

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Hoàng Thị Trang Nguyên

**NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP, ĐẶC TÍNH CẤU TRÚC VÀ
HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA HẠT VI NANG
CARRAGEENAN-LECTIN TỪ RONG ĐỎ**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Hà Nội - 2025

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Hoàng Thị Trang Nguyên

NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP, ĐẶC TÍNH CẤU TRÚC VÀ
HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA HẠT VI NANG
CARRAGEENAN-LECTIN TỪ RONG ĐỎ

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành: Vật Liệu Cao Phân Tử Và Tổ Hợp

Mã số: 9440125

Xác nhận của Học viện
Khoa học và công nghệ

Người hướng dẫn 1

Người hướng dẫn 2

TS. Lê Đình Hùng

PGS.TS. Thành Thị Thu Thủy

Hà Nội – 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: "*Nghiên cứu tổng hợp, đặc tính cấu trúc và hoạt tính sinh học của hạt vi nang carrageenan-lectin từ rong đỏ*" là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày tháng năm

Tác giả luận án

Hoàng Thị Trang Nguyễn

LỜI CẢM ƠN

Trước tiên, tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến Thầy TS. Lê Đình Hùng - Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công Nghệ Nha Trang (nay là Viện Hải dương học) và Cô PGS. TS. Thành Thị Thu Thủy - Viện Hóa học đã hướng dẫn, chỉ bảo và giúp đỡ tận tình trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công Nghệ Nha Trang (nay là Viện Hải dương học), Viện Hóa học, và Viện Khoa học Vật liệu đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban giám hiệu trường Đại học Nha Trang, lãnh đạo Khoa Công nghệ Thực phẩm, các đồng nghiệp trong Bộ môn Kỹ thuật Hóa học nơi tôi công tác đã tạo điều kiện và hỗ trợ về sắp xếp công việc chuyên môn để tôi đảm bảo tiến độ thực hiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn các anh chị Phòng Công nghệ sinh học biển - Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang (nay là Viện Hải dương học), và Trung tâm phổ Cộng hưởng từ hạt nhân - Viện Hóa học đã hỗ trợ tôi trong quá trình phân tích các kết quả thực nghiệm.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn gia đình thân yêu đã luôn bên cạnh, quan tâm, giúp đỡ, động viên và khích lệ để tôi hoàn thành luận án.

Hà Nội, ngày tháng năm

Tác giả luận án

Hoàng Thị Trang Nguyên

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC HÌNH VÀ ĐỒ THỊ.....	vi
DANH MỤC BẢNG.....	ix
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT	xi
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN.....	5
1.1. Tổng quan về rong đỏ	5
1.1.1. Rong đỏ	5
1.1.2. Loài <i>Kappaphycus striatus</i> và <i>Betaphycus gelatinus</i>	6
1.2. Carrageenan từ rong đỏ	8
1.2.1. Cấu trúc của carrageenan	8
1.2.2. Tính chất hóa lý, hoạt tính sinh học và khả năng ứng dụng của carrageenan	10
1.3. Lectin từ rong đỏ	16
1.3.1. Cấu trúc của lectin từ rong đỏ	16
1.3.2. Hoạt tính sinh học và khả năng ứng dụng của lectin từ rong đỏ.....	19
1.4. Hạt vi nang carrageenan từ rong đỏ	26
1.4.1. Hoạt tính sinh học và khả năng ứng dụng của hạt vi nang carrageenan	26
1.4.2. Phương pháp chế tạo hạt vi nang carrageenan.....	28
1.5. Tình hình nghiên cứu trên thế giới và ở Việt Nam liên quan đến nội dung nghiên cứu luận án	30
1.5.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới.....	30
1.5.2. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam	33
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	35
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	35
2.2. Chiết tách, tinh chế lectin và carrageenan từ rong đỏ.....	37
2.2.1. Chiết tách, tinh chế và xác định hàm lượng protein của lectin.....	37
2.2.2. Chiết tách và tinh chế carrageenan	39

2.3. Chế tạo hạt vi nang carrageenan-lectin và đánh giá sự giải phóng lectin từ hạt vi nang carrageenan-lectin	39
2.3.1. Tổng hợp dẫn xuất carboxymethyl-carrageenan.....	41
2.3.2. Chế tạo hạt vi nang carrageenan-lectin	43
2.3.3. Xác định sự giải phóng lectin từ hạt vi nang carrageenan-lectin.....	45
2.4. Xác định thành phần hóa học và đặc trưng cấu trúc của carrageenan, carboxymethyl-carrageenan và hạt vi nang carrageenan – lectin	45
2.4.1. Xác định thành phần hóa học của carrageenan, carboxymethyl-carrageenan	45
2.4.2. Xác định đặc trưng cấu trúc của carrageenan, carboxymethyl-carrageenan và hạt vi nang carrageenan-lectin	47
2.5. Đánh giá hoạt tính sinh học và độ trương của carrageenan, carboxymethyl-carrageenan và hạt vi nang carrageenan-lectin	48
2.5.1. Xác định hoạt tính chống oxy hóa của carrageenan và dẫn xuất carboxymethyl-carrageenan	48
2.5.2. Xác định hoạt tính ngưng kết hồng cầu của lectin, carrageenan và hạt vi nang carrageenan-lectin	49
2.5.3. Xác định độ trương của hạt carrageenan và các dẫn xuất carboxymethyl-kappa-carrageenan.....	52
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	53
3.1. Kết quả xác định thành phần hóa học, đặc trưng cấu trúc và đặc tính của lectin và carrageenan từ rong đỏ <i>Kappaphycus striatus</i>	53
3.1.1. Thành phần, đặc tính và cấu trúc của lectin từ rong đỏ <i>Kappaphycus striatus</i>	53
3.1.2. Thành phần, tính chất và đặc trưng cấu trúc của carrageenan từ rong đỏ <i>Kappaphycus striatus</i>	61
3.2. Kết quả xác định thành phần, tính chất và đặc trưng cấu trúc của lectin và carrageenan từ rong đỏ <i>Betaphycus gelatinus</i>	69
3.2.1 Thành phần và đặc tính của lectin từ rong đỏ <i>Betaphycus gelatinus</i>	69
3.2.2. Thành phần và tính chất và đặc trưng cấu trúc của carrageenan từ rong đỏ <i>Betaphycus gelatinus</i>	72
3.3. Kết quả xác định đặc tính và đặc trưng cấu trúc của carboxymethyl-kappa-carrageenan và hạt vi nang carrageenan-lectin	81
3.3.1. Thành phần và tính chất của carboxymethyl-kappa-carrageenan.....	81

3.3.2. Đặc trưng cấu trúc của carboxymethyl-kappa-carrageenan từ rong <i>Kappaphycus striatus</i>	82
3.3.3. Xác định độ trương của hạt carrageenan và các dẫn xuất carboxymethyl- kappa-carrageenan.....	91
3.3.4. Đặc trưng cấu trúc của hạt vi nang carrageenan-lectin.....	93
3.4. Kết quả đánh giá hoạt tính sinh học của carrageenan, carboxymethyl-kappa- carrageenan và hạt vi nang carrageenan-lectin	97
3.4.1. Hoạt tính chống oxy hóa	97
3.4.2. Hoạt tính ngưng kết hồng cầu	99
3.5. Đánh giá sự giải phóng lectin từ hạt vi nang carrageenan-lectin.....	104
KẾT LUẬN	106
KIẾN NGHỊ	107
CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN.....	108
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	109
PHỤ LỤC.....	

DANH MỤC HÌNH VÀ ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Cấu trúc hóa học disaccharide của một số loại carrageenan.	9
Hình 1.2. Mô tả cấu trúc 1C_4 và 4C_1 của β -D-galactopyranose..	11
Hình 1.3. Cấu trúc bậc 1 của các lectin từ rong đỏ <i>Kappaphycus striatus</i> : a) Lectin KSA-2; b) Lectin KSL.	17
Hình 1.4. Mô hình phân tử của lectin KAA-2.	19
Hình 2.1. a) Vùng nuôi trồng và b) Thu hoạch rong <i>K. striatus</i> tại vịnh Vân Phong, Khánh Hòa.	35
Hình 2.2. Rong <i>K. striatus</i> : a) rong tươi, b) rong khô, c) tiêu bản (Ký hiệu tiêu bản: Nitra A24.9.02)	36
Hình 2.3. Rong <i>B. gelatinus</i> : a) rong tươi, b) rong khô, c) tiêu bản (Ký hiệu tiêu bản: Nitra A6.2.02)	36
Hình 2.4. Sơ đồ quá trình chiết lectin từ rong đỏ.	38
Hình 2.5. Sơ đồ quy trình chiết tự nhiên carrageenan từ bã rong.	39
Hình 2.6. Sơ đồ quy trình chiết carrageenan từ bã rong xử lý với dung dịch kiềm.	40
Hình 2.7. Tổng hợp carboxymethyl κ -carrageenan, DA là 3,6-anhydro- α -D-galactopyranose;.....	41
Hình 2.8. Sơ đồ quy trình tổng hợp carboxymethyl-carrageenan.	42
Hình 2.9. Mô tả phương pháp gel hóa ion.	43
Hình 3.1. Hoạt tính NKHC của lectin từ <i>K. striatus</i> thay đổi theo nhiệt độ.	55
Hình 3.2. Hoạt tính NKHC của lectin từ <i>K. striatus</i> ở các giá trị pH.	56
Hình 3.3. Lectin từ rong đỏ <i>K. striatus</i> và <i>B. gelatinus</i> liên kết với các gốc đường mannose của yeast mannan và porcine thyroglobulin (trong khung vuông).	59
Hình 3.4. Cấu trúc bậc 1 của các lectin từ rong đỏ KSL.....	60
Hình 3.5. Hình ảnh carrageenan chiết tách từ rong <i>K. striatus</i> theo phương pháp tự nhiên và phương pháp chiết xử lý kiềm.	62
Hình 3.6. Phổ FT-IR của carrageenan từ rong <i>K. striatus</i> : a) carrageenan chiết tự nhiên, b) carrageenan chiết xử lý kiềm (KOH).	64
Hình 3.7. Phổ 1H NMR của carrageenan từ rong <i>K. striatus</i>	65

