

NGHIÊN CỨU ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA XẠ KHUẨN *STREPTOMYCES ANGSTMYCETICUS* HBQ19 NỘI SINH TRÊN CÂY QUẾ (*CINNAMOMUM CASSIA* PRESL) TẠI HÒA BÌNH

**Vũ Thị Hạnh Nguyễn¹, Chu Kỳ Sơn², Vũ Thu Trang²,
Nguyễn Văn Thế¹, Phí Quyết Tiến¹**

¹*Viện Công nghệ Sinh học,*

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²*Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm,
Trường Đại học Bách khoa Hà Nội*

Cây Quế (*Cinnamomum* sp.) là loại cây thân gỗ được biết đến như vị thuốc bổ được sử dụng rộng rãi trong đông y học cổ truyền và thực phẩm. Các nghiên cứu đã chứng minh chất cinnamaldehyde trong quế có khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh như: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*... (El-Farmawi *et al.*, 2013). Ngoài giá trị dược lý do thành phần của cây mang lại, cây quế còn là môi trường sinh trưởng của xạ khuẩn nội sinh. Xạ khuẩn nội sinh là các xạ khuẩn từ vùng rễ xâm nhập vào rễ, thân, lá cây mà không gây hại hay cạnh tranh dinh dưỡng với cây chủ (Golinska *et al.*, 2015). Các hợp chất có hoạt tính sinh học từ xạ khuẩn nội cộng sinh được chứng minh là rất đa dạng về mặt số lượng và hoạt tính sinh học như: chất kháng sinh, kháng ung thư, chống oxy hóa, kiểm soát sinh học... (Passari *et al.*, 2015). Polyketide là nhóm đại diện cho các sản phẩm trao đổi chất bậc hai được sản xuất bởi vi khuẩn, nấm, xạ khuẩn và thực vật (Rojas *et al.*, 2012). Polyketide đa vòng thơm được hình thành dựa trên quá trình ngưng kết từ các đơn vị acetate, propionate, acyl butyrate và khử nhóm β -carbonyl thông qua 3 vùng mã hóa enzyme ketosynthase (KS), acyl transferase (AT) và acyl carrier protein (ACP) tại các module (Gontang *et al.*, 2010). Trong đó, enzyme polyketide synthase II (PKS-II) tham gia tổng hợp cấu trúc cơ bản chuỗi polyketide và polyketide synthase I (PKS-I) chịu trách nhiệm tạo khung polyketide hoàn chỉnh (Mahera *et al.*, 2013). Nonribosomal peptide synthetase (NRPS) sinh tổng hợp sản phẩm trao đổi chất bậc hai không thông qua ribosome tạo dạng peptide nhờ quá trình tổng hợp các protein và axit amin.

Cho đến nay, số lượng các nghiên cứu khả năng kháng khuẩn và chống tế bào ung thư từ xạ khuẩn nội sinh trên cây dược liệu tại Việt Nam vẫn còn rất hạn chế. Bài báo này, nghiên cứu tập trung vào đánh giá khả năng sinh kháng sinh, chất ức chế ung thư và phân tích trình tự gen mã hóa PKS-I, PKS-II từ chủng xạ khuẩn HBQ19 nội sinh.

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

- **Vật liệu nghiên cứu:** Chủng xạ khuẩn *Streptomyces angustmyceticus* HBQ19 (mã số truy cập trên Genbank: KM207769) được phân lập từ các mẫu cây quế thu thập tỉnh Hòa Bình. Các chủng vi sinh vật kiểm định: *S. enterica* ATCC 14028, *E. coli* ATCC 11105, *S. lutea* CNLM, *B. cereus* ATCC 11778, *Proteus vulgaris* CNLM, *S. epidemidis* ATCC 12228, *P. aeruginosa* CNLM, *E. aerogenes* ATCC 13048, *C. albicans* ATCC 10231 nhận từ Bộ sưu tập giống của phòng Công nghệ Lên men, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Chủng *Escherichia coli* XL1-blue (Stratagene, Mỹ) và vector tách dòng pJET1.2/blunt (Thermo scientific, Mỹ). Enzyme giới hạn *Bgl*III, T4 DNA ligase, Rnase, Taq DNA polymerase (Thermo Scientific, Mỹ), RPMI 1640, PBS (phosphate buffered saline, g/L), FBS (Fetal bovine serum) (Gibco, Mỹ), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (DUCHEFA biochemie, Hà Lan) và một số hóa chất, thiết bị thông dụng khác.

