

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



ĐỖ THỊ QUỲNH

**NGHIÊN CỨU CÁC HỢP CHẤT THỨ CẤP CÓ HOẠT TÍNH
KHÁNG VI SINH VẬT KIỂM ĐỊNH PHÂN LẬP TỪ BA
CHUNG XẠ KHUẨN THUỘC CHI *Actinoalloteichus* VÀ
Streptomyces Ở VÙNG BIỂN TRUNG BỘ, VIỆT NAM**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành: Hóa hữu cơ

Mã số: 9 44 01 14

Hà Nội - 2024

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

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS. TS. Phạm Văn Cường, Viện Hóa sinh biển – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
2. PGS. TS. Đoàn Thị Mai Hương, Viện Hóa sinh biển – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

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

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Đặt vấn đề

Đại dương chiếm 70% diện tích bề mặt trái đất, là nơi có sự đa dạng về sinh học lớn nhất. Đây là nơi sinh sống của 34 trên 36 ngành động thực vật trên trái đất với hơn 300.000 loài sinh vật đã được biết đến. Môi trường biển là một nguồn phong phú cung cấp các hợp chất thiên nhiên, một kho dự trữ liệu khổng lồ đang chờ được khai thác và khám phá. Đặc thù môi trường sống khắc nghiệt dưới biển sâu chính là điều kiện để hình thành các hợp chất hữu cơ với đặc điểm cấu trúc hóa học độc đáo và hoạt tính sinh học quý giá.

Việt Nam là quốc gia có đường bờ biển dài hơn 3260 km chạy dọc từ Bắc xuống Nam với thềm lục địa rộng, nhiều đảo gần bờ và đặc biệt có hai quần đảo Hoàng Sa – Trường Sa ở giữa biển Đông. Điều kiện địa lý thuận lợi đã cho nước ta tiềm năng to lớn về nguồn tài nguyên biển phong phú, tạo nên hệ sinh vật biển đa dạng, dồi dào cả về trữ lượng và thành phần chủng loài. Việt Nam có định hướng phát triển kinh tế biển, khai thác tài nguyên thiên nhiên và nghiên cứu các sản phẩm tự nhiên từ biển. Tuy nhiên nghiên cứu các hợp chất thứ cấp từ nguồn vi sinh vật biển của Việt Nam mới chỉ được bắt đầu, có rất ít các nghiên cứu đã công bố, mặc dù nguồn đa dạng vi sinh vật biển của nước ta là rất lớn.

Việc khảo sát, tìm kiếm các hợp chất thứ cấp từ vi sinh vật biển nói chung và các loài xạ khuẩn biển nói riêng trên thế giới đang là vấn đề được quan tâm hiện nay. Các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học đã chỉ ra hợp chất thứ cấp từ xạ khuẩn biển có cấu trúc hóa học đa dạng và có hoạt tính sinh học lý thú. Nhiều hợp chất thứ cấp từ xạ khuẩn biển đã được thử nghiệm nhằm ứng dụng trong y học, công nghiệp, nông nghiệp.

Trong khuôn khổ của đề tài trọng điểm “Nghiên cứu phát hiện các hợp chất kháng lao và kháng vi sinh vật kiểm định từ nguồn vi sinh vật đáy biển ở Khu vực Nam Trung Bộ (vùng biển Khánh Hòa-Bình Thuận)”, cặn chiết ethyl acetate của các chủng xạ khuẩn đã được sàng lọc hoạt tính kháng VSVKĐ, trong đó ba chủng xạ khuẩn biển G631, G666, G246 thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật trong điểm tốt đối với 3-5 chủng vi sinh vật kiểm định với giá trị MIC từ 2-256 $\mu\text{g/ml}$. Xuất phát từ những lý do trên, chúng tôi đã thực hiện luận án với tên đề tài ***“Nghiên cứu các hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định phân lập từ ba chủng xạ khuẩn thuộc chi***

***Actinoalloteichus* và *Streptomyces* ở vùng biển trung bộ, Việt Nam**”, với mục tiêu “Nghiên cứu phát hiện các hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định từ ba chủng xạ khuẩn biển (G666, G631, G246) được phân lập từ vùng biển của Việt Nam”.

Nội dung của luận án bao gồm:

1. Lên men nhân sinh khối lượng lớn 03 chủng xạ khuẩn biển có hoạt tính kháng VSVKĐ tốt là G666, G631 và G246.
2. Phân lập và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất thứ cấp từ 03 chủng xạ khuẩn biển đã nhân nuôi sinh khối lượng lớn.
3. Đánh giá hoạt tính kháng VSVKĐ của các hợp chất thứ cấp phân lập được.

Luận án bao gồm 140 trang với 29 bảng, 69 hình và 96 tài liệu tham khảo.

NỘI DUNG CHÍNH CỦA LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. Giới thiệu chung về xạ khuẩn (Actinobacteria)

1.2. Các nghiên cứu về xạ khuẩn biển chi *Streptomyces*

*1.2.1. Giới thiệu chung về chi *Streptomyces**

*1.2.2. Các hợp chất thứ cấp từ xạ khuẩn biển chi *Streptomyces**

1.3. Các nghiên cứu về xạ khuẩn biển chi *Actinoalloteichus*

1.3.1. Các hợp chất alkaloid

1.3.2. Các hợp chất khác

1.4. Các nghiên cứu ở Việt Nam về thành phần hóa học của xạ khuẩn biển chi *Streptomyces* và chi *Actinoalloteichus*

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Hóa chất, thiết bị và phương pháp nuôi cấy nhân sinh khối lượng lớn

- Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy nhân sinh khối lượng lớn quy mô 50 kg theo phương pháp Nguyễn Văn Cách 2004 [72]

2.2.2. Phương pháp tạo cặn chiết từ sản phẩm nuôi cấy nhân sinh khối các chủng xạ khuẩn

2.2.3. Phương pháp phân lập các hợp chất thứ cấp

2.2.4. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được

2.2.5. Phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

- Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định được thực hiện dựa trên phương pháp pha loãng đa nồng độ của Andrews (2001) [75].

CHƯƠNG 3: THỰC NGHIỆM

3.1. Nuôi cấy nhân nuôi sinh khối lượng lớn 3 chủng xạ khuẩn

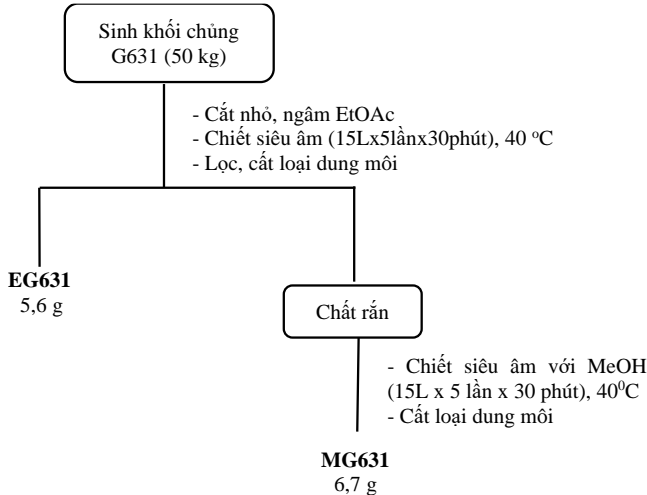
3.1.1. Nhân nuôi sinh khối dạng rắn quy mô 50 kg của chủng *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631

3.1.2. Nhân nuôi sinh khối dạng rắn quy mô 50kg của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G666

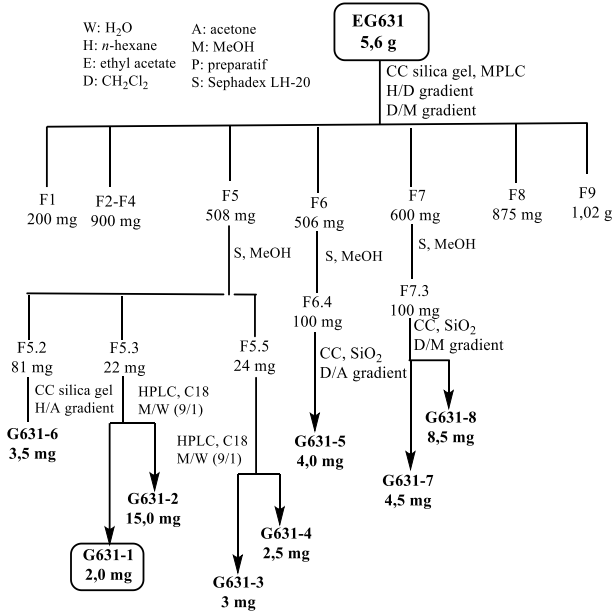
3.1.3. Nhân nuôi sinh khối dạng rắn quy mô 50 kg chủng *Streptomyces* sp. G246

