

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

-----*****-----

NGUYỄN VŨ ANH

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA α -
MANGOSTIN TỪ VỎ QUẢ MĂNG CỤT
Garcinia mangostana L. LÊN VI KHUẨN
Streptococcus mutans TRÊN BIOFILM VÀ ĐỊNH
HƯỚNG ỨNG DỤNG

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS. NGUYỄN THỊ MAI PHƯƠNG

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – ĐHTN <http://www.ltc.tnu.edu.vn>

HÀ NỘI - 2015

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình thực hiện luận văn khoa học, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ, khích lệ và động viên của các Thầy, Cô giáo, các bạn đồng nghiệp, bạn bè và những người thân trong gia đình. Qua đây, tôi xin được gửi lời cảm ơn sâu sắc của mình đến những cá nhân và tập thể đã hết lòng giúp đỡ để tôi có thể hoàn thành bản luận văn này.

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS . Nguyễn Thị Mai Phương, phòng Sinh hóa Thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình hướng dẫn trong suốt quá trình học tập và thực hiện nghiên cứu.

Tôi xin chân thành cảm ơn các cán bộ nghiên cứu của phòng Sinh hóa thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, ban lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học đã nhiệt tình giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành bản luận văn này.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn gia đình thân yêu, bạn bè, người thân và đồng nghiệp - những người đã luôn luôn ở bên tôi, luôn động viên, khích lệ và là chỗ dựa vững chắc cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Hà Nội, 18 tháng 12 năm 2015

Học viên

Nguyễn Vũ Anh

CÁC THUẬT NGỮ VIẾT TẮT

EPS	exopolysaccharide
GTF	glucosyltransferase
HPLC	high performance liquid chromatography
NMR	nuclear magnetic resonance
NSM	nước súc miệng
PTS	sugar-phosphotransferase system
TLC	thin layer chromatography
TSA	tryptic soy agar

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Bệnh sâu răng và vi khuẩn <i>Streptococcus mutans</i>	4
1.1.1. Bệnh học sâu răng.....	4
1.1.1.1 Nguyên nhân gây sâu răng.....	4
1.1.1.2. Mảng bám răng (<i>dental plaque</i>).....	5
1.1.1.3. Cơ chế gây sâu răng	6
1.1.1.4. Vi khuẩn <i>Streptococcus mutans</i>	7
1.1.2. Tình hình bệnh sâu răng trên thế giới và Việt Nam.....	9
1.1.3. Các biện pháp ngăn ngừa sâu răng	10
1.1.3.1. Sử dụng chất kháng khuẩn	10
1.1.3.2. Sử dụng chất thay thế đường.....	12
1.1.3.3. Liệu pháp thay thế (<i>replacement therapy</i>)	12
1.1.3.4. Vacxin.....	13
1.1.3.5. Kiểm soát sự hình thành <i>biofilm</i>	13
1.2. Một số cơ chế thích nghi acid của vi khuẩn xoang miệng	15
1.2.1. Bơm proton F-ATPase	16
1.2.2. Sự thay đổi của màng tế bào vi khuẩn khi thích nghi acid.....	17
1.2.3. Sự sinh các chất kiềm	18
1.2.3.1. <i>Urease</i>	18
1.2.3.2. Hệ thống <i>arginin deiminase (ADS)</i>	19
1.3. Giới thiệu về cây măng cụt	20
1.3.1. Đặc điểm sinh học	20
1.3.2. Các chất xathone trong măng cụt	20

1.3.3. Sinh tổng hợp các chất xanthone.....	21
1.3.4. Tác dụng sinh học của các chất xanthone trong cây măng cụt.....	23
1.3.4.1. Hoạt tính kháng khuẩn.....	23
1.3.4.2. Hoạt tính kháng nấm.....	23
1.3.4.3. Tác dụng chống oxi hóa.....	23
1.3.4.4. Tác dụng chống viêm (anti-inflammation)	24
1.3.4.5. Hoạt tính chống ung thư	24
Chương 2 : NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	25
2.1. Chủng vi sinh vật và các điều kiện nuôi cấy.....	26
2.2. Nguyên liệu thực vật	26
2.3. Hóa chất và thiết bị.....	26
2.4. Phương pháp nghiên cứu	27
2.4.1. Các phương pháp nghiên cứu tế bào	27
2.4.1.1. Chuẩn bị dịch tế bào	27
2.4.1.2. Đo mức độ sinh acid của tế bào (pH drop)	27
2.4.2. Các phương pháp xác định hoạt độ enzyme	28
2.4.2.1. Chuẩn bị tế bào thấm.....	28
2.4.2.2. Xác định hoạt độ enzyme phosphoryl hóa đường (PTS)	28
2.4.2.3. Xác định hoạt độ enzyme F – ATPase	29
2.4.2.4. Xác định hoạt độ enzyme glucosyltransferase (GTF)	29
2.4.3. Các phương pháp nghiên cứu về biofilm.....	30
2.4.3.1. Tạo biofilm	30
2.4.3.2. Xác định thành phần biofilm	31
2.4.3.3. Quan sát cấu trúc biofilm dưới kính hiển vi huỳnh quang quét lase	31
2.5. Đánh giá sự tích lũy của α-mangostin trên biofilm	32
2.6. Tinh sạch hoạt chất khoáng khuẩn <i>S. mutans</i> từ vỏ quả măng cụt... 32	
2.6.1. Tách các hợp chất polyphenol bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC)	32