Môi trường nuôi cấy: Môi trường YIM 38 (g/l): cao malt 4,0; cao men 4,0; glucose 4,0; thạch 20,0; H₂O 1000 ml, pH 7,2 (Zhao *et al.*, 2005). LB (g/l): cao men 5,0; tryptone 10,0; NaCl 10,0; thạch 15,0; H₂O 1000 ml; pH 6,5. Hansen (g/l): glucose: 50; pepton: 10; KH₂PO₄: 3; MgSO₄.7H₂O: 2; H₂O: 1000 ml; thạch: 15,0; pH: 6,0.

Phương pháp nghiên cứu:

Chuẩn bị các dòng tế bào: Các dòng tế bào ung thư người gồm A-549 (ung thư phổi), MCF-7 (ung thư vú), Hep3B (ung thư gan) được cung cấp bởi GS. Jeong-Hyung Lee, Hàn Quốc. Tế bào ung thư được nuôi cấy *in vitro* theo phương pháp Skehan (1990).

Các bước tiến hành: Tế bào được nuôi cấy 48 giờ trong môi trường RPMI 1640 ở 37°C, 5% CO₂ với 10% FBS, penicillin (100 U/ml) và streptomycin sulphate (100 µg/mL). Sau đó chúng được nuôi cấy trong giếng 96 với thể tích là 200 µl, mật độ 2.5x10⁴ tế bào/giếng (A549, Hep3B) và 5x10⁴ tế bào/giếng (MCF-7). Sau 24 giờ, chúng được thử với hợp chất pha sẵn ở các nồng độ khác nhau trong DMSO. Sau 48 giờ, cho phản ứng với 20 µl MTT (pha trong PBS), ủ 4 giờ ở 37°C và 5% CO₂. Sau đó hút bỏ hết môi trường trên bề mặt, kết tủa formazan được hòa tan trong isopropanol. Độ hấp thụ được đo ở 570 nm. Camptothecin được sử dụng làm đối chứng dương.

Khuếch đại gen mã hóa PKS-I, PKS-II của xạ khuẩn: Chủng xạ khuẩn *S. angustmyceticus* HBQ19 được nuôi trong môi trường. Sau 72 giờ, ly tâm thu tế bào ở 10.000 vòng/phút trong 5 phút. DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001). Gen mã hóa PKS-I, PKS-II được khuếch đại theo phương pháp của QN Tùng và cộng sự (2014).

Đánh giá hoạt tính kháng VSV kiểm định của các chủng xạ khuẩn: Khả năng kháng VSV kiểm định được xác định theo phương pháp đục lỗ thạch áp của Hadacek *cs*, 2000.

Tách dòng và phân tích trình tự gen mã hóa PKS-I, PKS-II: Gen *pks-I* (~1400 bp) và *pks-II* (~600 bp) thu từ phản ứng PCR được tinh sạch và gắn vào vector tách dòng pJET1.2/blunt theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất. Biến nạp sản phẩm nhận được sau phản ứng ghép nối vào chủng *E. coli* XL1-blue. Tách plasmid theo hướng dẫn của bộ kit GenJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific, Mỹ), xử lý bằng *Bgl*III để kiểm tra kích thước của đoạn gen được chèn trong vector pJET1.2/blunt. Trình tự nucleotide của gen *pks-I*, *pks-II* trên vector tách dòng pJET1.2/blunt được xác định trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM[®]3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, Mỹ) tại Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Kết quả giải trình tự gen hai chiều được kiểm tra bằng phần mềm phân tích BioEdit (ver. 7.1.9, Mỹ), so sánh với các gen tương ứng đăng ký trên ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Sử dụng các phần mềm Clustal-X (ver. 1.83, Anh), Mega (ver. 6.0.5, Mỹ) và công cụ NaPDoS (<http://npdomainseeker.sdsc.edu>) để so sánh, phân tích trình tự trên cơ sở số liệu thu được.

