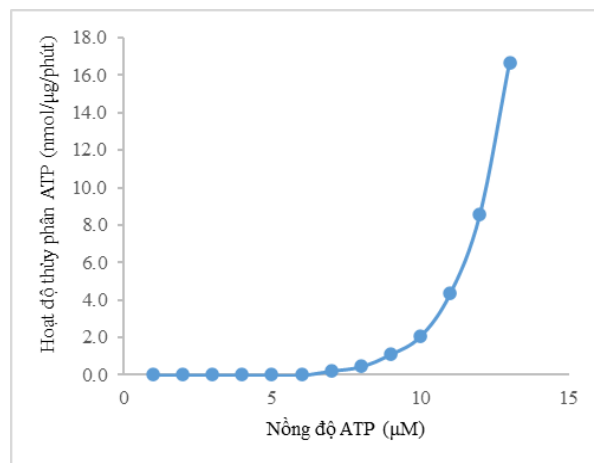


Hình 3.46. Các phân đoạn rửa Protein tái tổ hợp ClpC1. M: Maker; 1: phân đoạn rửa lần 3; 2: phân đoạn rửa lần 2; 3: phân đoạn rửa lần 1; 4: phân đoạn ptotein tổng số chưa qua cột; 5, 6: Phân đoạn rửa giải; I, II, III: Phân đoạn ptotein tổng số sau khi qua cột

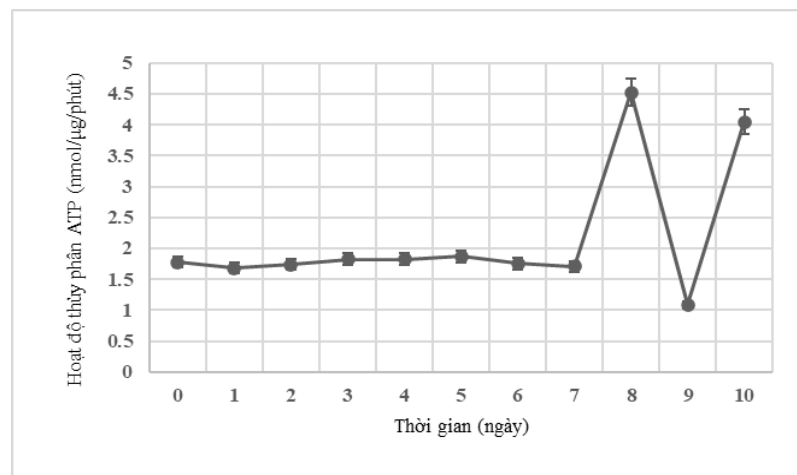
Hoạt tính thủy phân ATP (Adenosin triphosphat) và mức độ ổn định của protein tái tổ hợp ClpC1 được tiến hành kiểm tra và theo dõi trong suốt thí nghiệm.

Hoạt độ thủy phân ATP của tế bào được xác định bằng phương pháp đo lượng phosphate (Pi) giải phóng ra. Khi enzym ATPase thủy phân ATP thành ADP (Adenosin diphosphat) và Pi thì Pi sẽ được giải phóng. Lượng Pi này có thể được đo bằng cách sử dụng phản ứng hoá học với chất chỉ thị BIOMOL® Green [142]. Đây là phương pháp đơn giản, dễ thực hiện và chi phí thấp cho phép xác định hàm lượng nhỏ Pi. 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 (Hình 3.47). Do đó, để xác định hoạt tính ATPase cũng như ảnh hưởng của các chất sạch đến hoạt tính ATPase của ClpC1, các thí nghiệm được thực hiện với nồng độ ATP 100 μ M.

Sau khi tinh sạch, protein tái tổ hợp ClpC1 được tiến hành kiểm tra tính ổn định của hoạt tính thủy phân ATP. Từ hình 3.48 cho thấy hoạt tính thủy phân ATP ổn định trong 7 ngày. Sau ngày thứ 7, hoạt độ ATPase không còn ổn định.

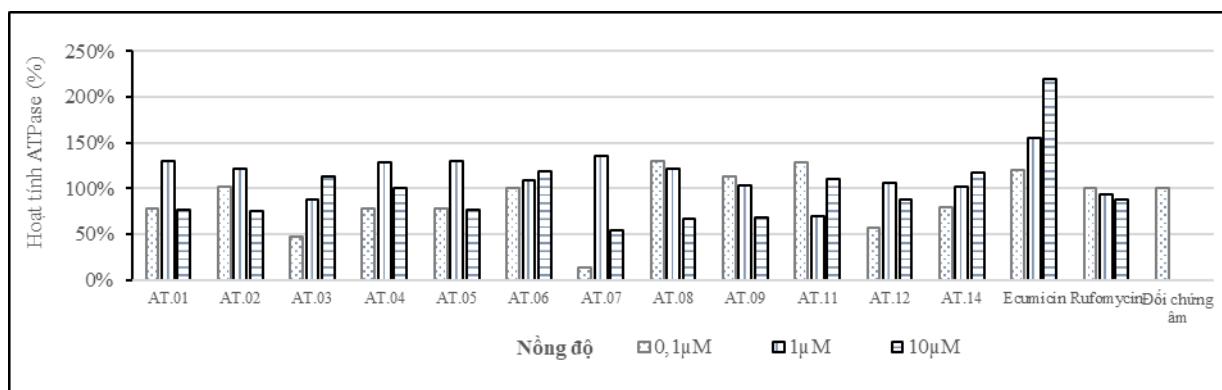


Hình 3.47. Hoạt độ thủy phân ATP của Protein tái tổ hợp ClpC1 theo nồng độ ATP



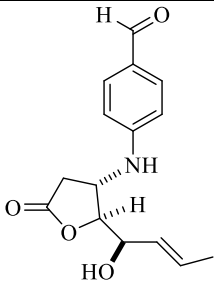
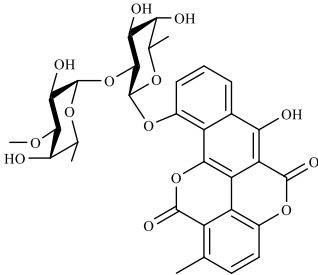
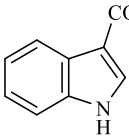
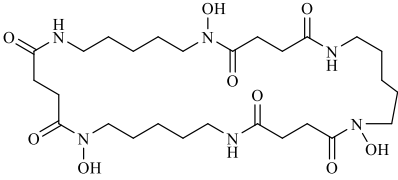
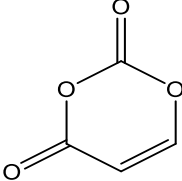
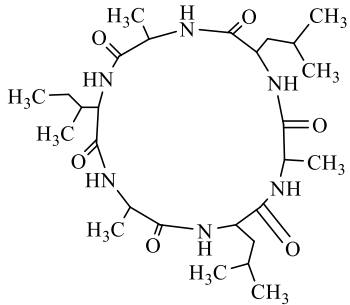
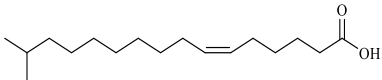
Hình 3.48. Hoạt độ thủy phân ATP của protein tái tổ hợp ClpC1 theo ngày