3.2. Phân lập các hợp chất từ chủng *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631

3.2.1. Xử lý, tạo cặn chiết và phân lập chủng *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631

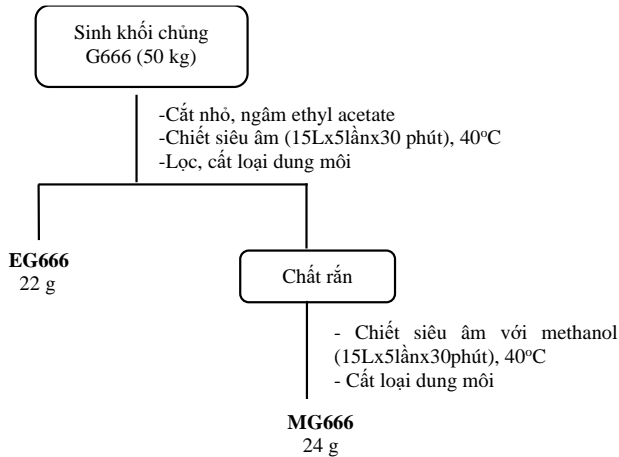


Hình 3.9: Sơ đồ tạo cặn chiết *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631



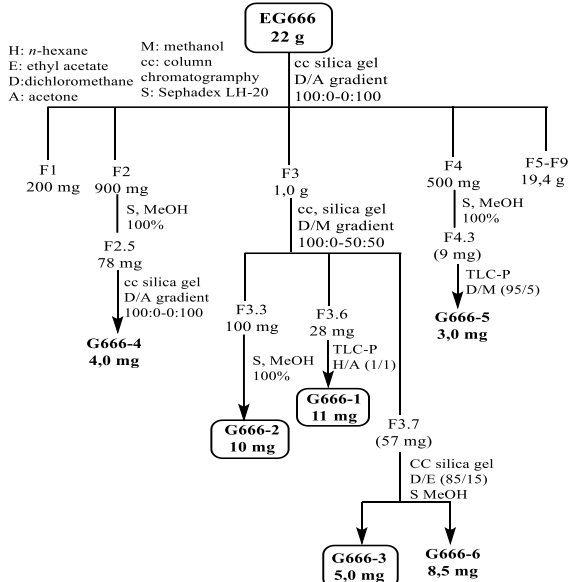
Hình 3.10: Sơ đồ phân lập từ cặn chiết chủng *A. cyanogriseus* G631
3.2.2. Hằng số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập từ
chủng *A. cyanogriseus* G631.

3.3. Phân lập các hợp chất thứ cấp chủng *Streptomyces* sp. G666

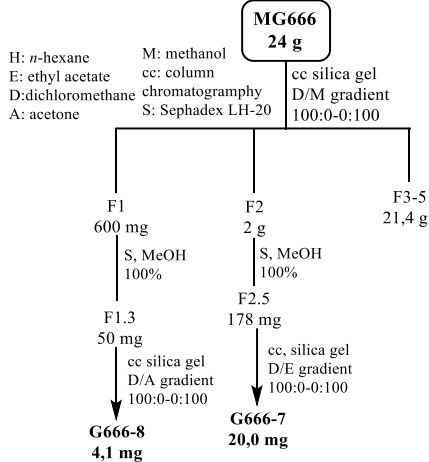


Hình 3.11: Sơ đồ tạo cặn chiết chủng *Streptomyces* sp. G666

3.3.1. Xử lý mẫu, tạo cặn chiết, phân lập chủng *Streptomyces* sp. G666
 3.3.2. Hằng số vật lý và dữ kiện phổ của các hợp chất phân lập từ chủng *Streptomyces* sp. G666



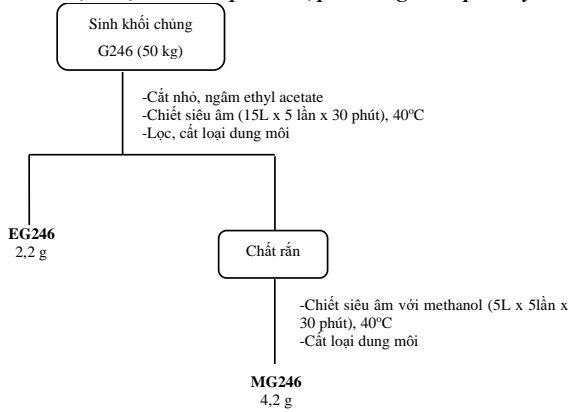
Hình 3.12: Sơ đồ phân lập cặn chiết **EG666** *Streptomyces* sp. G666



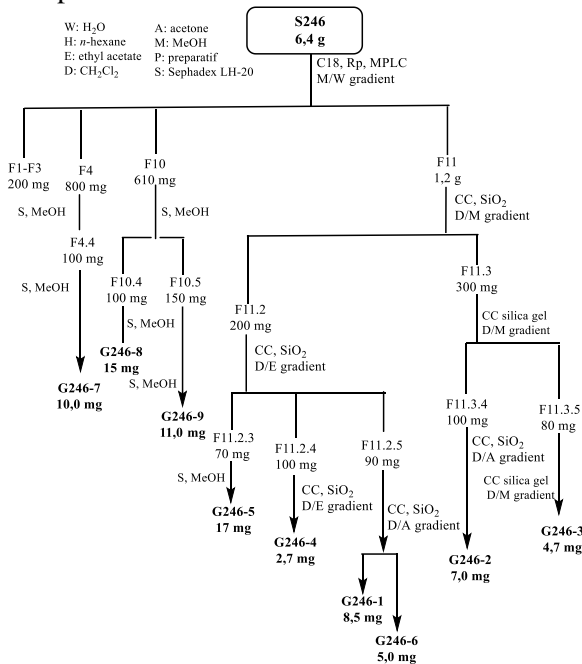
Hình 3.13: Sơ đồ phân lập cặn chiết **MG666** *Streptomyces* sp. G666

3.4. Phân lập các hợp chất từ chủng *Streptomyces* sp. G246

3.4.1. Xử lý mẫu, tạo cặn chiết, phân lập chủng *Streptomyces* sp. G246



Hình 3.14: Sơ đồ tạo cặn chiết từ sinh khối lượng lớn chủng *Streptomyces* sp. G246



Hình 3.15: Sơ đồ phân lập từ cặn chiết chủng *Streptomyces* sp. G246

3.4.2. Hằng số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập từ chủng *Streptomyces* sp. G246

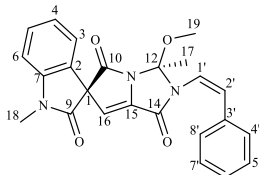
3.5. Hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được

Tất cả các hợp chất phân lập được từ ba chủng xạ khuẩn G666, G631 và G246 hợp được tiến hành thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiềm định đối với 7 chủng VSVKĐ.

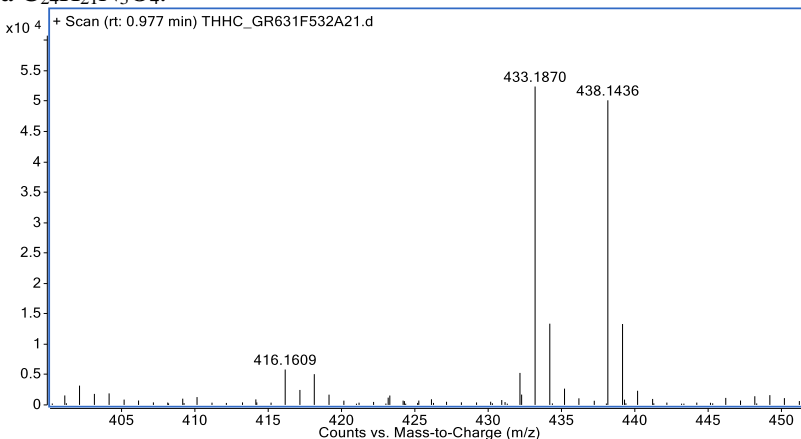
CHƯƠNG 4: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ chủng *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631

4.1.1. Hợp chất isocyanogramide (G631-1) (chất mới)



Hợp chất **G631-1** được phân lập từ căn chiết ethyl acetate có dạng dầu màu vàng, độ quay cực riêng $[\alpha]_D^{26} = -59,3$ (c 0,2; CH_2Cl_2). Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS cho pic ion giả phân tử ở m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 438,1436 (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử $[\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{NaO}_4]^+$ 438,1430), độ bất bão hòa bằng 16 (**Hình 4.16**). Kết hợp với phổ ^{13}C -NMR, HSQC cho phép xác định CTPT của hợp chất là $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4$.