Phương pháp xử lý thống kê: Dùng toán thống kê, phần mềm Excel 2010 và phần mềm XLSTAT 2016 để phân tích độ sai lệch một chiều (ANOVA) được thực hiện để phân tích những khác biệt đáng kể (P=0,05) giữa các hoạt tính kháng khuẩn của chủng.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khả năng kháng VSV kiểm định của chủng *S. angustmyceticus* HBQ19 nội sinh:

Chủng *S. angustmyceticus* HBQ19 đã được phân loại và nghiên cứu đặc điểm sinh học theo nghiên cứu của QN Tùng và cộng sự (2014). Xác định phổ kháng khuẩn của chủng xạ khuẩn *S.*

angustmyceticus HBQ19 thể hiện phổ kháng mạnh, rộng với các chủng VSV kiểm định (Bảng 1), trong đó chủng *S. epidermidis* là VSV gây bệnh ký sinh trên người và động vật như viêm loét, viêm nhiễm trên da (Otto 2009) và chủng *S. enterica* gây bệnh thương hàn. Tương tự, các nghiên cứu trước đó cũng đã đề cập đến tiềm năng kháng khuẩn từ các chất chiết xuất từ xạ khuẩn nội sinh (Taechowisan *et al.*, 2003; Verma *et al.*, 2009). Những phát hiện từ nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với những báo cáo trước đây của Li và cộng sự. (2008), người đã giả thuyết rằng loài vi khuẩn nội sinh *Streptomyces* phân lập được từ cây có dược tính có đặc tính kháng khuẩn và kháng u.

Bảng 1

Khả năng kháng vi sinh vật kiểm định của chủng HBQ19

Chủng vi sinh vật kiểm định	Đường kính VKK (D-	Chủng vi sinh vật kiểm định	Đường kính VKK (D-
Gram (-)		Gram (+)	
<i>E. coli</i> ATCC 11105	9,8 ^g ±0,11	<i>S. lutea</i> CNLM	18,3 ^c ±0,10
<i>P. vulgaris</i> CNLM	18,5 ^c ±0,01	<i>S. epidermidis</i> ATCC	27,0 ^a ±0,42
<i>S. enterica</i> ATCC 14028	12,7 ^l ±0,08	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	16,5 ^d ±0,60
<i>P. aeruginosa</i> CNLM	13,9 ^e ±0,13	Nấm men	
<i>E. aerogenes</i> ATCC	0 ^h	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	25,7 ^b ±0,61

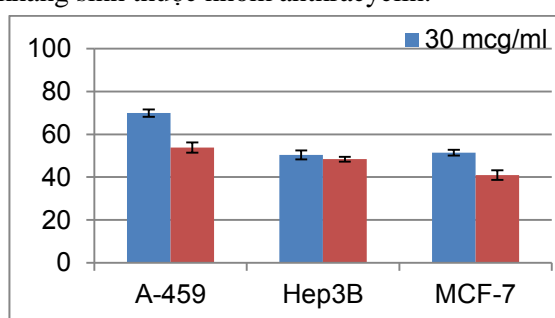
Ghi chú: Các giá trị theo sau bởi các chữ khác nhau trong một cột khác nhau đáng kể theo đánh giá của Fisher ($p < 0,05$).

Nghiên cứu bước đầu về khả năng gây độc tế bào

Đánh giá khả năng sinh kháng sinh thuộc nhóm anthracyclin của chủng *S. angustmyceticus* HBQ19: Một trong những nhóm kháng sinh có nguồn gốc từ xạ khuẩn *S. olivaceus*, *S. glaucescens*, *S. peucetius* hiện đang được sử dụng để điều trị nhiều loại ung thư thuộc nhóm anthracyclin. Đánh giá khả năng sinh anthracyclin của chủng xạ khuẩn *S. angustmyceticus* HBQ19 dựa trên thử nghiệm biến đổi màu khi môi trường chuyển từ axit sang bazơ, anthracycline có thể được phát hiện trực tiếp trên môi trường nuôi cấy bằng phép thử màu theo phương pháp của Trease và Evans (1996). Kết quả cho thấy, chủng có thể hiện phản ứng chuyển màu da cam khi có pH axit và màu tím khi có pH kiềm (Hình 1). Như vậy chủng *S. angustmyceticus* HBQ19 có khả năng sinh chất kháng sinh thuộc nhóm anthracyclin.