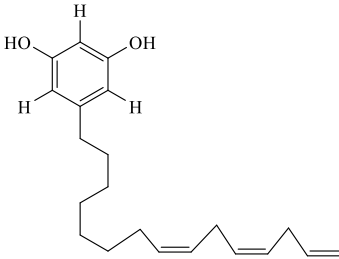
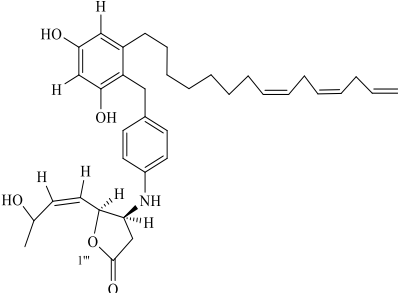
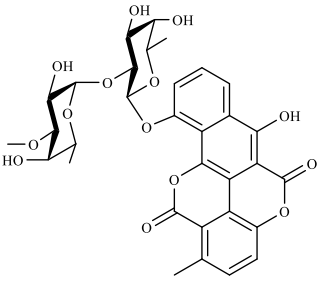
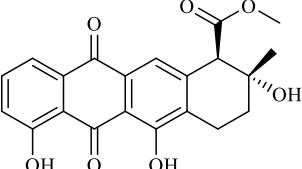
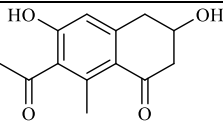
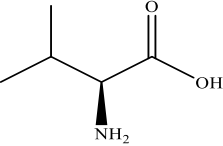
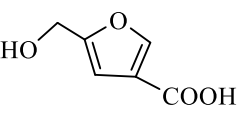
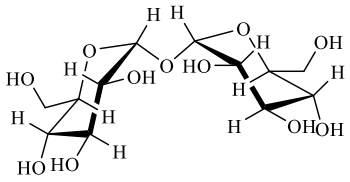
Các tài liệu đã công bố cho thấy ecumicin và rufomycin là hai loại kháng sinh có đích tác động tới protein ClpC1 của vi khuẩn *Mycobacterium tuberculosis* bằng cách ảnh hưởng đến chức năng thủy phân ATP của nó [28, 143, 144]. Các hợp chất kháng sinh này tác động tới protein ClpC1 theo các hướng khác nhau. Khi nồng độ của ecumicin tăng sẽ tác động tới protein ClpC1 thông qua việc tăng hoạt độ ATPase của protein này [28, 143, 144]. Ngược với ecumicin, rufomycin tác động tới protein ClpC1 theo hướng giảm hoạt tính của ATPase [28, 143, 144]. Do đó, 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 μ M, 1.0 μ M và 10.0 μ M) 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 μ M 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 3.49. Kết quả đánh giá tác động của các hợp chất lên ATPase của ClpC1

Bảng 3.13. Tổng kết các hợp chất phân lập được từ các chủng xạ khuẩn nghiên cứu

TT	Chủng xạ khuẩn	Kí hiệu	Tên chất	Công thức cấu tạo	Hoạt tính sinh học
1	<i>Streptomyces alboniger</i> VH19-A121	AT.01	Obscurolide B _{2β}		
		AT.02	Chartreusin		Hoạt tính kháng <i>M. smegmatis</i>
2	<i>Streptomyces wuyuanensis</i> VH19-A079	AT.03	Indole-3-carboxylic acid		Tác động tới protein tái tổ hợp ClpC1
3	<i>Streptomyces aureus</i> VTCC43181	AT.04	Nocardamin		
		AT.05	Pleurone		
		AT.06	Halolitoralin A		Tác động tới protein tái tổ hợp ClpC1
4	<i>Streptomyces spiroverticillatus</i>	AT.07	(6Z)-15-methyl-6-hexadecenoic acid		

	VH19-A067				
5	<i>Streptomyces alboniger</i> VH19-A105B	AT.08	Cardoltriene		Tác động tới protein tái tổ hợp ClpC1
		AT.09	Cardoltriene M (chất mới)		Tác động tới protein tái tổ hợp ClpC1
		AT.10	Chartreusin		
		AT.11	7-deoxyauramycinone		
6	<i>Streptomyces cyaneus</i> VTCC43860	AT.12	7-acetyl-3,6-dihydroxy-8-methyl tetralone		
7	<i>Streptomyces</i> sp. VTCC43168	AT.13	Valin		
8	<i>Actinoplanes missouriensis</i> VTCC40900	AT.14	Flufuran		Tác động tới protein tái tổ hợp ClpC1
		AT.15	Trehalose		

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_{2β} (**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.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

1. **Huynh Thi Ngọc 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 Ngọc 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 Ngọc 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)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. McIntosh J., 2015, Tuberculosis: Causes, Symptoms, and Treatments, *Medical News Today*.
- [2]. Bagcchi S., 2023, WHO's global tuberculosis report 2022, *The Lancet Microbe*, 4(1), p. e20. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00359-7](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00359-7).
- [3]. Wortberg A., Perscheid G., Moormann J., Luan N.Q. Vo, 2023, Towards the Design of a Gamified Application to Increase Tuberculosis Treatment Adherence in Vietnam, *Proceedings of the 56th Hawaii International Conference on System Sciences*, pp. 3146-55. <https://hdl.handle.net/10125/103018>.
- [4]. WHO, 2021, Tuberculosis Report 2021, *Geneva: World Health Organization*.
- [5]. World Health Organization, 2022, Global Tuberculosis report 2022. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061729>.
- [6]. Ngoc N.B., Dinh H.V., Thuy N.T., Quang D.V., Huyen C.T.T., Hoa N.M., Anh N.H., Dat P.T., Hoa N.B., Tiemersma E., Nhung N.V., 2021, Active surveillance for adverse events in patients on longer treatment regimens for multidrug-resistant tuberculosis in Viet Nam, *Plus one*, 16(9), p. e0255357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255357>.
- [7]. Redwood L., Fox G.J., Nguyen T.A., Bernarys S., Mason P., Vu V.A., Nguyen V.N., Mitchell E.M.H., 2022, Good citizens, perfect patients, and family reputation: Stigma and prolonged isolation in people with drug-resistant tuberculosis in Vietnam, *PLOS Glob. Public Health*, 2(6), p. e0000681. <https://doi.org/10.1371/journal.pgph.0000681>.
- [8]. Ryan N.J., Lo J.H., 2014, Delamanid: first global approval, *Drugs*, 74(9), pp. 1041-5. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0241-5>.
- [9]. Mahajan R., 2013, Bedaquiline: First FDA-approved tuberculosis drug in 40 years, *Int. J. Appl. Basic Med.*, 3, pp. 1-2. 10.4103/2229-516X.112228.
- [10]. Somoskovi A., Bruderer V., Hömke R., Bloemberg G.V., Böttger E.C., 2015, A mutation associated with clofazimine and bedaquiline cross-resistance in MDR-TB following bedaquiline treatment, *Eur. Respir. J.*, 45(2), pp. 554-7. 10.1183/09031936.00142914.
- [11]. Newman D.J., Cragg G.M., 2020, Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019, *J. Nat. Prod.*, 83(3), pp. 770-803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.
- [12]. Sharma M., Dangi P., Choudhary M., Sciences A., 2014, Actinomycetes: source, identification, and their applications, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 3(2), pp. 801-32.

