

V. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được một quy trình chiết tách và tinh sạch enzym urease từ đậu tương hiệu quả, loại bỏ được các protein tạp. Tạo được chế phẩm UC1 bằng phương pháp kết tủa phân đoạn với $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ có hoạt độ urease riêng 120,56 nKat/mg, và chế phẩm UC2 qua đông khô có hoạt độ urease riêng 113,60 nKat/mg, độ tinh sạch tăng 1,22 lần so với dịch lọc thô. Tinh chế tạo được chế phẩm urease (UR1) có hoạt độ urease riêng 230,55 nKat/mg với độ tinh sạch gấp 2,33 lần so với dịch lọc thô. Tạo được chế phẩm Urease bột đông khô UR2 có hoạt độ urease riêng là 224,89 nKat/mg chế phẩm, độ tinh sạch nâng lên 2,28 lần so với dịch lọc thô.

Đã xác định một số đặc điểm của chế phẩm urease UR2 có các đặc tính: Bột xốp, trắng ngà, tan trong nước $\geq 98\%$, đạt độ ẩm $\leq 6\%$, hoạt độ urease $224,89 \pm 24,11$ nKat/mg.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Phạm Thị Ánh Hồng**, (2003), *Kỹ thuật sinh hóa*, Nxb ĐHQG Tp.HCM.
2. **Nguyễn Đức Lượng và các tác giả** (2004), *Công nghệ enzyme*, NXBĐHQG Tp. HCM.
3. **Cristian Follmer and aids, Jackbean, soybean and bacillus pasteurii urease biological effects unrelated to ureolytic activity**, Eur. J. Biochem. 271, 1357-1363, Cambridge, 2004
4. **Roger Norris and Keith Brocklehurst**, (2001) *A Convenient Method of Preparation of High-Activity Urease from Canavalia ensiformis by Covalent Chromatography and an Investigation of its Thiol Groups with 2,2'-Dipyridyl Disulphide as a Thiol Titrant and Reactivity Probe*, Department of Biochemistry Bartholomew's Hospital Medical College, University of London.
5. **Stefano Benin, Faculty of Scienc**, (2001), *Structure and Function Relationships of Urease*, University of York.

FLOURENSADIOL- HỢP CHẤT KHÁNG SINH TÁCH TỪ VI KHUẨN LAM ANABAENA SP.

Lê Thị Ánh Tuyết¹, Nguyễn Thị Giang An², Hồ Sĩ Hạnh³,
Đặng Diễm Hồng⁴, Nguyễn Anh Dũng², Sabine Mundt⁵

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tách các hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn và nấm từ dịch nuôi cấy tảo lam *Anabaena* sp, phân lập ở đất trồng bông của tỉnh Đắk Lắk, Việt Nam. Chúng này được lựa chọn trên kết quả của việc sàng lọc 12 chủng vi khuẩn lam của Việt Nam cho các hoạt tính kháng vi khuẩn và kháng nấm.

Kết quả nghiên cứu đã dẫn đến việc tách và nhận ra một hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn rất cao- fluorensadiol ($\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_2$). Hợp chất này thuộc nhóm diterpenoid, đây là lần đầu tiên được tách từ tảo lam và đây cũng là lần đầu tiên hoạt tính kháng khuẩn của fluorensadiol được thông báo..

Từ khóa: tảo lam, fluorensadiol, *Anabaena* sp., kháng khuẩn, kháng nấm.

¹ Trường Đại học Hồng Đức, Thanh Hóa; ² Trường Đại học Vinh, Nghệ An;

³ Trường Cao đẳng Sư phạm Đắk Lắk, Đắk Lắk;

⁴ Viện Công nghệ Sinh học; ⁵ Trường Đại học Greifswald, CHLB Đức

ABSTRACT**Fluorensadiol with antibiotics activity from cyanobacteria *Anabaena* sp.**

The aim of this work to isolate metabolites with antibacterial and antifungal activity from the culture medium of *Anabaena* sp. strain isolated from a sample of industrial cultivating soil (cotton) collected Dak Lak province, Vietnam. This strain was selected on the basis of screening of 12 Vietnamese cyanobacterial strains for antibacterial and antifungal activity. The obtained results led to isolation and identification of fluorensadiol with strong antibacterial activity belong to diterpenoid which is the first report on occurrence of diterpenoid in cyanobacteria and the antibacterial activity of fluorensadiol was also reported for the first time.

Key word: cyanobacteria, fluorensadiol, *Anabaena* sp., antibacterial activity, antifungal activity.