Hình 3.8. Phổ ^{13}C NMR của carrageenan từ rong <i>K. striatus</i>	67
Hình 3.9. Phổ FT-IR của carrageenan từ rong <i>B. gelatinus</i> : a) carrageenan chiết tự nhiên, b) carrageenan chiết xử lý với dung dịch kiềm (KOH).	74
Hình 3.10. Phổ ^1H NMR của carrageenan từ rong đỏ <i>Betaphycus gelatinus</i> : a) carrageenan chiết tự nhiên, b) carrageenan biến đổi kiềm (KOH).	76
Hình 3.11. Phổ ^{13}C NMR của carrageenan từ rong đỏ <i>Betaphycus gelatinus</i> : a) carrageenan chiết tự nhiên, b) carrageenan chiết xử lý kiềm (KOH).	79
Hình 3.12. Phổ FT-IR của các mẫu carboxymethyl-kappa-carrageenan	83
Hình 3.13. Phổ ^1H NMR của kappa-carrageenan (KC), KC-0/1 và carboxymethyl-kappa-carrageenan (CMKC-1/1 đến CMKC-5/1).	85
Hình 3.14. Độ thay thế (DS) của các mẫu carboxymethyl-kappa-carrageenan (CMKC-1/1 đến CMKC-5/1).	87
Hình 3.15. Phổ ^{13}C NMR của kappa-carrageenan (KC), KC-0/1 và carboxymethyl-kappa-carrageenan (CMKC-1/1 đến CMKC-5/1).	89
Hình 3.16. Trích đoạn phổ ^{13}C NMR của CMKC-3/1.	90
Hình 3.17. Tổng hợp carboxymethyl-kappa-carrageenan.	91
Hình 3.18. Độ trương của các hạt KC-0/1 và carboxymethyl-kappa-carrageenan (CMKC-1/1 đến CMKC-5/1) ở môi trường: (a) pH = 1,2, (b) pH = 7,4.	92
Hình 3.19. Hạt vi nang CMKC-3/1-L dạng: a) hạt ướt, b) hạt sấy khô, c) mô phỏng hạt vi nang carrageenan-lectin. Nồng độ CMKC-3/1 là 3,0%.	95
Hình 3.20. Ảnh SEM của (a) hạt KC-L, (b) bề mặt hạt KC-L, (c) hạt CMKC-3/1 không có lectin, (d) bề mặt hạt CMKC-3/1 không có lectin.	96
Hình 3.21. Hoạt tính chống oxy hóa của KC-0/1 và carboxymethyl-kappa-carrageenans (CMKC-1/1 đến CMKC-5/1) ở nồng độ (500 $\mu\text{g/mL}$).	98
Hình 3.22. Sự ngưng kết sự ngưng kết hồng cầu nhóm máu A của các mẫu KC-0/1 và các mẫu CMKC	99
Hình 3.23. Nồng độ ngưng kết hồng cầu thấp nhất (LHC) (mg/mL) của KC-0/1 và carboxymethyl-kappa-carrageenan	101
Hình 3.24. Nồng độ ngưng kết hồng cầu thấp nhất (LHC) (mg/mL) của KC-0/1 và carboxymethyl-kappa-carrageenan (CMKC-1/1 đến CMKC-5/1)	102

- Hình 3.25.** Nồng độ thấp nhất gây NKHC trên hồng cầu thỏ của CMKC-3/1 và lectin trong hỗn hợp CMKC-3/1-lectin.....103
- Hình 3.26.** Lectin được giải phóng (%) từ hạt vi nang KC-L, các hạt CMKC-3/1 (2,0 – 3,5%)- L qua thời gian tại các môi trường (a) pH = 1,2, (b) pH = 7,4.105

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Thành phần hóa học của rong biển.	5
Bảng 1.2. Hệ thống phân loại rong <i>Kappaphycus striatus</i> và <i>Betaphycus gelatinus</i>	7
Bảng 1.3. Cấu trúc của các lectin từ rong đỏ.	18
Bảng 1.4. Hoạt tính ngưng kết của một số lectin từ rong đỏ ở Việt Nam.	20
Bảng 1.5. Tính chất của lectin từ một số loài rong đỏ.	22
Bảng 1.6. Tiềm năng y sinh của các lectin từ một số loài rong đỏ.	30
Bảng 1.7. Các hệ chất mang có thành phần kappa-carrageenan và lĩnh vực ứng dụng đã được công bố.	31
Bảng 3.1. Phân tích hoạt tính ngưng kết hồng cầu của dịch lectin chiết thô từ rong đỏ <i>K. striatus</i> với các dạng hồng cầu khác nhau.	53
Bảng 3.2. Hàm lượng protein và hoạt tính NKHC của lectin chiết từ rong đỏ <i>K. striatus</i>	54 54
Bảng 3.3. Kết quả thí nghiệm ảnh hưởng của cation hóa trị hai đến hoạt tính ngưng kết hồng cầu của lectin từ rong <i>K. striatus</i>	55
Bảng 3.4. Nồng độ đường monosaccaride và glycoprotein nhỏ nhất có khả năng ức chế hoạt tính ngưng kết hồng cầu của các lectin từ rong đỏ <i>K. striatus</i>	57
Bảng 3.5. Hàm lượng và thành phần của carrageenan được chiết từ rong <i>K. striatus</i> theo phương pháp chiết carrageenan từ bã rong xử lý với dung dịch kiềm.	61
Bảng 3.6. Độ chuyển dịch hóa học trong phổ ^1H NMR (ppm) của carrageenan chiết xuất từ rong đỏ <i>K. striatus</i> và kappa-carrageenan trong tài liệu tham khảo.	66
Bảng 3.7. Độ chuyển dịch hóa học trong phổ ^{13}C NMR (ppm) của carrageenan chiết xuất từ rong đỏ <i>K. striatus</i>	68
Bảng 3.8. Hàm lượng protein và hoạt tính NKHC của lectin chiết từ rong đỏ <i>B. gelatinus</i>	70 70
Bảng 3.9. Nồng độ đường monosaccaride và glycoprotein có khả năng ức chế hoạt tính ngưng kết hồng cầu của các lectin từ <i>B. gelatinus</i>	71
Bảng 3.10. Hàm lượng và thành phần của carrageenan được chiết từ <i>B. gelatinus</i> theo từng thời gian thu hoạch.	73

Bảng 3.11. Độ chuyển dịch hóa học trong phổ ^{13}C NMR (ppm) của carrageenan chiết xuất từ rong đỏ <i>B. gelatinus</i>	78
Bảng 3.12. Thành phần của các mẫu carboxymethyl-kappa-carrageenan.	81
Bảng 3.13. Độ chuyển dịch hóa học trong phổ ^1H NMR (ppm) của các mẫu carboxymethyl-kappa-carrageenan KC-0/1, CMKC-3/1.	86
Bảng 3.14. Giá trị DS của các mẫu carboxymethyl-kappa-carrageenan theo hai phương pháp xác định.	87
Bảng 3.15. Độ chuyển dịch hóa học trong phổ ^{13}C NMR (ppm) của các mẫu carboxymethyl-kappa-carrageenan KC-0/1, CMKC-3/1.	88
Bảng 3.16. Kích thước và trọng lượng của các hạt vi nang KC-L (KC 3%), CMKC-3/1-L với các nồng độ khác nhau của CMKC-3/1 ở dạng ướt và khô.	94
Bảng 3.17. Hoạt tính chống oxy hóa của KC-0/1 và carboxymethyl-kappa-carrageenans (CMKC-1/1 đến CMKC-5/1) ở nồng độ (500 $\mu\text{g/mL}$).	97
Bảng 3.18. Nồng độ ngưng kết hồng cầu thấp nhất đối (LHC) mg/mL của mẫu KC, KC-0/1 và các mẫu CMKC đối với mỗi nhóm máu.	100

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

STT	Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
1	<i>B. gelatinus</i>	<i>Betaphycus gelatinus</i>	Rong Hồng Vân
2	CMKC	Carboxymethyl-kappa-carrageenan	-
3	CTAB	Cetyltrimethylammonium Bromide	-
4	G4S	D-Galactose-4-sulfate	-
5	DA	3,6 anhydro- α -D-galactose	-
6	DS	Degree of substitution	Độ thay thế
7	<i>E. gelatinae</i>	<i>Eucheuma gelatinae</i>	-
8	<i>E. serra</i>	<i>Eucheuma serra</i>	-
9	FT-IR	Fourier-transform infrared spectroscopy	Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier
10	<i>K. alvarezii</i>	<i>Kappaphycus alvarezii</i>	Rong Sụn
11	<i>K. striatus</i>	<i>Kappaphycus striatus</i>	Rong Bắp Sú
12	KC	Kappa-carrageenan	-
13	LHC	Lowest hemagglutination concentration	Nồng độ nhỏ nhất gây ngưng kết hồng cầu
14	MCA	Acid Monochloroacetic	-
15	NKHC	-	Ngưng kết hồng cầu
16	NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectrum	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
17	PEG	Poly Ethylene Glycol	-
18	SEM	Scanning Electron Microscope	Kính hiển vi điện tử quét
19	UV-Vis	Ultraviolet - Visible	Phổ hấp thụ phân tử - tử ngoại - khả kiến
20	SGF	simulated gastric fluid	Dịch dạ dày mô phỏng
21	SIF	Simulated intestinal fluid	Dịch ruột mô phỏng

MỞ ĐẦU

Lý do chọn đề tài

Việt Nam với chiều dài bờ biển khoảng 3260 km là môi trường thuận lợi tạo điều kiện phát triển nguồn rong biển đa dạng và phong phú. Theo các nghiên cứu rong biển ở Việt Nam có 4 ngành là rong đỏ (*Rhodophyta*), rong nâu (*Phaeophyta*), rong lục (*Chlorophyta*) và rong lam (*Cyanophyta*). Trong đó rong đỏ Carageenophyte gồm các loài *Kappaphycus alvarezii*, *Kappaphycus striatus*, *Eucheuma denticulatum*, và *Eucheuma gelatinae* (*Betaphycus gelatinus*) các loài rong có giá trị kinh tế quan trọng được trồng rộng rãi hoặc thu hoạch tự nhiên ở miền trung, đây không chỉ là nguồn polysaccharide cho công nghiệp thực phẩm, mà còn là nguồn lectin giá trị để sử dụng trong y học [1-9].

