

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

HVCH: NGHIÊM VĂN ĐỨC

**TÊN ĐỀ TÀI LUẬN VĂN:
NGHIÊN CỨU NĂM NỘI SINH TRONG CÂY NGHỆ
VÀNG (*CURCUMA LONGA L.*) VÀ CÁC HỢP CHẤT
THIÊN NHIÊN TỪ NĂM NỘI SINH**

LUẬN VĂN: THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2015

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

HVCH: NGHIÊM VĂN ĐỨC

NGHIÊN CỨU NĂM NỘI SINH TRONG CÂY NGHỆ
VÀNG (*CURCUMA LONGA L.*) VÀ CÁC HỢP CHẤT
THIÊN NHIÊN TỪ NĂM NỘI SINH

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm – Hóa sinh

Mã ngành: 60420114

LUẬN VĂN: THẠC SĨ SINH HỌC

HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:
TS. DƯƠNG NGỌC TÚ

Hà Nội - 2015

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc và chân thành tới TS. Dương Ngọc Tú, Trưởng phòng Sinh dược - Viện Hóa học, Phó giám đốc kiêm điều phối viên Trung tâm Xuất sắc liên ngành về lĩnh vực các hợp chất thiên nhiên Việt Nam – Vương quốc Anh. Thầy đã luôn hướng dẫn, định hướng và giúp đỡ tôi thực hiện thành công luận văn này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới các thầy cô giáo trường Đại học Thái Nguyên cũng như các thầy cô thuộc Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, các thầy cô Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình giảng dạy và truyền thụ cho tôi kiến thức chuyên môn để thực hiện luận văn này.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn các nhà khoa học, các bạn đồng nghiệp tại phòng Sinh dược, phòng Nghiên cứu các Hợp chất tự nhiên, Viện Hóa học và đã đồng hành và giúp đỡ tôi trong quá trình nghiên cứu. Đặc biệt là PGS.TS. Nguyễn Thị Hoàng Anh người đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo tôi từng bước từ khi mới bắt đầu nghiên cứu về lĩnh vực các hợp chất thiên nhiên, cũng như giúp đỡ, và cho tôi những lời khuyên quý báu để tôi hoàn thành luận văn này.

Xin gửi lời cảm ơn tới gia đình, bố mẹ những người sinh thành, nuôi dưỡng tôi là chỗ dựa tinh thần vững chắc cho tôi suốt thời gian qua. Cuối cùng tôi xin gửi lời cảm ơn tới anh chị, bạn bè tôi đã cổ vũ động viên, giúp đỡ tôi hoàn thành luận văn này.

Một lần nữa tôi vô cùng cảm ơn.