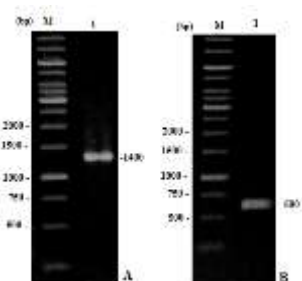
Hình 1: Sự thay đổi màu sắc theo pH môi trường của chủng *S. angustmyceticus* HBQ19. A. màu vàng giềng có pH axit; B. màu tím giềng có pH bazơ



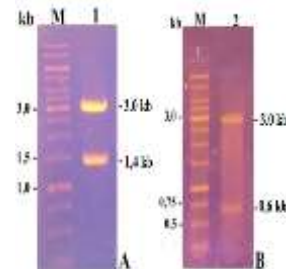
Hình 2: Xác định hoạt tính gây độc tế bào của chủng *S. angustmyceticus* HBQ19

Đánh giá hoạt tính kháng tế bào ung thư: Khảo sát khả năng chống ung thư theo phương pháp MTT, cho thấy chủng HBQ19 có khả năng gây độc hai dòng tế bào Hep3B và MCF-7 ở nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$ (Hình 2). Thí nghiệm sử dụng đối chứng dương là camptothecin, một trong những chất có khả năng diệt tế bào.

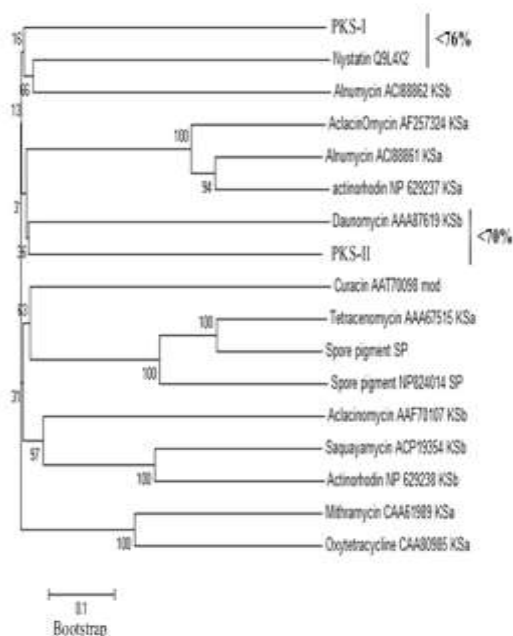
Xác định gen mã hóa PKS-I và PKS-II của chủng xạ khuẩn HBQ19: Nhiều tài liệu trên thế giới công bố, một số sản phẩm trao đổi chất có hoạt tính sinh học ở xạ khuẩn được tổng hợp bởi 2 nhóm enzym: PKS-I, PKS-II (Gonzalez *et al.*, 2005; Kehr *et al.*, 2011). Do đó, sàng lọc và đánh giá các gen liên quan đến quá trình trao đổi chất thứ cấp là rất cần thiết để đánh giá tiềm năng sinh tổng hợp chất kháng sinh của chủng *S. angustmyceticus* HBQ19. Sản phẩm khuếch đại gen *pks* của chủng xạ khuẩn HBQ19 bằng phản ứng PCR cho một băng DNA duy nhất có kích thước 1400 bp (*pks-I*) và 600 bp (*pks-II*) tương ứng với kích thước dự đoán khi thiết kế mồi (Hình 3). Một số nghiên cứu khác như Zhao *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012 khi nghiên cứu đa dạng của gen *pks-I*, *pks-II*, *nrps* đã phát hiện các chủng xạ khuẩn nội sinh có mang gen chức năng chiếm tỷ lệ khá cao, nhưng kết quả này phụ thuộc vào phương pháp phân lập, loại thực vật và vùng phân lập. Dựa trên sự đa dạng về gen đã chứng minh xạ khuẩn nội sinh có thể sinh tổng hợp được rất nhiều loại kháng sinh khác nhau có tiềm năng ứng dụng trong y học. Hiện nay, nghiên cứu sàng lọc và dự đoán cấu trúc kháng sinh bằng phương pháp khuếch đại gen mã hóa enzym tham gia tổng hợp kháng sinh là hướng đi đầy triển vọng của các nhà khoa học trên thế giới.