- [13]. Ilic S., Konstantinovic S., Todorovic Z., Lazic M., Veljkovic V., Jokovic N., Radovanovic B., 2007, Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in streptomycete isolates, *Microbiology*, 76(4), pp. 421-8.
- [14]. van der Heul H.U., Bilyk B.L., McDowall K.J., Seipke R.F., van Wezel G.P., 2018, Regulation of antibiotic production in Actinobacteria: new perspectives from the post-genomic era, *Nat. Prod. Rep.*, 35(6), pp. 575-604.
- [15]. Hoshino S., Onaka H., Abe I., 2019, Activation of silent biosynthetic pathways and discovery of novel secondary metabolites in actinomycetes by co-culture with mycolic acid-containing bacteria, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 46(3-4), pp. 363-74.
- [16]. Marmann A., Aly A.H., Lin W., Wang B., Proksch P., 2014, Co-cultivation—a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms, *Mar. Drugs*, 12(2), pp. 1043-65.
- [17]. Peng X.-Y., Wu J.-T., Shao C.-L., Li Z.-Y., Chen M., Wang C.-Y., 2021, Co-culture: Stimulate the metabolic potential and explore the molecular diversity of natural products from microorganisms, *Mar. Life Sci. Technol.*, pp. 1-12.
- [18]. Arbex M.A., Varella M.d.C.L., Siqueira H.R.d., Mello F.A.F.d., 2010, Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations-part 2: second line drugs, *J. Bras. Pneumol.*, 36(5), pp. 641-56.
- [19]. Stover C.K., Warrenner P., VanDevanter D.R., Sherman D.R., Arain T.M., Langhorne M.H., Anderson S.W., Towell J.A., Yuan Y., McMurray D.N., 2000, A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis, *Nature*, 405(6789), pp. 962-6. <https://doi.org/10.1038/35016103>.
- [20]. Matsumoto M., Hashizume H., Tomishige T., Kawasaki M., Tsubouchi H., Sasaki H., Shimokawa Y., Komatsu M., 2006, OPC-67683, a nitro-dihydroimidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice, *PLoS Med.*, 3(11), p. e466. 10.1371/journal.pmed.0030466.
- [21]. Falzari K., Zhu Z., Pan D., Liu H., Hongmanee P., Franzblau S.G., 2005, In vitro and in vivo activities of macrolide derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrobial agents chemotherapy*, 49(4), pp. 1447-54.
- [22]. Braña A.F., Sarmiento-Vizcaíno A., Pérez-Victoria I., Martín J., Otero L., Palacios-Gutiérrez J.J., Fernández J., Mohamedi Y., Fontanil T., Salmón M., 2019, Desertomycin G, a New Antibiotic with Activity against *Mycobacterium tuberculosis* and Human Breast Tumor Cell Lines Produced by *Streptomyces althoticus* MSM3, Isolated from the Cantabrian Sea Intertidal Macroalgae *Ulva* sp, *Mar. Drugs*, 17(2), p. 114.

- [23]. Hussain A., Rather M.A., Bhat Z.S., Majeed A., Maqbool M., Shah A.M., Aga M.A., Shah A., Mushtaq S., Sangwan P.L., 2019, *In vitro* evaluation of dinactin, a potent microbial metabolite against *Mycobacterium tuberculosis*, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 53(1), pp. 49-53.
- [24]. Schmitt E.K., Riwanto M., Sambandamurthy V., Roggo S., Miault C., Zwingelstein C., Krastel P., Noble C., Beer D., Rao S.P., 2011, The natural product cyclomarin kills *Mycobacterium tuberculosis* by targeting the ClpC1 subunit of the caseinolytic protease, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 123(26), pp. 6011-3.
- [25]. Gavrish E., Sit C.S., Cao S., Kandror O., Spoering A., Peoples A., Ling L., Fetterman A., Hughes D., Bissell A., 2014, Lassomycin, a ribosomally synthesized cyclic peptide, kills *Mycobacterium tuberculosis* by targeting the ATP-dependent protease ClpC1P1P2, *Chem. Biol.*, 21(4), pp. 509-18.
- [26]. Gao W., Kim J.-Y., Chen S.-N., Cho S.-H., Choi J., Jaki B.U., Jin Y.-Y., Lankin D.C., Lee J.-E., Lee S.-Y., 2014, Discovery and characterization of the tuberculosis drug lead ecumicin, *Organic letters*, 16(23), pp. 6044-7.
- [27] Lee H., Suh J.-W., 2016, Anti-tuberculosis lead molecules from natural products targeting *Mycobacterium tuberculosis* ClpC1, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 43(2-3), pp. 205-12. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1709-3>.
- [28]. Choules M.P., Wolf N.M., Lee H., Anderson J.R., Grzelak E.M., Wang Y., Ma R., Gao W., McAlpine J.B., Jin Y.-Y., 2019, Rufomycin targets ClpC1 proteolysis in *Mycobacterium tuberculosis* and *M. abscessus*, *Antimicrobial agents chemotherapy*, 63(3), pp. e02204-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.02204-18>.
- [29]. Adeniji A.A., Knoll K.E., 2020, Potential anti-TB investigational compounds and drugs with repurposing potential in TB therapy: A conspectus, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 104(13), pp. 5633-62.
- [30]. Kling A., Lukat P., Almeida D.V., Bauer A., Fontaine E., Sordello S., Zaburannyi N., Herrmann J., Wenzel S.C., König C., 2015, Targeting DnaN for tuberculosis therapy using novel griselimycins, *Sci.*, 348(6239), pp. 1106-12.
- [31]. Herrmann J., Rybníček J., Müller R., 2017, Novel and revisited approaches in antituberculosis drug discovery, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 48, pp. 94-101.
- [32]. Chen C., Song F., Wang Q., Abdel-Mageed W.M., Guo H., Fu C., Hou W., Dai H., Liu X., Yang N., biotechnology, 2012, A marine-derived *Streptomyces* sp. MS449 produces high yield of actinomycin X 2 and actinomycin D with potent anti-tuberculosis activity, *Appl. Microbiol.*, 95(4), pp. 919-27.
- [33]. El Sayed K.A., Bartyzel P., Shen X., Perry T.L., Zjawiony J.K., Hamann M.T., 2000, Marine natural products as antituberculosis agents, *Tetrahedron*, 56(7),

pp. 949-53.