2.6.2. Phân tích cấu trúc hóa học bằng cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) ...	33
2.7. Xử lý số liệu.....	33
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	34
3.1. Nghiên cứu quy trình chiết xuất α-mangostin từ vỏ quả măng cụt ..	34
3.1.1. Tách chiết phân đoạn có chứa α -mangostin từ vỏ quả măng cụt	34
3.1.2. Tinh sạch α -mangostin từ vỏ quả măng cụt	36
3.1.2.1. Lựa chọn hệ dung môi thích hợp để chạy cột sắc ký silica gel	36
3.1.2.2. Tinh sạch α -mangostin trên cột sắc ký silica gel sử dụng hệ dung môi n-hexane: acetone (3:1)	37
3.2. Đánh giá tác dụng kháng khuẩn của α-mangostin lên <i>S. mutans</i> trên biofilm	44
3.2.1. α -mangostin ức chế sự sinh acid của vi khuẩn <i>S. mutans</i> trên biofilm.....	44
3.2.1.1. <i>Ức chế sự giảm pH của môi trường</i>	<i>44</i>
3.2.1.2. <i>α-mangostin ức chế hoạt tính enzyme liên quan đến quá trình sinh và chống chịu acid F-ATPase và PTS</i>	<i>45</i>
3.2.2. Đánh giá tác dụng ức chế sự hình thành biofilm của vi khuẩn <i>S. mutans</i>	48
3.2.2.1. <i>α-mangostin ức chế sự sinh tổng hợp EPS ngoại bào</i>	<i>48</i>
3.2.2.2. <i>α-mangostin làm thay đổi cấu trúc biofilm của <i>S. mutans</i>.....</i>	<i>49</i>
3.2.2.3. <i>α-mangostin ức chế hoạt tính các enzyme GTF liên quan đến sự hình thành biofilm của vi khuẩn <i>S. mutans</i></i>	<i>51</i>
3.3. Khả năng giết vi khuẩn trên biofilm của α-mangostin	52
3.4. Khả năng tích lũy của α-mangostin trên biofilm	53
3.4.1. Bước đầu đánh giá tác dụng chống sâu răng của dung dịch nước súc miệng có chứa α -mangostin.....	54
3.4.1.1. <i>Khả năng ức chế sự sinh acid</i>	<i>54</i>
3.4.1.2. <i>Khả năng ức chế sự hình thành biofilm (màng bám răng).....</i>	<i>55</i>
Chương 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	57
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	58

DANH MỤC CÁC BẢNG SỬ DỤNG TRONG LUẬN VĂN

Trang

Bảng 1. Công thức hóa học một số xanthone có trong vỏ quả măng cụt	21
Bảng 2. Độ sạch của chế phẩm α -mangostin so với chất chuẩn	40
Bảng 3. Độ sống sót của <i>S. mutans</i> trên biofilm được xử lý với α -mangostin	53
Bảng 4. Khả năng tích lũy của α -mangostin trên biofilm của vi khuẩn <i>S. mutans</i>	53
Bảng 5. Khả năng ức chế sự sinh acid của <i>S. mutans</i> trên biofilm của các dung dịch nước súc miệng	55
Bảng 6. Ảnh hưởng của NSM chứa α -mangostin lên sự tích lũy sinh khối biofilm của vi khuẩn <i>S. mutans</i>	56

DANH MỤC CÁC HÌNH SỬ DỤNG TRONG LUẬN VĂN

	Trang
Hình 1.1. Cấu trúc của răng	4
Hình 1.2. Ba giai đoạn chính hình thành mảng bám răng	6
Hình 1.3. Vi khuẩn <i>Streptococcus mutans</i>	8
Hình 1.4. Quả măng cụt (<i>Garcinia mangostana</i> L.)	20
Hình 1.5. Quá trình hình thành xanthone trong thực vật	22
Hình 2.1. Mô hình tạo biofilm <i>S. mutans</i> trên bề mặt đĩa hydroxyapatite	31
Hình 3.1. Sắc ký đồ phân đoạn chiết vỏ quả măng cụt trong ethanol và n-hexane sử dụng phương pháp sắc ký lớp mỏng	36
Hình 3.2. Sắc ký đồ phân đoạn n-hexane sử dụng phương pháp sắc ký lớp mỏng	37
Hình 3.3. Sắc ký cột silica gel phân đoạn chiết n-hexane của vỏ quả măng cụt với hệ dung môi rửa chiết n-hexane: acetone theo tỉ lệ (3:1)	38
Hình 3.4.A. Sắc ký đồ α -mangostin tinh sạch từ vỏ quả măng cụt với hệ dung môi Hexane: acetone (3:1 v/v)	38
Hình 3.4.B. Sắc ký đồ α -mangostin tinh sạch từ vỏ quả măng cụt với hệ dung môi TEAF (5:3:1:1 v/v)	38
Hình 3.5. Phổ HPLC của chất tinh sạch (A) so với chất chuẩn (B) sau khi qua cột sắc ký silica gel đo trên máy LC-MSD-Trap-SL	39
Hình 3.6. Phổ Proton (A) và ^{13}C (B) của chất α -mangostin đo trên máy NMR Bruker, Avance 500	42
Hình 3.7. Cấu trúc hóa học của α -mangostin ($\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_6$)	43
Hình 3.8. Sơ đồ qui trình tinh sạch α -mangostin từ vỏ quả măng cụt	43