Lectin là một protein hoặc glycoprotein có khả năng liên kết đặc hiệu với các cấu trúc carbohydrate khác nhau trên bề mặt tế bào hoặc trên lớp vỏ vi khuẩn và virus. Vì vậy, lectin không chỉ được dùng như thuốc thử hóa sinh trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu, mà còn có tiềm năng sử dụng trong các liệu pháp chữa bệnh ung thư và kháng virus [10-12]. Một số lectin được chiết xuất từ rong đỏ với các đặc tính riêng có hoạt tính kháng khuẩn, kháng virus, kháng tế bào ung thư như lectin chiết từ rong *Eucheuma serra* [13-15], lectin KAA-2 từ rong *Kappaphycus alvarezii* đã có hoạt tính ức chế mạnh sự lây nhiễm của các dòng virus cúm (H1N1 và H3N2) ở nồng độ nanomol [16, 17], lectin KSL từ rong đỏ *Kappaphycus striatus* có tác dụng chống ung thư trên 5 dòng tế bào ung thư HT29, Hela, MCF-7, SK-LU-1 và AGS [3, 8, 18]. Tuy nhiên, rất khó để sử dụng trực tiếp lectin qua đường miệng, do ảnh hưởng của môi trường acid trong dạ dày và enzyme trong đường ruột. Vì vậy cần tìm ra các chất mang không chỉ có các đặc tính tương thích với bản chất của lectin, mà còn thể hiện khả năng phân hủy sinh học, tính tương thích sinh học, bảo vệ chất có hoạt tính sinh học và giải phóng có kiểm soát ở vị trí đích. Trong số các polymer được dùng để làm chất mang, các polysaccharide tự nhiên từ rong biển như carrageenan, alginate và các dẫn xuất của chúng đang được tập trung nghiên cứu nhiều nhất.

Polysaccharide từ rong đỏ chủ yếu là các carrageenan. Mặc dù carrageenan có khả năng làm chất mang cho các hợp chất có hoạt tính sinh học và thuốc, nhưng một

vật liệu làm chất mang có hiệu quả đối với các chất có khối lượng phân tử lớn (polypeptide, protein, vaccine, acid nucleic và gene) cần phải đảm bảo sự giải phóng các chất trong vùng ruột, để có thể ngăn chặn sự giải phóng các chất sớm hoặc sự phân hủy chúng trong môi trường pH thấp trong dạ dày. Điều này có thể được thực hiện bằng cách gắn các nhóm nhạy với pH, như gắn nhóm carboxyl (-COOH) vào cấu trúc carrageenan thông qua quá trình carboxymethyl hóa. Carboxymethyl carrageenan có tính chất tương phụ thuộc vào độ pH rất thích hợp để phân phối các chất có hoạt tính qua đường tiêu hóa có môi trường thay đổi độ pH từ có tính acid (pH từ 1-3) trong dạ dày, sang hơi kiềm (pH từ 6-8) trong ruột [18]. Bên cạnh đó, chất mang từ dẫn xuất carboxymethyl của carrageenan còn tạo ra một diện tích tiếp xúc lớn trên bề mặt tế bào, giúp tăng hiệu quả thẩm thấu và các chất có hoạt tính sinh học qua màng ruột [19].

Ở Việt Nam, rong đỏ đã được nuôi trồng rộng rãi hoặc thu hoạch tự nhiên. Các rong này không chỉ cũng như nguồn nguyên liệu cho lectin và carrageenan, mà còn là nguồn thu nhập cho các hộ nuôi trồng ven biển. Tuy nhiên, để nâng cao khả năng sử dụng cũng như giá trị kinh tế của các rong này, việc nghiên cứu các sản phẩm mới từ rong đỏ là rất cần thiết, đặc biệt là các dẫn xuất carboxymethyl từ carrageenan của rong đỏ. Điều này đã dẫn dắt nghiên cứu sinh tiến hành thực hiện luận án: “**Nghiên cứu tổng hợp, đặc tính cấu trúc và hoạt tính sinh học của hạt vi nang carrageenan-lectin từ rong đỏ**”, với mục đích hướng đến phát triển nguồn rong đỏ cũng như nguồn vật liệu sinh học cho sử dụng trong thực phẩm và y học.

Mục tiêu nghiên cứu

Luận án “ **Nghiên cứu tổng hợp, đặc tính cấu trúc và hoạt tính sinh học của hạt vi nang carrageenan-lectin từ rong đỏ**” có mục tiêu nghiên cứu:

- Đánh giá được hoạt tính ngưng kết hồng cầu của lectin chiết tách từ 2 đối tượng rong đỏ loài *Kappaphycus striatus* và *Betaphycus gelatinus*.
- Xác định được đặc trưng cấu trúc carrageenan chiết tách từ rong đỏ *Kappaphycus striatus* và *Betaphycus gelatinus*.

- Tổng hợp được dẫn xuất carboxymethyl-carrageenan, phân tích đặc trưng cấu trúc của dẫn xuất carboxymethyl-carrageenan.

- Chế tạo được hạt vi nang carboxymethyl-carrageenan bọc lectin, phân tích đặc trưng cấu trúc của hạt, đánh giá sự giải phóng lectin từ hạt vi nang.

Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Đầu tiên chiết tách và tinh chế lectin từ rong đỏ *Kappaphycus striatus* và *Betaphycus gelatinus*, xác định hoạt tính của các lectin này.

Nội dung 2: Thu bã rong sau khi chiết lectin, tiến hành chiết carrageenan từ bã rong, nghiên cứu đặc trưng cấu trúc của carrageenan từ rong đỏ *Kappaphycus striatus* và *Betaphycus gelatinus*.

Nội dung 3: Tổng hợp và nghiên cứu đặc trưng cấu trúc dẫn xuất carboxymethyl-kappa-carrageenan từ kappa-carrageenan có nguồn gốc từ rong đỏ *Kappaphycus striatus*.

Nội dung 4: Nghiên cứu tạo hạt vi nang carboxymethyl-carrageenan bọc lectin từ rong *Kappaphycus striatus*, xác định đặc trưng cấu trúc và hoạt tính của hạt vi nang.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án

Luận án nghiên cứu thu nhận tích hợp đồng thời lectin và carrageenan từ rong đỏ *Kappaphycus striatus* và *Betaphycus gelatinus* được nuôi trồng và thu hoạch tại vùng biển Khánh Hòa. Kết quả luận án đã xác định được đặc điểm cấu trúc, thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học của các carrageenan từ hai đối tượng rong đỏ, bổ sung dữ liệu khoa học cho nguồn tài nguyên rong biển trong nước.

Đặc biệt, luận án đã tổng hợp thành công dẫn xuất carboxymethyl-kappa-carrageenan (CMKC) từ rong đỏ *Kappaphycus striatus*. Dẫn xuất này thể hiện tính trương nở phụ thuộc pH và có hoạt tính sinh học chống oxy hóa và ngưng kết hồng cầu. Bên cạnh đó, hệ hạt vi nang carrageenan-lectin và CMKC-lectin đã được tạo thành, cho thấy khả năng bao bọc, bảo vệ hoạt tính sinh học của lectin trong các môi

trường pH thay đổi. Kết quả nghiên cứu có ý nghĩa khoa học quan trọng cho hướng phát triển các hệ chất mang từ các polyssacharide từ rong biển.

Về thực tiễn, kết quả của luận án cho thấy tiềm năng ứng dụng của rong đỏ trong dược phẩm, chứa các chất có hoạt tính kháng virus, chống ung thư và làm chất mang trong các hệ phân phối thuốc. Đồng thời, nghiên cứu góp phần nâng cao giá trị sử dụng của rong đỏ nuôi trồng tại Khánh Hòa, hướng tới phát triển các sản phẩm sinh học có giá trị gia tăng cao, từ đó vừa mang lại hiệu quả kinh tế vừa hỗ trợ định hướng phát triển kinh tế biển theo hướng bền vững.

Những đóng góp mới của luận án

1. Đây là công trình nghiên cứu khoa học đầu tiên ở Việt Nam thu nhận tích hợp lectin và carrageenan từ hai đối tượng rong đỏ: *Kappaphycus striatus* được trồng tại vịnh Vân Phong tỉnh Khánh Hòa và *Betaphycus gelatinus* được thu hoạch tự nhiên tại vùng biển Ninh Thuận (nay là Khánh Hòa). Luận án đã phân tích đặc tính cấu trúc và hoạt tính sinh học của các lectin và carrageenan chiết tách từ các rong đỏ *Kappaphycus striatus* và *Betaphycus gelatinus*:

- Thành phần của carrageenan từ rong đỏ *Kappaphycus striatus* chủ yếu là kappa-carrageenan, trong khi đó thành phần hóa học của carrageenan từ rong *Betaphycus gelatinus* là carrageenan lai hóa bao gồm beta-carrageenan và kappa-carrageenan.

- Carrageenan và dẫn xuất carboxymethyl-kappa-carrageenan từ rong đỏ được xác định có hoạt tính ngưng kết hồng cầu và hoạt tính chống oxy hóa.