Hình 3: Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen *pks-I* (A) và *pks-II* (B) trên gel agarose 1,0%. Băng M: Thang DNA chuẩn (1kb); 1. Sản phẩm PCR từ chủng HBQ19



Hình 4: Sản phẩm cắt plasmid trên gel agarose 1,0%. Băng M: Thang DNA chuẩn 1 kb; Băng 1, 2: plasmid pJET1.2/blunt::*pks-I* (A) và pJET1.2/blunt::*pks-II* (B) được cắt bởi enzyme giới hạn *Bgl*II.



Hình 5: Cây phát sinh chủng loại thể hiện mối quan hệ suy diễn của trình tự amino acid của PKS-I và PKS-II với các của trình tự enzyme liên quan đến tổng hợp kháng sinh khác trên cơ sở dữ liệu NaPDos. Giá trị bootstrap (%) thể hiện tỷ lệ sai khác về di truyền.

Tách dòng và xác định trình tự gen *pks-I*, *pks-II* của chủng HBQ19: Sản phẩm phản ứng PCR khuếch đại gen *pks-I*, *pks-II* được tinh sạch và gắn vào vector tách dòng pJET1.2/blunt. Sau khi được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* XL1-blue và nuôi cấy trên môi trường LB có bổ sung 100 µg/ml ampicillin. Để xác định chính xác đoạn chèn, hai plasmid được cắt bằng enzym giới hạn *Bgl*II. Kết quả điện di kiểm tra thu được gồm hai băng DNA rõ nét có kích thước 3,0 kb (tương ứng với kích thước pJET1.2/blunt) và 1,4 kb thể hiện cho đoạn gen *pks-I* (Hình 4A) và

0,6 kb thể hiện cho đoạn gen *pkc-II* (Hình 4B). Như vậy, gen *pkc-I*, *pkc-II* đã được chèn vào vector tách dòng pJET1.2/blunt. Hai vector tái tổ hợp này tiếp tục được chọn cho giải trình tự gen. Trình tự gen *pkc-I* cho thấy gen có độ dài 1198 bp mang khung đọc mở (Reading Frame, RF) mã hóa cho protein gồm 399 axit amin. Khi so sánh độ tương đồng trình tự gen *pkc-I* của chủng *S. angustmyceticus* HBQ19 với các trình tự protein tương ứng trên GenBank cho tỷ lệ tương đồng đạt 97-99% tại vùng mã hóa enzym (Bảng 2). Bên cạnh đó, khi so sánh độ tương đồng trình tự đoạn gen *pkc-II* có độ dài 584 bp, mã hóa cho RF gồm 194 axit amin cho tỷ lệ tương đồng cao (97%) với trình tự amino acid tương ứng từ *Streptomyces decoyicus* NRRL 2666 (mã số truy cập WP030083349.1) tại vùng mã hóa enzym acyl carrier protein (ACP). Theo tổng hợp của Kim & Yi (2012), đến thời điểm công bố năm 2012 trên các cơ sở dữ liệu đã lưu giữ khoảng 350 trình tự gen mã hóa cho PKS-I và 280 trình tự gen mã hóa PKS-II từ các nguồn vi sinh vật khác nhau, chủ yếu từ vi khuẩn và xạ khuẩn (Kim & Yi, 2012). Nghiên cứu lý thuyết dựa trên cấu trúc kháng sinh đã biết và trình tự gen mã hóa enzym tham gia vào quá trình tổng hợp kháng sinh cho phép dự đoán sản phẩm cuối cùng được tạo thành (Kehr *et al.*, 2011).