Hình 4.11: Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **G631-1**

Phổ ^1H -NMR của **G631-1** cho tín hiệu của 5 proton vòng thơm ở δ_{H} 7,28 (1H, d, $J = 7,2$ Hz, H-6'); 7,32 (2H, d, $J = 7,2$ Hz, H-4'/H-8') và 7,37 (2H, t, $J = 7,2$ Hz, H-5'/H-7'), cho phép xác định sự có mặt của

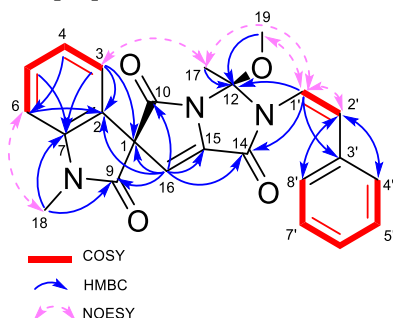
1 vòng thơm thế ở 1 vị trí, 4 proton vòng thơm ở δ_H 6,93 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-6); 7,11 (1H, dd, $J = 7,2; 7,8$ Hz, H-4); 7,14 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-3) và 7,40 (1H, dd, $J = 7,2; 7,8$ Hz, H-5), cho phép xác định sự có mặt của một vòng thơm thế 1,2. Ngoài ra, trên phổ $^1\text{H-NMR}$ còn có tín hiệu của 2 proton olefinic của một liên kết đôi có cấu hình *cis* ở δ_H 5,86 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-1'); 6,65 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-2'); 1 proton olefinic dưới dạng singlet ở δ_H 5,84 (1H, s, H-16) và 3 nhóm methyl ở δ_H 1,95 (3H, s, H-17); 3,27 (3H, s, H-18); 3,31 (3H, s, H-19).

Phân tích phổ $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT và HSQC của hợp chất **G631-1** cho thấy tín hiệu cộng hưởng của 24 nguyên tử carbon trong đó có 1 nhóm methyl ở δ_C 23,8 (C-17), 1 nhóm N-CH₃ ở δ_C 27,1 (C-18), 1 nhóm O-CH₃ ở δ_C 50,2 (C-19); 12 nhóm methine ở δ_C 106,4 (C-16); 109,2 (C-6); 115,9 (C-1'); 123,5 (C-4); 124,3 (C-3); 128,3 (C-6'); 128,4 (C-4',8'); 128,5 (C-5',7'); 130,3 (C-5); 130,8 (C-2'); 06 carbon không liên kết trực tiếp với hydro ở δ_C 70,2 (C-1); 98,6 (C-12); 124,4 (C-2); 135,0 (C-3'); 140,2 (C-15); 144,9 (C-7) và 03 carbon carbonyl ở δ_C 154,3 (C-14); 167,5 (C-10); 170,0 (C-9). Dựa trên độ dịch chuyển hóa học của C-14 (δ_C 154,3), C-10 (δ_C 167,5) và C-9 (δ_C 170,0) gợi ý chúng là các nhóm carbonyl amide. Phân tích dữ liệu ^1H và $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **G631-1** gợi ý đến các tín hiệu của khung spirocyclic pyrrolo[1,2-c]imidazole đã được phân lập từ cùng loài xạ khuẩn *Actinoalloteichus cyanogriseus* [60]. Điều này được khẳng định thông qua việc phân tích chi tiết trên phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều. Trên phổ $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ xuất hiện 3 hệ tương tác spin-spin, bao gồm: i) H-3 (δ_H 7,14)/ H-4 (δ_H 7,11)/ H-5 (δ_H 7,40)/ H-6 (δ_H 6,93) (tương tác của hệ vòng thơm thế 1,2); ii) H-4' (δ_H 7,32)/H-5' (δ_H 7,37)/H-6' (δ_H 7,28)/H-7' (δ_H 7,37)/H-8' (δ_H 7,32) (tương tác của hệ vòng phenyl); iii) H-1' (δ_H 5,86)/H-2' (δ_H 6,65) (tương tác của nối đôi olefinic).

Phân tích phổ HMBC cho thấy các tương tác xa giữa proton H-16 (δ_H 5,84) với C-1 (δ_C 70,2)/C-2 (δ_C 124,4)/C-10 (δ_C 167,5)/C-14 (δ_C 154,3)/C-15 (δ_C 140,2); tương tác giữa proton H-18 (δ_H 3,27) với C-7 (δ_C 144,9)/C-9 (δ_C 170,0) cho thấy sự hiện diện vòng spiro ở vị trí C-1 và các nhóm carbonyl ở C-9, C-10. Vòng thơm thế 1,2 *ortho* ở vị trí C-2/C-7 được xác định qua các tương tác HMBC giữa H-3 (δ_H 7,14) với C-1 (δ_C 70,2)/C-2 (δ_C 124,4)/C-7 (δ_C 144,9); tương tác giữa H-6 (δ_H 6,93) với C-2 (δ_C 124,4)/C-7 (δ_C 144,9). Điều này cũng được khẳng định bằng các tương tác $^1\text{H-}^1\text{H}$ trên phổ COSY giữa H-3/H-4/H-5/H-6. Tương tự, sự có mặt của nhóm phenyl ethenyl cũng được khẳng

định bằng các tương tác trên phổ HMBC giữa H-2' (δ_H 6,65) với C-1' (δ_C 115,9)/C-3' (δ_C 135,0)/C-4' (8') (δ_C 128,4) và tương tác trên phổ COSY giữa H-4'/H-5'/H-6'/H-7'/H-8' và H-1'/H-2'.

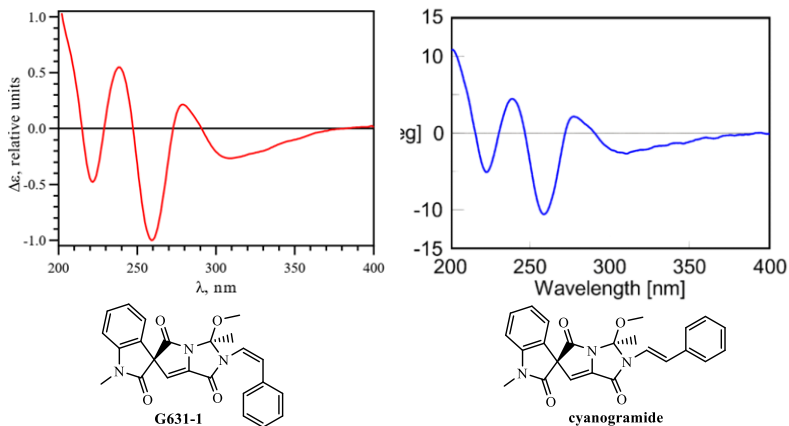
Thông qua các phân tích phổ trên, có thể dự đoán được cấu trúc của hợp chất **G631-1** như **Hình 4.20**, cấu trúc này tương tự như hợp chất cyanoramide [60], tuy nhiên, hợp chất **G631-1** có cấu hình nối đôi dạng *cis* ở vị trí C-1' và C-2' khác với dạng *trans* trong cấu trúc hợp chất cyanoramide. Thêm vào đó, hằng số tương tác của H-1' (δ_H 5,86) và H-2' (δ_H 6,65) có giá trị là $J = 9,6$ Hz và tương tác trên phổ NOESY giữa H-1' và H-2' cho phép xác định cấu hình của liên kết đôi giữa C-1' và C-2' là Z [77].



Hình 4.20: Một số tương tác phổ COSY, HMBC, NOESY của hợp chất **G631-1**

Vị trí nguyên tử N-13 thuộc khung tetrahydroimidazole được xác định bằng tương tác HMBC giữa H-1' (δ_H 5,86) với C-12 (δ_C 98,6)/C-14 (δ_C 154,3). Nhóm methyl và nhóm methoxy ở vị trí C-12 cũng được xác định bằng các tương tác giữa H-17 (δ_H 1,95) và H-19 (δ_H 3,31) với C-12 (δ_C 98,6) trên phổ HMBC.

