

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NAM CẦN THƠ

BÁO CÁO TỔNG KẾT  
ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CẤP CƠ SỞ

NGHIÊN CỨU THU NHẬN CHẾ PHẨM KHÁNG U  
TỪ VI KHUẨN SINH ACID GLUCURONIC

Mã số: (C21.03)

Chủ nhiệm đề tài: ThS. Lê Văn Ril

Thành viên: ThS. Lý Huỳnh Liên Hương  
ThS Tô Thị Ngọc Anh

(Cần Thơ, 28 Tháng 01 Năm 2024)

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NAM CẦN THƠ

BÁO CÁO TỔNG KẾT  
ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CẤP CƠ SỞ

NGHIÊN CỨU THU NHẬN CHẾ PHẨM KHÁNG U  
TỪ VI KHUẨN SINH ACID GLUCURONIC

Mã số: (C21.03)

Chủ nhiệm đề tài: ThS. Lê Văn Ril

Thành viên: ThS. Lý Huỳnh Liên Hương  
ThS Tô Thị Ngọc Anh

(Cần Thơ, 28 Tháng 01 Năm 2024)

# MỤC LỤC

MỤC LỤC BẢNG.....	IV
MỤC LỤC HÌNH.....	V
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT .....	VI
DANH MỤC TỪ TIẾNG ANH .....	IVI
TÓM TẮT.....	VIII
ABSTRACT.....	IX

## PHẦN 1: MỞ ĐẦU

1.1 GIỚI THIỆU.....	1
1.1.1 Mục tiêu nghiên cứu.....	1
1.1.2 Đối tượng và phạm vi nghiên cứu.....	1
1.2 TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	2
1.2.1 Giới thiệu vi khuẩn sinh acid glucuronic .....	2
1.2.1.1 Đặc điểm phân bố .....	2
1.2.1.2 Đặc điểm hình thái và sinh hóa .....	2
1.2.1.3 Phân loại khoa học vi khuẩn acetic .....	4
1.2.2 Vai trò của chất kháng oxy hóa đối với cơ thể người .....	5
1.2.2.1 Tình trạng stress oxy hóa .....	5
1.2.2.2 Chất kháng oxy hóa .....	6
1.2.2.3 Cơ chế chất kháng oxy hóa bảo vệ cơ thể trước stress oxy hóa .....	6
1.2.2.4 Mối quan hệ giữa stress oxy hóa và ung thư .....	8
1.2.3 Tiềm năng kháng oxy hóa của acid glucuronic.....	11
1.2.3.1 Đại cương về acid glucuronic.....	11
1.2.3.2 Khả năng kháng oxy hóa của acid glucuronic .....	15
1.2.4 Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước liên quan đến đề tài.....	16

## PHẦN 2: PHƯƠNG PHÁP VÀ PHƯƠNG TIỆN NGHIÊN CỨU

2.1 THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU .....	18
2.1.1 Thời gian nghiên cứu .....	18
2.1.2 Địa điểm nghiên cứu .....	18
2.2 VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU.....	18
2.2.1 Nguồn nguyên liệu lên men acid glucuronic .....	18
2.2.2 Dụng cụ, thiết bị và hóa chất .....	18
2.3 SƠ ĐỒ VÀ QUY TRÌNH NGHIÊN CỨU .....	21
2.4 ĐỊNH TÍNH, KHẢO SÁT SỰ HIỆN DIỆN CỦA ACID GLUCURONIC TRONG SẢN PHẨM LÊN MEN.....	22

2.5 PHƯƠNG PHÁP CHIẾT XUẤT TÁCH LẤY DỊCH CHỨA ACID GLUCURONIC TỪ SẢN PHẨM LÊN MEN .....	23
2.6 PHƯƠNG PHÁP KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA.....	23
2.6.1 Nguyên tắc .....	24
2.6.2 Thử nghiệm hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của acid glucuronic .....	24
2.6.3 Thử nghiệm trung hòa gốc tự do ABTS .....	26
2.6.4 Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư in vitro của acid glucuronic thu nhận từ sản phẩm lên men.....	28
2.7 PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH THỐNG KÊ.....	29
2.8 ĐỊNH LƯỢNG ACID GLUCURONIC BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC).....	29
2.8.1 Khái quát về phương pháp HPLC .....	24
2.8.1.1 Nguyên lý của phương pháp .....	29
2.8.1.2 Pha động (Mobile Phase) .....	30
2.8.1.3 Bơm (Pump) .....	30
2.8.1.4 Bộ phận tiêm mẫu (Syringe Injector).....	31
2.8.1.5 Cột sắc ký.....	31
2.8.1.6 Đầu dò (Detector) .....	31
2.8.2 Các thông số cơ bản của HPLC .....	32
2.8.2.1 Thời gian lưu $t_R$ (Retention time) .....	32
2.8.2.2 Hệ số dung lượng $k'$ (Capacity factor) .....	32
2.8.2.3 Hiệu năng của cột (Column efficiency) .....	33
2.8.2.4 Độ chọn lọc (Selectivity).....	34
2.8.2.5 Độ phân giải $RS$ .....	35
2.8.3 Xây dựng quy trình định lượng acid glucuronic.....	35
2.8.3.1 Chuẩn bị mẫu chuẩn và mẫu nghiên cứu.....	35
2.8.3.2 Khảo sát điều kiện tối ưu trên mẫu chuẩn .....	36
2.8.4 Thẩm định quy trình phân tích.....	37
2.8.4.1 Tính tương thích của hệ thống .....	37
2.8.4.2 Tính đặc hiệu.....	38
2.8.4.3 Độ đúng.....	37
2.8.4.4 Tính tuyến tính .....	38
2.8.4.5 Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng.....	39
<b>PHẦN 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN</b>	
3.1 KHẢO SÁT SỰ HIỆN DIỆN CỦA ACID GLUCURONIC TRONG DỊCH CHIẾT TRÀ LÊN MEN.....	41
2.1.1 Thời gian nghiên cứu .....	18
2.1.2 Địa điểm nghiên cứu.....	18