Bảng 2

So sánh độ tương đồng trình tự axit amin của *pkc-I* và *pkc-II* từ chủng *S. angustmyceticus* HBQ19 với một vài trình tự tương ứng trên GenBank

Trình tự gen	Trình tự amino acid được so sánh	Mã số truy cập trên GenBank	Độ tương đồng (%)
<i>pkc-I</i>	Acyl tranferase (<i>Streptomyces wadayamensis</i> A23)	KDR59688.1	99
	Acyl tranferase (<i>Streptomyces</i> sp. S4)	WP010639290.1	99
	Acyl tranferase (<i>Streptomyces</i> sp. SM8)	WP008414560.1	97
<i>pkc-II</i>	Beta-ACP synthase (<i>Streptomyces decoyicus</i> NRRL 2666)	WP030083349.1	97
	Beta-ACP synthase (<i>Streptomyces</i> sp. NRRL S-337)	WP030811870.1	97
	Beta-ACP synthase (<i>Streptomyces</i> sp. FxanaC1)	WP018091670.1	97

Bảng 3

Cơ chế tổng hợp kháng sinh dựa trên trình tự axit amin của *pkc-I* và *pkc-II* từ *S. angustmyceticus* HBQ19

Trình tự axit amin	Mã số truy cập trên GenBank	Độ tương đồng (%)	Sản phẩm tổng hợp	Phân loại nhóm
<i>pkc-I</i>	Q9L4X2	76	Nystatin	Polyene macrolide
<i>pkc-II</i>	NP629237	70	Actinorhodin	Anthracycline

Dự đoán kháng sinh tạo thành nhờ trình tự axit amin của *pkc-I* và *pkc-II* từ *S. angustmyceticus* HBQ19 trên phần mềm Natural Product Domain Seeker (NaPDos) cho thấy (Bảng 3, Hình 5): trình tự *pkc-I* có độ tương đồng thấp (76%) so với gen tương ứng *pkc-I* tham gia tổng hợp nystatin (mã số truy cập Q9L4X2). Trình tự *pkc-II* có độ tương đồng đạt 70% so với *pkc-II* tham gia vào quá trình tổng hợp kháng sinh actinorhodin (mã số truy cập NP629237). Nystatin là loại kháng sinh chống nấm thuộc nhóm kháng sinh polyene macrolide do xạ khuẩn *Streptomyces nourse* tổng hợp (Trygveet *et al.*, 2011). Hiện nay nystatin được sử dụng phổ biến

trong điều trị các bệnh nhiễm trùng da, miệng, thực quản... Actinorhodin thuộc nhóm Benzoisochromanequinone (kháng sinh polyketide) và có cấu trúc dạng vòng aquinone mất cân với pH (màu đỏ khi gặp pH axit, màu xanh khi gặp pH kiềm). Actinorhodin chủ yếu được sử dụng làm tiền chất tổng hợp các loại kháng sinh thuộc nhóm polyketide khác nhờ thay đổi mạch nhánh (side chain) của cấu trúc polyketide (Mighelet *al.*, 1992). Theo nghiên cứu của Gontang và cộng sự (2010) khi nghiên cứu tách dòng và phân tích trình tự gen *pks* từ xạ khuẩn biển đã nhận định tỷ lệ xạ khuẩn phân lập từ lớp trầm tích biển mang gen mã hóa PKS chiếm 8,3 % so với xạ khuẩn từ đất. Trong tổng số 90 trình tự PKS từ 10 chi xạ khuẩn biển khác nhau, 14 trình tự thể hiện độ tương đồng > 85% so với trình tự axit amin tham gia con đường tổng hợp một số loại kháng sinh như: Kijanamicin, tetronomycin, actinofuranone...