[34]. Ashforth E.J., Fu C., Liu X., Dai H., Song F., Guo H., Zhang L., 2010, Bioprospecting for antituberculosis leads from microbial metabolites, *Nat. Prod. Rep.*, 27(11), pp. 1709-19.

[35]. Cui J., Kim E., Moon D.H., Kim T.H., Kang I., Lim Y., Shin D., Hwang S., Du Y.E., Song M.C., 2022, Taeanamides A and B, Nonribosomal Lipodecapeptides Isolated from an Intertidal-Mudflat-Derived *Streptomyces* sp., *Mar. Drugs*, 20(6), p. 400. <https://doi.org/10.3390/md20060400>.

[36]. Mullooney M.W., Hwang C.H., Newsome A.G., Wei X., Tanouye U., Wan B., Carlson S., Barranis N.J., Ó hAinmhire E.n., Chen W.-L., 2015, Diazaanthracene antibiotics from a freshwater-derived actinomycete with selective antibacterial activity toward *Mycobacterium tuberculosis*, *ACS Infect. Dis.*, 1(4), pp. 168-74.

[37]. Pérez-Bonilla M., Oves-Costales D., De la Cruz M., Kokkini M., Martín J., Vicente F., Genilloud O., Reyes F., 2018, Phocoenamicins B and C, new antibacterial spirotetronates isolated from a marine *Micromonospora* sp, *Mar. Drugs*, 16(3), p. 95.

[38]. Tuấn C.Đ., Hiệu T.V., Hương Đ.T.M., Quyên V.T., Murphy B., Minh C.V., Cường P.V., 2016, Các hợp chất thứ cấp từ chủng xạ khuẩn biển *Micromonospora* sp.(G043), *Vietnam J. Chem.*, 54(5), p. 581.

[39]. Hesseltine C., Porter J., Deduck N., Hauck M., Bohonos N., Williams J., 1954, A new species of *Streptomyces*, *Mycol.*, 46(1), pp. 16-23. <https://doi.org/10.1080/00275514.1954.12024337>.

[40]. Natsume M., Yasui K., Kondo S., Marumo S.J.T.I., 1991, The structures of four new pamamycin homologues isolated from *Streptomyces alboniger*, *Tetrahedron Lett.*, 32(26), pp. 3087-90.

[41]. Kondo S., Yasui K., Natsume M., Katayama M., Marumo S., 1988, Isolation, physico-chemical properties and biological activity of pamamycin-607, an aerial mycelium-inducing substance from *Streptomyces alboniger*, *J. Antibiot.*, 41(9), pp. 1196-204.

[42]. Yan X., Zhang B., Tian W., Dai Q., Zheng X., Hu K., Liu X., Deng Z., Qu X.J.S., 2018, Puromycin A, B and C, cryptic nucleosides identified from *Streptomyces alboniger* NRRL B-1832 by PPtase-based activation, *Synth. Syst. Biotechnol.*, 3(1), pp. 76-80.

[43]. Porter J., Hewitt R., Hesseltine C., Krupka G., Lowery J., Wallace W., Bohonos N., Williams J.J.A., 1952, Achromycin: a new antibiotic having

trypanocidal properties, *Antibiot. Chemother.*, 2(8), pp. 409-10.

- [44]. Luo N., Yang Y.-B., Yang X.-Q., Miao C.-P., Li Y.-Q., Xu L.-H., Ding Z.-T., Zhao L.-X., 2018, The streptazolin-and obscurolide-type metabolites from soil-derived *Streptomyces alboniger* YIM20533 and the mechanism of influence of γ -butyrolactone on the growth of *Streptomyces* by their non-enzymatic reaction biosynthesis, *RSC Adv.*, 8(61), pp. 35042-9. <https://doi.org/10.1039/C8RA06690F>.
- [45]. Zhang X., Zhang J., Zheng J., Xin D., Xin Y., Pang H., 2013, *Streptomyces wuyuanensis* sp. nov., an actinomycete from soil, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63(Pt_8), pp. 2945-50. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.047050-0>.
- [46]. Stapley E.O., Hendlin D., Jackson M., Miller A.K., Hernandez S., Mata J.M., 1971, Azirinomycin. I Microbial production and biological characteristics, *J. Antibiot.*, 24(1), pp. 42-7. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.24.42>.
- [47]. Sripreechasak P., Suwanborirux K., Tanasupawat S., 2014, Characterization and antimicrobial activity of *Streptomyces* strains from soils in southern Thailand, *J. Appl. Pharm. Sci.*, 4(10), pp. 024-31. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2014.401005>.
- [48]. Ando K., Oishi H., Hirano S., Okutomi T., Suzuki K., Okazaki H., Sawada M., SAGAWA T., 1971, Tetranactin, a new miticidal antibiotic I. Isolation, characterization and properties of tetranactin, *J. Antibiot.*, 24(6), pp. 347-52. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.24.347>.
- [49]. Miller T.W., Tristram E.W., Wolf F.J., 1971, Azirinomycin. II Isolation and chemical characterization as 3-methyl-2 (2H) azirinecarboxylic acid, *J. Antibiot.*, 24(1), pp. 48-50. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.24.48>.
- [50]. Haneda M., Nawata Y., Hayashi T., Ando K., 1974, Tetranactin, a new miticidal antibiotic. VI Determination of dinactin, trinactin and tetranactin in their mixtures by NMR spectroscopy, *J. Antibiot.*, 27(7), pp. 555-7. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.27.555>.
- [51]. Callewaert D.M., Radcliff G., Tanouchi Y., Shichi H., 1988, Tetranactin, a macrotetrolide antibiotic, suppresses *in vitro* proliferation of human lymphocytes and generation of cytotoxicity, *Int. Immunopharmacol.*, 16(1), pp. 25-32. [https://doi.org/10.1016/0162-3109\(88\)90047-1](https://doi.org/10.1016/0162-3109(88)90047-1).
- [52]. Tanouchi Y., Shichi H., 1988, Immunosuppressive and anti-proliferative effects of a macrotetrolide antibiotic, tetranactin, *Immunol.*, 63(3), p. 471.
- [53]. Petříčková K., Pospíšil S., Kuzma M., Tylová T., Jágr M., Tomek P., Chroňáková A., Brabcová E., Anděra L., Křišťufek V., 2014, Biosynthesis of Colabomycin E, a New Manumycin-Family Metabolite, Involves an Unusual Chain-Length Factor, *ChemBioChem*, 15(9), pp. 1334-45. DOI:

10.1002/cbic.201400068.

