



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0042155

(51)<sup>2021.01</sup> C12N 1/20; C12P 17/00

(13) B

(21) 1-2022-01427

(22) 07/03/2022

(45) 25/12/2024 441

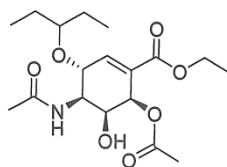
(43) 25/08/2022 413

(73) Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam (VN)  
18, Hoàng Quốc Việt - Cầu Giấy - Hà Nội

(72) Phạm Văn Cường (VN); Đoàn Thị Mai Hương (VN); Đỗ Thị Quỳnh (VN); Lê Thị Hồng Minh (VN); Trịnh Thị Thanh Vân (VN); Vũ Thị Quyên (VN); Vũ Thị Huyền (VN).

(54) HỢP CHẤT STREPTOMINE A VÀ PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT HỢP CHẤT NÀY TỪ CHỦNG XẠ KHUẨN BIỂN STREPTOMYCES SP. G666

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất streptomine A có công thức (1) được tách chiết từ sản phẩm lên men dạng rắn của chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. G666 và phương pháp tách chiết hợp chất này. Hợp chất streptomine A thu được thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật đối với 3 chủng gram (+) *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579 và 1 chủng nấm men *Candida albicans* ATCC10231.



Công thức 1

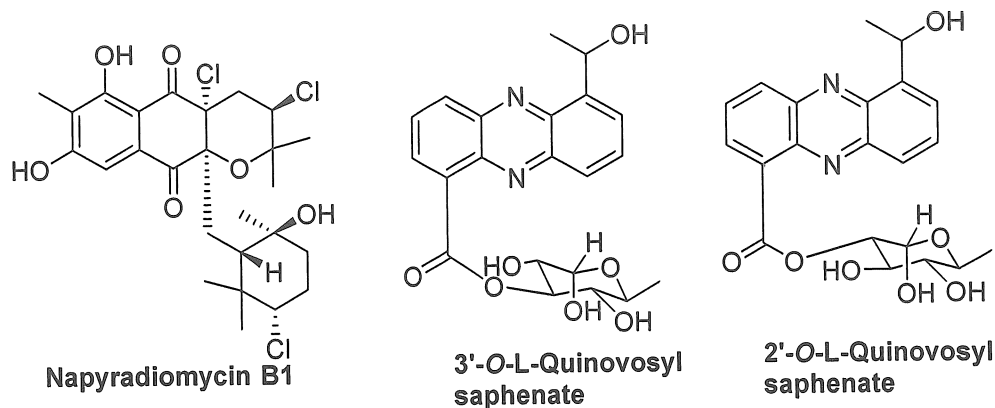
### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực các hợp chất thiên nhiên, cụ thể là đề cập đến hợp chất streptomine A có nguồn gốc từ chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. G666 và phương pháp tách chiết hợp chất này từ chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. G666.

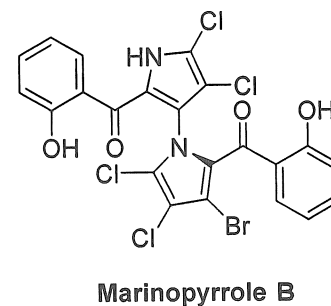
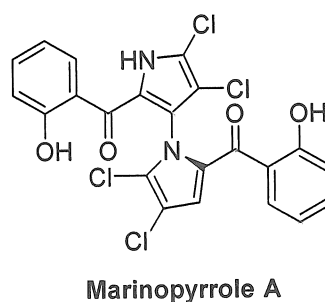
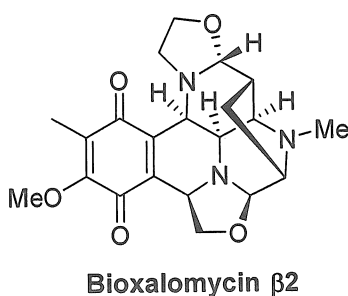
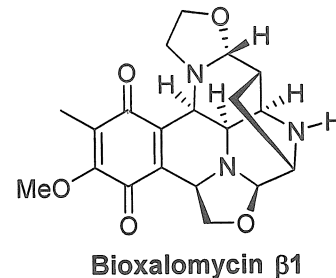
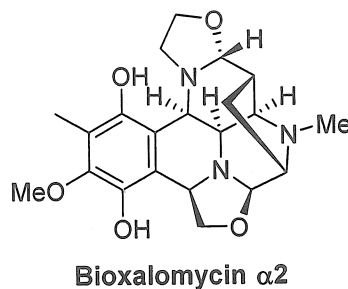
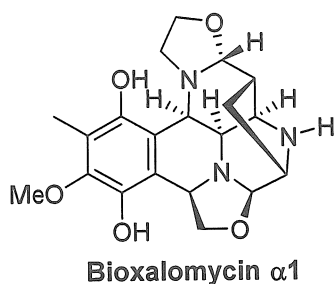
### Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Môi trường biển là điều kiện thuận lợi để phát triển các hợp chất tự nhiên có cấu trúc hóa học đa dạng, hoạt tính sinh học phong phú, được coi là nguồn tài nguyên quý cho các nghiên cứu phát triển thuốc kháng sinh mới. Xạ khuẩn biển là nguồn cung cấp các hợp chất có hoạt tính sinh học lý thú. Nhiều nghiên cứu cho thấy tính đa dạng về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các hợp chất được tách chiết từ các chủng xạ khuẩn biển. Một trong những đặc điểm quan trọng của xạ khuẩn là khả năng hình thành chất kháng sinh.

