

**DIKETOPIPERAZINE TỪ SẢN PHẨM TRAO ĐỔI CHẤT THỨ CẤP  
CỦA VI KHUẨN *XENORHABDUS* SP. CỘNG SINH VỚI  
*STEINERNEMA ROBUSTICULUM* TN21 Ở VIỆT NAM**

**PHAN KẾ LONG, NGUYỄN THỊ NHẢ**

*Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật*

**HELGE B. BODE**

*Trường Đại học Tổng hợp Johann Wolfgang Goethe*

Tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng (Entomopathogenic nematodes – EPN) thuộc hai giống *Steinernema* và *Heterorhabditis* hiện đang rất được quan tâm trên thế giới không chỉ do khả năng phòng trừ sinh học sâu hại của chúng mà còn tiềm năng ứng dụng trong y dược các sản phẩm trao đổi chất thứ cấp của vi khuẩn cộng sinh (VKCS) với chúng (*Xenorhabdus* ở *Steinernema* và *Photorhabdus* ở *Heterorhabditis*) (Webster *et al.*, 1998). Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng, các hoạt chất sinh ra trong quá trình trao đổi chất của các chủng/loài vi khuẩn này có khả năng kháng sinh, kháng nấm, ngăn chặn sự tăng sinh của tế bào ung thư. Chính vì vậy các chủng/loài vi khuẩn *Xenorhabdus*/*Photorhabdus* hiện là nguồn hợp chất tự nhiên quan trọng để nghiên cứu các loại thuốc mới cho con người (Webster *et al.*, 2002).

Tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng ở Việt Nam có tính đa dạng khá cao. Hiện nay, khoảng hơn 40 chủng EPN đã được phân lập từ các vùng sinh thái khác nhau của Việt Nam và đây cũng là nguồn VKCS rất quan trọng không chỉ ở Việt Nam mà còn đối với thế giới (Phan Kế Long và cộng sự, 2003). Nghiên cứu này sẽ xác định các hoạt chất sinh ra từ quá trình trao đổi chất của vi khuẩn cộng sinh *Xenorhabdus* sp. với *Steinernema robustispiculum* TN 21 (Phan *et al.*, 2005).

**I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**Mẫu tuyến trùng:** Tuyến trùng *Steinernema robustispiculum* TN21 được phân lập từ đất rừng ở Sa Sơn, Sa Thầy thuộc dãy núi Chư Mom Ray nam, tỉnh Kon Tum bằng phương pháp bẫy mồi (Bedding & Akhurst, 1975).

**Phân lập vi khuẩn:** Ấu trùng cảm nhiễm của tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng sau khi được tẩy trùng bề mặt bằng streptomycin 5000 đơn vị/ml trong 2-3 giờ, sẽ chuyển vào đĩa petri Ø 9mm (500 ấu trùng trong 1 ml nước cất) cùng với giấy thấm Whatman # 1. Cho 5 ấu trùng bướm sáo lớn *Galleria mellonella* vào đĩa, bọc lại bằng Parafilm để ngăn ngừa sự bốc hơi nước và bảo quản trong chỗ tối ở 25°C. Sau khi *G. mellonella* chết (24-48 giờ), tẩy trùng bề mặt xác của *G. mellonella* bằng cách đun vào cồn 96° trong vòng từ 1-2 phút, dùng 2 kẹp nhỏ, khẽ xé rách lớp vỏ rồi dùng que cấy đã tiệt trùng lấy một chút dịch cơ thể *Galleria* cấy lên đĩa môi trường Luria-Bertani (LB) gồm: 10g Trypton, 5g Yeast extract, 5g NaCl, 15g Agar, 0.025g Bromothymol Blue (BTB), 0.04g Triphenyltetrazolium chloride (TTC) và 1000ml nước cất. Bọc kín đĩa bằng Parafilm và bảo quản ở 30°C, 24-48 giờ.

**Nhân nuôi vi khuẩn in-vitro:** Chuyển 1 khuẩn lạc từ đĩa nuôi cấy vào 10ml môi trường LB lỏng trong bình tam giác 250ml chứa 25ml LB, lắc qua đêm ở 30°C, 280rpm. Sau đó chuyển 1/3 thể tích trên sang bình tam giác 3000ml có chứa 600ml LB và 2% XAD-16 (Sigma) và lắc 3 ngày ở nhiệt độ 30°C, 280rpm.

**Tách chiết và tinh sạch hoạt chất:** Sau thời gian trên, gạn bỏ dung dịch để thu các hạt XAD-16 và chuyển sang cốc thủy tinh 500ml. Cho lần lượt 300, 200 và 100ml MeOH và lắc 15 phút để thu hoạt chất. Lọc lấy dịch MeOH, chuyển 200 $\mu$ l dịch chiết sang ống HPLC và định tính các hoạt chất dưới hệ HPLC/MS ở bước sóng 294nm, phần còn lại làm khô bằng hệ thống cất thu hồi dung môi.