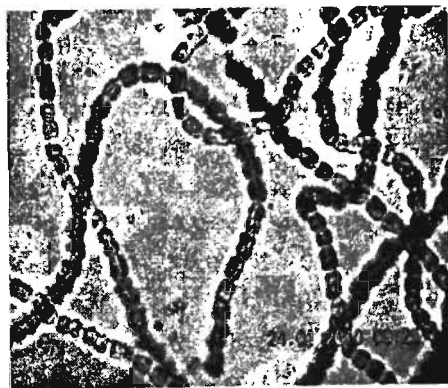
I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tảo lam (cyanobacteria) được biết là một nguồn giàu các hợp chất thứ cấp với sự đa dạng về cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học, bao gồm độc tố (toxin), kháng vi khuẩn, kháng nấm, kháng viêm, diệt các dòng tế bào ung thư....và các chất này là các peptid, alkaloid, nucleoside, lactone, acid béo... Trong những năm gần đây, việc sàng lọc và tách các hợp chất có hoạt tính sinh học ứng dụng trong dược học và các ứng dụng khác từ tảo lam đang được quan tâm đáng kể. Trong suốt thập kỷ qua, rất nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học và cấu trúc mới lạ đã được tách từ tảo lam, nhưng cho đến nay tảo lam vẫn còn là nguồn dược liệu phong phú đặc biệt là tảo lam từ vùng Đông Nam Á nơi có sự đa dạng sinh học cao mà chưa được khám phá. Hướng tới mục tiêu tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính sinh học mới lạ từ tảo lam Việt Nam, trong phạm vi nghiên cứu

này, chúng tôi tiến hành tách các hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn và nấm của dịch nuôi cấy tảo lam *Anabaena* sp, phân lập ở đất trồng bông của tỉnh Đắk Lắk, Việt Nam. Chủng này được lựa chọn để nghiên cứu là do trong quá trình chúng tôi sàng lọc 12 chủng vi khuẩn lam của Việt Nam cho các hoạt tính kháng vi khuẩn và kháng nấm gây bệnh ở người thì chủng này là một trong 2 chủng thể hiện hoạt tính trên cao nhất (Le Thi Anh Tuyet & Sabine Mundt, 2009).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**1. Nguyên vật liệu****1.1. Đối tượng nghiên cứu**

Chủng *Anabaena* sp. được phân lập từ đất trồng bông của tỉnh Đắk Lắk, Việt Nam là đối tượng nghiên cứu. Chủng này hiện nay đang được lưu giữ tại phòng Công nghệ Tảo, Viện Công nghệ sinh học và phòng nuôi giữ tảo của Viện Sinh Dược, Trường ĐH Greifswald, CHLB Đức.



Anabaena sp. (x100)

1.2. Hóa chất

Các hóa chất được dùng trong nghiên cứu này đều là những hóa chất có tiêu chuẩn chất lượng cao của các hãng cung cấp lớn như Merck (Đức), Sigma (Mỹ), WVR (Đức), Carl Roth (Đức).

1.3. Thiết bị, dụng cụ sử dụng trong nghiên cứu

Tách dịch nuôi cấy tảo ra khỏi tế bào tảo được thực hiện trong máy ly tâm có dòng chảy liên tục Centrifuge Rotanta 460R (Đức).

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (High-Performance Liquid Chromatography-HPLC) nhãn hiệu Kontron Instruments (Đức) cùng với cột sắc ký Synergi Polar RP 80A⁰ (Đức) được sử dụng trong nghiên cứu này.

Phổ 1D (¹H, ¹³C và DEPT-135) và 2D (COSY, HMQC, HMBC) được ghi trên máy Bruker AVANCE DMX 600, dung môi trifluoroethanol-d₂/H₂O (1:1)

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp nuôi cấy và thu dịch nuôi cấy tảo lam

Chủng tảo lam *Anabaena sp.* được nuôi trong cột thủy tinh chứa 35 lít môi trường BG11 (Mundt và cộng sự, 2001), pH của môi trường nuôi cấy luôn luôn là 8.5, dưới ánh sáng của hệ thống đèn huỳnh quang (8μmol/m²), nhiệt độ nuôi cấy 26°C với thời gian nuôi cấy là 6 tuần.