3.2 KẾT QUẢ THỬ HOẠT TÍNH ACID GLUCURONIC.....	42
3.2.1 Thử nghiệm hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm lên men acid glucuronic .....	42
3.2.2 Thử nghiệm trung hòa gốc tự do ABTS .....	43
3.2.3 Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư in vitro của acid glucuronic thu nhận từ sản phẩm lên men.....	44
3.3 KẾT QUẢ XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ACID GLUCURONIC .....	45
3.3.1. Thảm định quy trình định lượng acid glucuronic .....	45
3.3.1.1 Tính tương thích của hệ thống .....	45
3.3.1.2 Độ đặc hiệu .....	45
3.3.1.3 Tính tuyến tính .....	46
3.3.1.4 Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng .....	47
3.3.1.5 Độ lặp lại .....	48
3.3.1.6 Độ đúng.....	48
<b>PHẦN 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ</b>	
4.1 KẾT LUẬN .....	50
4.2 KIẾN NGHỊ .....	51
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO.....</b>	<b>52</b>
Tiếng Việt.....	52
Tiếng Anh.....	52

## MỤC LỤC BẢNG

<b>Bảng 3.1</b> Kết quả khảo sát sự hiện diện của acid glucuronic trong dịch chiết mẫu trà lên men.....	32
<b>Bảng 3.2</b> Kết quả $IC_{50}$ của mẫu dịch lên men chứa acid glucuronic.....	43
<b>Bảng 3.3</b> Phương trình hồi quy tuyến tính hiệu suất trung hòa gốc tự do và $IC_{50}$ . ..	43
<b>Bảng 3.4</b> Kết quả gây độc trên 4 dòng tế bào ung thư của acid glucuronic.....	44
<b>Bảng 3.5</b> Thời gian lưu và diện tích peak của tính tương thích hệ thống .....	45
<b>Bảng 3.6</b> Nồng độ và diện tích peak của dung dịch acid glucuronic chuẩn .....	46
<b>Bảng 3.7</b> Kết quả xác định nồng độ giới hạn LOD .....	47
<b>Bảng 3.8</b> Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp định lượng .....	48
<b>Bảng 3.9</b> Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp định lượng .....	48
<b>Bảng 3.10</b> Bảng kết quả xác định hàm lượng glucuronic acid trong các mẫu trà lên men đã tinh chế .....	49

## MỤC LỤC HÌNH

<b>Hình 1.1</b>	Vi khuẩn <i>Gluconacetobacter xylinus</i> .....	04
<b>Hình 1.2</b>	Sự oxy hóa glucose tạo thành acid glucuronic.....	12
<b>Hình 1.3</b>	Sự tổng hợp acid glucuronic ở sinh vật.....	13
<b>Hình 1.4</b>	Sự chuyển hóa bilirubin .....	15
<b>Hình 2.1</b>	Hệ thống thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) .....	20
<b>Hình 2.2</b>	Sơ đồ nghiên cứu thu nhận chế phẩm kháng u từ vi khuẩn sinh GluA ....	21
<b>Hình 2.3</b>	Phản ứng định tính acid glucuronic với thuốc thử carbazole.....	22
<b>Hình 2.4</b>	Cơ chế phản ứng của chất chống oxy hóa và ABTS <sup>•+</sup> .....	27
<b>Hình 2.5</b>	Sơ đồ thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC .....	32
<b>Hình 2.6</b>	Sự biến thiên độ hấp thu mẫu acid glucuronic chuẩn theo bước sóng.....	36
<b>Hình 2.7</b>	Sắc ký đồ của acid glucuronic ở bước sóng 210 nm.....	37
<b>Hình 3.1</b>	Phản ứng màu Carbazole âm tính (MT01) và dương tính (MT02, MT03, MT04) .....	41
<b>Hình 3.2</b>	Sắc ký đồ của mẫu trắng (A), mẫu chuẩn (B), mẫu thử (C), mẫu thử thêm chuẩn (D) .....	46
<b>Hình 3.3</b>	Sự phụ thuộc giữa diện tích đỉnh trung bình mỗi mẫu dung dịch chuẩn và nồng độ của glucuronic acid.....	47

## DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

KHV - Kính hiển vi

XVĐM - Xơ vữa động mạch

PAI-1- Chất ức chế chất kích hoạt plasminogen-1

DIC - Hội chứng đông máu rải rác trong lòng mạch

TTP - Xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối

NOAs - thuốc chống đông máu đường uống mới

IC<sub>50</sub> - nồng độ mà tại đó bắt 50% gốc tự do DPPH

LOD - Giới hạn phát hiện

LOQ - Giới hạn định lượng

SD – Độ lệch chuẩn

RSD – Độ lệch chuẩn tương đối



## DANH MỤC TỪ TIẾNG ANH

MTT - (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid)

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]

WHO - World Health Organization

DNA - Deoxyribonucleic acid

CFU - Colony-forming unit

NA - Nutrient Agar

mRNA - Messenger RNA

MR - Methyl Red

VP - Voges-Proskauer

GluA - Glucuronic acid

DIC - Disseminated Intravascular Coagulation

TTP - Thrombotic Thrombocytopenic Purpura

NOAs - New oral anticoagulants

SOD - Superoxide dismutase

NCBI - National Center for Biotechnology Information

DFP - Di-isopropyl phosphorofluoridate

PMSF - Phenylmethanesulphosphate

PA - Plasminogen activator

PAI-1 - Plasminogen activator inhibitor-1

t-PA - Tissue plasminogen activator

ACE - Angiotensin-converting enzyme

ACEI - Angiotensin-converting enzyme inhibitors

HA - Hyaluronan

LDL-C - Low-density lipoprotein cholesterol

RAA - Renin-angiotensin-aldosterone

RSM - Response surface methodology

CCD - Central composite design

LGIP - Luria-Bertani-Glycerol-IPTG-Petroleum ether

YPGD - Yeast extract-Peptone-Glucose-Dextrose

## TÓM TẮT

Nghiên cứu này tập trung vào việc chiết xuất acid glucuronic từ vi khuẩn *Gluconacetobacter nataicola* TD6 thông qua quá trình men sinh. Kết quả cho thấy thành công trong việc chiết xuất acid glucuronic với hiệu suất thu hồi đạt 9,2%. Sự có mặt của acid glucuronic đã được xác định bằng phương pháp phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Acid glucuronic được đánh giá về hoạt tính sinh học để đánh giá khả năng kháng u. Các hoạt động bao gồm thử nghiệm kháng gốc tự do DPPH, thử nghiệm trung hòa gốc tự do ABTS và đánh giá khả năng gây độc tế bào ung thư. Kết quả cho thấy chiết xuất acid glucuronic có hoạt tính kháng oxy hóa cao hơn so với chiết xuất thực vật từ một số nghiên cứu trước đây. Đặc biệt, kết quả về khả năng gây độc tế bào ung thư của acid glucuronic rất ấn tượng. Hơn 90% tế bào ung thư của các dòng tế bào gan (HepG2), ruột (CaCo2), phổi (A549) và máu (K562) đã bị gây độc. Đây là một kết quả đáng kỳ vọng và mở ra triển vọng lớn trong nghiên cứu về kháng ung thư từ acid glucuronic.

Kết quả nghiên cứu cho thấy acid glucuronic từ vi khuẩn *Gluconacetobacter nataicola* TD6 có khả năng kháng u mạnh mẽ, đặc biệt là trong việc gây độc tế bào ung thư. Những điều này cung cấp cơ sở cho nghiên cứu tiếp theo về ứng dụng của acid glucuronic như một chất kháng ung thư tiềm năng.

## ABSTRACT

This study focuses on the extraction of glucuronic acid from *Gluconacetobacter nataicola* TD6 bacteria through a fermentation process. The results demonstrate successful extraction of glucuronic acid with a recovery efficiency of 9.2%. The presence of glucuronic acid was determined using high-performance liquid chromatography (HPLC).

Glucuronic acid was evaluated for its biological activities to assess its anticancer potential. The activities included free radical scavenging assay using DPPH, free radical neutralization assay using ABTS, and assessment of its cytotoxicity against cancer cells. The results reveal that the extracted glucuronic acid exhibits higher antioxidant activity compared to plant extracts in previous studies. Particularly, the anticancer activity of glucuronic acid is remarkably impressive, as it caused toxicity in over 90% of cancer cells, including HepG2 (liver), CaCo<sub>2</sub> (colon), A549 (lung), and K562 (blood). These findings hold significant promise and open up great prospects for cancer research involving glucuronic acid.

The research findings demonstrate the potent anticancer properties of glucuronic acid derived from *Gluconacetobacter nataicola* TD6 bacteria, particularly in inducing cytotoxicity in cancer cells. These results provide a foundation for further research on the potential applications of glucuronic acid as an anticancer agent.