Tách phân đoạn sản phẩm thu được bằng sắc ký cột số 2, silicagel 60 và 300ml dung môi lần lượt như sau: Hexan, Chloroform, Chloroform : MeOH = 99 : 1, Chloroform : MeOH = 9 : 1, Chloroform : MeOH = 8 : 2, Chloroform : MeOH = 7 : 3, Chloroform : MeOH = 6 : 4, Chloroform : MeOH = 1 : 1 và MeOH.

Các phân đoạn sau đó được làm khô, hòa tan lại bằng MeOH và định tính bằng HPLC/MS. Hợp chất quan tâm được tinh sạch bằng RP-HPLC, thay đổi gradient MeOH từ 50-95% trong 25 phút ở bước sóng UV 254nm. Sản phẩm thu được được làm khô và kiểm tra độ tinh sạch bằng HPLC/MS trước khi xác định cấu trúc bằng NMR.

**Xác định cấu trúc hóa học:** Cấu trúc hóa học của các hoạt chất sau khi tinh sạch được xác định bằng NMR ( $^1\text{H}$  500MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz) trên hệ thống Bruker DRX 500 Spectrometer.

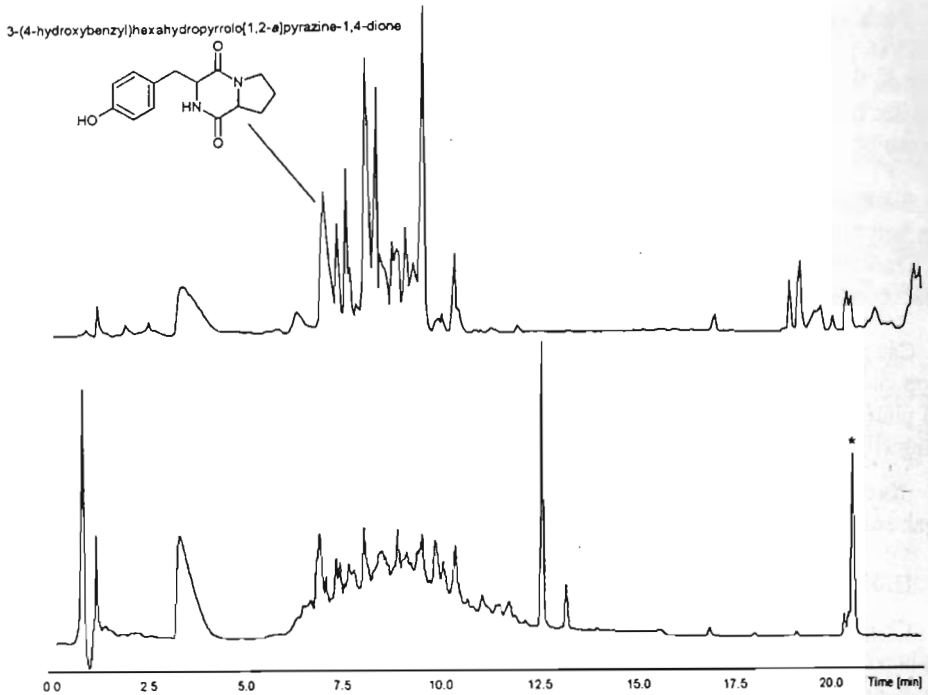
## II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Chủng vi khuẩn *Xenorhabdus* sp. cộng sinh với *Steinernema robustispiculum* TN 21 sản sinh ra hợp chất không phân cực nhưng hấp thu UV ở mức độ cao (hình 1). Nhưng đáng tiếc chúng tôi không thu được nhiều để có thể xác định được cấu trúc hóa học của hợp chất này. Tuy nhiên, chúng tôi thu được 2,9mg của một hợp chất phân cực đủ để tiến hành xác định cấu trúc hóa học. Sử dụng phương pháp NMR ( $^1\text{H}$  500 MHz và  $^{13}\text{C}$  125 MHz), chúng tôi có thể xác định đây là Diketopiperazine, 3-(4-hydroxybenzyl) hexahydropyrrolo [1,2-*a*] pyrazine-1,4-dione. Diketopiperazine này giống với 3-isopropylhexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-1,4-dione đã từng được phân lập từ sản phẩm chuyển hóa của *Photorhabdus* (Bode thông tin riêng).