Sau sáu tuần nuôi cấy, dịch nuôi cấy tảo trong môi trường BG11 sau ly tâm 6500 vòng/phút trong máy ly tâm có dòng chảy

liên tục, ở nhiệt độ phòng loại bỏ tế bào (dịch nuôi và các tế bào tảo lam sau khi ly tâm được chia làm hai phần tách biệt nhau). Sau đó dịch nuôi này được cô lại theo tỷ lệ 1/10 (thể tích) nhờ máy cô quay chân không.

2.2. Phương pháp chiết dịch nuôi tảo lam

Dựa vào phương pháp chiết các hợp chất ngoại bào từ dịch nuôi các tế bào vi khuẩn (Cannell, 1998) dịch nuôi tảo lam đã được cô quay sẽ được chiết với ethyl acetate 3 lần theo tỷ lệ 3 thể tích dịch nuôi: 1 thể tích EtOAc và lắc 180vòng/phút trong 24 giờ/lần chiết. Phần hòa tan (dịch chiết EtOAc) được thu lại bằng bình chiết sau đó bổ sung sulfate natri sao cho có nồng độ 5g.L⁻¹. Dịch chiết EtOAc thu được trong ba lần chiết sẽ trộn lẫn vào nhau. Dung môi được loại bỏ bằng máy loại dung môi (máy quay chân không). Phần cặn thu được (cặn dịch chiết EtOAc) sẽ được xử lý tùy theo mục đích.

Để tiến hành tách các chất trong cặn dịch chiết EtOAc, phần cặn này được hòa tan trong EtOAc. Tuy nhiên, trước khi tiến hành chạy HPLC, dịch chiết thô trong EtOAc sẽ được kiểm tra lại hoạt tính kháng vi sinh vật bằng phương pháp (ghi tên phương pháp dùng để thử hoạt tính) với EtOAc là đối chứng âm.

2.3. Phương pháp tách các chất từ cặn dịch chiết EtOAc

Việc phân lập các chất có trong cặn dịch chiết EtOAc được tiến hành trên hệ thống HPLC với cột Synergi POLAR-RP 80 A⁰ có kích thước 250x10mm, 4micron; vận tốc: 3.0 mL/phút; UV được dùng để tách mẫu là 238nm; nồng độ cho mỗi lần chạy là 1mg/50μL; gradient được thể hiện ở bảng 1

Bảng 1: Gradient dùng trong quá trình phân lập các chất của cặn dịch chiết EtOAc

Thời gian (phút)	0.50	12.50	18.50	22.50	24.50	26.50
H ₂ O (%)	95	75	40	0.0	0.0	80.0
CH ₃ CN (%)	5	25	60	100	100	5

2.4. Phương pháp thử hoạt tính

Hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của cặn dịch chiết EtOAc và Fluorensadiol được tiến hành theo Pharmacopoea Europaea. Các chủng vi sinh vật được sử dụng để thử hoạt tính

là: Gram âm (*Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), Gram dương (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6051), nấm (*Candida maltosa* SBUG 700), các chủng này được cung cấp bởi Viện Sinh Dược, trường đại học Greifswald, CHLB Đức. Các chủng này được nuôi trong môi trường “Standard II nutrient agar for microbiology” (Merck, Đức): peptone từ thịt 3.45g, peptone từ casein 3.45g, NaCl 5.1g, agar-agar 13.0g; pH 7.5±0.2.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

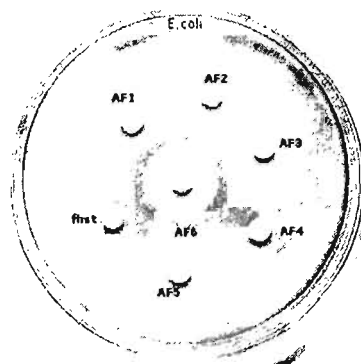
Từ 4 lít môi trường nuôi cấy, thu được 12mg cặn dịch chiết EtOAc. Cặn dịch EtOAc thể hiện hoạt tính kháng khuẩn rất cao (bảng 2)

Bảng 2: Hoạt tính kháng khuẩn và nấm của cặn dịch chiết EtOAc và các dịch chiết từ tế bào

	Đường kính của vùng ức chế (mm) ¹			
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. maltosa</i>
Cặn dịch chiết EtOAc từ dịch nuôi cấy	15.0	16.0	24.0	16.0
Các dịch chiết từ tế bào	0.0	0.0	0.0	0.0
Môi trường BG11	0.0	0.0	0.0	0.0