- [54]. Wang W., Feng M., Li X., Chen F., Zhang Z., Yang W., Shao C., Tao L., Zhang Y., 2022, Antibacterial Activity of Aureonuclemycin Produced by *Streptomyces aureus* Strain SPRI-371, *Molecules*, 27(15), p. 5041. <https://doi.org/10.3390/molecules27155041>.
- [55]. Matsuura S., 1958, On *Streptomyces spiroverticillatus* nov.sp, *Botanical Society of Japan*, 71(837), pp. 87-93. <https://doi.org/10.15281/jplantres1887.71.87>.
- [56]. Cheng X.-C., Kihara T., Kusakabe H., Magae J., Kobayashi Y., Fang R.-P., Ni Z.-F., Shent Y.-C., Keido K., Yamaguchi I., 1987, A new antibiotic, tautomycin, *J. Antibiot.*, 40(6), pp. 907-9. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.40.907>.
- [57]. Oikawa M., Ueno T., Oikawa H., Ichihara A., 1995, Total synthesis of tautomycin, *J. Org. Chem.*, 60(16), pp. 5048-68. <https://doi.org/10.1021/jo00121a026>.
- [58]. Adler J.T., Cook M., Luo Y., Pitt S.C., Ju J., Li W., Shen B., Kunnimalaiyaan M., Chen H., 2009, Tautomycetin and tautomycin suppress the growth of medullary thyroid cancer cells via inhibition of glycogen synthase kinase-3 β , *Mol. Cancer Ther.*, 8(4), pp. 914-20. 10.1158/1535-7163.Mct-08-0712.
- [59]. Cheng X.-C., Kihara T., Kusakabe H., Fang R.-P., Ni Z.-F., Shen Y.-C., Ko K., Yamaguchi I., Isono K., 1987, Xanthostatin, a new antibiotic, *Agric. Biol. Chem.*, 51(1), pp. 279-81. <http://dx.doi.org/10.1080/00021369.1987.10867987>.
- [60]. Nogawa T., Okano A., Takahashi S., Uramoto M., Konno H., Saito T., Osada H., 2010, Verticilactam, a new macrolactam isolated from a microbial metabolite fraction library, *Org. Lett.*, 12(20), pp. 4564-7. <https://doi.org/10.1021/ol1018618>.
- [61]. Nogawa T., Terai A., Amagai K., Hashimoto J., Futamura Y., Okano A., Fujie M., Satoh N., Ikeda H., Shin-Ya K., 2020, Heterologous Expression of the Biosynthetic Gene Cluster for Verticilactam and Identification of Analogues, *J. Nat. Prod.*, 83(12), pp. 3598-605. <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00755>.
- [62]. Uyeda M., Yokomizo K., Ito A., Nakayama K., Watanabe H., Kido Y., 1997, A New Antiherpetic Agent, AH-1763 Ila, Produced by *Streptomyces cyaneus* Strain No. 1763, *J. Antibiot.*, 50(10), pp. 828-32. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.50.828>.
- [63]. Uchida T., Imoto M., Masuda T., Imamura K., Hatori Y., Sawa T., Naganawa H., Hamada M., Takeuchi T., Umezawa H., 1983, New antitumor antibiotics, ditrisarubicins A, B and C, *J. Antibiot.*, 36(8), pp. 1080-3. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.36.1080>.

- [64]. Shimosaka A., Hayakawa Y., Nakagawa M., Furihata K., Seto H., Otake N., 1987, Isolation of new anthracycline antibiotics, A447 C and D, *J. Antibiot.*, 40(1), pp. 116-21. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.40.116>.
- [65]. Ando T., Hirayama K., Takahashi R., Horino I., Etoh Y., Morioka H., Shibai H., Murai A., 1985, Cosmomycin D, a new anthracycline antibiotic, *Agric. Biol. Chem.*, 49(1), pp. 259-62. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.49.259>.
- [66]. Morioka H., Etoh Y., Horino I., Takezawa M., Ando T., Hirayama K., Kano H., Shibai H., 1985, Production and isolation of cosmomycins A, B, C and D: new differentiation inducers of friend cell F5-5, *Agric. Biol. Chem.*, 49(7), pp. 1951-8. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10867016>.
- [67]. Kim J., Lee Y.-J., Shin D.-S., Jeon S.-H., Son K.-H., Han D.C., Jung S.-N., Oh T.-K., Kwon B.-M., 2011, Cosmomycin C inhibits signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathways in MDA-MB-468 breast cancer cell, *Bioorg. Med. Chem.*, 19(24), pp. 7582-9. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.10.025>.
- [68]. Tsuge N., Mizokami M., Imai S., Shimazu A., Seto H., 1992, Adipostatins A and B, new inhibitors of glycerol-3-phosphate dehydrogenase, *J. Antibiot.*, 45(6), pp. 886-91. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.45.886>.
- [69]. Egert E., Noltemeyer M., Siebers J., Rohr J., Zeeck A., 1992, The structure of tetracenomycin C, *J. Antibiot.*, 45(7), pp. 1190-2. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.45.1190>.
- [70]. Couch J.N., 1963, Some new genera and species of the *Actinoplanaceae*, *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, 79(1), pp. 53-70.
- [71]. Debono M., Merkel K.E., Molloy R.M., Barnhart M., Presti E., Hunt A.H., Hamill R.L., 1984, Actaplanin, new glycopeptide antibiotics produced by *Actinoplanes missouriensis* the isolation and preliminary chemical characterization of actaplanin, *J. Antibiot.*, 37(2), pp. 85-95. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.37.85>.
- [72]. Hunt A.H., Debono M., Merkel K.E., Barnhart M., 1984, Structure of the pseudoaglycon of actaplanin, *J. Org. Chem.*, 49(4), pp. 635-40. <https://doi.org/10.1021/jo00178a011>.
- [73]. Bajaj D., Batra J.K., 2012, The C-terminus of ClpC1 of *Mycobacterium tuberculosis* is crucial for its oligomerization and function, *PloS one*, 7(12), p. e51261. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051261>.
- [74]. Taylor G., Frommherz Y., Katikaridis P., Layer D., Sinning I., Carroni M., Weber-Ban E., Mogk A., 2022, Antibacterial peptide CyclomarinA creates toxicity by deregulating the *Mycobacterium tuberculosis* ClpC1–ClpP1P2 protease, *J. Biol.*

Chem., 298(8). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102202>.

[75]. Kar N.P., Sikriwal D., Rath P., Choudhary R.K., Batra J.K., 2008, *Mycobacterium tuberculosis* ClpC1: Characterization and role of the N-terminal domain in its function, *FEBS J.*, 275(24), pp. 6149-58. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06738.x>.

[76]. Lee H., Suh J.-W., 2016, Anti-tuberculosis lead molecules from natural products targeting *Mycobacterium tuberculosis* ClpC1, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 43(2-3), pp. 205-12. DOI 10.1007/s10295-015-1709-3.