2. Lần đầu tiên tổng hợp dẫn xuất carboxymethyl-kappa-carrageenan từ kappa-carrageenan của rong đỏ *Kappaphycus striatus* nuôi trồng tại vịnh Vân Phong tỉnh Khánh Hòa, Việt Nam. Dẫn xuất carboxymethyl-kappa-carrageenan của kappa-carrageenan từ rong đỏ với tính chất trương nở phụ thuộc vào sự thay đổi của môi trường pH có tiềm năng ứng dụng của trong việc tạo các chất mang bọc các chất có hoạt tính sinh học trong y học.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về rong đỏ

1.1.1. Rong đỏ

Rong biển là các sinh vật sống bám trên nền san hô chết hoặc các nền cứng ở các vùng ven biển. Rong biển có sẵn trong tự nhiên, có thể phát triển trong nhiều môi trường và dễ trồng trong môi trường tự nhiên cũng như thu hoạch quanh năm. Theo các nghiên cứu ở Việt Nam năm 2013 có trên 827 loài rong biển thuộc 4 ngành là rong lam (*Cyanophyta*), rong đỏ (*Rhodophyta*), rong nâu (*Phaeophyta*) và rong lục (*Chlorophyta*). Trong đó rong đỏ nhiều nhất 412 loài, rong lục có 180 loài, rong nâu có 147 loài và rong lam có 88 loài [27]. Rong biển có lợi cho sức khỏe do chứa hàm lượng vitamin và khoáng chất cao, thành phần hóa học chính của tất cả các loài rong biển là giống nhau, nhưng tỷ lệ phần trăm hàm lượng protein khác nhau tùy theo loài (Bảng 1.1) [28]. Rong nâu có hàm lượng protein khoảng 3 - 15%, trong khi rong đỏ và rong lục chứa 10 - 47% protein [28].

Bảng 1.1. Thành phần hóa học của rong biển.

Thành phần	Nước	Carbohydrates	Protein	Khoáng	Chất béo
Hàm lượng	80 - 90%	50% hàm lượng khô	Rong nâu: 3 - 15% hàm lượng khô; Rong đỏ và xanh: 10 - 47% hàm lượng khô	7 - 38% hàm lượng khô	1 - 3% hàm lượng khô

Rong đỏ gồm các loài *Kappaphycus alvarezii*, *Kappaphycus striatus*, *Eucheuma denticulatum* và *Betaphycus gelatinus* là những loài rong quan trọng về mặt kinh tế và được trồng rộng rãi hoặc thu hoạch tự nhiên ở Việt Nam, không chỉ là nguồn lectin giá trị mà còn là nguồn carrageenan để sử dụng trong thực phẩm, mỹ phẩm và làm các chất mang trong dược phẩm.

Rong có màu đỏ là do có chứa các sắc tố carotenoid và phycobiliprotein. Phycobiliprotein thu năng lượng ánh sáng, được biến đổi thành chất diệp lục trong quá trình quang hợp. Phycocyanin và phycoerythrin che lấp chất diệp lục và carotenoid, dẫn đến màu của rong đỏ, thay đổi từ đỏ sang tím [29]. Thành phần chính của polysaccharide từ rong đỏ chủ yếu là carrageenan với các ứng dụng đa dạng như chất làm dày, tạo kết cấu, chất tạo bọt và chất ổn định được quan tâm nhiều đến ngành công nghiệp hydrocolloid (keo ưa nước). Một số loại rong đỏ ở Việt Nam là nguồn polysaccharide-carrageenan từ các chi *Kappaphycus* và *Eucheuma* [27]. Tốc độ phát triển và thành phần hóa học của rong đỏ bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ của nước cũng như cường độ ánh sáng và dinh dưỡng trong nước, các yếu tố này thay đổi tùy theo địa phương và mùa [7, 8]. Hiện nay, các rong đỏ *Kappaphycus alvarezii*, *Kappaphycus striatus* đang được nuôi trồng tạo nguồn thu nhập thêm cho các hộ nghèo ven biển tại tỉnh Khánh Hòa, các giống này được di nhập từ Philippines từ năm 2005 [30]. Sản lượng rong tùy thuộc điều kiện và phương pháp nuôi trồng, loài *K. alvarezii* có hiệu suất carrageenan từ 18 - 25% trọng lượng khô và độ bền của gel từ 1566 - 1712 g/cm². Các giá trị này tương tự như giá trị thu được từ *Kappahycus alvarezii* khi trồng ở Philippines và Indonesia [21].

Rong biển Việt nam sống trong vùng biển nhiệt đới cũng đã được khảo sát chứa hemagglutinin (lectin) [1, 4]. Các kết quả nghiên cứu đã đạt được trước đó cho thấy rằng các lectin từ rong đỏ *Kappaphycus alvarezii*, *Kappaphycus striatus* và *Eucheuma denticulatum* có đặc tính liên kết N-glycan dạng high-mannose [7, 8] và cấu trúc tương tự với các đặc tính liên kết N-glycan dạng high-mannose và cấu trúc của các lectin kháng ung thư và virus (HIV, SARS-CoV và cúm) đã được công bố [3, 13, 14, 16-18, 27, 28, 31-33] chỉ ra rằng các rong đỏ đang được nuôi trồng ở Việt Nam như *Kappa alvarezii*, *Kappa striatus* và *Eucheuma denticulatum* hứa hẹn là một nguồn lectin giá trị để sử dụng cũng như thuốc kháng ung thư trong y học.

1.1.2. Loài *Kappaphycus striatus* và *Betaphycus gelatinus*

Rong đỏ *Kappaphycus striatus* hay rong Bắp Sú được định danh là *Eucheuma striatum* (Schmitz) và xếp vào chi *Eucheuma* thuộc họ *Solieriaceae*, bộ *Gigartinales*, lớp *Eucheumatoideae*, ngành *Rhodophyta*. Một số loài trong chi *Eucheuma* có thành phần hóa học chủ yếu là kappa-carrageenan, nên năm 1989 Doty

đã tách ra một chi mới, đặt tên là *Kappaphycus* và xếp loài rong Bắp Sú vào chi này mang tên *K. striatum*. Sau đó được Liao hiệu chỉnh thành *K. striatus* vào năm 1996 [27, 35]. Rong Bắp Sú phát triển ở khu vực có sự trao đổi nước trung bình, nơi có chất đáy cát – san hô. Rong Bắp Sú có nhiều dòng khác nhau, trong đó ba dòng rong Sacol nâu, Sacol xanh và Payaka nâu có những đặc tính sinh học vượt trội và được trồng phổ biến ở đảo Coco, Philippines. Đến năm 2005, ba dòng này đã được di nhập trồng vào vùng biển các tỉnh miền Trung, Việt Nam.

Bảng 1.2. Hệ thống phân loại rong *Kappaphycus striatus* và *Betaphycus gelatinus*.

Rong	<i>Kappaphycus striatus</i>	<i>Betaphycus gelatinus</i>
Giới	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>
Ngành	<i>Rhodophyta, Wettstein</i>	<i>Rhodophyta, Wettstein</i>
Lớp	<i>Florideophyceae, Cronquist</i>	<i>Florideophyceae, Cronquist</i>
Bộ	<i>Gigartinales, F. Schmitz</i>	<i>Gigartinales, F. Schmitz</i>
Họ	<i>Solieriaceae, J. Agardh</i>	<i>Solieriaceae, J. Agardh</i>
Chi	<i>Kappaphycus, Doty</i>	<i>Betaphycus</i>
Loài	<i>K. striatus</i> (F. Schmitz, 1895) Doty ex P.C. Silva, 1996	<i>Betaphycus gelatinus</i> (Esper) Doty ex P. C. Silva 1996

Rong đỏ *Betaphycus gelatinus* hay rong Hồng Vân được định danh là *Eucheuma gelatinae* (Esp.) bởi J. Agrardh vào năm 1847, đến năm 1996 được Doty hiệu chỉnh là *Betaphycus gelatinus* (Esper), được xếp vào chi *Betaphycus*, họ *Solieriaceae*, bộ *Gigartinales*, lớp *Eucheumatoideae*, ngành *Rhodophyta* [27, 36]. Rong *Betaphycus gelatinus* sống ở rạn san hô chết vùng nước trong, sóng mạnh, phân bố khắp vùng biển nhiệt đới Ấn Độ Dương - Thái Bình Dương và mở rộng đến một số khu vực biển ôn đới của Nhật Bản và Úc. Rong Hồng Vân sinh trưởng và phát triển quanh năm, tốt nhất từ tháng 12 đến tháng 6 năm sau. Thành phần chủ yếu của rong Hồng Vân là carrageenan (gồm các loại beta -, gamma -, kappa -, iota-

