

# ACTINOMYCIN D, ACTINOMYCIN X<sub>2</sub>, HAI CHẤT KHÁNG SINH ĐƯỢC PHÂN LẬP DỊCH LÊN MEN *STREPTOMYCES* 21.123

PGS.TS Cao Văn Thu<sup>1</sup>, DS. Nguyễn Quỳnh Trang, DS. Hoàng Thị Cẩm,  
DS. Nguyễn Thị Hải Vân, ThS. Hoàng Thùy Hương, ThS. Tạ Thu Lan<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Khoa Dược, Trường Đại học Hòa Bình

<sup>2</sup> Trường Đại học Dược Hà Nội

Tác giả liên hệ: cvthu@daihochoabinh.edu.vn

Ngày nhận: 29/5/2022

Ngày nhận bản sửa: 05/6/2022

Ngày duyệt đăng: 24/6/2022

## Tóm tắt

*Streptomyces* 21.123 là chủng *Streptomyces* sinh tổng hợp kháng sinh được chúng tôi phân lập từ mẫu đất miền Bắc Việt Nam. Từ dịch lọc dịch lên men của chủng xạ khuẩn này, hỗn hợp kháng sinh được chiết tách tốt sang pha ethyl acetat ở pH 7,0. Sắc ký lớp mỏng cho thấy có ít nhất 4 thành phần trong hỗn hợp kháng sinh này. Các thành phần chính được phân tách và được tinh chế qua sắc ký cột Silica gel. Sử dụng phổ khối và phổ cộng hưởng từ hạt nhân đã biện giải được cấu trúc hóa học của 2 thành phần chính là actinomycin D và actinomycin X<sub>2</sub>.

**Từ khóa:** *Streptomyces*, phổ khối, phổ NMR, actinomycin D, actinomycin X<sub>2</sub>.

## Actinomycin D and Actinomycin X<sub>2</sub> - the two antibiotic components isolated from filtrate of the fermentation broth *Streptomyces* 21.123

### Abstract

*Streptomyces* 21.123 is an antibiotic biosynthesizing *Streptomyces* strain from soil samples in the North of Vietnam. From the filtrate of the fermentation broth of this actinomycete strain, the antibiotic mixture was well extracted into the ethyl acetate phase at pH 7.0. Thin layer chromatography showed that there were at least 4 components in this antibiotic mixture. The major components were separated and purified by Silica gel column chromatography. Using mass spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy, the chemical structures of the two main components, actinomycin D and actinomycin X<sub>2</sub> were explained.

**Keywords:** *Streptomyces*, mass spectroscopy, NMR spectroscopy, actinomycin D, actinomycin X<sub>2</sub>.

## 1. Đặt vấn đề

*Streptomyces* là chi xạ khuẩn gồm nhiều loài có khả năng sinh tổng hợp kháng sinh đa dạng về cấu trúc và đặc tính kháng sinh, một số loài trong chi này còn có khả năng sinh tổng hợp các kháng sinh chống ung thư. *Streptomyces* 21.123 là chủng xạ khuẩn được phân lập từ đất miền Bắc Việt Nam có di truyền ổn định, có khả năng sinh tổng hợp kháng sinh tốt. Sau một số bước cải tạo giống *Streptomyces* 21.123 được lên men trên máy lắc, dịch lọc được chiết xuất bằng ethyl acetat, từ đó đã tinh chế được kháng sinh chính là actinomycin D và chất thứ hai là

actinomycin X<sub>2</sub>. Cấu trúc của kháng sinh được xác định bằng phương pháp phổ NMR và MS. Bài viết này giới thiệu quá trình phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 2 kháng sinh trên.

## 2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Chủng giống vi sinh vật, môi trường [1]

Chủng *Streptomyces* 21.123 được phân lập từ mẫu đất ở miền Bắc Việt Nam. Chủng vi khuẩn kiểm định: *Proteus mirabilis* BV 108, *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Các môi trường chính: MT1, MT1dt và môi trường đã được tối ưu hóa [1], canh thang, thạch thường.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu [1-3]

Cải tạo và chọn giống *Streptomyces* 21.123 ứng dụng phương pháp sàng lọc ngẫu nhiên và đột biến sử dụng ánh sáng UV 254 nm, dung dịch HNO<sub>2</sub> kết hợp với sàng lọc ngẫu nhiên sau đột biến. Đánh giá hoạt tính kháng sinh được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán sử dụng khối thạch, giếng thạch, khoan giấy lọc. Phương pháp lên men chìm trên máy lắc Taitec Bioshaker BR 300 LF. Phương pháp chiết kháng sinh từ dịch lọc bằng ethyl acetat ở pH 7,0 được áp dụng để chiết xuất kháng sinh. Phương pháp sắc ký lớp mỏng được sử dụng để khảo sát các thành phần của kháng sinh. Phương pháp sắc ký cột với chất hấp phụ là Silica gel cỡ hạt 0,04 - 0,063 mm được sử dụng để tinh chế kháng sinh.