Hà Nội, ngày tháng 12 năm 2015

Học viên

Nghiêm Văn Đức

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN	i
MỤC LỤC.....	ii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT.....	iii
DANH MỤC CÁC SƠ ĐỒ, BẢNG BIỂU	iv
DANH MỤC CÁC HÌNH ẢNH, ĐỒ THỊ.....	v
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Nấm nội sinh.	4
1.1.1. Khái niệm và quan hệ giữa nấm nội sinh và thực vật.	4
1.1.2. Phân lập nấm nội sinh:.....	5
1.2. Tình hình nghiên cứu về nấm nội sinh:	6
1.2.1. Tình hình nghiên cứu về nấm nội sinh trên thế giới:	6
1.2.2. Tình hình nghiên cứu về nấm nội sinh trong nước:	12
CHƯƠNG II: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	16
2.1. Vật liệu nghiên cứu, dụng cụ, hóa chất và thiết bị máy móc.	16
2.1.1. Vật liệu nghiên cứu.	16
2.1.2. Dụng cụ, hóa chất và thiết bị máy móc.	16
2.2. Phương pháp nghiên cứu.	16
2.2.1. Phương pháp thu hái mẫu thực vật.	16
2.2.2. Phương pháp phân lập nấm nội sinh trong thực vật.....	16
2.2.3. Phương pháp bảo quản nấm.....	17
2.2.4. Phương pháp phân loại dựa vào quan sát hình thái.	18
2.2.5. Phương pháp sinh khối nấm nội sinh.	19
2.2.6. Phương pháp chiết tách các hợp chất tự nhiên.	20
2.2.7. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất.	21
2.2.8. Phương pháp thử hoạt tính kháng nấm của các hợp chất sinh học.	23
CHƯƠNG III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	24
3.1. Kết quả phân lập và sinh khối nấm nội sinh.	24
3.1.1. Kết quả thu hái và xử lý mẫu thí nghiệm.	24
3.1.2. Kết quả phân lập nấm nội sinh.....	25
3.1.3. Kết quả định danh một số chủng nấm nội sinh.	33
3.1.4. Kết quả sinh khối nấm nội sinh:	35
3.2. Kết quả ngâm chiết và phân lập các hợp chất từ mẫu nấm nội sinh.	36
3.2.1. Kết quả ngâm chiết mẫu nấm B1 và C, sinh khối.....	36
3.2.2. Kết quả thử hoạt tính kháng nấm B.cinera của các dịch chiết	38
3.2.3. Kết quả phân lập chất từ nấm Fusarium sp. (B1).	39
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	51
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	52

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu	Tên tiếng Anh	Tên tiếng Việt
AChE	Acetylcholinesterase	Enzyme thủy phân acetylcholinesterase
ARNr	ARN ribosome	ARN ribosome
TLC	Thin layer chromatography	Sắc ký bản mỏng
CC	Column chromatography	Sắc ký cột
HPLC	High-performance liquid chromatography	sắc ký lỏng hiệu năng cao
GC/MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry	Sắc ký khí ghép khối phổ
MS	Mass spectrometry	Khối phổ
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
IR	Infrared spectroscopy	Phổ hồng ngoại

DANH MỤC CÁC SƠ ĐỒ, BẢNG BIỂU

Sơ đồ 3.1: Qui trình ngâm chiết mẫu nấm đã sinh khối	37
Sơ đồ 3.2: Qui trình phân lập các hợp chất từ nấm <i>Fusarium</i> sp. (B1)...	40
Bảng 3.1: Hoạt tính ức chế nấm <i>Botrytis cinera</i> của các dịch chiết nấm	38
Bảng 3.2: Thông tin các hợp chất 1-12	41
Bảng 3.3: Số liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR và HSQC của chất 14 (DMSO, 500 và 125 MHz)	47

DANH MỤC CÁC HÌNH ẢNH, ĐỒ THỊ

Hình 3.1: Hình ảnh mẫu nghệ vàng (<i>Curcuma longa</i>).....	24
Hình 3.2: Thu hái mẫu nghệ vàng	24
Hình 3.3: Khử trùng các mẫu nghệ trong phân lập nấm nội sinh.....	25
Hình 3.4: Mẫu đối trùng (kiểm tra công thức khử trùng).....	25
Hình 3.5: Mẫu thí nghiệm (mẫu lá, củ nuôi cấy phân lập nấm nội sinh)	26
Hình 3.6: Chủng nấm A.....	27
Hình 3.7: Chủng nấm B1	27
Hình 3.8: Chủng nấm B2.....	28
Hình 3.9: Chủng nấm C	28
Hình 3.10: Chủng nấm D.....	28
Hình 3.11: Chủng nấm E	29
Hình 3.12: Chủng nấm F	29
Hình 3.13: Chủng nấm G.....	29
Hình 3.14: Chủng nấm H.....	30
Hình 3.15: Chủng nấm I	30
Hình 3.16: Chủng nấm J.....	30
Hình 3.17: Chủng nấm K.....	31
Hình 3.18: Chủng nấm L.....	31
Hình 3.19: Chủng nấm M.....	31
Hình 3.20: Chủng nấm Ng1.....	32
Hình 3.21: Chủng nấm Ng2.....	32
Hình 3.22: Chủng nấm Ng3.....	32
Hình 3.23: Khuẩn lạc và cơ quan sinh sản của chủng C, bar 20 μm	33
Hình 3.24: Khuẩn lạc và cơ quan sinh sản của chủng B1, bar 10 μm	34
Hình 3.25: Khuẩn lạc và cơ quan sinh sản của chủng NG01, bar 20 μm	35
Hình 3.26: Khuẩn lạc và cuống sinh bào tử của chủng NG03, bar 20 μm	35
Hình 3.27: Kết quả sinh khối chủng nấm <i>Fusarium</i> sp. (B1)	36
Hình 3.28: Ngâm chiết mẫu sinh khối chủng nấm	37
Hình 3.29: Hình ảnh thử hoạt tính ức chế sự phát triển chủng nấm <i>Botrytis cinera</i> của các cặn chiết.	39
Hình 3.30: Phổ sắc ký đồ của mẫu NB1M4.....	44
Hình 3.31: Phổ 1H chất 14	48
Hình 3.32: Phổ C13CPD chất 14.....	49
Hình 3.33: Phổ HSQC chất 14.....	50