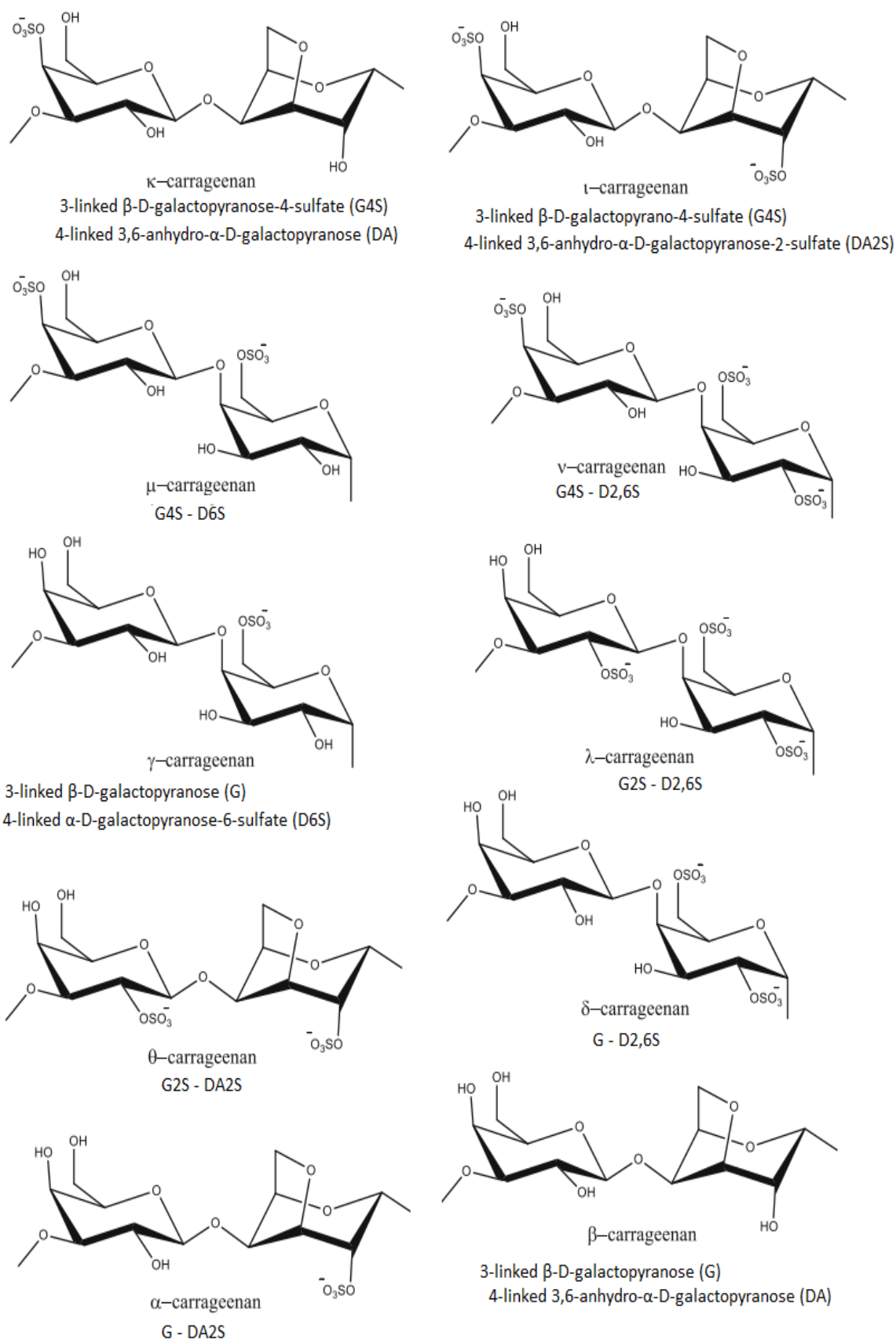
carrageenan), acid béo, protein, và các chất khoáng (Iod, Nitrogen, Sulfate). Ở Việt Nam hiện rong phát triển tự nhiên ở vùng biển Thừa Thiên Huế, Ninh Thuận, Bình Thuận và đang được nghiên cứu để nuôi trồng.

1.2. Carrageenan từ rong đỏ

1.2.1. Cấu trúc của carrageenan

Carrageenan là tên gọi chung của một họ polysaccharide và có khả năng tạo gel, là sản phẩm thu được bằng cách chiết từ một số loài rong đỏ họ *Rhodophyta*, thường là từ các chi như *Eucheuma*, *Solieria*, *Crius*, *Chondrus*, *Hypnea*, *Sarconema*, *Iridaea*, *Gigartinastellate* và *Agardhiella*. Rong đỏ chi *Eucheuma* và *Kappaphycus* là loại rong biển đang được trồng phổ biến nhất ở một số nước Đông Nam Á cũng như nguồn thu nhập cho các hộ dân sống vùng ven biển [37]. Carrageenan không có giá trị dinh dưỡng và được sử dụng như một chất tạo gel, ổn định và làm đặc và cũng như chất thay thế chất béo trong công nghiệp thực phẩm, đặc biệt là trong các sản phẩm sữa và trong lĩnh vực mỹ phẩm, dược phẩm, ngành dệt và in [38].

Cấu trúc carrageenan bao gồm chủ yếu các gốc D-galactose mà chúng hình thành các disaccharide lặp lại qua liên kết 3- β -D-galactopyranose và liên kết 4- α -D-galactopyranose. Carrageenan được phân loại theo mức độ thế các nhóm este sulfate trên các nhóm hydroxyl và vị trí thế của chúng như kappa (κ) carrageenan, iota (ι) carrageenan, lambda (λ) carrageenan, mu (μ) carrageenan, nu (ν) carrageenan, theta (θ) carrageenan, alpha (α) carrageenan, beta (β) carrageenan, Gamma (γ) carrageenan và delta (δ) carrageenan [38, 40] (Hình 1.1). Trong số này ba loại kappa-, iota- và lambda-carrageenan có tầm quan trọng về mặt thương mại do tính chất dẻo và tạo keo của chúng [41]. Những tên gọi này không phản ánh cấu trúc hóa học xác định mà chỉ là sự khác biệt chung về thành phần và mức độ sulfate hóa tại các vị trí cụ thể trong carrageenan. Kappa-carrageenan có hàm lượng ester sulfate khoảng 25 - 30% và hàm lượng 3,6-anhydro-D-galactose khoảng 28 đến 35%. Iota-carrageenan có hàm lượng ester sulfate khoảng 28 - 30% và hàm lượng 3,6-anhydro-D-galactose khoảng 25 - 30%. Lambda-carrageenan có hàm lượng ester sulfate khoảng 32 - 39% và không có hàm lượng 3,6-anhydro-D-galactose [42].



Hình 1.1. Cấu trúc hóa học disaccharide của một số loại carrageenan.

Các loại carrageenan thu được tùy thuộc vào quy trình chiết và nguồn rong đỏ nguyên liệu. Các loại carrageenan ở trên khác nhau về vị trí và số nhóm ester sulfate đính vào chuỗi polysaccharide, do đó mỗi loại có tính chất vật lý và hoá học đặc trưng khác nhau.

1.2.2. Tính chất hóa lý, hoạt tính sinh học và khả năng ứng dụng của carrageenan

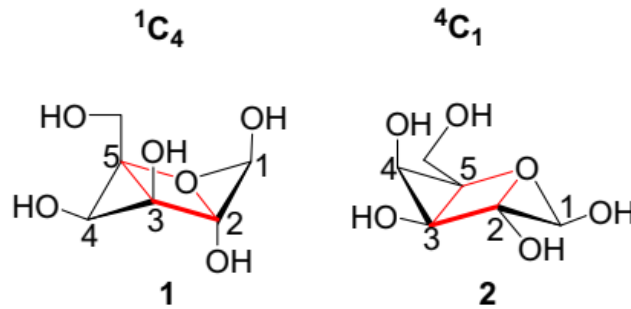
1.2.2.1. Tính chất hóa lý và hoạt tính sinh học của carrageenan

Khả năng phản ứng hóa học của carrageenan chủ yếu là do các nhóm ester sulfate có tính anion. Các carrageenan thương mại thường ở dạng muối natri, kali và canxi hoặc phổ biến nhất là hỗn hợp của chúng. Các đặc tính vật lý của carrageenan được quyết định bởi các cation liên kết, cùng với cấu trúc của các đơn vị đường trong mạch carrageenan.

Sự tạo gel của carrageenan: Các gel carrageenan giống agar có thể biến đổi thuận nghịch khi thay đổi nhiệt độ, chúng tan khi đun nóng và tạo gel lại khi nguội. Nhiệt độ tạo gel của kappa - carrageenan nằm trong khoảng 35°C đến 65°C và nhiệt độ tan gel trong khoảng 55°C đến 85°C. Các đặc tính của gel carrageenan phụ thuộc vào thành phần hóa học, cấu trúc và kích thước phân tử của nó. Sự hình thành gel carrageenan có thể được chia thành bốn giai đoạn: (1) khi hòa tan trong nước nóng, phân tử bị cuộn lại không đều; (2) khi giảm nhiệt độ, phân tử tạo thành chuỗi xoắn đơn; (3) khi nhiệt độ giảm hơn nữa, một chuỗi xoắn kép được hình thành giữa các phân tử (cấu trúc mạng ba chiều) và (4) khi tiếp tục giảm nhiệt độ, chuỗi xoắn kép kết tụ lại tạo thành gel, sự đông đặc bắt đầu diễn ra. Trong số các carrageenan thương mại, κ -carrageenan và ι -carrageenan tạo gel, trong khi λ -carrageenan chỉ được đặc trưng như một chất làm đặc. Sự khác biệt về tính chất lưu biến do cấu trúc của các carrageenan: ở kappa-carrageenan và iota-carrageenan đơn vị 3,6-anhydro-D-galactose có cấu trúc 1C_4 , trong khi đơn vị D-galactopyranose trong λ -carrageenan có cấu trúc 4C_1 (Hình 1.2) [39].

Cấu trúc 1C_4 của đơn vị 3,6-anhydro-D-galactose trong κ -carrageenan và ι -carrageenan là dạng cấu trúc xoắn bậc 2, điều này cần thiết cho đặc tính tạo gel. Các carrageenan như lambda (λ) carrageenan, mu (μ) carrageenan và nu (ν) carrageenan có các đơn vị disaccharide không có vòng 3,6-anhydro và có cấu trúc 4C_1 gây ra sự

gấp khúc trên mạch polysaccharide, nên không hình thành các chuỗi xoắn, do đó ngăn cản sự tạo gel. Kappa- và iota-carrageenan có sự liên kết chéo của các chuỗi xoắn liên kế có chứa các nhóm sulfate hướng về phía ngoài của tạo thành một mạng lưới xoắn kép ba chiều và hình thành gel. Trong lambda-carrageenan, nhóm 2-sulfate hướng vào phía trong, nên không tạo liên kết chéo [39].