Phổ khối và các loại phổ NMR được đo tại Viện Hóa học các hợp chất tự nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

## 3. Kết quả nghiên cứu

Dịch chiết ethyl acetat của dịch lọc dịch lên men kháng sinh *Streptomyces* 21.123 được loại dung môi, phân lập bằng phương pháp sắc ký kết hợp với kết tinh lại trong dung môi hữu cơ, thu được kháng sinh chính - **chất 2** (37,20%) và chất kháng sinh chính thứ 2 - **chất 1** (19,89%).

- Phổ <sup>13</sup>C-NMR, <sup>1</sup>H-NMR, DEPT, COSY, HMBC, HSQC, phổ khối lượng của chất 2 được thể hiện so sánh với phổ của actinomycin D đã được công bố theo bảng sau [3-5]:

**Bảng 1.** Các đặc trưng phổ NMR của chất 2 so với actinomycin D

Vị trí	Actinomycin D		Chất 2			
	α-ring	β-ring	α-ring		β-ring	
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>C</sub>	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
<b>L-Meval</b>						
C=O	#	#	167,673	-	167,572	-
α-CH	71,3/71,4		71,369	2,70	71,182	2,70
β-CH	26,9	26,9	26,934	2,65	26,890	2,65
N-CH <sub>3</sub>	39,2	39,2	39,283	2,92	39,163	2,90
2 x CH <sub>3</sub>	&	&	\$	@	\$	@
<b>Sar</b>						
C=O	#	#	166,551	-	166,502	-
CH <sub>2</sub>	51,4	51,4	51,370	3,60		3,60
N-CH <sub>3</sub>	34,9	34,9	34,935	2,85	34,873	2,85
<b>L-Pro</b>						
C=O	#	#	173,659	-	173,297	-
α-CH	56,3	56,3	56,454	5,90/6,00	56,240	5,90/6,00
β-CH <sub>2</sub>	31,0/31,3		30,953	1,82/2,18	31,252	1,82/2,18
γ-CH <sub>2</sub> /C	22,9/23,1		22,843	2,15/2,30	23,010	2,15/2,3
δ-CH <sub>2</sub>	47,3/47,5		47,332	3,68/3,75	47,332	3,68/3,75
<b>D-Val</b>						
C=O	#	#	173,262	-	173,248	-
α-CH	58,7	58,7	58,873	3,59	58,718	3,70
β-CH	31,5/31,7		31,792	2,78	31,561	2,90
2 x CH <sub>3</sub>	&	&	\$	@	\$	@
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
<b>L-Thr</b>						
C=O	#	#	168,976	-	168,498	-
α-CH	54,9/55,3		54,812	4,53	55,182	4,45

$\beta$ -CH	75,0	75,0	74,961	5,23	75,044	5,23
CH <sub>3</sub>	17,8	17,4	17,759	1,27	17,345	1,27
<b>Phenoxazon</b>						
	<b>1a</b>		<b>1</b>			
	$\delta_c$		$\delta_c$		$\delta_H$	
C=O	#		166,502/166,551		-	
1	101,6		101,660		-	
2	146,0		147,569		-	
3	#		179,064		-	
4	113,5		113,505		-	
4a	145,1		145,072		-	
5a	140,5		140,469		-	
6	127,5		127,668		-	
7	130,2		130,284		7,36	
8	125,9		125,749		7,62	
9	132,6		132,559		-	
9a	129,1		129,080		-	
4-CH <sub>3</sub>	7,7		7,775		2,25	
6-CH <sub>3</sub>	15,0		15,055		2,25	

#: 13 nhóm C=O của actinomycin D [1]  $\delta_c$  = 166,1; 166,3; 2 x 166,5; 2 x 167,6; 168,5; 168,9; 3 x 173,3; 173,7, 179,1.

&: 8 nhóm CH<sub>3</sub> của actinomycin D [1]  $\delta_c$  = 6 x 19,1; 2 x 21,6.

\$: 8 nhóm CH<sub>3</sub> của chất 2  $\delta_c$  = 17,759; 18,977; 19,039; 19,093; 19,239; 19,281; 21,572; 21,671.

@: 8 nhóm CH<sub>3</sub> của chất 2  $\delta_H$  = 0,72 (6H); 0,96 (12H); và 1,02 (6H).