III. KẾT LUẬN

Chủng *S. angustmyceticus* HBQ19 thể hiện khả năng kháng khuẩn mạnh với 8 chủng VSV gây bệnh trong 9 chủng VSV thử nghiệm với đường kính kháng khuẩn của dịch lên men giao động từ 10 – 27 mm, trong đó chủng HBQ19 có hoạt tính kháng cao đối với chủng *S. epidermidis* ATCC 12228 (27,0 mm) và *C. albicans* ATCC 10231 (25,7 mm). Đây cũng là chủng xạ khuẩn mang 2 gen mã hóa tổng hợp kháng sinh *pks-I*, *pks-II*, có khả năng tiêu diệt hai dòng tế bào Hep3B và MCF-7 ở nồng độ 100 µg/ml và có khả năng sinh kháng sinh thuộc nhóm anthracycline là nhóm kháng sinh được sử dụng để điều trị nhiều loại ung thư. Gen *pks-I* và *pks-II* từ chủng *S. angustmyceticus* HBQ19 được khuếch đại bằng phản ứng PCR, tách dòng và phân tích trình tự axit amin. Trình tự axit amin từ gen *pks-I* (399 axit amin), *pks-II* (194 axit amin) nhận được trong nghiên cứu thể hiện độ tương đồng cao (đạt 97-99 %) so với các trình tự tương ứng trên GenBank (NCBI). Gen mã hóa PKS-I (mã số truy cập: Q9L4X2), PKS-II (mã số truy cập: NP629237) thể hiện độ tương đồng thấp đạt lần lượt 76%, 70% với enzyme tương ứng tham gia tổng hợp kháng sinh nystatin và actinorhodin.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện nhờ sử dụng thiết bị của Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen. Công trình được thực hiện nhờ kinh phí của đề tài Mã số: VAST04.07/16-17 cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và hỗ trợ từ đề tài B2014-01.79 Bộ Giáo dục và Đào tạo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **El-Farmawi D., Olama Z., Holail H.**, 2013. The antibacterial effect of some natural bioactive material against *Klebsiella pneumonia* and MRSA. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 3(3): 576-588.
2. **Golinska P, Wypij M, Agarkar G, Rathod D, Dahm H, Rai M** (2015). Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. *Antonie van Leeuwenhoek* 108:267–289.
3. **Gontang E. A., Gaudencio S. P., Fenical W., Jense P. R.**, 2010. Sequence-based analysis of secondary-metabolite biosynthesis in marine actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(8): 2487-2499.
4. **Gonzalez I., Ayuso-Sacido A., Anderson A., Genilloud O.**, 2005. Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiol Ecol.*, 54: 401-415.
5. **Hadacek F, Greger H** (2000). Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem. Anal* (11): 137-147.

6. **Kehr J. C., Picchi D. G., Dittmann**, 2011. Natural product biosynthesis in cyanobacteria: a treasure trove of unique enzymes. *Beilstein J. Org Chem.*, 7: 1622-1635.
7. **Kim J., Yi G. S.**, 2012. PKMiner: a database for exploring type II polyketide synthases. *BMC Microbiol.*, 12(169): 1-12.
8. **Li J., Zhao G. Z., Chen H. H., Wang H. B., Qin S., Zhu W. Y., Xu L. H., Jiang C. L., Li W. J.**, 2008. Antitumour and antimicrobial activities of endophytic *streptomyces* from pharmaceutical plants in rainforest. *Lett Appl Microbiol.*, 47: 574-580.
9. **Li J., Zhao G. Z., Huang H. Y., Qin S., Zhu W. Y., Zhao L., Xu L. H., Zhang S., Li W. J., Strobel G.**, 2012. Isolation and characterization of culturable endophytic actinobacteria associated with *Artemisia annua* L. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101: 515-527.
10. **Mahera M. S., Sulaiman A. A., Ismet A., Milton W.**, 2013. Evaluation of antibiotic producing genes in *Streptomyces* isolated from a desert environment of Saudi Arabia. *Life Sci J.*, 10(4): 974-980.
11. **Mighel AFM, Eduardo M, Luis B, Davia AH, Francisco M.**, 1992. Nucleotide sequence and deduced function of a set of transcribed genes of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) including the polyketide synthase for the antibiotic actinorhodin. *J. Biol. Chem* 267(27): 19278-19290.
12. **Otto, M.** 2009. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(8), 555–567.
13. **Passari AK, Mishra VK, Saikia R, Gupta VK, Singh BP.**, 2015. Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their *in vitro* antimicrobial biosynthetic potential. *Frontiers in Microbiology* 6: 273 1-13.
14. **Rojas D. J., Sette L. D., Araujo W. L., Lopes M. S. G., Silva L. F., Furlan R. L. A., Padilla G.**, 2012. The diversity of polyketide synthase genes from sugarcane-derived fungi. *Microb Ecol.*, 63: 565-577.
15. **Sambrook J, Russell D. W.**, 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
16. **Skehan P.**, 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*, 82(13):1107-1112.
17. **Trease GE, Evans WC.**, 1996 A textbook of Pharmacognosy. 14th ed. Bailliere Tindall Ltd, London, 832.
18. **Taechowisan, T., Peberdy, J. F., and Lumyong, S.**, 2003. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 381–385.
19. **Trygve B., Havard S., Kristin F. D., Olga N. S., Ingrid B., Olga V., Trygve A., Trond E. E., Sergey B. Z.**, 2011. New nistatin-related antiungal polyene macrolides with altered polyol region generated via biosynthetic engineering of *Streptomyces noursei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(18): 6636-6643.