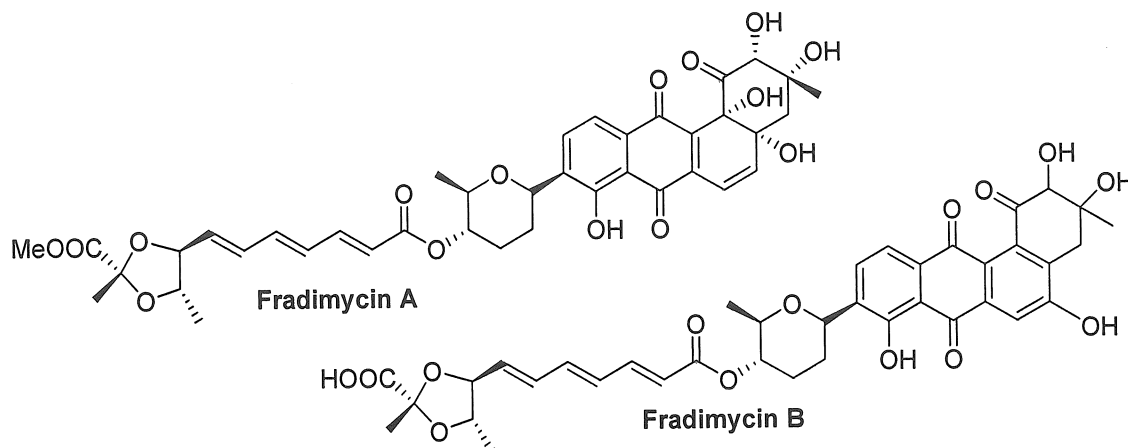
Chi *Streptomyces* là chi lớn nhất trong xạ khuẩn, có khả năng sản xuất nhiều hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học đa dạng như kháng vi sinh vật, kháng viêm, kháng ung thư, đặc biệt là kháng sinh như streptomycin, tetracycline, chloramphenicol, kanamycin, vancomycin, neomycin (J. Berdy, *J. Antibiot.*, 2005, 58, 1-26). Các chất chuyển hóa từ *Streptomyces* nguồn gốc biển có cấu trúc thú vị và độc đáo, nhiều hợp chất hiếm hoặc chưa từng có từ các nguồn trên cạn. Từ chủng *Streptomyces* sp. No. 9558 phân lập từ trầm tích ở vùng biển Kujukuri, Chiba, Nhật Bản, tác giả Shiomi và cộng sự đã phân lập được hợp chất napyradiomycin B1. Hợp chất này thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật đối với nhiều chủng vi sinh vật thử nghiệm như *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium bovis* với giá trị MIC nằm trong khoảng 0,78-3,12 µg/mL (K. Shiomi et al., *J. Antibiot.*, 1986, 39, 487-493).



Các hợp chất thuộc lớp chất phenazin là 3'-O-L-Quinovosyl saphenat và 2'-O-L-Quinovosyl saphenat có hoạt tính kháng khuẩn cũng được phát hiện từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. CNB-253 phân lập từ trầm tích biển thuộc vịnh Bodega, California, Mỹ (C. Pathirana et al., *J. Org. Chem.*, 1992, 57, 740-742). Đây là các hợp chất có chứa khung carbon hiếm trong tự nhiên với phần L-quinovose ester. Các hợp chất này thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với một số chủng vi khuẩn thử nghiệm, trong đó hợp chất 3'-O-L-Quinovosyl saphenat thể hiện hoạt tính tốt nhất đối với vi khuẩn Gram dương với giá trị MIC = 4  $\mu\text{g/mL}$  (J. B. Laursen et al. *Chemical Reviews*, 2004, 104, 1663-1686). Cũng cần nhấn mạnh rằng, hiện nay, một số sản phẩm là các dẫn xuất của phenazin đang được nghiên cứu sử dụng khai thác hoạt tính kháng khuẩn của chúng trong các lĩnh vực y dược và nông nghiệp. Trong một nghiên cứu về chủng *Streptomyces* sp. LL-31F508 phân lập từ trầm tích biển Florida, Mỹ, tác giả Bernan đã phát hiện được bốn hợp chất bioxalomycin  $\alpha$ 1- $\beta$ 2. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật cho thấy bốn hợp chất này thể hiện hoạt tính rất mạnh đối với các chủng *Staphylococcus* sp. và *Enterococcus* sp. Đặc biệt hợp chất bioxalomycin  $\beta$ 2 thể hiện hoạt tính mạnh nhất với giá trị MIC nằm trong khoảng 0,002 đến 0,1  $\mu\text{g/mL}$  (V. S. Bernan et al., *J. Antibiot.*, 1994, 47, 1417-1424). Từ chủng *Streptomyces* sp. CNQ-418 có nguồn gốc từ trầm tích biển, hợp chất marinopyrrol A và B đã được phân lập vào năm 2008. Đây là các hợp chất tự nhiên chứa liên kết N giữa 2 vòng pyrrol, thể hiện hoạt tính đối với chủng *Staphylococcus aureus* kháng methicillin (MRSA) với giá trị MIC<sub>90</sub> = 0,31-1,1  $\mu\text{M}$  (C. C. Hughes et al., *Org. Lett.*, 2008, 10, 629-631).