Hình 1.2. Mô tả cấu trúc 1C_4 và 4C_1 của β-D-galactopyranose. Cấu trúc được xác định bằng các chữ số chỉ các nguyên tử vòng nằm trên hoặc dưới một mặt phẳng chuẩn xác định (màu đỏ) chứa các nguyên tử C-2, C-3, C-5 và O. Trong cấu trúc 1, C-1 ở trên mặt phẳng và C-4 ở dưới và do đó, ký hiệu là 1C_4 , cấu trúc 2 là 4C_1 .

Sự hình thành gel của carrageenan cũng bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của các cation như Ca^{2+} và K^+ , chúng làm giảm sự tổ hợp của các chuỗi xoắn gây ra bởi tương tác giữa các phân tử, ổn định các chuỗi và tạo thành một mạng ba chiều có trật tự [43]. Kappa-carrageenan tạo thành gel cứng với các ion K^+ và tạo thành gel mềm, đàn hồi khi tương tác với các ion Ca^{2+} ; lambda-carrageenan không tạo gel khi có mặt các cation. Trạng thái gel của carrageenan cũng bị ảnh hưởng bởi môi trường acid hay kiềm và điều kiện nhiệt độ.

Độ tan: Các loại carrageenan tan tốt trong sữa nóng, tan trong nước nóng tới nồng độ 10% và tan trong các dung dịch muối Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , NH_4^+ . Với các dung môi khác, carrageenan tan trong anhydrous hydrazine (N_2H_4), ít tan trong formamide (CH_3NO) và methyl sulfoxide ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}$), không tan trong dầu và dung môi hữu cơ. Carrageenan khi tiếp xúc với dung môi theo thời gian có sự hút nước mạnh và kèm theo sự trương phồng đáng kể tạo thành gel. Carrageenan là polysaccharide phân cực nên trương nở trong dung môi phân cực như nước. Ở nhiệt độ thấp carrageenan thường chỉ trương nở, ít tan.

Độ nhót của carrageenan: phụ thuộc vào nồng độ, nhiệt độ, sự có mặt của các chất tan khác, loại carrageenan và trọng lượng phân tử của nó. Độ nhót tăng tỷ lệ thuận với nồng độ, khối lượng phân tử và tỷ lệ nghịch với nhiệt độ. Các muối trong dung dịch làm giảm độ nhót của dung dịch carrageenan bằng cách giảm lực đẩy tĩnh điện giữa các nhóm sulfate.

Tính hấp thu hồng ngoại và màu: Dung dịch carrageenan là một chất hữu cơ, nên có khả năng hấp thu phổ hồng ngoại có bước sóng trong phạm vi nhất định, phụ thuộc vào loại và thành phần carrageenan. Dựa vào tính chất này, người ta có thể biết được carrageenan thuộc loại κ -, λ -, ι - ... Các loại polysaccharide thường cho bước sóng ở vùng hồng ngoại trong khoảng $1000 - 1100 \text{ cm}^{-1}$, các loại carrageenan tạo gel cho đỉnh hấp thu cực đại ở 1065 cm^{-1} , loại không tạo gel ở vùng 1020 cm^{-1} .

Sự phân hủy carrageenan: Carrageenan không bền ở pH thấp và dễ bị phân hủy bởi quá trình thủy phân xúc tác acid. Ở nhiệt độ cao và độ pH thấp, tốc độ thủy phân diễn ra nhanh. Tốc độ thủy phân ở pH và nhiệt độ nhất định của carrageenan ở dạng gel thấp hơn ở trạng thái dung dịch keo. Có nhiều nghiên cứu về khả năng phân hủy của carrageenan qua đường tiêu hóa, cho thấy carrageenan bị thủy phân tại dạ dày nơi có pH thấp $\sim 1,2$, và ít bị phân hủy tại ruột có pH $\sim 7,4$ [44].

Hoạt tính sinh học của carrageenan: các carrageenan sở hữu nhiều hoạt tính như hoạt tính chống khối u và điều hòa miễn dịch của lambda-carrageenan từ rong *Chondrus ocellatus*[45]; kappa-carrageenan oligosaccharides carrageenan có tác dụng chống khối u trong khi thúc đẩy hệ thống miễn dịch, tác dụng giảm cholesterol [46]; kappa-carrageenan oligosaccharides (CO-1) có nguồn gốc từ carrageenan ức chế hiệu quả virus cúm A (H1N1) [47]; iota-, kappa-, lambda-carrageenan, fucans, fucoidan đã được nghiên cứu cho thấy có hoạt tính chống oxy hóa tiềm năng [48]; thường xuyên bổ sung carrageenan trong chế độ ăn uống hàng ngày có thể làm giảm mức cholesterol và lipid ở người [49].

1.2.2.2. Khả năng ứng dụng của carrageenan

Các carrageenan thu được từ rong đỏ có các đặc tính hóa lý đặc trưng, nên nó được sử dụng rất rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm và phi thực phẩm để làm chất đông hoá, ổn định, tạo gel, tạo độ nhót, tạo kết cấu, Việc sử dụng carrageenan làm

chất mang bọc ngày càng phổ biến, trong đó kappa-carrageenan là loại được ứng dụng nhiều. Carrageenan được sử dụng để bọc hương vị, hương thơm, lợi khuẩn và các enzyme trong sản xuất thực phẩm [50]. Ngoài ra carrageenan cũng được dùng để bọc các mùi hương trong mỹ phẩm, và có tiềm năng sử dụng làm chất mang vitamin cho các kem mỹ phẩm khi kết hợp với các polysaccharide khác như chitosan [51].

Hiện nay các polymer tự nhiên đang chiếm một vai trò nổi bật trong ngành công nghiệp dược phẩm do các đặc tính phổ biến, độc đáo và đặc biệt của chúng, bao gồm khả năng phân hủy sinh học, không độc, khả năng tái tạo, có tính bền vững và sự phong phú tương đối so với các hợp chất tổng hợp [52]. Các chức năng của carrageenan trong dược phẩm bao gồm ổn định, làm đặc và hoạt động như chất tạo gel trong gel kháng acid, ổn định nhũ tương để bào chế thuốc không hòa tan, kéo dài thời hạn sử dụng của dung dịch kháng sinh và tăng cường tính đồng nhất trong dung dịch keo [49]. Ban đầu carrageenan được sử dụng làm chất mang để cố định các enzyme hoặc các vi sinh vật trong sản xuất thuốc. Quá trình sản xuất thuốc kháng sinh bán tổng hợp penicillin, các tế bào *E. coli* được cố định trên κ -carrageenan [53]. Sản xuất quy mô công nghiệp acid D-aspartic và L-alanine bằng cách cố định tế bào *Pseudomonas dacunhae* trên κ -carrageenan [54]. Các nghiên cứu cho thấy carrageenan cũng có các hoạt tính kháng virus và kháng u. Trong những năm gần đây, một số thử nghiệm lâm sàng để kiểm tra hiệu quả kháng virus của carrageenan đối với các bệnh nhiễm virus khác nhau đã được công bố [55]. Carrageenan có thể ngăn chặn virus suy giảm miễn dịch ở người (HIV) và các bệnh lây truyền qua đường tình dục, ngăn chặn nhiễm trùng từ virus gây u nhú ở người (HPV) [56], carrageenan dạng xịt mũi cho thấy hiệu quả kháng virus đáng kể đối với tất cả các virus cảm lạnh thông thường và đặc biệt chống lại virus corona (HCoV) [57]. Gần đây, iota-carrageenan cũng đã được công bố ức chế sự lây nhiễm của virus SARS-CoV-2 [58].

Carrageenan ngày càng được ứng dụng nhiều trong các hệ phân phối thuốc, vì nó có ba đặc điểm quan trọng [41, 59]: (a) các liên kết glycosidic của nó bị phân cắt bởi các enzyme hydrolase, tạo ra khả năng phân hủy sinh học; (b) các nhóm sulfate trong carrageenan là anion và tăng cường hoạt động của polyelectrolytes; và (c) sự hiện diện của các nhóm hydroxyl cung cấp các tương tác cần thiết để tạo ra các biến đổi hóa học. Carrageenan được ứng dụng trong các công thức dược phẩm, bao gồm

dạng thuốc viên, màng bọc, hạt hòa tan nhanh (FDI), dạng vi hạt, hệ thuốc hít, thuốc tiêm và hydrogel. Carrageenan thực hiện các chức năng khác nhau trong các công thức dược phẩm này, từ việc hình thành chất nền, chất ổn định, chất kết dính, chất phân hủy, chất hòa tan, chất làm đặc và chất phủ, cho đến các quy trình phức tạp hơn, chẳng hạn như kiểm soát giải phóng thuốc. Carrageenan dễ dàng tạo thành gel, vì vậy chúng thường được sử dụng trong hệ chất mang thuốc, thường được tạo thành thông qua quá trình gel hóa có thể thuận nghịch theo nhiệt độ, liên kết chéo ion và biến đổi chuỗi carrageenan [60]. Một số hệ phân phối thuốc từ carrageenan đã được nghiên cứu: carrageenan kết hợp chitosan để tạo các vi nang bọc glucose oxidase, kiểm soát quá trình giải phóng thuốc qua đường miệng [61]; kappa- và iota-carrageenan được sử dụng làm hạt vi cầu chứa chất gây tê cục bộ và allopurinol, ứng dụng ngăn ngừa và điều trị viêm niêm mạc miệng [62]; hệ phân phối carrageenan được sử dụng để kiểm soát sự giải phóng acetaminophen [63]; các hạt kappa- và iota-carrageenan được tạo bằng phương pháp gel hóa ionotropic như một hệ giải phóng thuốc có kiểm soát cho thuốc ibuprofen và verapamil hydrochloride [64]; dạng hạt hydrogel kappa-carrageenan như một hệ thống phân phối curcumin - một hợp chất có hoạt tính sinh học có nhiều lợi ích cho sức khỏe [65].