[77]. Kazmaier U., Junk L., 2021, Recent developments on the synthesis and bioactivity of ilamycins/rufomycins and cyclomarins, marine cyclopeptides that demonstrate anti-malaria and anti-tuberculosis activity, *Mar. Drugs*, 19(8), p. 446. <https://doi.org/10.3390/md19080446>.

[78]. Kumar G., 2023, Natural products and their analogues acting against *Mycobacterium tuberculosis*: A recent update, *Drug Dev. Res.*, 84(5), p. 779-804. <https://doi.org/10.1002/ddr.22063>.

[79]. Bhanot A., Lunge A., Kumar N., Kidwai S., Singh R., Sundriyal S., Agarwal N., 2023, Discovery of small molecule inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* ClpC1: SAR studies and antimycobacterial evaluation, *Results Chem.*, 5, p. 100904. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.100904>.

[80]. Leach B.E., Calhoun K.M., Johnson L.E., Teeters C.M., Jackson W.G., 1953, Chartreusin, a new antibiotic produced by *Streptomyces chartreusis*, a new species, *J. Am. Chem. Soc.*, 75(16), pp. 4011-2. <https://doi.org/10.1021/ja01112a040>.

[81]. Dougan D.A., Alver R., Turgay K., 2021, Exploring a potential Achilles heel of *Mycobacterium tuberculosis*: defining the ClpC1 interactome, *FEBS J.*, 288(1), pp. 95-8. <https://doi.org/10.1111/febs.15430>.

[82]. Parish T., 2014, Targeting mycobacterial proteolytic complexes with natural products, *Chem. Biol.*, 21(4), pp. 437-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.04.002>.

[83]. Jagdev M.K., Tompa D.R., Ling L.L., Peoples A.J., Dandapat J., Mohapatra C., Lewis K., Vasudevan D., 2023, Crystal structure of the N-terminal domain of MtClpC1 in complex with the anti-mycobacterial natural peptide Lassomycin, *Int. J. Biol. Macromol.*, 253, p. 126771. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126771>.

[84]. Taylor G., Cui H., Leodolter J., Giese C., Weber-Ban E., 2023, ClpC2 protects mycobacteria against a natural antibiotic targeting ClpC1-dependent protein degradation, *Commun. Biol.*, 6(1), p. 301. <https://doi.org/10.1038/s42003-023->

04658-9.

- [85]. Bordes P., Genevaux P., 2021, Control of toxin-antitoxin systems by proteases in *Mycobacterium tuberculosis*, *Front. mol. biosci.*, 8, p. 691399. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.691399>.
- [86]. Duc N.M., Lee H., Suh J.W., Thuy V.T.B., Minh N.N., Hong N.P.L., 2020, The high-throughput screening system for inhibitor *Mycobacterium tuberculosis* compounds based on ATP hydrolysis activity of recombinant protein ClpC1, *Vietnam J. Biotechnol.*, 18(2), pp. 239-47
- [87]. Kumar R.R., Jadeja V.J., 2016, Isolation of actinomycetes: A complete approach, *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.*, 5(5), p.606-618 <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.505.062>.
- [88]. Carlson S., Tanouye U., Omarsdottir S., Murphy B.T., 2015, Phylum-specific regulation of resistomycin production in a *Streptomyces* sp. via microbial coculture, *J. Nat. Prod.*, 78(3), pp. 381-7.
- [89]. Gordon R.E., Smith M.M., 1953, Rapidly Growing, acid fast bacterel I: Species' Descriptions of *Mycobacterium phlei* Lehmann and Neumann and *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) Lehmann and Neumann, *J. Bacteriol.*, 66(1), pp. 41-8.
- [90]. King G.M., 2003, Uptake of carbon monoxide and hydrogen at environmentally relevant concentrations by mycobacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(12), pp. 7266-72. <https://doi.org/10.1128%2Faem.69.12.7266-7272.2003>.
- [91]. Magwenzi R., Nyakunu C., Mukanganyama S., 2014, The Effect of selected Combretum species from Zimbabwe on the growth and drug efflux systems of *Mycobacterium aurum* and *Mycobacterium smegmatis*, *J. Microb. Biochem. Technol*, 3(003). <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.S3-003>.
- [92]. Allotey-Babington G.L., Nettey H., Debrah P., Adi-Dako O., Sasu C., Antwi A., Darko Y., Nartey N., Asare J., 2014, Screening of Several Anti-Infectives for *in Vitro* Activity against *Mycobacterium smegmatis*, *Advances in Microbiology*, 4(16), p. 1197. <http://doi.org/10.4236/aim.2014.416129>.
- [93]. Rosano G.L., Ceccarelli E.A., 2014, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges, *Front. Microbiol.*, 5, p. 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>.
- [94]. Studier F.W., 2005, Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures, *Protein Expr. Purif.*, 41(1), pp. 207-34. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>.

- [95]. Sambrook J and Russell D., 2001, Molecular cloning: A laboratory manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [96]. Laemmli U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227(5259), pp. 680-5.
- [97]. Jose P.A., Jebakumar S.R.D., 2014, Unexplored hypersaline habitats are sources of novel actinomycetes, *Frontiers Media SA, Front.Microb.*, 5, p. 242. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00242>.
- [98]. Singh L.S., Sharma H., Talukdar N.C., 2014, Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India, *BMC Microbiol.*, 14, pp. 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0278-3>.
- [99]. Sarkar G., Suthindhiran K., 2022, Diversity and biotechnological potential of marine actinomycetes from India, *Ind. J. Microbiol.*, 62(4), pp. 475-93. <https://doi.org/10.1007/s12088-022-01024-x>.
- [100]. Manikkam R., Venugopal G., Subramaniam B., Ramasamy B., Kumar V., 2014, Bioactive potential of actinomycetes from less explored ecosystems against *Mycobacterium tuberculosis* and other nonmycobacterial pathogens, *Int. Sch. Res. Notices*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/812974>.
- [101]. Ivanova V., Lyutskanova D., Kolarova M., Aleksieva K., Raykovska V., Stoilova-Disheva M., 2010, Structural elucidation of a bioactive metabolites produced by *Streptomyces Avidinii* SB9 strain, isolated from permafrost soil in Spitsbergen, Arctic, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 24(4), pp. 2092-5. DOI: 10.2478/v10133-010-0080-9.
- [102]. Adler J.T., Cook M., Luo Y., Pitt S.C., Ju J., Li W., Shen B., Kunnimalaiyaan M., Chen H., 2009, Tautomycin and tautomycin suppress the growth of medullary thyroid cancer cells via inhibition of glycogen synthase kinase-3 β , *Mol. Cancer Ther.*, 8(4), pp. 914-20. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0712>.
- [103]. Goodreid J.D., Wong K., Leung E., McCaw S.E., Gray-Owen S.D., Lough A., Houry W.A., Batey R.A., 2014, Total synthesis and antibacterial testing of the A54556 cyclic acyldepsipeptides isolated from *Streptomyces hawaiiensis*, *J. Nat. Prod.*, 77(10), pp. 2170-81. <https://doi.org/10.1021/np500158q>.
- [104]. Michel K.H., Kastner R.E., 1985, A54556 antibiotics and process for production thereof, Abstr, C. Ed., *Google Patents*.
- [105]. Yan X., Zhang B., Tian W., Dai Q., Zheng X., Hu K., Liu X., Deng Z., Qu X., 2018, Puromycin A, B and C, cryptic nucleosides identified from *Streptomyces*