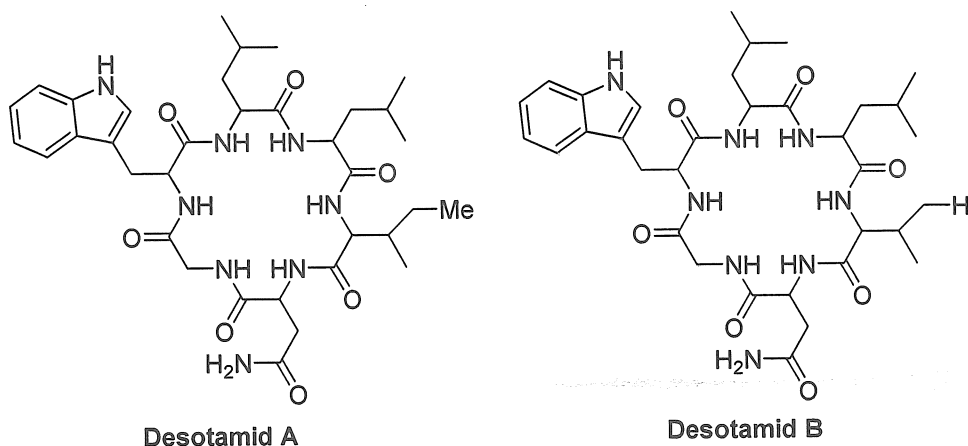


Từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces fradiae* (PTZ0025) phân lập từ trầm tích biển, năm 2012, hai hợp chất fradimycin A và B được phát hiện. Hai hợp chất này thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật đối với chủng *Staphylococcus aureus* với giá trị MIC tương ứng là 6,0 và 2,0  $\mu\text{g/mL}$  và hoạt tính gây độc tế bào ung thư đối với một số dòng tế bào ung thư thử nghiệm (W. Xin et al. *Mar. Drugs*, 2012, 10, 2388-2402).

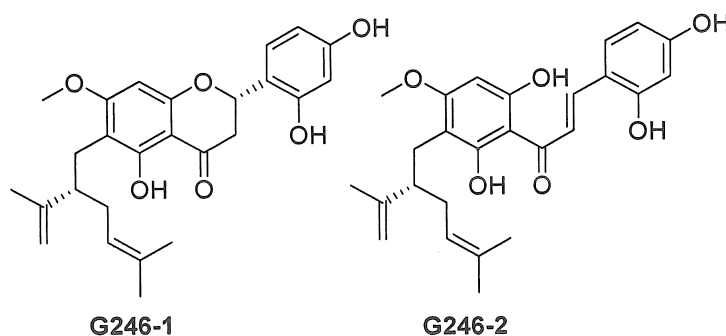


Năm 2014, desotamit A và desotamit B là hai hợp chất vòng hexapeptit được phân lập từ chủng xạ khuẩn trầm tích biển sâu *Streptomyces scopuliridis* SCSIO ZJ46. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật cho thấy hai hợp chất này có hoạt tính tốt đối với các chủng vi sinh vật *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* kháng methicillin (MRSA) với giá trị MIC nằm trong khoảng 12,5-32,0  $\mu\text{g/mL}$ . Nghiên cứu mối quan hệ giữa hoạt tính - cấu trúc cho

thấy mảnh cấu trúc tryptophan đóng vai trò quyết định đối với hoạt tính kháng vi sinh vật của hai hợp chất này (Y. Song et al., *J. Nat. Prod.*, 2014, 77, 1937-1941).