Carrageenan có khả năng bọc và có ứng dụng nhiều trong các hệ phân phối thuốc và các chất có hoạt tính sinh học, nhưng về tính chất carrageenan dễ bị phân hủy trong môi trường acid. Vì vậy có thể biến tính carrageenan để tạo chất mang có hiệu quả cao trong các hệ phân phối các hoạt chất, ngăn sự giải phóng các hoạt chất sớm, hoặc bị thoái hóa khi vận chuyển thuốc qua dạ dày và kiểm soát sự giải phóng thuốc tại vị trí đích. Có thể thực hiện điều này bằng cách biến đổi hóa học gắn các nhóm nhạy cảm với pH, chẳng hạn như nhóm carboxyl ($-\text{COOH}$) trên chuỗi phân tử carrageenan, thông qua quá trình carboxymethyl hóa. Carboxymethyl-carrageenan có tính chất trương nở phụ thuộc vào độ pH, rất phù hợp để phân phối các hoạt chất theo vị trí cụ thể đến ruột do sự thay đổi trong độ pH từ có tính acid trong dạ dày đến hơi kiềm trong ruột khi nó mang các hoạt chất di chuyển qua đường tiêu hóa [66]. Quá trình carboxymethyl hóa polysaccharide là một biến đổi hóa học được nghiên cứu rộng rãi để phát triển vật liệu sinh học mới, do tính đơn giản về kỹ thuật và chi phí

thấp, hiện nay nó được ứng dụng rộng rãi của nó trong sản xuất carboxymethyl cellulose - CMC [67, 68].

Dẫn xuất carboxymethyl-kappa-carrageenan (CMKC) sau khi tổng hợp và phân tích thể hiện tính tương hợp sinh học và tăng cường các hoạt tính sinh học so với kappa-carrageenan, chẳng hạn như khả năng tương thích sinh học, khả năng tồn tại và không có độc tính đối với tế bào, hoạt tính ngưng kết hồng cầu đối với tế bào hồng cầu của con người, khả năng chọn lọc và ức chế tăng trưởng đối với vi khuẩn. CMKC có hoạt tính kháng khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* và *Pseudomonas aeruginosa* với các nồng độ ức chế 1,0 µg/µL, 0,063 µg/µL, 0,5 µg/µL và 1,0 µg/µL tương ứng theo nghiên cứu của L. Y. C. Madruga và cộng sự, 2020 [69]. Các hoạt tính sinh học của CMKC chịu ảnh hưởng bởi các yếu tố, độ thế nhóm (-COOH), khối lượng phân tử và nồng độ [70].

Nghiên cứu đã công bố cho thấy carboxymethyl-kappa-carrageenan là một hydrogel nhạy cảm với pH, có tính trương nở phụ thuộc vào pH của môi trường. Carboxymethyl-kappa-carrageenan cho thấy tỷ lệ trương nở thấp hơn so với kappa-carrageenan tự nhiên trong dung dịch dạ dày mô phỏng SGF (pH ~1,2), và tỷ lệ trương nở cao hơn so với kappa-carrageenan tự nhiên trong dung dịch ruột mô phỏng SIF (pH ~7,4). Các nhóm carboxymethyl có sự ion hóa nếu pH môi trường cao hơn pKa của nhóm carboxylic (~3,4 - 3,7), do đó ở pH thấp các nhóm carboxyl được proton hóa và thúc đẩy sự hình thành của các liên kết hydro với nhau, do đó làm giảm tỷ lệ trương nở của carboxymethyl-kappa-carrageenan. Ở pH cao hơn trong môi trường hơi kiềm, các nhóm carboxyl của carboxymethyl-kappa-carrageenan bị deproton hóa dẫn đến lực đẩy tĩnh điện giữa các nhóm (-COOH) bị ion hóa tăng, nên tăng tỷ lệ trương nở [68, 70, 71]. Tính chất này của CMKC ảnh hưởng lớn đến việc tăng hiệu quả tải thuốc của các hệ phân phối thuốc.

Đặc biệt dẫn xuất carboxymethyl của carrageenan có các nhóm (-COOH) linh động trong cấu trúc, nên khi ứng dụng làm chất mang trong hệ phân phối nó tạo mật độ liên kết ngang cao và ngăn chặn sự khuếch tán của acid trong dạ dày cũng như enzyme vào bên trong cấu trúc của polysaccharide đã đóng gói protein. Bên cạnh đó, chất mang từ dẫn xuất carboxymethyl của carrageenan còn tạo ra một diện tích tiếp xúc lớn trên bề mặt tế bào, để giải phóng protein ra khỏi cấu trúc của chất mang và

theo sự gia tăng nồng độ thẩm qua màng ruột đến vị trí tế bào đích [19]. Gần đây, các dẫn xuất carboxymethyl hóa kappa/iota-carrageenan đã được tổng hợp thành công đã được thông báo bởi K.H. Leong và cộng sự (2011) và Sahoo và cộng sự (2017) [68, 72]. Do các tính chất tương phụ thuộc pH trong cả hai dịch dạ dày và dịch ruột, các dẫn xuất carboxymethyl-kappa/iota-carrageenan đã được phát triển hoặc kết hợp với các polymer khác (như chitosan hoặc gelatin) ứng dụng làm chất mang bọc insulin qua đường uống [72, 73] và bọc amphotericin B cho sử dụng kháng nấm [74]. Ngoài ra, các hoạt tính kháng khuẩn, không gây độc tế bào, hoạt tính ngưng kết hồng cầu và hoạt tính bắt gốc tự do cho thấy rằng các dẫn xuất của carboxymethyl-kappa-carrageenan hoặc được trộn với poly vinyl alcohol (PVA) có tiềm năng sử dụng trong băng y tế giúp chữa lành vết thương [69, 70].

1.3. Lectin từ rong đỏ

1.3.1. Cấu trúc của lectin từ rong đỏ

Lectin bản chất là protein hoặc glycoprotein mà chúng có thể liên kết các mono- và oligo-saccharide trong glyco liên hợp của sinh vật một cách thuận nghịch, nhưng không có hoạt tính xúc tác và không phải là sản phẩm của phản ứng miễn dịch [75]. Trong các công bố về lectin từ rong biển, nhiều loài rong đỏ đã được báo cáo có chứa các lectin có đặc tính liên kết carbohydrate đối với glycoprotein. Những tương tác lectin-glycan này tiếp tục kích hoạt nhiều phản ứng sinh hóa, dẫn đến chúng được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu y sinh. Rong đỏ Carageenophyte gồm các loài *Kappaphycus alvarezii*, *Kappaphycus striatus*, *Eucheuma denticulatum*, và *Betaphycus gelatinus* không chỉ là nguồn carrageenan cho công nghiệp thực phẩm, mà còn là nguồn lectin giá trị để sử dụng trong y học [1-9].

a)	
GRYTVQ NQ WGGSSAPW NDAGLWILGSRGNQ NVMAIDVNSSDGGANLNGTMTYSGE GPIGFKGARRGES	(1-68)
NVYDVEN Q WGGSSAPWHAGGQFVIGSRSGQGV LAVNITSSDGGKTLTGTMTYEREGPIGFKGTQSGG-	(69-135)
DTYNVEN Q WGGSSAPWNKAGI WALGDRSGQAMIAMDVSSDGGKTL EGTMQYKGE GPIGFRGKLSGA-	(136-202)
NNYSVEN Q WGGSSAPWNKAGDWLIGDRHN Q NITAVKVSSDNDGKNLDGTCTYEREGPIGFKGVATS--	(203-268)

b)	
GRYTVQ NQ WGGSSAPW NDAGLWILGSRGNQ NVMAIDVNSSDGGANLNGTMTYSGE GPIGFKGARRGES	(1-68)
NVYDVEN Q WGGSSAPWHAGGQFVIGSRSGQGV LAVNITSSDGGKTLTGTMTYEREGPIGFKGTQSGG-	(69-135)
DTYNVEN Q WGGSSAPWNKAGI WALGDRSGQAMIAMDVSSDGGKTL EGTMQYKGE GPIGFRGKLSGA-	(136-202)
NNYSVEN Q WGGSSAPWNKAGDWLIGDRHN Q NITAVKVSSDNDGKNLDGTCTY ESGAIGFKGVAS---	(203-267)

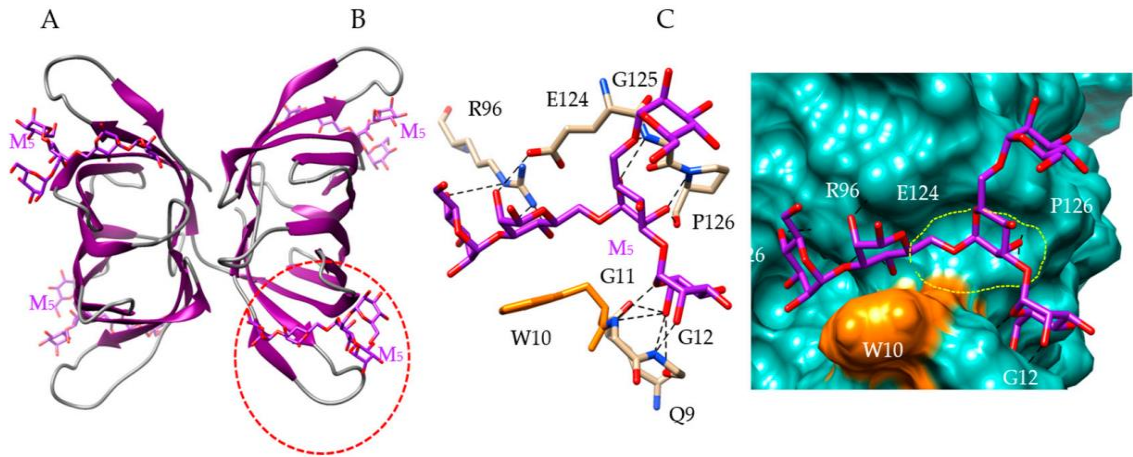
Hình 1.3. Cấu trúc bậc 1 của các lectin từ rong đỏ *Kappaphycus striatus*: a) Lectin KSA-2; b) Lectin KSL. Các acid amin giống nhau được tô xám.