- alboniger* NRRL B-1832 by PPTase-based activation, *Synth. Syst. Biotechnol.*, 3(1), pp. 76-80. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.02.001>.
- [106]. McCann P.A., Pogell B.M., 1979, Pamamycin: a new antibiotic and stimulator of aerial mycelia formation, *J. Antibiot.*, 32(7), pp. 673-8. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.32.673>.
- [107]. Ritzau M., Philips S., Zeeck A., Hoff H., Zähler H., 1993, Obscurolides, a novel class of phosphodiesterase inhibitors from *Streptomyces*. II. Minor components belonging to the obscurolide B to D series, *J. Antibiot.*, 46, pp. 1625-8. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.46.1625>.
- [108]. Wang Y.S., Zhang B., Zhu J., Yang C.L., Guo Y., Liu C.L., Liu F., Huang H., Zhao S., Liang Y., 2018, Molecular basis for the final oxidative rearrangement steps in chartreusin biosynthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, 140(34), pp. 10909-14. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b06623>.
- [109]. Hagemeier J., Schneider B., Oldham N.J., Hahlbrock K., 2001, Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in *Arabidopsis thaliana* leaves infected with virulent or avirulent *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strains, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(2), pp. 753-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.2.753>.
- [110]. Dzoyem J.P., Melong R., Tsamo A.T., Maffo T., Kapche D.G., Ngadjui B.T., McGaw L.J., Eloff J.N., 2017, Cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activity of four compounds produced by an endophytic fungus *Epicoccum nigrum* associated with *Entada abyssinica*, *Rev. Bras. Farmacogn.*, 27, pp. 251-3. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.011>.
- [111]. Lopez J.A.V., Nogawa T., Futamura Y., Shimizu T., Osada H., 2019, Nocardamin glucuronide, a new member of the ferrioxamine siderophores isolated from the ascamycin-producing strain *Streptomyces* sp. 80H647, *J. Antibiot.*, 72(12), pp. 991-5. <https://doi.org/10.1038/s41429-019-0217-5>.
- [112]. Yokoyama Y., Arai M.A., Hara Y., Ishibashi M., 2019, Identification of BMI1 promoter inhibitors from *Streptomyces* sp. IFM-11958, *Bioorg. Med. Chem.*, 27(13), pp. 2998-3003. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.05.002>.
- [113]. Ueki M., Suzuki R., Takamatsu S., Takagi H., Uramoto M., Ikeda H., Osada H., 2009, Nocardamin production by *Streptomyces avermitilis*, *Actinomycetologica*, 23(2), pp. 34-9. <https://doi.org/10.3209/saj.SAJ230203>.
- [114] Lee I.-S., Ryoo I.-J., Kwon K.-Y., Ahn J.S., Yoo I.-D., 2011, Pleurone, a novel human neutrophil elastase inhibitor from the fruiting bodies of the mushroom *Pleurotus eryngii* var. *ferulae*, *J. Antibiot.*, 64(8), pp. 587-9.

<https://doi.org/10.1038/ja.2011.47>.

[115]. Lin J., Yang L.Y., Pan Z.D., 2023, Identification of potential bioactive compounds from *Aspergillus terreus* against HCVNS3 serine protease, *Chem. Biodivers.*, 20(8), p. e202300532. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202300532>.

[116]. Yang L., Tan R.-x., Wang Q., Huang W.-y., Yin Y.-x., 2002, Antifungal cyclopeptides from *Halobacillus litoralis* YS3106 of marine origin, *Tetrahedron Lett.*, 43(37), pp. 6545-8. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)01458-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)01458-2).

[117]. Dahiya R., Pathak D., 2007, First total synthesis and biological evaluation of halolitoralin A, *J. Serb. Chem. Soc.*, 72(2), pp. 101-7. <https://doi.org/10.2298/JSC0702101D>.

[118]. Carballeira N.M., Cruz H., Hill C.A., De Voss J.J., Garson M., 2001, Identification and total synthesis of novel fatty acids from the siphonariid limpet *Siphonaria denticulata*, *J. Nat. Prod.*, 64(11), pp. 1426-9. <https://doi.org/10.1021/np010307r>.

[119]. Alvarenga T.A., de Oliveira P.F., de Souza J.M., Tavares D.C., Andrade e Silva M.L., Cunha W.R., Groppo M., Januário A.H., Magalhães L.G., Pauletti P.M., 2016, Schistosomicidal activity of alkyl-phenols from the Cashew *Anacardium occidentale* against *Schistosoma mansoni* adult worms, *J. Agric. Food Chem.*, 64(46), pp. 8821-7. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04200>.

[120]. Gimenez V.M., Alvarenga T.A., Groppo M., Silva M.L., Cunha W.R., Januário A.H., Smilkstein M.J., Riscoe M.K., Pauletti P.M., 2019, Antiplasmodial evaluation of *Anacardium occidentale* and alkyl-phenols, *Rev. Bras. Farmacogn.*, 29, pp. 36-9. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.11.003>.

[121]. Alvarenga T.A., Alves O.J.A., Pagotti M.C., Cunha W.R., Andrade M.L., de Fátima Sales J., Silva F.G., Januario A.H., Magalhães L.G., Pauletti P.M., 2021, In vitro antileishmanial activity of *Anacardium othonianum* and isolated compounds against *Leishmania amazonensis*, *Acta Bras.*, 5(1), pp. 44-7. <http://dx.doi.org/10.22571/2526-4338429>.

[122]. Wang R., Nguyen J., Hecht J., Schwartz N., Brown K.V., Ponomareva L.V., Niemczura M., van Dissel D., Van Wezel G.P., Thorson J.S., 2022, A biobricks metabolic engineering platform for the biosynthesis of anthracyclonones in *Streptomyces coelicolor*, *ACS Synth. Biol.*, 11(12), pp. 4193-209. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00498>.

[123]. Maskey R.P., Gruen-Wollny I., Laatsch H., 2003, Resomycins AC: New Anthracyclinone Antibiotics Formed by a Terrestrial *Streptomyces* sp, *J. Antibiot.*, 56(9), pp. 795-800. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.56.795>.