Tiếp tục phân tích phổ hoàn toàn khẳng định chất 2 chính là actinomycin D. Hợp chất đã biết đến từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces 21.123* đã được nghiên cứu trước đó.

- Phổ <sup>13</sup>C-NMR, <sup>1</sup>H-NMR, DEPT, COSY, HMBC, HSQC, phổ khối lượng của chất 1 được thể hiện theo bảng sau [3-5]:

**Bảng 2.** Các đặc trưng phổ NMR của chất 1 so với actinomycin D

Vị trí	Actinomycin D		Chất 1			
	$\alpha$ -ring	$\beta$ -ring	$\alpha$ -ring		$\beta$ -ring	
	$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_H$	$\delta_c$	$\delta_H$
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
<b>L-Meval</b>						
C=O	#	#	167,496	-	166,584	-
$\alpha$ -CH	71,3/71,4		71,454	2,70	71,242	2,70
$\beta$ -CH	26,9	26,9	27,017	2,66	26,954	2,66
N-CH <sub>3</sub>	39,2	39,2	39,368	2,95	39,184	2,95
2 x CH <sub>3</sub>	&	&	\$	@	\$	@
<b>Sar</b>						
C=O	#	#	166,320	-	166,128	-
CH <sub>2</sub>	51,4	51,4	52,865	4,60 -3,98	51,321	4,72 - 4,62
N-CH <sub>3</sub>	34,9	34,9	34,914	2,89	34,758	2,89
<b>L-Pro</b>						
C=O	#	#	173,534	-	173,135	-
$\alpha$ -CH	56,3	56,3	56,462	5,80	54,979	6,6

$\beta$ -CH <sub>2</sub>	31,0/31,3		31,029	1,82	31,549	2,37/3,86
$\gamma$ -CH <sub>2</sub> /C	22,9/23,1		22,962	2,15-2,31	208,773	-
$\delta$ -CH <sub>2</sub>	47,3/47,5		47,436	3,75-3,89	51,321	3,60-4,60
<b>D-Val</b>						
C=O	#	#	174,030	-	172,719	-
$\alpha$ -CH	58,7	58,7	58,534	3,59	57,159	3,75
$\beta$ -CH	31,5/31,7		31,859	2,75	31,697	3,21
2 x CH <sub>3</sub>	&	&	\$	@	\$	@
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
<b>L-Thr</b>						
C=O	#	#	168,976	-	168,738	-
$\alpha$ -CH	54,9/55,3		54,306	4,58	54,769	4,55
$\beta$ -CH	75,0	75,0	74,749	5,20	74,641	5,15
CH <sub>3</sub>	17,8	17,4	17,679	1,20	17,125	1,25
<b>Phenoxazon</b>						
	<b>1a</b>		<b>1</b>			
	$\delta_c$		$\delta_c$		$\delta_H$	
C=O	#		165,939/165,258		-	
1	101,6		101,704		-	
2	146,0		147,421		-	
3	#		179,016		-	
4	113,5		113,622		-	
4a	145,1		145,027		-	
5a	140,5		140,511		-	
6	127,5		127,891		-	
7	130,2		130,347		7,36	
8	125,9		126,127		7,62	
9	132,6		132,070		-	
9a	129,1		129,153		-	
4-CH <sub>3</sub>	7,7		7,728		2,25	
6-CH <sub>3</sub>	15,0		15,030		2,51	

#: 13 nhóm C=O của actinomycin D  $\delta_c$  = 166,1; 166,3; 2 x 166,5; 2 x 167,6; 168,5; 168,9; 3 x 173,3; 173,7, 179,1.

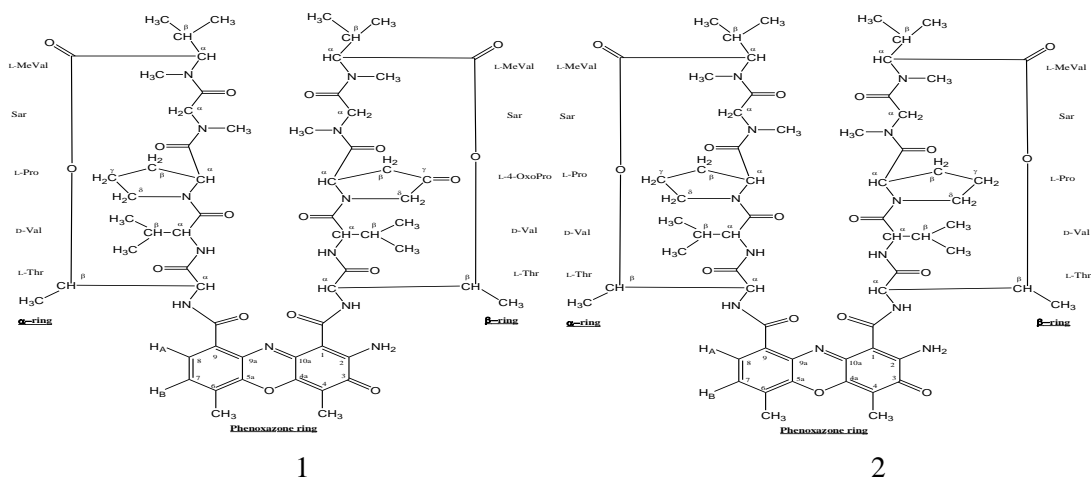
&: 8 nhóm CH<sub>3</sub> của actinomycin D  $\delta_c$  = 6 x 19,1; 2 x 21,6.