Hợp chất **G631-1** có 2 trung tâm bất đối ở C-1 và C-12. Cấu hình tuyệt đối của hợp chất này được xác định bằng cách so sánh phổ ECD thực nghiệm với phổ ECD của hợp chất cyanoramide, hợp chất **G631-1** có hiệu ứng Cotton (-) ở 221, 259 và 309 nm; hiệu ứng Cotton (+) tại 238 và 278 nm (**hình 4.19**), tương tự như hợp chất cyanoramide trong tài liệu tham khảo [60]. Điều đó cho thấy rằng cấu hình tuyệt đối của hai trung tâm lập thể tại C-1 và C-12 lần lượt là *R* và *S*. Như vậy, cấu trúc của hợp chất **G631-1** có dạng spirocyclic pyrrolo[1,2-c]imidazole, đây là một chất mới, được đặt tên là isocyanoramide.



Hình 4.22: Phổ CD thực nghiệm (trái) của hợp chất **G631-1** và phổ CD tham khảo của hợp chất cyanogramide [60]

4.1.2. Hợp chất cyanogramide (G631-2)

4.1.3. Hợp chất marinacarboline F (G631-3)

4.1.4. Hợp chất marinacarboline H (G631-4)

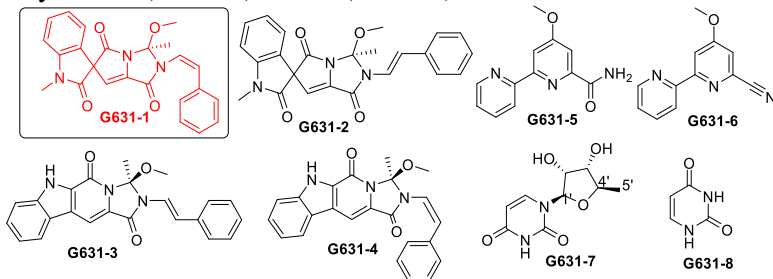
4.1.5. Hợp chất caerulomycinonitril (G631-5)

4.1.6. Hợp chất caerulomycinamide (G631-6)

4.1.7. Hợp chất 5'-deoxyuridine (G631-7)

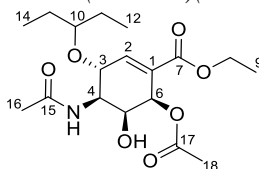
4.1.8. Hợp chất uracil (G631-8)

Từ căn chiết chủng *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631, sử dụng kết hợp các phương pháp sắc ký đã phân lập được 8 hợp chất, bao gồm isocyanogramide (**G631-1**) (hợp chất mới), cyanogramide (**G631-2**), marinacarboline F (**G631-3**), marinacarboline H (**G631-4**), caerulomycinamide (**G631-5**), caerulomycinonitril (**G631-6**), 5'-deoxyuridine (**G631-7**), uracil (**G631-8**).

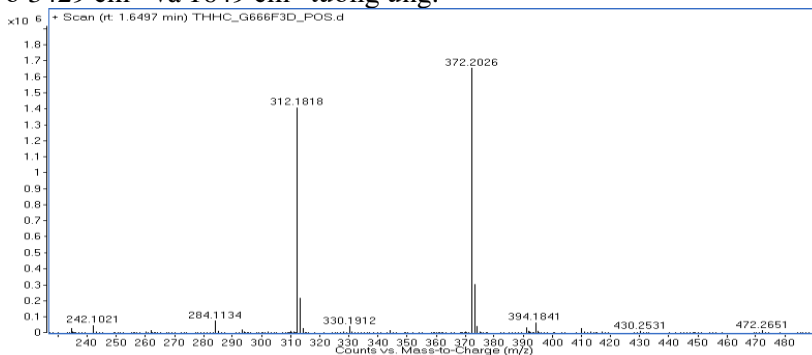


4.2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ chủng *Streptomyces* sp. G666

4.2.1. Hợp chất streptomine A (G666-1)(chất mới)



Hợp chất **G666-1** được phân lập ở dạng chất rắn vô định hình màu trắng, độ quay cực $[\alpha]_D^{26} = -38,2$ (c 0,6; CHCl_3). Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS của hợp chất **G666-1** cho pic ion giả phân tử ở m/z 372,2026 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{NO}_7$ có m/z 372,2022), kết hợp với dữ liệu phổ ^{13}C -NMR, HSQC xác định được công thức phân tử của **G666-1** là $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{NO}_7$, độ bất bão hòa bằng 5. Trên phổ IR cho thấy đỉnh hấp thụ của nhóm hydroxyl và carbonyl ở 3429 cm^{-1} và 1649 cm^{-1} tương ứng.



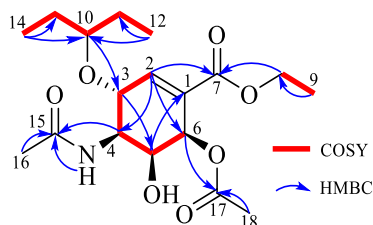
Hình 4.39: Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **G666-1**

Phổ ^1H -NMR của hợp chất **G666-1** cho thấy tín hiệu của năm nhóm methine lai hóa sp^3 ở δ_{H} 4,32 (1H, dd, $J = 2,0; 9,5$ Hz, H-3); 3,90 (1H, ddd, $J = 2,0; 7,5; 9,5$ Hz, H-4); 4,07 (1H, dd, $J = 2,0; 2,5$ Hz, H-5); 5,65 (1H, d, $J = 3,0$ Hz, H-6); 3,35 (1H, quint, $J = 6,0$ Hz, H-10); một proton olefinic ở δ_{H} 7,11 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2); một tín hiệu proton doublet ở δ_{H} 6,18 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, NH); tín hiệu singlet của hai nhóm methyl ở δ_{H} 2,04 (6H, s, CH_3 -16, CH_3 -18), tín hiệu triplet của ba nhóm methyl ở δ_{H} 0,89 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, CH_3 -12); 0,94 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, CH_3 -14); 1,27 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, CH_3 -9). Ba nhóm methylene ở δ_{H} 1,52 (2H, m, CH_2 -11); 1,55 (2H, m, CH_2 -13); 4,18 (1H,

m, Ha-8) và 4,25 (1H, m, Hb-8) cũng được quan sát thấy trên phổ $^1\text{H-NMR}$.

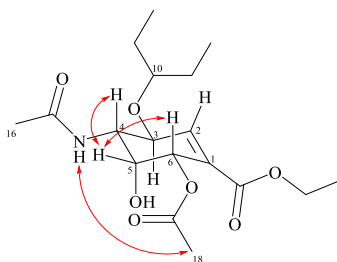
Từ dữ liệu phổ $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT và HSQC cho phép xác định hợp chất **G666-1** có mười tám nguyên tử carbon bao gồm ba nhóm carbonyl ở δ_{C} 165,1 (C-7); 170,1 (C-17); 171,5 (C-15); năm nhóm methyl ở δ_{C} 9,3 (C-12); 9,7 (C-14); 14,1 (C-9); 20,9 (C-18); 23,5 (C-16); ba nhóm methylene tại δ_{C} 25,6 (C-11); 26,3 (C-13); 61,0 (C-8); năm nhóm methine sp^3 tại δ_{C} 53,0 (C-4); 68,6 (C-6); 70,6 (C-5); 71,6 (C-3); 82,2 (C-10); một nhóm methine sp^2 tại δ_{C} 143,5 (C-2) và một carbon không liên kết trực tiếp với hydro ở δ_{C} 126,7 (C-1). Độ chuyển dịch hóa học của các nguyên tử cacbon của C-3; C-8; C-4; C-5 và C-6 cho thấy chúng có liên kết với nguyên tử oxy hoặc nitơ.