Từ dịch nuôi cấy của chủng vi sinh vật *Streptomyces* sp. G246 phân lập từ loài hải miên *Halichondria panicea* (Pallas, 1766) thu thập ở bán đảo Sơn Trà, Đà Nẵng, 2 hợp chất flavonoid mới là 6-lavandulyl-7-metoxyl-5,2',4'-trihydroxylflavanon (**G246-1**) và 5'-lavandulyl-40-metoxyl-2,4,2',6'-tetrahydroxylchalcon (**G246-2**) và 8 hợp chất đã biết được phân lập và xác định cấu trúc hóa học. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của 2 hợp chất đối với 7 chủng vi sinh vật kiểm định *Escherichia coli* (ATCC25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC7853), *Salmonella enterica* (ATCC13076), *Enterococcus faecalis* (ATCC29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Bacillus cereus* (ATCC14579), *Candida albicans* (ATCC10231) cho thấy hợp chất 6-lavandulyl-7-metoxyl-5,2',4'-trihydroxylflavanon thể hiện hoạt tính với 7 chủng vi sinh vật thử nghiệm với giá trị MIC nằm trong khoảng 16-128  $\mu\text{g/mL}$ . Hợp chất 5'-lavandulyl-40-metoxyl-2,4,2',6'-tetrahydroxylchalcon thể hiện hoạt tính đối với 6 chủng vi sinh vật thử nghiệm (trừ chủng *E. coli*) với giá trị MIC nằm trong khoảng 1-32  $\mu\text{g/mL}$  (D. D. Cao et al, *Natural Product Research*, 2020, 34, 413-420).

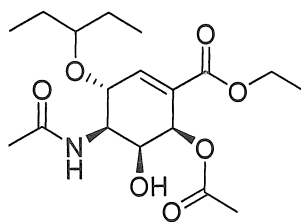


Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy rằng vùng biển nước ta có sự đa dạng sinh học phong phú. Tuy nhiên cho tới nay, ở nước ta mới chỉ có một số công trình nghiên cứu về các hợp chất thứ cấp được sinh tổng hợp từ các chủng xạ khuẩn, vi khuẩn và vi nấm biển. Do đó, nghiên cứu tìm kiếm các hợp chất mới có hoạt tính kháng vi sinh vật, có nguồn gốc từ các chủng xạ khuẩn được phân lập từ nguồn trong nước là một hướng nghiên cứu hứa hẹn nhiều triển vọng, cần được đẩy mạnh triển khai thực hiện nhằm ứng dụng trong việc chăm sóc sức khỏe cộng đồng.

### Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất thiên nhiên mới có hoạt tính kháng vi sinh vật, có nguồn gốc từ chủng xạ khuẩn phân lập được tại vùng biển Việt Nam.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất streptomine A có công thức (1) được tách chiết từ chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. G666 phân lập được từ mẫu sên biển (*Phyllidia varicosa* Lamarck 1801) thu thập ở vùng biển Vân Phong – Khánh Hòa của Việt Nam. Hợp chất này có hoạt tính kháng vi sinh vật đối với 3 chủng gram (+) *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579 và chủng nấm men *Candida albicans* ATCC10231.



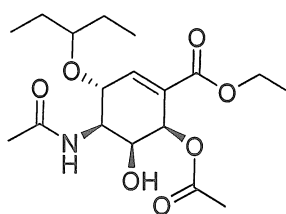
Công thức 1

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tách chiết hợp chất streptomine A từ chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. G666. Quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị các môi trường A1 và A1+; b) lên men sinh khối chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G666 và c) tách chiết hợp chất streptomine A từ sản phẩm lên men của chủng *Streptomyces* sp. G666 này.

### Mô tả chi tiết sáng chế

Chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. G666 được sử dụng trong sáng chế do Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam phân lập từ mẫu sên biển (*Phyllidia varicosa* Lamarck 1801) thu thập ở vùng biển Vân Phong – Khánh Hòa của Việt Nam. Chủng xạ khuẩn biển này đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với mã số **OM899717** và được lưu giữ tại Viện Hóa sinh biển – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam ở nhiệt độ -80°C.

Hợp chất streptomine A được tách chiết từ chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. G666 nêu trên. Hợp chất này có công thức (1) sau:



Công thức 1

Công thức phân tử của hợp chất:  $C_{18}H_{29}NO_7$

HR-ESI-MS  $m/z$  372,2026  $[M+H]^+$  (Tính toán lý thuyết cho công thức phân tử  $C_{18}H_{30}NO_7$   $m/z$  372,2022)

Hợp chất này được xác định bằng các phương pháp phổ NMR 1D, 2D, phổ khối lượng HR ESI-MS và phổ CD. Dữ liệu phổ  $^1H$ -NMR và  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ,  $^1H$ : 500.13 MHz,  $^{13}C$ : 125.76 MHz) được thể hiện như sau:

| C  | $\delta_C$ | $\delta_H$ mult. (J in Hz) |
|----|------------|----------------------------|
| 1  | 126,7      | -                          |
| 2  | 143,5      | 7,11 d (2,0)               |
| 3  | 71,6       | 4,32 dd (2,0; 9,5)         |
| 4  | 53,0       | 3,90 ddd (2,0; 7,5; 9,5)   |
| 5  | 70,6       | 4,07 dd (2,0; 2,5)         |
| 6  | 68,6       | 5,65 d (3,0)               |
| 7  | 165,1      | -                          |
| 8  | 61,0       | 4,18 m<br>4,25 m           |
| 9  | 14,1       | 1,27 t (7,0)               |
| 10 | 82,2       | 3,35 quint (6,0)           |

| C  | $\delta_c$ | $\delta_H$ mult. (J in Hz) |
|----|------------|----------------------------|
| 11 | 25,6       | 1,52 m                     |
| 12 | 9,3        | 0,89 t (7,5)               |
| 13 | 26,3       | 1,55 m                     |
| 14 | 9,7        | 0,94 t (7,5)               |
| 15 | 171,5      | -                          |
| 16 | 23,5       | 2,04 s                     |
| 17 | 170,1      | -                          |
| 18 | 20,9       | 2,04 s                     |
| NH |            | 6,18 d (7,5)               |