\$: 8 nhóm CH<sub>3</sub> của chất 1  $\delta_c$  = 18,816; 18,916; 19,032; 19,066; 19,197; 19,226; 21,573; 21,692.

@: 8 nhóm CH<sub>3</sub> của chất 1  $\delta_H$  = 0,75 (6H); 0,96 (12H); và 1,02 (6H).

Kết quả so sánh giá trị phổ của actinomycin D và chất 1 rất giống nhau,

ngoại trừ xuất hiện thêm nhóm carbonyl ở vùng trường thấp tại  $\delta_c$  208,773. Kết quả phổ gợi ý so sánh với kết quả phổ của chất actinomycin X<sub>2</sub> đã được đưa ra khi nghiên cứu chủng xạ khuẩn *Streptomyces 15.29* đã được công bố. Kết hợp với kết quả phổ ghi nhận được của chất 1 và phổ NMR của actinomycin X<sub>2</sub> đã được công bố nhận thấy chất 1 chính là actinomycin X<sub>2</sub> với khối lượng theo phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic có cường độ rất cao tại m/z 1269,45 [M+H]<sup>+</sup> và m/z 1291,43 [M+Na]<sup>+</sup>.



L-MeVal: *N*-metyl-L-valine; Sar: sarcosine; L-Pro: L-proline;  
L-4-oxoPro: L-4-oxo-proline; D-Val: D-valine; L-Thr: L-threoline

**Hình 1.** Cấu trúc hóa học của actinomycin X<sub>2</sub> (1) và actinomycin D (2)

#### 4. Bàn luận

Kết quả của chúng tôi thu được khác với kết quả của Caixia Chen và cộng sự [3] phân lập được actinomycin D và actinomycin X<sub>2</sub> cùng là thành phần chính từ *Streptomyces sp MS449* phân lập từ biển. Còn ở Việt Nam, mới chỉ có Cao Văn Thu và cộng sự [2] công bố phân lập được actinomycin X<sub>2</sub> từ *Streptomyces 15.29* mà thôi.

#### 5. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho phép lần đầu tiên ở Việt Nam đã phân lập thành công 2 kháng sinh gồm: chất 2 - actinomycin D (thành phần chính), chất 1 - actinomycin X<sub>2</sub> (chất phụ) từ dịch lên men của *Streptomyces 21.123* với hiệu suất khá cao lần lượt là 37,20 % và 19,89 % tính từ cấy kháng sinh thô

#### Tài liệu tham khảo

1. PGS.TS và các cộng sự (2020), “Nghiên cứu tối ưu hóa lên men sinh tổng hợp kháng sinh nhờ *Streptomyces 21.123.33.12*”, *Nội san Khoa học và Công nghệ Đại học Hòa Bình*, Số 01 (12/2020), tr. 98-104.
2. Cao Văn Thu, Bùi Việt Hà, Phan Văn Kiệt (2010), “Actinomycin X<sub>2</sub>, chất kháng sinh được phân lập từ quá trình lên men sinh tổng hợp”, *Tạp chí Hóa học*, T.48, tr. 469-474.
3. C. Chen, F. Song, Q. Wang, W. M. Abdel - Mageed, H Guo, C. Fu, W. Hou, H. Dai, X. Liu, N. Yang, F. Xie, K. Yu, R. Chen, L. Zhang (2012), “A marine - derived *Streptomyces sp. MS449* produces high yield of actinomycin X<sub>2</sub> and actinomycin D with potent anti-tuberculosis activity”, *Appl Micr & Biotechnol*, vol. 95 (4), pp. 919-927.
4. A. B. Mauger and W. J. Rzeszotarski(1976), *Organic Magnetic Resonance*, Vol. 8, 219-223.
5. Liviab Inbar and Aviva Lapidot (1988), *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 263, 16014-16022.