Phân tích phổ COSY của hợp chất **G666-1** cho thấy có ba hệ tương tác *spin-spin* bao gồm: CH_3 -12 (δ_{H} 0,89)/ CH_2 -11 (δ_{H} 1,52)/H-10 (δ_{H} 3,35)/ CH_2 -13 (δ_{H} 1,55)/ CH_3 -14 (δ_{H} 0,94); H-2 (δ_{H} 7,11)/H-3 (δ_{H} 4,32)/H-4 (δ_{H} 3,90)/H-5 (δ_{H} 4,07)/H-6 (δ_{H} 5,65) và CH_2 -8 (δ_{H} 4,18 và 4,25)/ CH_3 -9 (δ_{H} 1,27). Các phân tích dữ liệu phổ 2D-NMR, đặc biệt là phổ HMBC cho thấy sự hiện diện của vòng cyclohexene thể *penta*, tương tác của proton nhóm methyl H-16 (δ_{H} 2,04) với nhóm carbonyl C-15 (δ_{C} 171,5) và tương tác proton methyl H-18 (δ_{H} 2,04) với nhóm carbonyl C-17 (δ_{C} 170,1) chứng tỏ có 2 nhóm acetyl. Tương tác giữa H-4 (δ_{H} 3,90) với C-5 (δ_{C} 70,6)/C-15 (δ_{C} 171,5)/C-3 (δ_{C} 71,6) và tương tác giữa NH (δ_{H} 6,18) với C-15 (δ_{C} 171,5) chứng tỏ sự kết nối của nhóm NH-acetyl với C-4. Ngoài ra, các tương tác HMBC giữa proton nhóm methyl H-12 (δ_{H} 0,89) với C-11 (δ_{C} 25,6)/C-10 (δ_{C} 82,2); proton nhóm methyl H-14 (δ_{H} 0,94) với C-13 (δ_{C} 26,3)/C-10 (δ_{C} 82,2), tương tác HMBC giữa H-3 (δ_{H} 4,32) với C-10 (δ_{C} 82,2); H-10 (δ_{H} 3,35) với C-3 (δ_{C} 71,6)/C-12 (δ_{C} 9,3)/C-14 (δ_{C} 9,7) cho phép xác định có một nhóm pentan-3-yloxy tại C-3 trong cấu trúc của hợp chất **G666-1**. Sự có mặt của nhóm ethyl ester ở C-1 được khẳng định bằng các tương tác HMBC của H-8 với C-7 (δ_{C} 165,1)/C-9 (δ_{C} 14,1), tương tác của H-2 với C-1 (δ_{C} 126,7)/C-7 (δ_{C} 165,1). Vị trí của nhóm *O*-acetyl tại C-6 được xác định bởi các tương tác HMBC giữa H-6 với C-1/C-2/C-4/C-5/C-17.



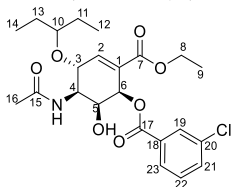
Hình 4.45: Một số tương tác COSY, HMBC của hợp chất **G666-1**

Cấu hình tương đối của hợp chất **G666-1** được xác định dựa trên các dữ liệu phổ NOESY. Proton H-3 có hằng số tương tác giữa H-3/H-4 có các giá trị *anti* ($J_{3,4} = 9,5$ Hz) và *gauche* ($J_{2,3} = 2,0$ Hz) cho thấy H-3/H-4 có định hướng axial trong vòng. Tương tác của H-5 với H-4/H-6 có giá trị nhỏ ($J_{4,5} = 2,0$ Hz, $J_{5,6} = 2,5$ Hz) gợi ý rằng H-5 ở vị trí *cis* đối với H-4 và đối với H-6 thì nó ở vị trí pseudo-equatorial. Do vậy, các proton H-4, H-5, H-6 nằm trên cùng một phía của vòng cyclohexene. Ngoài ra, tương tác NOESY giữa H-3 với NH chỉ ra rằng H-3 và nhóm NH-acetyl nằm trên cùng một phía của vòng cyclohexene. Dẫn xuất cyclohexene mới này được đặt tên là streptomine A.



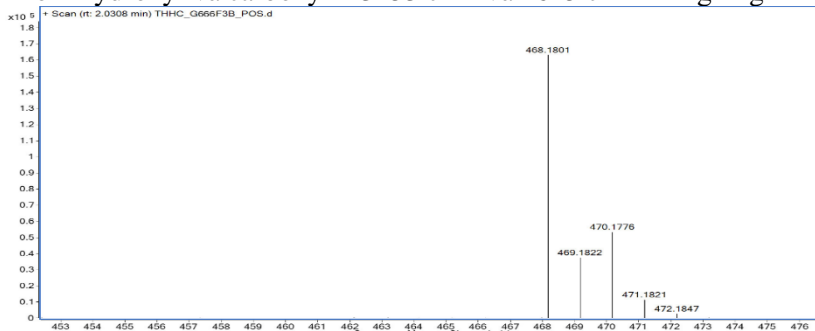
Hình 4.47: Tương tác NOESY của hợp chất **G666-1**

4.2.2. Hợp chất streptomine B (G666-2) (chất mới)



Hợp chất **G666-2** được phân lập dưới dạng chất rắn hình kim màu trắng, độ quay cực riêng là $[\alpha]^{26}_D = -50,1$ (c 0,25; CHCl_3). Phổ

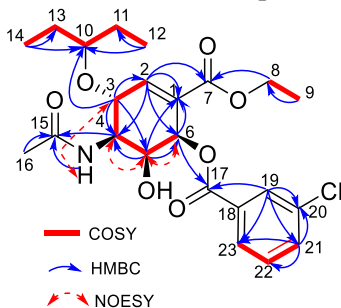
khối phân giải cao xuất hiện các pic ion giả phân tử ở m/z 468,1801; 470,1776 $[M+H]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử $[C_{23}H_{31}^{35}ClNO_7]^+$ m/z 468,1789; $[C_{23}H_{31}^{37}ClNO_7]^+$ m/z 470,1760), kết hợp với các dữ liệu phổ ^{13}C -NMR xác định được công thức phân tử của **G666-2** là $C_{23}H_{30}ClNO_7$. Trên phổ IR cho thấy đỉnh hấp thụ của nhóm hydroxyl và carbonyl ở 3453 cm^{-1} và 1645 cm^{-1} tương ứng



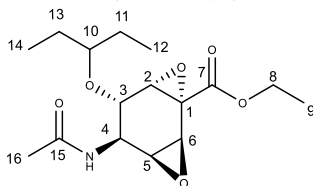
Hình 4.48: Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **G666-2**

Phổ 1D-NMR của **G666-2** gần giống với phổ của **G666-1**, sự khác biệt giữa **G666-1** và **G666-2** là tín hiệu của nhóm benzoyl thế ở **G666-2** thay vì nhóm acetyl ở **G666-1**. Trên phổ COSY quan sát thấy bốn hệ tương tác *spin-spin* được thể hiện bằng các hình in đậm trong **Hình 4.51** bao gồm: CH_3 -12/ CH_2 -11/ H -10/ CH_2 -13/ CH_3 -14; H -2/ H -3/ H -4/ H -5/ H -6; CH_2 -8/ CH_3 -9 và H -21/ H -22/ H -23. Các mối liên kết của nhóm acetamide ở C-4 và pentanyloxy ở C-3 được xác định bằng tương tác HMBC của C-15 (δ_C 171,8) với H-4 (δ_H 3,91)/NH (δ_H 6,21) và tương tác của C-3 (δ_C 71,5) với H-10 (δ_H 3,39), tương ứng. Như trong cấu trúc của **G666-1**, nhóm ethyl este của **G666-2** được xác định dựa vào tương tác HMBC của C-7 (δ_C 165,0) với CH_2 -8 (δ_H 4,15 và 4,18) và H-2 (δ_H 7,19). Nhóm benzoyloxy thế được gắn tại C-6 dựa vào tương tác HMBC của C-17 (δ_C 164,4) với H-6 (δ_H 5,91)/H-19 (δ_H 7,94)/H-23 (δ_H 7,88). Dựa vào độ chuyển dịch của C-5 (δ_C 70,6) chứng tỏ C-5 liên kết với oxy và dựa vào độ chuyển dịch của C-20 (δ_C 134,6) xác định được clo liên kết với C-20 của vòng benzen. Cấu hình tương đối của **G666-2** tương tự như cấu hình của **G666-1**, được thiết lập bằng các phân tích hằng số tương tác proton (**Bảng 4.12**) và tương tác NOESY. Phân tích chi tiết các tương tác trên phổ HMBC, COSY và

NOESY (hình 4.55) cho phép xác định chính xác cấu trúc của **G666-2**, đây là một chất mới được đặt tên là streptomine B.

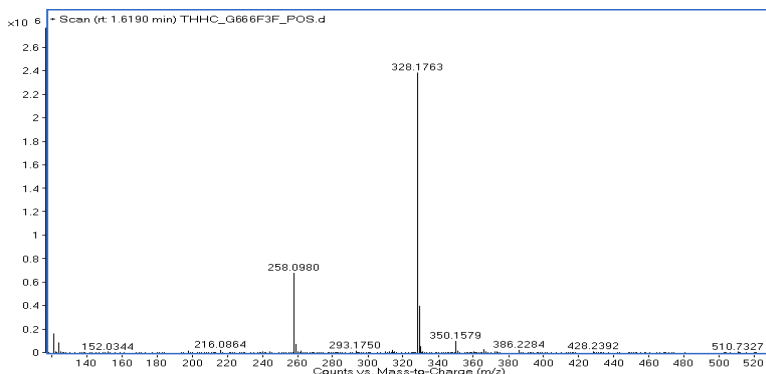


Hình 4.55: Một số tương tác COSY, HMBC, NOESY của **G666-2**
4.2.3. Hợp chất streptomine C (G666-3) (chất mới)



Hợp chất **G666-3** được phân lập dưới dạng chất rắn hình kim màu trắng, độ quay cực riêng $[\alpha]_D^{26} = +65,9$ (c 0,5; CHCl_3). Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS của hợp chất **G661-3** cho pic ion giả phân tử tại m/z 328,1763 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{NO}_6]^+$ có m/z 328,1763), kết hợp với dữ liệu phổ ^{13}C -NMR, HSQC xác định được công thức của **G666-3** là $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{NO}_6$, DBE = 5. Trên phổ IR cho thấy đỉnh hấp thụ của nhóm hydroxyl và carbonyl ở 3444 cm^{-1} và 1643 cm^{-1} tương ứng.