20. **Tung QN, Nhan KT, Son CK, Nguyen VTH, Trang VT, Tien PQ.**, 2014. Assessment and screening of antimicrobial activities of endophytic actinomycetes associated with *Cinnamomum loureiri*. *Journal of Biotechnology* 12 (2): 365-371.
21. **Verma, V. C., Gond, S. K., Kumar, A., Mishra, A., Kharwar, R. N., and Gange, A. C.**, 2009. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: isolation, diversity, and anti-microbial activity. *Microb. Ecol.* 57, 749–756.
22. **Zhao K, Penttinen P, Guan T, Xiao J, Chen Q, Xu J, Lindstro K, Zhang L, Zhang X, Strobel GA.**, 2011. The Diversity and Anti-Microbial Activity of endophytic actinomycetes Isolated from Medicinal Plants in Panxi Plateau, China. *Curr Microbiol* (2011) 62:182–190.

BIOLOGICAL CHARACTERISATION OF ENDOPHYTIC *Streptomyces angustmyceticus* HBQ19 ASSOCIATED WITH *Cinnamomum cassia* Presl IN HOA BINH PROVINCE

**Vu Thi Hanh Nguyen, Chu Ky Son, Vu Thu Trang,
Nguyễn Văn Thế, Phi Quyet Tien**

SUMMARY

The purposes of this study were to identify the antimicrobial and anticancer activities of *Streptomyces angustmyceticus* HBQ19 isolated from *Cinnamomum cassia* Presl obtained from HoaBinh province. HBQ19 showed the effectively inhibition activities against 8 tested pathogens (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Candida albicans* ATCC 10231, *Proteus vulgaris* CNLM, *Sarcina lutea* CNLM, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Salmonella enterica* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* CNLM, *Escherichia coli* ATCC 11105) among 9 tested pathogens. Using MTT assay on three cancer cell lines such as A-549 (human lung carcinoma), MCF-7 (human breast cancer), Hep3B (human liver cancer), HBQ19 showed the cytotoxic activities against A-549 and Hep3B cells at 100 µg/ml. The strain HBQ19 have two polyketide synthase (PKS) genes type I and II related to antibiotic synthesis. HBQ19 also presented as an anthracycline producing actinomycetes. The sequence of amplified *pks-I* gene (GenBank Acc. No.: Q9L4X2) from *S. angustmyceticus* HBQ19 consists of 1198 bp encoding for the 399 amino acid protein; the *pks-II* gene sequence (GenBank Acc. No.: NP629237) consists of 548 bp encoding for an 194 amino acid protein. Amino acid sequences of *pks-I*, *pks-II* genes showed 76%, 70% similarity with the nystatin and actinorhodin synthesis enzymes.