MỞ ĐẦU

Nấm nội sinh là những vi sinh vật sống trong tế bào cây mà không gây ra bất kì tác động tiêu cực nào. Trong nhiều trường hợp, nấm nội sinh có chức năng bảo vệ cây chống lại các loài gây bệnh bên ngoài. Có hai cơ chế liên quan đến khả năng bảo vệ cây này, hoặc các loài nấm nội sinh trực tiếp sản xuất ra các sản phẩm trao đổi chất để tấn công các loài ngoại lai xâm nhập, hoặc chúng sẽ kích thích cơ chế phòng vệ của cây chủ. Nấm nội sinh còn có thể kích thích tăng trưởng cây bằng cách sản xuất ra hormone thực vật, tổng hợp siderophore, cố định nito, hòa tan các chất khoáng, ức chế ethylene, hoặc trợ giúp quá trình phytoremediation. Nấm nội sinh có thể được truyền đi từ thể hệ này sang thể hệ khác thông qua mô cây, hạt, hoặc các phương thức truyền giống thực vật khác. Trong số hơn 300 ngàn loài cây thực vật bậc cao, mỗi cây là vật chủ của một hoặc nhiều loài nấm nội sinh. Tương tác giữa nấm nội sinh và cây chủ tương ứng liên quan đến quá trình đồng sản xuất các phân tử có hoạt tính sinh học, tuy nhiên người ta vẫn chưa hiểu hết được bản chất sự tương tác này. Điều quan trọng là bản chất mối quan hệ cộng sinh xác định rằng các hợp chất có hoạt tính sinh học từ nấm nội sinh đều không hại đến tế bào cây và không gây độc, do đó việc ứng dụng chúng trong y tế, chữa trị bệnh cho con người có tiềm năng rất cao.

Hợp chất tự nhiên là các chất hóa học có nguồn gốc từ thiên nhiên có hoạt tính sinh học hoặc có tác dụng dược học dùng để làm thuốc. Các hợp chất thiên nhiên đóng vai trò quan trọng trong việc đáp ứng nhu cầu trên thế giới đối với các chất có hoạt tính sinh dược. Những loài nấm nội sinh sống cộng sinh bên trong tế bào thực vật, chúng hiện nay đang được nghiên cứu sâu và rộng trên thế giới và được coi như là nguồn tài nguyên vô tận chưa khám phá hết với ngành công nghệ sinh học - dược phẩm. Những nghiên cứu về nấm nội sinh có nguồn gốc từ biển đã tìm thấy hơn 270 các hợp chất mới từ những năm 1990 tới giữa năm 2002 (2/3 trong số đó là từ tảo biển và cây