Phương pháp tách chiết hợp chất này từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G666 bao gồm các bước: a) chuẩn bị các môi trường A1 và A1+; b) lên men sinh khối chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G666; và c) tách chiết hợp chất streptomine A từ sản phẩm lên men của chủng xạ khuẩn này.

Các môi trường A1 và A1+ được chuẩn bị là các môi trường có các thành phần sau đây:

| Môi trường A1      |       | Môi trường A1+     |        |
|--------------------|-------|--------------------|--------|
| Tinh bột tan       | 15,5g | Tinh bột tan       | 500g   |
| Cao nấm men        | 6,2g  | Cao nấm men        | 200g   |
| Pepton             | 3,1g  | Pepton             | 100g   |
| Muối biển nhân tạo | 46,5g | CaCO <sub>3</sub>  | 1,5g   |
| Nước cất           | 1,55l | FeSO <sub>4</sub>  | 5g     |
|                    |       | KBr                | 4,75g  |
|                    |       | Muối biển nhân tạo | 1500g  |
|                    |       | Agar               | 750g   |
|                    |       | Nước cất           | 46,94l |

Ổng giữ chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G666 được bảo quản ở -80°C được đem rã đông, sau đó cấy rìa trên đĩa petri chứa 10ml môi trường A1, nuôi tĩnh ở nhiệt độ 28°C trong 4 ngày. Chọn 5 khuẩn lạc riêng rẽ được mọc từ đĩa petri để nhân giống cấp 1 bằng cách cấy vào bình tam giác chứa 30ml môi trường A1, sau



đó nuôi lắc trên thiết bị lắc với tốc độ 150 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 5 ngày để thu được dịch nhân giống cấp 1.

Dịch nhân giống cấp 1 được tiến hành nhân giống cấp 2 bằng cách bổ sung vào bình chứa môi trường A1 theo tỷ lệ 2% giống và nuôi lắc với tốc độ 150 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 6 ngày.

Tiến hành lên men sinh khối bằng cách bổ sung dịch nhân giống cấp 2 vào bình chứa môi trường A1+ đặc theo tỷ lệ 3% giống, nuôi tĩnh ở nhiệt độ 28°C trong 20 ngày để thu được sản phẩm lên men dạng rắn của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G666.

Sản phẩm lên men dạng rắn của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G666 được gộp lại, cắt nhỏ rồi chiết siêu âm ở 35°C lần lượt với các dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, etyl axetat, MeOH và n-BuOH theo tỉ lệ là 4:1 (kg/L), mỗi loại dung môi chiết 3 lần với thời gian 30 phút cho 1 lần chiết. Lọc loại bỏ cặn thu được dịch chiết, sau đó dịch chiết được đem quay cất trong chân không dưới áp suất giảm để loại hoàn toàn dung môi và thu được phần cặn chiết CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, etyl axetat, MeOH và n-BuOH.

Phần cặn chiết etyl axetat thu được được đem sắc ký cột silica gel với hệ dung môi diclometan:metanol theo tỷ lệ thể tích lần lượt là 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 0:100 thu được 8 phân đoạn được ký hiệu lần lượt là F1-F8 (Bảng 1).

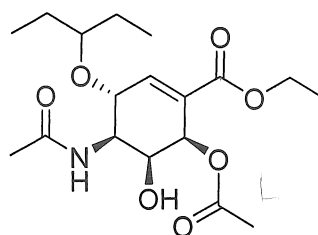
Bảng 1. Các phân đoạn thu được sau khi sắc ký cột silica gel

| STT | Phân đoạn | Tỉ lệ thể tích hệ dung môi diclometan:metanol (theo thể tích) |
|-----|-----------|---------------------------------------------------------------|
| 1   | F1        | 100:0                                                         |
| 2   | F2        | 90:10                                                         |
| 3   | F3        | 80:20                                                         |
| 4   | F4        | 70:30                                                         |
| 5   | F5        | 60:40                                                         |
| 6   | F6        | 50:50                                                         |

|   |    |       |
|---|----|-------|
| 7 | F7 | 40:60 |
| 8 | F8 | 0:100 |

Phân đoạn F3 tiếp tục được sắc ký cột silica gel với hệ dung môi diclometan:metanol theo tỉ lệ thể tích lần lượt là 95:5, 90:10; 85:15; 80:20; 75:25, 70:30, 65:35, 60:40 và 20:80 để thu được 9 phân đoạn nhỏ ký hiệu lần lượt là F3.1-F3.9;