Phổ ^{13}C -NMR, DEPT và HSQC của **G666-3** cho thấy tín hiệu của mười sáu nguyên tử carbon bao gồm hai nhóm carbonyl ở δ_C 168,0 (C-7); 170,1 (C-15); bốn nhóm methyl có độ chuyển dịch hóa học ở δ_C 14,1 (C-9); 9,3 (C-12); 9,6 (C-14); 23,4 (C-16); ba nhóm methylene tại δ_C 62,6 (C-8); 25,7 (C-11); 26,4 (C-13); sáu nhóm methine tại δ_C 60,1 (C-2); 72,8 (C-3); 48,1 (C-4); 55,2 (C-5); 52,3 (C-6); 82,1 (C-10). Độ chuyển dịch hóa học của các nguyên tử carbon ở δ_C C-3, C-8, C-4, C-5 và C-6 cho phép xác định chúng có liên kết với oxy hoặc nitơ

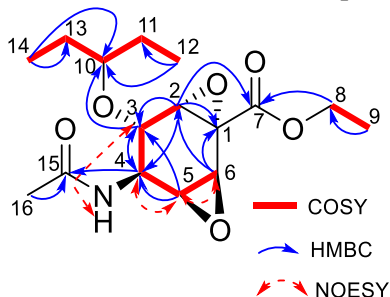


Hình 4.56: Phổ HR-ESI- MS của hợp chất **G666-3**

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **G666-3** phù hợp với dữ liệu phổ $^{13}\text{C-NMR}$ với tín hiệu 4 nhóm methyl ở δ_{H} 0,88 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, CH_3 -12); 0,96 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, CH_3 -14); 1,34 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, CH_3 -9) và 2,03 (3H, s, H-16), tín hiệu của ba nhóm methylene ở δ_{H} 1,51 (2H, m, CH_2 -11); 1,53 (2H, m, CH_2 -13); 4,25-4,36 (2H, m, CH_2 -8). Tín hiệu của sáu nhóm methine sp^3 ở δ_{H} 3,65 (1H, s, H-2); 3,67 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-3); 4,47 (1H, dt, $J = 1,0; 9,0$ Hz, H-4); 3,37 (1H, dd, $J = 1,0; 4,5$ Hz, H-5); 3,87 (1H, d, $J = 4,5$ Hz, H-6); 3,31 (1H, quint, $J = 5,5$ Hz, H-10) và 1 nhóm NH dưới dạng doublet ở δ_{H} 5,6 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, NH) cũng được quan sát thấy trên phổ $^1\text{H-NMR}$.

Dữ liệu phổ NMR hợp chất **G666-3** có sự tương đồng với **G666-1**, nhưng khác với hợp chất **G666-1**, trên phổ của hợp chất **G666-3** cho thấy sự đóng vòng epoxy ở vị trí C1-C2 [C-1 (δ_{C} 57,9); C-2 (δ_{C} 60,1)] thay cho liên kết đôi và đóng vòng epoxy ở vị trí C5-C6 [C-5 (δ_{C} 55,2); C-6 (δ_{C} 52,3)] thay cho nhóm OH và *O*-acetyl. Trên phổ COSY xuất hiện chuỗi tương tác spin-spin của H-2 (δ_{H} 3,65)/H-3 (δ_{H} 3,67)/H-4 (δ_{H} 4,47)/H-5 (δ_{H} 3,37)/H-6 (δ_{H} 3,87). Tương tác HMBC của C-1 (δ_{C} 57,9) với proton H-2/H-6 cho thấy sự có mặt của vòng cyclohexane. Nhóm pentanyloxy được xác định gắn ở C-3 và nhóm acetamide gắn ở C-4 dựa vào tương tác HMBC của H-3 với C-10 (δ_{C} 82,1) và tương tác của H-4 với C-15 (δ_{C} 170,0). Nhóm ethyl este được xác định bằng các tương tác của CH_2 -8 (δ_{H} 4,32) với C-7 (δ_{C} 168,0) trên phổ HMBC. Hơn nữa, tương tác NOE của H-4 với H-5 và H-6 cho thấy sự định hướng của chúng trên cùng một phía của vòng cyclohexane. Các phân tích chi

tiết về phổ 2D-NMR đã xác nhận cấu trúc của hợp chất **G666-3** (Hình 4.62) đây là một chất mới và được đặt tên là streptomine C.



Hình 4.62: Một số tương tác chính trên phổ COSY, HMBC của hợp chất **G666-3**

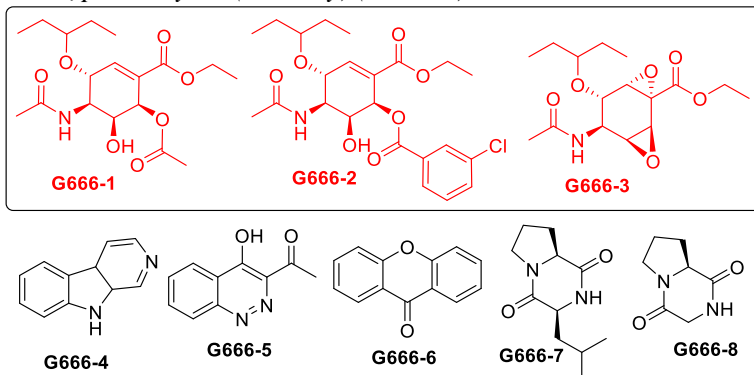
4.2.4. Hợp chất norharman (G666-4)

4.2.5. Hợp chất 3-acetyl-4-hydroxycinnoline (G666-5)

4.2.6. Hợp chất xanthone (G666-6)

4.2.7. Hợp chất cyclo-(Pro-Leu) (G666-7)

4.2.8. Hợp chất cyclo-(Pro-Gly) (G666-8)



Từ dịch ngoại bào của chủng vi sinh vật *streptomyces* sp. G666, cấu trúc của 8 hợp chất đã được xác định, đó là streptomine A (G666-1), streptomine B (G666-2), streptomine C (G666-3), 9H-pyrido[3,4-b]indole (G666-4), 3-acetyl-4-hydroxycinnoline (G666-5), xanthone (G666-6), cyclo-(leu-Pro) (G666-7), cyclo-(Pro-Gly) (G666-8). Trong đó, ba hợp chất G666-2, G666-2 và G666-3 là các hợp chất mới.

4.3. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ chủng *Streptomyces* sp. G246

4.3.1. Hợp chất spirotryprostatin A (G246-1)

4.3.2. Hợp chất cyclo-(Pro-Met) (G246-2)

4.3.3. Hợp chất phenol A acid (G246-3)

4.3.4. Hợp chất 3,4-dihydroxy-6,7-dimethyl-quinoline-2-carboxylic (G246-4)

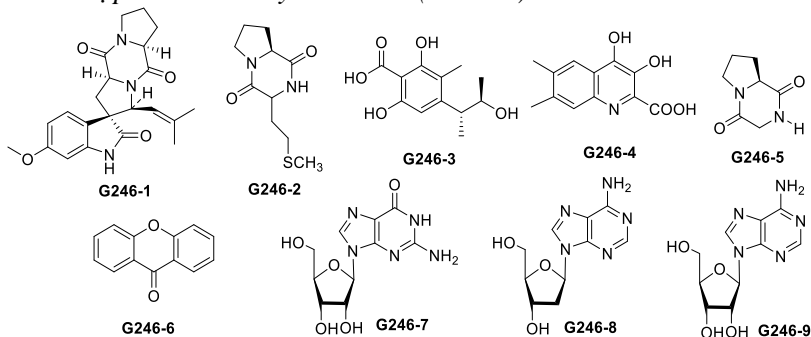
4.3.5. Hợp chất cyclo-(Pro-Gly) (G246-5)

4.3.6. Hợp chất xanthone (G246-6)

4.3.7. Hợp chất guanosine (G246-7)

4.3.8. Hợp chất adenosine (G246-8)

4.3.9. Hợp chất 2'-deoxyadenosine (G246-9)



Từ dịch ngoại bào của chủng vi sinh vật *streptomyces* sp. G246, cấu trúc của 9 hợp chất đã được phân lập và xác định, bao gồm spirotryprostatins A (G246-1), cyclo-(Pro-Met) (G246-2), phenol A acid (G246-3), 3,4-dihydroxy-6,7-dimethyl-quinoline-2-carboxylic (G246-4), cyclo-(Pro-Gly) (G246-5), xanthone (G246-6), guanosine (G246-7), 2'-deoxyadenosine (G246-8), adenosine (G246-9).