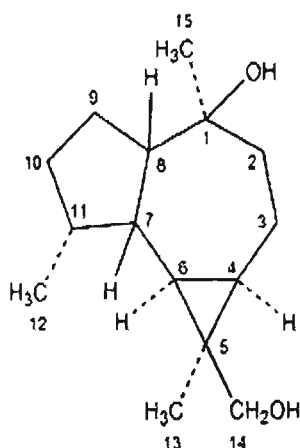
¹. Bao gồm cả đường kính của đĩa giấy, nồng độ mẫu dùng để thử hoạt tính là 2mg/dĩa

Qua bảng 2 ta thấy, chỉ có cặn dịch chiết EtOAc từ dịch nuôi cấy là thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và nấm, do đó cặn này được chọn để phân lập các chất. Với các điều kiện như đã mô tả ở phần phương pháp, dưới bước sóng 238nm, từ cặn dịch chiết EtOAc chúng tôi đã thu được bảy phân đoạn tương ứng với thời điểm thổi của các đỉnh lần lượt như sau: 12.75, 15.76, 17.71, 18.33, 19.32, 20.77 và 22.77 phút. Dung môi trong các 7 phân đoạn được làm bay hơi hết dưới máy cô quay chân không, sau đó bảy phân đoạn này kí hiệu là (first, AF₁, AF₂, AF₃, AF₄, AF₅, AF₆) được khảo sát hoạt tính kháng *Escherichia coli* ATCC 11229. Thật thú vị, chỉ có duy nhất phân đoạn AF₆ là thể hiện hoạt tính kháng khuẩn rất cao với đường kính ức chế là 20mm, nồng độ thử hoạt tính 200µg/dĩa (hình 1) và việc xác định cấu trúc hóa học của chất trong phân đoạn này được tiến hành.



Hình 1: Hoạt tính kháng *E. coli* của 7 phân đoạn

Kết quả của việc xác định cấu trúc hóa học đã chỉ ra phân đoạn AF₆ là phân đoạn chỉ chứa một hợp chất có tên là fluorensadiol (hình 2).



Hình 2: Fluorensadiol, $C_{15}H_{26}O_2$

IV. BÀN LUẬN

Khi khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của cặn dịch chiết EtOAc từ dịch nuôi cấy và các dịch chiết từ tế bào tảo lam cùng với môi trường BG11 chỉ thấy duy nhất cặn dịch chiết EtOAc là thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và nấm, điều đó chứng tỏ rằng các chất có hoạt tính kháng khuẩn và nấm là các chất ngoại bào. Điều này phù hợp với một số kết quả nghiên cứu của Jaki và cộng sự, 2000; Volk, 2005; Volk và Furkert, 2006 rằng các hợp chất có hoạt tính sinh học cũng được tìm thấy trong dịch nuôi cấy tảo lam. Fluorensadiol lần đầu tiên được tách từ một loại cây bụi *Flourensia cernus* mọc ở vùng Big Bend, Texas, Mỹ (Kingston và cộng sự, 1975; Pettersen và cộng sự, 1975) nhưng trong kết quả của chúng tôi fluorensadiol lần đầu tiên được tách từ tảo lam. Đây là điều thú vị nhưng không ngạc nhiên vì có rất nhiều công trình đã công bố các loài thuộc các chi, họ, bộ khác xa nhau có thể tổng hợp các hợp chất giống nhau (Sivonen và Börner, 2008). Chức năng thực sự của các hợp chất thứ cấp thì từ xưa đến nay chưa được công bố rõ ràng, nhưng có thể chúng liên quan đến phản ứng của các sinh vật khi có điều kiện môi

trường sống giống nhau (Volk và Furkert, 2006). Cây bụi *Flourensia cernus* mọc ở vùng Big Bend, Texas, Mỹ và *Anabaena* sp. được phân lập từ đất trồng bông ở tỉnh Đắk Lắk, Việt Nam có một điểm chung là chúng đều sống ở vùng đất nghèo chất dinh dưỡng và nhiệt độ cao. Có thể, nhóm diterpenoid này liên quan đến các phản ứng bảo vệ chống lại các tổ chức sinh vật cùng sống trong cùng môi trường và để nâng cao cơ hội sống sót trong môi trường sống của chúng. Một điều đáng lưu ý là trong nghiên cứu của chúng tôi, hoạt tính kháng khuẩn của fluorensadiol lần đầu tiên được tìm ra.