Phân đoạn F3.6 thu được được tinh chế trên cột sephadex LH-20 theo tỷ lệ 1:1,61 (trọng lượng:thể tích) với dung môi metanol thu được hợp chất ở dạng chất rắn màu trắng. Hợp chất này được xác định cấu trúc hóa học bằng các phương pháp phổ NMR 1D, 2D, phổ khối lượng HR ESI-MS và phổ CD. Kết quả thu được hợp chất mới có tên khoa học là ethyl (3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-4-acetamido-6-acetoxy-5-hydroxy-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-en-1-carboxylat. Hợp chất được đặt tên là streptomine A, có công thức 1 là:



Công thức 1

Hợp chất streptomine A thu được có hoạt tính kháng vi sinh vật đối với 3 chủng gram (+) *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579 và chủng nấm men *Candida albicans* ATCC10231 với giá trị MIC lần lượt là 64, 64, 64 và 16 µg/ml.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được minh họa thêm bằng các ví dụ sau. Các ví dụ này được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa mà không nhằm làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế này.

Ví dụ 1. Lên men sinh khối chủng *Streptomyces* sp. G666

Chuẩn bị môi trường A1 và A1+ bao gồm các thành phần sau:

| Môi trường A1      |       | Môi trường A1+     |        |
|--------------------|-------|--------------------|--------|
| Tinh bột tan       | 15,5g | Tinh bột tan       | 500g   |
| Cao nấm men        | 6,2g  | Cao nấm men        | 200g   |
| Pepton             | 3,1g  | Pepton             | 100g   |
| Muối biển nhân tạo | 46,5g | CaCO <sub>3</sub>  | 1,5g   |
| Nước cất           | 1,55l | FeSO <sub>4</sub>  | 5g     |
|                    |       | KBr                | 4,75g  |
|                    |       | Muối biển nhân tạo | 1500g  |
|                    |       | Agar               | 750g   |
|                    |       | Nước cất           | 46,94l |

Lấy ống giữ chủng xạ khuẩn được bảo quản ở -80°C đem rã đông, dùng que cấy cấy ria trên đĩa petri chứa 10ml môi trường A1, sau đó nuôi tĩnh ở nhiệt độ 28°C trong 4 ngày, chọn ra 5 khuẩn lạc riêng rẽ được mọc từ đĩa petri để cấy vào bình tam giác thể tích 125ml chứa 30ml môi trường A1, nuôi lắc trên thiết bị lắc với tốc độ 150 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 5 ngày thu được dịch nhân giống cấp 1.

Nhân giống cấp 2 bằng cách chuyển toàn bộ 30ml dịch nhân giống cấp 1 vào bình tam giác thể tích 5l chứa 1,5l môi trường A1, nuôi lắc với tốc độ 150 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 6 ngày.

Lên men sinh khối chủng *Streptomyces* sp. G666 bằng cách chuyển 30ml dịch nhân giống cấp 2 vào mỗi bình tam giác thể tích 5l chứa 1l môi trường đặc A1+ (cần 50 bình tam giác thể tích 5l chứa 1l môi trường đặc A1+), nuôi tĩnh ở nhiệt độ 28°C trong 20 ngày thu được sản phẩm lên men rắn của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G666.

## Ví dụ 2. Tách chiết hợp chất streptomine A

Chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. G666 nuôi cấy trên môi trường rắn được gộp lại, cắt nhỏ (2cm x 2cm) rồi chiết siêu âm ở 35°C lần lượt với 12,5 L dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, etyl axetat, MeOH và n-BuOH, mỗi loại dung môi chiết 3 lần với thời gian 30 phút cho 1 lần chiết. Lọc loại bỏ cặn, dịch chiết sau đó được cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 17g cặn chiết CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (**CG666**), 31g cặn chiết EtOAc (**EG666**), 96g cặn chiết MeOH (**MG666**) và 48g cặn chiết n-BuOH

(BG666). Phần cặn chiết EtOAc (EG666) được đem sắc ký cột silica gel với hệ dung môi diclometan:metanol theo tỉ lệ thể tích từ 100:0 đến 0:100 thu được 8 phân đoạn ký hiệu lần lượt là F1-F8 như nêu trong bảng 2.

Bảng 2. Các phân đoạn sau khi sắc ký cột silica gel của cặn chiết etyl axetat

| STT | Phân đoạn | Tỉ lệ dung môi<br>diclometan:metanol (theo thể tích) | Khối lượng các phân<br>đoạn (mg) |
|-----|-----------|------------------------------------------------------|----------------------------------|
| 1   | F1        | 100:0                                                | 200                              |
| 2   | F2        | 90:10                                                | 5100                             |
| 3   | F3        | 80:20                                                | 3000                             |
| 4   | F4        | 70:30                                                | 500                              |
| 5   | F5        | 60:40                                                | 2000                             |
| 6   | F6        | 50:50                                                | 3300                             |
| 7   | F7        | 40:60                                                | 5500                             |
| 8   | F8        | 0:100                                                | 9900                             |

Phân đoạn F3 thu được có khối lượng 3000mg tiếp tục được đem sắc ký cột silica gel với hệ dung môi diclometan:metanol theo tỉ lệ thể tích 95:5, 90:10; 85:15; 80:20; 75:25, 70:30, 65:35, 60:40 và 20:80 thu được 9 phân đoạn nhỏ tương ứng ký hiệu lần lượt là F3.1-F3.9 (Bảng 3).