4.4. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các hợp chất sạch đã phân lập

Các hợp chất sạch từ chủng xạ khuẩn được thử hoạt tính đối với 7 chủng VSVKD bao gồm 3 chủng vi khuẩn Gram âm: *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076; 3 chủng vi khuẩn Gram dương: *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579 và 1 chủng nấm *Candida albicans* ATCC10231.

Bảng 4.27: Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của của các hợp chất thứ cấp phân lập được từ chủng *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631

TT	Hợp chất	MIC (µg/ml)						
		Gram dương			Gram âm			Nấm
		<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enterica</i>	<i>C. albicans</i>
1	G631-1	128	64	-	-	-	-	128
2	G631-2	128	128	-	32	64	-	32
3	G631-3	64	128	-	256	-	-	64
4	G631-4	64	128	16	-	64	-	128
5	G631-5	128	64	128	-	-	-	32
6	G631-6	128	128	-	-	-	-	128
7	G631-7	64	256	128	-	-	-	64
8	G631-8	-	-	-	-	-	-	-
9	*S	256	256	128	32	256	128	
10	*C							32

*Chất đối chứng dương S: Streptomycin, C: Cycloheximide; (-) Không có hoạt tính

8 hợp chất thứ cấp phân lập từ chủng *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631 được thử hoạt tính kháng 7 chủng vi sinh vật kiểm định, kết quả cho thấy hợp chất mới **G631-1** thể hiện hoạt tính đối với 2 chủng Gram (+) *E. faecalis*, *S. aureus* và 1 chủng nấm *C. albicans* với giá trị MIC lần lượt là 128, 64 và 128 µg/ml. Hợp chất **G631-5** và **G631-7** cùng thể hiện hoạt tính đối với 4 chủng vi sinh vật kiểm định là *E. faecalis*, *S. aureus*, *B. cereus*, *C. albicans* với giá trị MIC từ 32-256 µg/ml. Hợp chất **G631-4** thể hiện hoạt tính đối với 5 chủng vi sinh vật kiểm định là *E. faecalis*, *S. aureus*, *B. cereus*, *aeruginosa*, *C. albicans* với giá trị MIC nằm trong khoảng 16-128 µg/ml, hợp chất này thể hiện hoạt tính tốt nhất đối với chủng *B. cereus* với giá trị MIC = 16 µg/ml. Hợp chất **G631-6** thể hiện hoạt tính chọn lọc đối với 2 chủng *E. faecalis*, *S. aureus* với giá trị MIC = 128 µg/ml. Hợp chất **G631-2** thể hiện hoạt tính đối với 5 chủng vi sinh vật kiểm định, hợp chất này có hoạt tính tốt với 2 chủng *E. coli* và *C. albicans* với giá trị MIC = 32

µg/ml. Hợp chất **G631-8** không thể hiện hoạt tính đối với 7 chủng vi sinh vật kiểm định thử nghiệm.

Bảng 4.18: Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của của các hợp chất thứ cấp phân lập được từ chủng *Streptomyces* sp. G666

TT	Hợp chất	MIC (µg/ml)						
		Gram dương			Gram âm			Nấm
		<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enterica</i>	
1	G666-1	64	64	64	-	-	-	16
2	G666-2	64	-	-	-	-	-	16
3	G666-3	32	64	-	-	-	-	16
4	G666-4	-	-	-	128	-	-	-
5	G666-5	64	256	256	-	-	-	128
6	G666-6	128	256	256	64	256	128	-
7	G666-7	-	-	-	-	-	-	-
8	G666-8	-	-	-	-	-	-	-
9	*S	256	256	128	32	256	128	
10	*C							32

*Chất đối chứng dương S: Streptomycin, C: Cycloheximide; (-) Không có hoạt tính

Cả 3 hợp chất mới phân lập từ chủng *Streptomyces* sp. G666 đều thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định tốt, trong đó hợp chất **G666-2** thể hiện hoạt tính chọn lọc đối với 2 chủng vi sinh vật kiểm định là *E. faecalis* và *C. albicans* với giá trị MIC lần lượt là 64 và 16 µg/ml. Hợp chất mới **G666-2** thể hiện hoạt tính đối với 3 chủng Gram (+) *E. faecalis*, *S. aureus*, *B. cereus* và 1 chủng nấm *C. albicans* với giá trị MIC lần lượt là 64, 64, 64 và 16 µg/ml. Hợp chất mới **G666-3** thể hiện hoạt tính đối với 2 chủng Gram (+) *E. faecalis*, *S. aureus* và 1 chủng nấm *C. albicans* với giá trị MIC lần lượt là 32, 64 và 16 µg/ml. Cả 3 hợp chất mới từ chủng G666 (**G666-1**, **G666-2**, **G666-3**) thể hiện hoạt tính kháng nấm đối với chủng *Candida albicans* cao hơn đối chứng dương là hợp chất cycloheximide. Hợp chất **G666-4** thể hiện hoạt tính chọn lọc đối với chủng *E. coli* với giá trị MIC = 64 µg/ml. Hợp chất **G666-6** thể hiện hoạt tính đối với 6/7 chủng vi sinh vật kiểm định thử nghiệm.

Bảng 4.29: Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của của các hợp chất thứ cấp phân lập được từ chủng *Streptomyces* sp. G246

TT	Hợp chất	MIC ($\mu\text{g/ml}$)						
		Gram dương			Gram âm			Nấm
		<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enterica</i>	<i>C. albicans</i>
1	G246-1	64	-	128	-	-	-	128
2	G246-2	32	-	-	-	-	-	-
3	G246-3	-	-	-	-	-	-	-
4	G246-4	128	-	-	32	256	64	-
5	G246-7	-	-	-	-	-	-	-
6	G246-8	32	-	-	-	-	-	64
7	G246-9	-	-	-	-	-	-	-
8	*S	256	256	128	32	256	128	
9	*C							32

*Chất đối chứng dương S: Streptomycin, C: Cycloheximide; (-) Không có hoạt tính

Trong số 7 hợp chất thứ cấp phân lập từ chủng *Streptomyces* sp. G246 thử nghiệm thì có 4 hợp chất thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định trong đó hợp chất **G246-1** thể hiện hoạt tính đối với 2 chủng Gram (+) *E. faecalis*, *B. cereus* và 1 chủng nấm *C. albicans* với giá trị MIC lần lượt là 64, 128 và 128 $\mu\text{g/ml}$. Hợp chất **G246-2** thể hiện hoạt tính chọn lọc đối với chủng *E. faecalis* với giá trị MIC = 32 $\mu\text{g/ml}$. Hợp chất **G246-4** thể hiện hoạt tính đối với cả 3 chủng Gram (-) *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* với giá trị MIC lần lượt là 32, 256 và 64 $\mu\text{g/ml}$. Hợp chất **G246-8** thể hiện hoạt tính tốt đối với 2 chủng Gram (+) *E. faecalis* và chủng nấm *C. albicans* với giá trị MIC lần lượt là 32 và 64 $\mu\text{g/ml}$.