- [124]. Yeo W.-H., Yun B.-S., Kim S.-S., Park E.-K., Kim Y.-H., Yoo I.-D., Yu S.-H., 1998, GTRI-02, a new lipid peroxidation inhibitor from *Micromonospora* sp. SA246, *J. Antibiot.*, 51(10), pp. 952-3. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.51.952>.
- [125]. Murín R., Mohammadi G., Leibfritz D., Hamprecht B., 2009, Glial metabolism of valine, *Neurochem. Res.*, 34, pp. 1195-203. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9895-2>.
- [126]. Cabrera G.M., Julia Roberti M., Wright J.E., Seldes A.M., 2002, Cryptoporic and isocryptoporic acids from the fungal cultures of *Polyporus arcularius* and *P. ciliatus*, *Phytochem.*, 61(2), pp. 189-93. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00221-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00221-2).
- [127]. Evidente A., Cristinzio G., Punzo B., Andolfi A., Testa A., Melck D., 2009, Flufuran, an antifungal 3, 5-disubstituted furan produced by *Aspergillus flavus* Link, *Chem. Biodivers.*, 6(3), pp. 328-34. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200800292>.
- [128]. Elsunni M.A., Yang Z.-D., 2018, Secondary metabolites of the endophytic fungi *Penicillium polonicum* and their monoamine oxidase inhibitory activity, *Chem. Nat. Compd.*, 54, pp. 1018-9. <https://doi.org/10.1007/s10600-018-2540-7>.
- [129]. Shleeveva M.O., Trutneva K.A., Demina G.R., Zinin A.I., Sorokoumova G.M., Laptinskaya P.K., Shumkova E.S., Kaprelyants A.S., 2017, Free trehalose accumulation in dormant *Mycobacterium smegmatis* cells and its breakdown in early resuscitation phase, *Front. Microbiol.*, 8, p. 524. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00524>.
- [130]. Ranjitha J., Rajan A., Shankar V., 2020, Features of the biochemistry of *Mycobacterium smegmatis*, as a possible model for *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Infect. Public Health.*, 13(9), pp. 1255-64. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.023>.
- [131]. Zhou Y., Wei W., Fleming J., Ye C., Zheng S., Liu F., Zhou L., Bi L., Liu W., 2020, *Mycobacterium smegmatis* MSMEG_0129 is a nutrition-associated regulator that interacts with CarD and ClpP2, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 124, p. 105763. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105763>.
- [132]. Golichenari B., Yari S., Tasbiti A.H., Behravan J., Vaziri F., Ghazvini K., 2022, First conjugation directed transfer of gene cassettes harboring $\alpha 1$, 3GT from fast-growing *Mycobacterium smegmatis* mc2 155 to slow-growing pathogen *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, presumably opening up new scopes in tuberculosis treatment, *Enzyme Microb. Technol.*, 156, p. 110003. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110003>.
- [133]. Tapfuma K.I., Nyambo K., Adu-Amankwaah F., Baatjies L., Smith L., Allie

- N., Keyster M., Loxton A.G., Ngxande M., Malgas-Enus R., 2022, Antimycobacterial activity and molecular docking of methanolic extracts and compounds of marine fungi from Saldanha and False Bays, South Africa, *Heliyon*, 8(12). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12406>.
- [134]. Tuyiringire N., Mugisha I.T., Tusubira D., Munyampundu J.-P., Muvunyi C.M., Vander Heyden Y., 2022, *In vitro* antimycobacterial activity of medicinal plants *Lantana camara*, *Cryptolepis sanguinolenta*, and *Zanthoxylum leprieurii*, *J. Clin. Tuberc. Other Mycobact. Dis.*, 27, p. 100307. <https://doi.org/10.1016/j.jctube.2022.100307>.
- [135]. Wang X., Feng L., Li M., Dong W., Luo X., Shang D., 2023, Membrane-active and DNA binding related double-action antimycobacterial mechanism of antimicrobial peptide W3R6 and its synthetic analogs, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, 9, p. 130415. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2023.130415>.
- [136]. Ramadhani P.N., Dyah Kurniati I., Dian Rakhmawatie M., 2023, Antimicrobial Activity of *Pecut Kuda* Leaf Extract (*Stachytarpheta jamaicensis* (L. Vahl) against *Mycobacterium smegmatis*, *Mutiara Medika: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*, 23(1), pp. 21-7. <https://doi.org/10.18196/mmjkk.v22i2.15599>.
- [137]. Alelaiwi S.H., Heindl J.E., Sivaganesh V., Peethambaran B., McKee J.R., 2022, Structure–activity relationship of 2-aminodibenzothiophene pharmacophore and the discovery of aminobenzothiophenes as potent inhibitors of *Mycobacterium smegmatis*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 63, p. 128650. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2022.128650>.
- [138]. Rakhmawatie M.D., MUSTOFA P.L., PRATIWI W.R., WIBAWA T., 2022, Identification of antimycobacterial from actinobacteria (INACC A758) secondary metabolites using metabolomics data, *Sains Malays*, 51(5), pp. 1465-73. <http://doi.org/10.17576/jsm-2022-5105-16>.
- [139]. Chaturvedi V., Dwivedi N., Tripathi R.P., Sinha S., 2007, Evaluation of *Mycobacterium smegmatis* as a possible surrogate screen for selecting molecules active against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 53(6), pp. 333-7. <https://doi.org/10.2323/jgam.53.333>.
- [140]. Grzelak E.M., Choules M.P., Gao W., Cai G., Wan B., Wang Y., McAlpine J.B., Cheng J., Jin Y., Lee H., 2019, Strategies in anti-*Mycobacterium tuberculosis* drug discovery based on phenotypic screening, *J. Antibiot.*, 72(10), pp. 719-28. <https://doi.org/10.1038/s41429-019-0205-9>.
- [141]. Loughran S.T., Bree R.T., Walls D., 2017, Purification of polyhistidine-tagged proteins, *Protein Chromatography: Methods Protocols*, pp. 275-303.

https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_14.

[142]. Baker T.A., Sauer R.T., 2012, ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1823(1), pp. 15-28. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.06.007>.

[143]. Weinhäupl K., Gragera M., Bueno-Carrasco M.T., Arranz R., Krander O., Akopian T., Soares R., Rubin E., Felix J., Fraga H., 2022, Structure of the drug target ClpC1 unfoldase in action provides insights on antibiotic mechanism of action, *J. Biol. Chem.*, 298(11). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102553>.

[144]. Hawkins P.M., Hoi D.M., Cheung C.-Y., Wang T., Quan D., Sasi V.M., Liu D.Y., Linington R.G., Jackson C.J., Oehlers S.H., 2022, Potent bactericidal antimycobacterials targeting the chaperone ClpC1 based on the depsipeptide natural products ecumicin and ohmyungsamycin A, *J. Med. Chem.*, 65(6), pp. 4893-908. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c02122>.

PHỤ LỤC