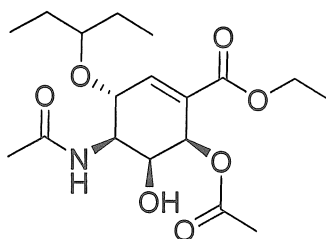
Bảng 3. Các phân đoạn sau khi sắc ký cột silica gel của phân đoạn F3

| STT | Phân đoạn | Tỉ lệ hệ dung môi<br>diclometan:metanol (theo thể tích) | Khối lượng các<br>phân đoạn (mg) |
|-----|-----------|---------------------------------------------------------|----------------------------------|
| 1   | F3.1      | 95:5                                                    | 290                              |
| 2   | F3.2      | 90:10                                                   | 300                              |
| 3   | F3.3      | 85:15                                                   | 100                              |
| 4   | F3.4      | 80:20                                                   | 200                              |
| 5   | F3.5      | 75:25                                                   | 250                              |
| 6   | F3.6      | 70:30                                                   | 280                              |
| 7   | F3.7      | 65:35                                                   | 390                              |

|   |      |       |     |
|---|------|-------|-----|
| 8 | F3.8 | 60:40 | 250 |
| 9 | F3.9 | 20:80 | 500 |

Phân đoạn F3.6 thu được có khối lượng 280mg được tinh chế trên cột Sephadex LH-20 với 450ml dung môi metanol, thu được 10.9mg hợp chất ở dạng chất rắn màu trắng.

Hợp chất thu được được xác định bằng các phương pháp phổ NMR 1D, 2D, phổ khối lượng ESI-MS và phổ CD cho thấy hợp chất này là ethyl 4(3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-4-acetamido-6-acetoxy-5-hydroxy-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-ene-1-carboxylat. Đây là một hợp chất mới được đặt tên là streptomine A, có công thức 1.



Công thức 1

**Ví dụ 3.** Thử nghiệm hoạt tính của phần cặn chiết etyl axetat và hợp chất có công thức (1).

Phần cặn chiết etyl axetat và hợp chất thu được trong ví dụ 2 được thử hoạt tính đối với 3 chủng vi khuẩn gram (-) (*Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076), 3 chủng gram (+) (*Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579) và 1 chủng nấm (*Candida albicans* ATCC10231).

Hoạt tính kháng vi sinh vật được thực hiện dựa trên phương pháp pha loãng đa nồng độ của Hadacek (2000). Đây là phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật nhằm đánh giá mức độ kháng vi sinh vật kiểm định của các mẫu thử thông qua các giá trị thể hiện hoạt tính là MIC (nồng độ ức chế tối thiểu). Phần cặn chiết etyl axetat và hợp chất có công thức 1 được pha loãng trong DMSO ở các dải nồng độ giảm dần: 256µg/ml, 128µg/ml, 64µg/ml, 32µg/ml, 16µg/ml, 8µg/ml, 4µg/ml và 2µg/ml, sau đó được thử hoạt tính với dung dịch chứa vi khuẩn hoặc nấm với nồng

độ  $2 \times 10^5$  CFU/ml. Đối chứng được sử dụng là streptomycin đối với các chủng vi khuẩn và cyclohexamit đối với nấm. Kết quả được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6. Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật của phần cặn chiết etyl axetat và hợp chất có công thức (1)

| TT | Tên chủng                                  | Cặn etyl axetat          | Hợp chất có công thức (1) | Streptomycin             | Cyclohexamit             |
|----|--------------------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
|    |                                            | MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) | MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )  | MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) | MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
| 1  | <i>Escherichia coli</i><br>ATCC25922       | -                        | -                         | 32                       |                          |
| 2  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC27853 | -                        | -                         | 256                      |                          |
| 3  | <i>Salmonella enterica</i><br>ATCC13076    | -                        | -                         | 128                      |                          |
| 4  | <i>Enterococcus faecalis</i><br>ATCC29212  | 256                      | 64                        | 256                      |                          |
| 5  | <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC25923  | 128                      | 64                        | 256                      |                          |
| 6  | <i>Bacillus cereus</i><br>ATCC 14579       | -                        | 64                        | 128                      |                          |
| 7  | <i>Candida albicans</i><br>ATCC10231       | -                        | 16                        |                          | 32                       |

Kết quả cho thấy cả phần cặn chiết etyl axetat và hợp chất theo sáng chế đều có hoạt tính kháng hai chủng *Enterococcus faecalis* ATCC29212 và *Staphylococcus aureus* ATCC25923. Ngoài ra, hợp chất có công thức (1) sau khi được tách chiết ra từ phần cặn chiết etyl axetat có độ tinh sạch cao còn thể hiện hoạt tính đối với

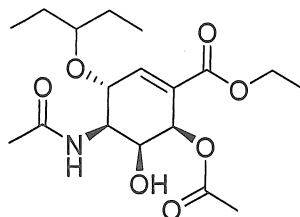
chủng và *Bacillus cereus* ATCC 13245 và *Candida albicans* ATCC10231, trong khi cặn chiết không thể hiện hoạt tính này.