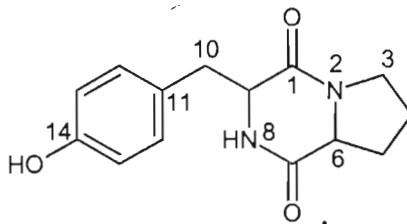
Bảng 1

### Dữ liệu NMR của 3-(4-hydroxybenzyl)hexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-1,4-dione

| Vị trí | $^{13}\text{C}$ (125 MHz, DMSO- $\text{D}_6$ ) | $^1\text{H}$ (500 MHz, DMSO- $\text{D}_6$ )      |
|--------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 1      | 165.5 (s)                                      |                                                  |
| 2      | -                                              |                                                  |
| 3      | 44.9 (t)                                       | 3.39 (m, 1H), 3.24 (dt, J = 11.6 Hz, 6.6 Hz, 1H) |
| 4      | 22.2 (t)                                       | 1.70 (m, 2H)                                     |
| 5      | 28.2 (t)                                       | 1.98 (m, 1H), 1.38 (m, 1H)                       |
| 6      | 58.8 (d)                                       | 4.04 (dd, J = 8,8 Hz, 7.6 Hz, 1H)                |
| 7      | 169.3 (s)                                      |                                                  |
| 8      | -                                              | 7.82 (s, 1H)                                     |
| 9      | 56.4 (d)                                       | 4.23 (br t, J = 4.7 Hz, 1H)                      |
| 10     | 35.2 (t)                                       | 2.92 (m, 2H)                                     |
| 11     | 127.4 (s)                                      |                                                  |
| 12     | 131.2 (d)                                      | 7.03 (m, 2H)                                     |
| 13     | 115.2 (d)                                      | 6.62 (m, 2H)                                     |
| 14     | 156.3 (s)                                      |                                                  |



Hình 1: Phân tích chất tiết từ vi khuẩn cộng sinh với *Steinernema robustipiculum* TN 21 bằng HPLC/MS (trên) và HPLC/UV (dưới): hợp chất không phân cực (\*) và 3-(4-hydroxybenzyl)hexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione



Hình 2: Cấu trúc của 3-(4-hydroxybenzyl)hexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione

Diketopiperazine là các peptide vòng nhỏ nhất được biết, thông thường được sinh tổng hợp từ các amino acid bởi nhiều loại sinh vật khác nhau kể cả động vật có vú và được coi là sản phẩm trao đổi chất thứ cấp hoặc sản phẩm phụ của quá trình phân tách peptide. Mặc dù có hai con đường sinh tổng hợp khác nhau (Lautru *et al.*, 2002), nhưng chúng cũng có thể là sản phẩm từ quá trình phân hủy protein. Điều này có thể đặc biệt đúng khi proline mang các dẫn xuất giống như proline có khả năng bẻ cong mạch peptit tạo điều kiện để hình thành các hợp chất này.

Một trong những đặc tính quan trọng của Diketopiperazine là khả năng kìm hãm yếu tố kích hoạt Plasminogen-1 (PAI-1) là nguyên nhân gây nên các bệnh về tim mạch và quá trình hình thành ung thư (Folker *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002; Brooks *et al.*, 2004; Einholm *et al.*, 2003). Ngoài ra, các Diketopiperazine còn có khả năng chống ung thư, kháng virus, kháng nấm, kháng khuẩn và chống các tác nhân làm tăng đường huyết (Martins & Carvalho, 2007).

### III. KẾT LUẬN

- Chúng vi khuẩn *Xenorhabdus* sp. cộng sinh với *Steinernema robustispiculum* TN 21 sản sinh ra hợp chất không phân cực và hợp chất phân cực là 3-(4-hydroxybenzyl)hexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-1,4-dione

- Lần đầu tiên Diketopiperazine được phân lập từ sản phẩm trao đổi chất thứ cấp của *Xenorhabdus*.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bedding R. A., R. J. Akhurst, 1975: Nematologica, 21: 109-110.
2. Brooks T. D., S. W. Wang, N. Br  nner, P. A. Charlton, 2004: Anti-Cancer Drugs, 15: 37-44.
3. Einholm A. P. et al., 2003: The Biochemical Journal, 373: 723-732.
4. Folkes A. et al., 2002: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 11: 2589-2592.
5. Lautr   S., M. Gondry, R. Genet, J. L. Pernodet, 2002: Chemistry & Biology, 9: 1355-1364.
6. Phan K   Long, Nguyễn Ngọc Châu, M. Moens, 2003: Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống: 670-673. NXB. KH & KT, Hà Nội.
7. Martins M. B., I. Carvalho, 2007: Tetrahedron, 63: 9923-9932.
8. Phan K. L., S. A. Subbotin, L. Waeyenberge, M. Moens, 2005: Systematic Parasitology, 60: 23-32.
9. Wang S. et al., 2002: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 12: 2367-2370.
10. Webster J. M., G. Chen, K. Hu, J. Li, 2002: Bacterial Metabolites. Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing: 99-114.
11. Webster J. M., G. Chen, J. Li, 1998: Parasitology Today, 14: 161-163.

### DIKETOPIPERAZINE FROM SECONDARY METABOLITES OF SYMBIOTIC *XENORHABDUS* SP. BACTERIA OF *STEINERNEMA ROBUSTISPICULUM* TN21, IN VIETNAM

PHAN KE LONG, NGUYEN THI NHA, HIELGE B. BODE

#### SUMMARY

The symbiotic bacteria of *Steinernema robustispiculum* TN 21, *Xenorhabdus* sp. produced a highly nonpolar but UV-active compound. Unfortunately, the corresponding compound could not be produced in large scale culture anymore, but we were able to isolate 2.0 mg of a polar compound. We were able to determine a full set of NMR spectra (<sup>1</sup>H 500 MHz vs. <sup>13</sup>C 125 MHz) that allowed the determination of its structure as 3-(4-hydroxybenzyl)hexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-1,4-dione. The same diketopiperazine as well as 3-isopropylhexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-1,4-dione have, since our first isolation from strain TN21, also been found in a *Photorhabdus* strain in the Bode group.