Như vậy trong số 23 hợp chất thử hoạt tính có 17 hợp chất có hoạt tính ức chế từ 1 đến 7 chủng VSVKĐ với giá trị MIC bằng và thấp hơn giá trị MIC của các kháng sinh đối chứng, trong đó có 16 hợp chất có hoạt tính lên các chủng vi khuẩn Gram dương, 6 hợp chất có hoạt tính lên các chủng vi khuẩn Gram âm và 13 hợp chất có hoạt tính lên chủng nấm kiểm định. Hợp chất **G666-6** thể hiện hoạt tính kháng VSVKĐ phổ rộng với khả năng tác động lên 6/6 chủng vi khuẩn kiểm định nhưng không có hoạt tính lên chủng nấm kiểm định. Ba hợp chất

G631-2, G631-4, G246-4 có hoạt tính lên 4/6 chủng vi khuẩn kiểm định với các giá trị MIC thấp hơn hoặc bằng với MIC của chất đối chứng dương, hợp chất **G246-4** không có hoạt tính lên chủng nấm kiểm định còn đối với hợp chất **G631-2** và **G631-4** có giá trị MIC thấp hơn hoặc bằng với chất đối chứng Cycloheximide. Năm hợp chất **G666-1, G631-5, G631-3, G631-5, G631-7** kháng 3/6 chủng vi khuẩn kiểm định và cả 5 chất đều có hoạt tính lên chủng nấm kiểm định, trong đó hợp chất **G666-1** thể hiện hoạt tính kháng nấm tốt nhất với giá trị MIC là 16 $\mu\text{g/mL}$ thấp hơn nhiều so với chất đối chứng Cycloheximide. Bốn hợp chất **G666-3, G631-1, G631-6, G246-1** thể hiện hoạt tính với 2/6 chủng vi khuẩn kiểm định tốt với giá trị MIC thấp hơn đối chứng dương Streptomycin, chúng đều có hoạt tính lên chủng nấm kiểm định và hợp chất **G666-3** có hoạt tính mạnh nhất với giá trị MIC 16 $\mu\text{g/mL}$. Ba hợp chất **G666-2, G246-2, G246-8** có tác dụng chọn lọc lên chủng vi khuẩn kiểm định *Enterococcus faecalis* với giá trị MIC lần lượt là 64, 32, 32 $\mu\text{g/mL}$ thấp hơn rất nhiều so với chất đối chứng dương Streptomycin, chúng đều có hoạt tính lên chủng nấm kiểm định, trong đó hợp chất **G666-2** có hoạt tính cao nhất với giá trị MIC 16 $\mu\text{g/mL}$. Nhiều chất thể hiện hoạt tính kháng nấm tốt đối với chủng nấm kiểm định *Candida albicans* ATCC10231 điển hình là **G666-1, G666-2, G666-3**.

KẾT LUẬN

1. Đã tiến hành nuôi cấy nhân sinh khối lượng lớn quy mô 50 kg ba chủng xạ khuẩn là *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631, *Streptomyces* sp. G666 và *Streptomyces* sp. 246. Đây là các chủng có hoạt tính kháng VSVKĐ tốt, kháng từ 3-5 chủng VSV kiểm định thử nghiệm.

2. Đã tiến hành nghiên cứu phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 25 hợp chất thứ cấp từ 3 chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G666, *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631 và *Streptomyces* sp. 246 (gồm 23 hợp chất khác nhau), trong đó có 4 hợp chất mới là streptomine A (**G666-1**), streptomine B (**G666-2**), streptomine C (**G666-3**) và isocyanogranamide (**G631-1**). Cấu trúc hóa học của các hợp chất mới được khẳng định bằng kết hợp các phương pháp phổ vật lý hiện đại và so sánh với tài liệu tham khảo.

3. Các hợp chất phân lập được đã được khảo sát hoạt tính kháng VSVKĐ trong đó cả 4 hợp chất mới đều thể hiện hoạt tính tốt, kháng từ 2-4 chủng vi sinh vật kiểm định thử nghiệm với giá trị MIC

từ 16-128 $\mu\text{g/ml}$, 3 hợp chất mới từ chủng G666 là **G666-1**, **G666-2**, **G666-3** thể hiện hoạt tính kháng nấm đối với chủng *Candida albicans* cao hơn đối chủng dương là hợp chất cycloheximide. Hợp chất (**G666-6**) kháng 5/7 chủng VSVKĐ và 1 hợp chất (**G666-6**) kháng 6/7 chủng VSVKĐ. 3 hợp chất là **G631-2**, **G631-4**, **G246-4** kháng 4/7 chủng VSVKĐ. 4 hợp chất là **G666-1**, **G666-5**, **G631-3**, **G631-5** kháng 3/7 chủng VSVKĐ. 3 hợp chất (**G666-3**, **G631-1**, **G631-6**) kháng 2/7 chủng VSVKĐ. 3 hợp chất (**G666-4**, **G246-2**, **G246-8**) kháng 1/7 chủng VSVKĐ. Đặc biệt là có 6 hợp chất có hoạt tính đối với các chủng Gram (-) thử nghiệm.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Từ kết quả sàng lọc hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định, đã tiến hành nuôi cấy nhân sinh khối lượng lớn quy mô 50 kg ba chủng xạ khuẩn là *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631, *Streptomyces* sp. G666 và *Streptomyces* sp. 246.
2. Từ 3 chủng xạ khuẩn *Actinoalloteichus cyanogriseus* G631, *Streptomyces* sp. G666 và *Streptomyces* sp. 246, đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 25 hợp chất thứ cấp (gồm 23 hợp chất khác nhau), trong đó có 4 hợp chất mới là streptomine A (**G666-1**), streptomine B (**G666-2**), streptomine C (**G666-3**) và isocyanogramide (**G631-1**).
3. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng VSVKĐ của 23 hợp chất thứ cấp phân lập được cho thấy 18/23 hợp chất thể hiện hoạt tính kháng VSVKĐ. Cả 4 hợp chất mới đều thể hiện hoạt tính tốt, kháng từ 2-4 chủng vi sinh vật kiểm định thử nghiệm với giá trị MIC từ 16-128 $\mu\text{g/ml}$, 3 hợp chất mới từ chủng G666 là **G666-1**, **G666-2**, **G666-3** thể hiện hoạt tính kháng nấm đối với chủng *Candida albicans* cao hơn đối chủng dương là hợp chất cycloheximide. Đặc biệt là có 6 hợp chất có hoạt tính đối với các chủng Gram (-) thử nghiệm.

KIẾN NGHỊ

1. Các hợp chất đã được phân lập từ các chủng xạ khuẩn nên tiếp tục tiến hành nghiên cứu về các tính sinh học khác, ví dụ như hoạt tính gây độc tế bào, hoạt tính kháng viêm, chống oxy hóa, nhằm hướng đến khả năng ứng dụng vào thực tế trong tương lai. Đặc biệt là đối với những chất mới có cấu trúc hóa học độc đáo như hợp chất isocyanogramide **G631-1**, streptomine A **G666-1**, streptomine B **G666-2**, streptomine C **G666-3**.

2. Ba chủng xạ khuẩn đã được nghiên cứu trong luận án cần được nhân sinh khối lượng lớn trong các môi trường khác nhằm phân lập được các hợp chất thứ cấp có tiềm năng về hoạt tính sinh học cũng như cấu trúc hóa học độc đáo. Bên cạnh đó, việc tiếp cận các nguồn xạ khuẩn biển Việt Nam đang ngày càng dễ dàng nhờ sự phát triển mạnh mẽ của khoa học kỹ thuật, chúng ta nên mở rộng tìm kiếm, thu thập thêm các chủng xạ khuẩn khác ở các vùng biển còn lại nhằm phục vụ nghiên cứu và củng cố chủ quyền biển đảo.

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Do Thi Quynh**, Trinh Thi Thanh Van, Nguyen Thuy Linh, Le Thi Hong Minh, Vu Thi Quyen, Brian T. Murphy, Doan Thi Mai Huong, Pham Van Cuong, 2023. *A New Alkaloid from Marine-Derived Actinomycete Actinoalloteichus cyanogriseus G631*, Records of Natural Products, (DOI: 10.25135/rnp.412.2305.2776).
2. **Do Thi Quynh**, Doan Thi Mai Huong, Tran Van Hieu, Truong Bich Ngan, Le Thi Hong Minh, Vu Thi Quyen, Nguyen Thi Hoang Anh, Brian T. Murphy, Pham Van Cuong, 2021. *Secondary metabolites produced by marine actinomycete Streptomyces sp. G246*, Vietnam Journal of Chemistry, 59 (1) (2021)1-8, (DOI: 10.15625/2525-2518/58/6/15176).
3. Phạm Văn Cường, Đoàn Thị Mai Hương, **Đỗ Thị Quỳnh**, Lê Thị Hồng Minh, Trịnh Thị Thanh Vân, Vũ Thị Quyên, Vũ Thị Thu Huyền. Hợp chất streptomine G666A và phương pháp tách chiết hợp chất này từ chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces sp. G666*. Quyết định chấp nhận đơn hợp lệ số 11958w/QĐ-SHTT ngày 15/7/2022, số đơn 1-2022-01427.
4. **Thi Quynh Do**, Thanh Van Trinh Thi, Thi Dao Phi, Thuy Linh Nguyen, Thi Quyen Vu, Hong Minh Le Thi, Brian T. Murphy, Thi Mai Huong Doan, Van Cuong Pham. *New shikimic acid derivatives from the marine-derived actinomycete Streptomyces sp. G666 and their antimicrobial activities*, Chemistry & Biodiversity, 2024 (submitted).