ngập mặn). Chỉ trong khoảng 5 năm từ 2002 tới 2006, đã tìm ra hơn 330 các hợp chất mới (là sản phẩm trao đổi chất bậc hai của nấm nội sinh). Các hợp chất trao đổi chất bậc hai do vi sinh vật sống sản sinh ra là con đường quan trọng để giải quyết nhu cầu thuốc mới trong y tế ngày càng tăng vì giá thành sản xuất rẻ, sự phong phú về cấu trúc, và tính mới. Các loài nấm sống nội sinh trong tế bào cây có thể sản sinh các hợp chất tương tự, hoặc cùng một loại hợp chất sản xuất bởi cây chủ. Cũng có trường hợp nấm có thể sản sinh ra các chất mà người ta không chiết ra được từ cây. Thông qua quá trình lên men vi sinh ở quy mô lớn, các loài nấm nội sinh có thể sản xuất một số lượng lớn các hợp chất có hoạt tính sinh học với giá thành rẻ để cung cấp cho ngành công nghiệp sản xuất dược phẩm. Điều quan trọng nữa là khi sử dụng vi sinh vật nội sinh sẽ tránh được việc khai thác cạn kiệt nguồn tài nguyên thực vật, làm mất sự đa dạng sinh học và đe dọa tuyệt chủng các loài cây, gây hậu quả xấu tới môi trường tự nhiên.

Nghệ vàng (*Curcuma longa* L.) thuộc họ Gừng (Zingiberaceae), thân rễ nghệ vàng chứa tinh dầu, ngoài ra còn có chất curcumin... Theo y học cổ truyền, nghệ vàng được phân làm hai vị thuốc. Thân rễ to được gọi là khương hoàng, các củ nhỏ mọc ra từ thân rễ được gọi là uất kim. Uất kim thường có màu đỏ hơn. Nghệ không chỉ làm gia vị để tạo màu cho món ăn mà đặc biệt nghệ còn dùng để làm thuốc, có nhiều loại nghệ nhưng công dụng nhất là loại nghệ vàng. Nghệ vàng có vị đắng cay, có mùi thơm hắc, tính ấm, có tác dụng hành khí phá ú, thông kinh chỉ thống. Nghệ vàng dùng để chữa các bệnh: kinh nguyệt không đều, viêm loét dạ dày, ung nhọt, phong thấp, tay chân đau nhức, đặc biệt Nghệ vàng còn dùng để điều trị ung thư, HIV, tiểu đường, Alzheimer, viêm gan B, C, kháng nấm, chống oxy hóa, sử dụng trong Mỹ phẩm và Thực phẩm [1].

Hoạt chất Curcumin trong củ Nghệ (*Curcuma longa* L.): Curcumin là thành phần chính của Curcuminoid – một chất trong củ Nghệ, có tên khoa

học là (1E,6E)-1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione. Curcumin có dạng bột màu vàng được mệnh danh như một loại thần dược có khả năng phòng chống và chữa được rất nhiều loại bệnh: tác dụng chuyển hóa lipid, hoạt tính chống viêm, chống oxy hóa, chống ung thư - cảm ứng apoptosis, chống tăng sinh mạch máu ở khối u, giúp tăng cường miễn dịch, chống đông máu, hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus.

Hiện nay có rất nhiều nghiên cứu về cây nghệ, nhưng đối tượng nấm nội ký sinh trong cây nghệ thì vẫn chưa được quan tâm nghiên cứu. Vì vậy phân lập nấm nội ký sinh từ cây nghệ là một hướng mới trong nghiên cứu khoa học nói chung và trong lĩnh vực các hợp chất thiên nhiên nói riêng. Để tìm hiểu về những vấn đề trên chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu đề tài **“Nghiên cứu nấm nội sinh trong cây nghệ vàng (*Curcuma longa* L.) và các hợp chất thiên nhiên từ nấm nội sinh”**. Mục tiêu chính của đề tài là tìm ra các chủng nấm nội sinh trong cây nghệ và nghiên cứu thành phần hóa học của chúng. Nghiên cứu hoạt tính sinh học của các hợp chất tự nhiên từ nấm nội sinh.