V. KẾT LUẬN

Từ cặn dịch chiết EtOAc thu được từ dịch nuôi cấy chủng tảo lam *Anabaena* sp. phân lập từ đất trồng bông của tỉnh Đắk Lắk, Việt Nam tách được fluorensadiol thuộc nhóm diterpenoid với hoạt tính kháng khuẩn rất mạnh. Sự có mặt của diterpenoids trong tảo lam là vô cùng hiếm, đến tận thời điểm này mới chỉ có một diterpenoid (tên là tolypodiol với hoạt tính kháng viêm được thông báo là tách từ tảo lam *Tolypothrix nodosa*. Đây mới là kết quả nghiên cứu bước đầu đối với hoạt tính kháng khuẩn (*E. coli*). Trong thời gian tới, chúng tôi sẽ tiếp tục tách đủ lượng fluorensadiol để thử hoạt tính với các dòng vi khuẩn, nấm khác, đánh giá ảnh hưởng độc tố của fluorensadiol nhằm khẳng định hơn giá trị của fluorensadiol và của chủng *Anabaena* sp. đối với tiềm năng sử dụng trong điều trị các bệnh do vi khuẩn, nấm gây nên.

Nghiên cứu này chủ yếu được thực hiện tại Viện Dược, trường Đại học Greifswald, CHLB Đức.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jaki B, Orjala J, Heilmann J, Lind A, Vogler B and Sticher O (2000) Novel extracellular diterpenoids with biological activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*. *J Nat Prod* 63, 339-343.
2. Kingston DG, Rao MM, Spittler TD, Pettersen RC and Cullen DL (1975) Sesquiterpenes from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry* 14, 2033-2037.
3. Le Thi Anh Tuyet and Sabine Mundt (2009) Screening of soil cyanobacteria from Vietnam for antibacterial activity. In "13th International symposium on phototrophic prokaryotes", August 9-14, 2009, Montreal, Quebec, Canada.
4. Mundt S, Kreilow S, Nowotny A and Effmert U (2001) Biochemical and pharmacological investigations of selected cyanobacteria. *Int J Hyg Environ Health*. 203, 327-334.
5. Pettersen RC, Cullen DL, Spittler TD and Kingston DG (1975) The crystal and Molecular structure of Flourensadiol, a natural product sesquiterpene isolated from a West Texas Shrub. *Acta Cryst B* 41, 1124
6. Sivonen K and Börner T (2008) Bioactive compounds produced by cyanobacteria. Edited by Antonia, H., and Enrique, F. 159-197.
7. Volk RB (2005) Antialgal activity of several cyanobacterial exometabolites. *J. Appl. Phycol.* 18, 145-151.
8. Volk RB and Furkert F H (2006) Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. *Microbiological Research* 161, 180-186.

NGHIÊN CỨU THỬ NGHIỆM KHẢ NĂNG THU GIỮ KIM LOẠI NẶNG CỦA CHẾ PHẨM MITOX

Lương Thị Hồng Vân*, Hà Thị Hoài Thu**, Hoàng Sầm**
Phan Hoàng Tuấn***, Phan Thanh Phương***,

TÓM TẮT

Các tác giả tiến hành phân tích hàm lượng của As, Cd, Pb, Mn, Fe, Cu trong các dung dịch thử (DDT) chứa kim loại nặng nói trên có can thiệp chế phẩm MITOX (KS) bằng thiết bị Metrohm 797 VA Computrace. Kết quả cho thấy: các công thức KS1 và KS2 của chế phẩm MITOX có khả năng làm giảm đáng kể hàm lượng các kim loại trong dung dịch thử (giảm ít nhất là 24,342% và nhiều nhất là 95,769%). Công thức KS2 tỏ ra có khả năng làm giảm kim loại nặng nhiều hơn so với KS1. Các thành phần KLN có trong chế phẩm MITOX không có khả năng hòa tan trong DDT.

Từ khoá: MITOX, KS, kim loại nặng...

SUMMARY

Study on the ability for *in-vitro* keeping heavy metals of the product MITOX

The authors analyzed the contents of As, Cd, Pb, Mn, Fe, Cu in the solutions containing heavy metals after the processing using MITOX (KS) with 797 VA Computrace Metrohm equipment. The results showed that the KS1 and KS2 MITOX preparations can significantly reduce the contents of Pb, Cd, As, Mn, Fe, Cu in the test solution. KS2 proved to be able to more efficient than KS1. The composition of heavy metals in the product MITOX could not dissolve in the test solution.

Keywords: MITOX, KS, heavy metals ...

* Viện KHSS - ĐHTN; ** Công ty TNHH SAMMAN

*** Trường Đại học Khoa học - ĐHTN