#### **Hiệu quả đạt được của sáng chế**

Hợp chất streptomine A được tách chiết từ sản phẩm lên men rắn của chủng xạ khuẩn biển mẫu sên biển (*Phyllidia varicosa* Lamarck 1801) thu thập ở vùng biển Vân Phong – Khánh Hòa của Việt Nam. Hợp chất này có hoạt tính kháng vi sinh vật đối với 3 chủng gram (+) *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579 và 1 chủng nấm men *Candida albicans* ATCC10231, là tiền đề cho các nghiên cứu khoa học tiếp theo nhằm phát triển và ứng dụng hợp chất này trong việc sản xuất thuốc kháng sinh dựa vào nguồn vi sinh vật được phân lập từ vùng biển Việt Nam.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất streptomine A có công thức 1 được tách chiết từ sản phẩm lên men rắn của chủng xạ khuẩn biển *Streptomyces* sp. G666, hợp chất này có hoạt tính kháng vi sinh vật đối với 3 chủng gram (+) *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579 và 1 chủng nấm men *Candida albicans* ATCC10231;



công thức 1.

2. Phương pháp tách chiết hợp chất streptomine A theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị các môi trường A1 và A1+ bao gồm các thành phần sau:

| Môi trường A1      |       | Môi trường A1+     |        |
|--------------------|-------|--------------------|--------|
| Tinh bột tan       | 15,5g | Tinh bột tan       | 500g   |
| Cao nấm men        | 6,2g  | Cao nấm men        | 200g   |
| Pepton             | 3,1g  | Pepton             | 100g   |
| Muối biển nhân tạo | 46,5g | CaCO <sub>3</sub>  | 1,5g   |
| Nước cất           | 1,55l | FeSO <sub>4</sub>  | 5g     |
|                    |       | KBr                | 4,75g  |
|                    |       | Muối biển nhân tạo | 1500g  |
|                    |       | Agar               | 750g   |
|                    |       | Nước cất           | 46,94l |

b) lên men sinh khối chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G666:

i) nhân giống cấp 1 bằng cách cấy ria chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G666 trên đĩa petri chứa 10ml môi trường A1, sau đó nuôi tĩnh ở nhiệt độ 28°C trong 4 ngày, chọn ra 5 khuẩn lạc riêng rẽ để cấy vào 30ml môi trường A1, nuôi lắc với tốc độ 150 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 5 ngày;



ii) nhân giống cấp 2 bằng cách bổ sung dịch nhân giống cấp 1 vào môi trường A1 theo tỉ lệ 2% giống, nuôi lắc với tốc độ 150 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 6 ngày;

iii) lên men sinh khối bằng cách chuyển dịch nhân giống cấp 2 vào môi trường A1+ đặc theo tỷ lệ 3% giống, nuôi tĩnh ở nhiệt độ 28°C trong 20 ngày thu được sản phẩm lên men rắn của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G666;

c) tách chiết hợp chất streptomine A:

i) sản phẩm lên men dạng rắn của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. G666 được gộp lại, cắt nhỏ rồi chiết siêu âm ở 35°C lần lượt với các dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, etyl axetat, MeOH và n-BuOH theo tỉ lệ là 4:1 (kg/L), mỗi loại dung môi chiết 3 lần với thời gian 30 phút cho 1 lần chiết, rồi lọc loại bỏ cặn thu được dịch chiết, sau đó dịch chiết được đem quay cất trong chân không dưới áp suất giảm để loại hoàn toàn dung môi và thu được phần cặn chiết CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, etyl axetat, MeOH và n-BuOH;

ii) sắc ký cột silica gel phân cặn chiết etyl axetat thu được với các hệ dung môi diclometan:metanol theo tỉ lệ thể tích lần lượt là 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 0:100 thu được 8 phân đoạn được ký hiệu lần lượt là F1-F8;

iii) sắc ký cột silica gel phân đoạn F3 thu được với các hệ dung môi diclometan:metanol theo tỉ lệ thể tích lần lượt là 95:5, 90:10; 85:15; 80:20; 75:25, 70:30, 65:35, 60:40 và 20:80 thu được 9 phân đoạn nhỏ tương ứng ký hiệu là F3.1-F3.9;

iv) tinh chế phân đoạn F3.6 thu được bằng cột Sephadex LH-20 theo tỷ lệ 1:1,61 (trọng lượng:thể tích) với dung môi metanol thu được hợp chất dưới dạng chất rắn màu trắng là hợp chất ethyl (3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-4-acetamido-6-acetoxy-5-hydroxy-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-en-1-carboxylat (streptomine), có công thức 1.