Nghiên cứu cấu trúc của lectin giúp khám phá các ứng dụng tiềm năng của chúng trong nhiều lĩnh vực đặc biệt là y sinh. Trong số các lectin từ rong đỏ, cấu trúc bậc 1 của lectin *Bryothamnion triquetrum* (BTL) là cấu trúc đầu tiên được xác định [76]. Gần đây, cấu trúc cơ bản của một số lectin từ rong đỏ cũng đã được xác định thông qua phương pháp giải trình tự protein và cDNA, như cấu trúc của lectin EDA-2 từ *E. denticulatum* [5], KAA-2 từ *K. alvarezii* [16], KSA-2 và KSL từ *K. striatus* [6, 8], SfL-1 và SfL-2 từ *S. filiformis* [33] và ESA-2 từ *E. serra* [18]. Cấu trúc bậc một của các lectin từ rong đỏ *K. striatus*: Cấu trúc chính của KSA-2 có bốn miền lặp lại song song, mỗi miền bao gồm 67 acid amin và có 45,5% tính đồng nhất trình tự; cấu trúc của KSL có bốn miền lặp lại song song, bao gồm 67 acid amin mỗi miền và mỗi miền có 43% sự tương đồng về acid amin (Hình 1.3) [6, 8].

Các lectin từ rong đỏ có cấu trúc không gian được mô tả gồm 1 chuỗi polypeptide này bao gồm hai thùng β (β -barrel) vuông góc, mỗi thùng chứa 2 tấm β (β -sheet), mỗi tấm β chứa 5 dải β (β -strand). Bảng 1.3 liệt kê cấu trúc của một số lectin từ rong đỏ [10]. Hình 1.4 mô tả cấu trúc β -barrel của lectin KAA-2 từ rong đỏ *Kappaphycus alvarezii*, cho thấy các vị trí liên kết với chuỗi pentamannoside [8].

Bảng 1.3. Cấu trúc của các lectin từ rong đỏ.

Loại rong	lectin	Cấu trúc
<i>Agardhiella subulata</i>	ASL-1, ASL-2	β -barrel
<i>Eucheuma amakusaensis</i>	EAA-1, EAA-2, EAA-3	β -barrel
<i>Eucheuma cottonii</i>	ECA-1, ECA-2	β -barrel
<i>Eucheuma denticulatum</i>	EDA-1, EDA-2	β -barrel
<i>Eucheuma serra</i>	ESA-1, ESA-2	β -barrel
<i>Grateloupia chiangii</i>	GCL	β -prism II
<i>Griffithsia</i> sp.	Griffithsin	β -prism I
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	KAA-2	β -barrel
<i>Kappaphycus striatus</i>	KSA-2	β -barrel
<i>Meristiella echinocarpa</i>	MEL	β -barrel
<i>Meristotheca papulosa</i>	MPA-1, MPA-2	β -barrel
<i>Solieria filiformis</i>	SfL-1, SfL-2	β -barrel
<i>Solieria robusta</i>	SrL	β -barrel
<i>Hydropuntia (Gracilaria) fisheri</i>	HFA	β -sandwich
<i>Porphyra umbilicalis</i>	NgL	β -sandwich



Hình 1.4. Mô hình phân tử của lectin KAA-2. (A) Lectin KAA-2 có cấu trúc β -barrel, phức hợp với chuỗi pentamannoside (M5 màu tím). (B) Mạng lưới liên kết hydro (đường đứt nét màu đen) gắn M5 vào gốc acid amin Q9, G11, G12, R96, E124, G125 và P126 tạo thành vị trí liên kết carbohydrate (đường nét đứt), gốc acid amin W10 cũng tham gia tương tác M5. (C) Bề mặt phân tử của KAA-2 tại vị trí liên kết carbohydrate.

1.3.2. Hoạt tính sinh học và khả năng ứng dụng của lectin từ rong đỏ

1.3.2.1. Hoạt tính sinh học của lectin

Hoạt tính ngưng kết hồng cầu của lectin: Đặc tính ngưng kết là một đặc tính đáng chú ý của lectin xảy ra do bản chất đa hóa trị của protein cùng với ái lực của nó với các carbohydrate đặc hiệu trên bề mặt tế bào. Dựa trên khả năng ngưng kết hồng cầu với các dạng nhóm máu, lectin được phân loại là đặc hiệu hoặc không đặc hiệu [77]. Lectin từ các loài rong đỏ khác nhau có các đặc tính ngưng kết tế bào hồng cầu khác nhau.

Hầu hết các lectin từ rong đỏ dễ dàng ngưng kết với hồng cầu của thỏ và cừu hơn hồng cầu của nhóm máu người (ABO), do hồng cầu thỏ nhiều acid sialic dạng Neu5Ac (5-N-Acetylneuraminic acid), Neu5,9Ac2 (5-N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid) và Neu9Ac5Gc (N-glycolyl-9-O-acetylneuraminic acid) trong glycoprotein trên bề mặt tế bào hơn hồng cầu của con người. Sự ưu tiên ngưng kết hồng cầu của một số lectin từ rong đỏ ở Việt Nam được liệt kê ở Bảng 1.4 [1-8, 77].

Bảng 1.4. Hoạt tính ngưng kết của một số lectin từ rong đỏ ở Việt Nam.

Rong đỏ	Hoạt tính ngưng kết với loại hồng cầu
<i>Eucheuma denticulatum</i>	Hồng cầu thỏ ^{a,b} và cừu ^{a,b,e}
<i>Galaxaura filamentosa</i>	Hồng cầu thỏ ^{a,b} , cừu ^{a,b} và gà ^{a,b}
<i>Gracilaria bailinae</i>	Hồng cầu thỏ ^{a,b,e} , cừu ^b và gà ^{a,b,e}
<i>Gracilaria bangmeiana</i>	Hồng cầu gà ^{a,b}
<i>Gracilaria changii</i>	Hồng cầu cừu ^{a,b} và gà ^b
<i>Gracilaria salicornia</i>	Hồng cầu thỏ ^{a,b,e} , cừu ^{a,b,e} và gà ^{a,b,e}
<i>Grateloupia filicina</i>	Hồng cầu Thỏ ^b , cừu ^b , gà ^{a,b} và người A ^{a,b} , B ^{a,b} và O ^{a,b}
<i>Halymenia maculata</i>	Hồng cầu thỏ ^{a,b,e} , cừu ^{a,b,e} và người A ^{a,b} , B ^{a,b} và O ^{a,b}
<i>Hypnea boergesenii</i>	Hồng cầu thỏ ^{a,b,e} , cừu ^{a,b} và gà ^{a,b}
<i>Hypnea nidulans</i>	Hồng cầu thỏ ^{a,b} , cừu ^{a,b} , người A ^{a,b} , B ^{a,b} và O ^{a,b}
<i>Hypnea valentiae</i>	Hồng cầu thỏ ^{a,b} , cừu ^{a,b} , người A ^b , B ^b và O ^b
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	Hồng cầu thỏ ^{a,b,e} , cừu ^{a,b}
<i>Kappaphycus striatum</i> (<i>K. striatus</i>)	Hồng cầu thỏ ^{a,b,e} , cừu ^{a,b,e}
<i>Betaphycus gelatinus</i>	Hồng cầu thỏ ^{a,b,e} , cừu ^{a,b,e} và gà ^{a,b,e}

^a: hồng cầu xử lý enzyme Trypsin; ^b: hồng cầu xử lý enzyme Papain; ^c: hồng cầu xử lý enzyme Bromelain; ^d: hồng cầu xử lý enzyme Subtilisin; ^e: Hồng cầu tự nhiên.

Hoạt tính ngưng kết hồng cầu của hầu hết lectin từ các loài rong đỏ *Rhodophyceae* thường bị ức chế mạnh bởi các glycoprotein, nhưng không bị ức chế bởi monosaccharide. Do đó, dựa trên đặc tính liên kết của chúng đối với glycoprotein, lectin từ rong đỏ có thể được phân loại: đặc hiệu dạng phức N-glycan hoặc đặc hiệu phức O-glycan, đặc hiệu dạng high-mannose và đặc hiệu cả hai dạng. Tuy nhiên, có một vài lectin từ một số loại rong đỏ cũng cho thấy tính đặc hiệu đối với monosaccharide và các dẫn xuất của chúng.

Đặc hiệu glycoprotein của lectin: Một số lectin thể hiện tính đặc hiệu các chuỗi đường loại N-glycan, trong khi một số ít thì đặc hiệu với O-glycan [1]. Lectin từ rong *Hypnea japonica* thể hiện tính đặc hiệu đối với N-glycan phức, được biết đến qua các thử nghiệm ức chế hoạt tính ngưng kết hồng cầu [78]. Còn các lectin từ rong *Hypnea valentiae*, *Hydrolython boergeresii*, *Hypnea nidulans* và *Gracilaria salicornia* thì đặc hiệu cho O-glycan và hoạt tính ngưng kết hồng cầu của chúng bị ức chế mạnh bởi asialo-fetuin mang cả hai dạng N-glycan phức và O-glycan (như bovine submaxillary mucin) mang acid N-acetyl neuraminic cũng như đường cuối cùng của chuỗi carbohydrate [79].

Đặc hiệu N-glycan dạng high-mannose: Một số lectin được tinh chế từ rong đỏ Carrageenophyte, như rong *Kappaphycus alvarezii* [3], *Kappaphycus striatum* [5] [5], *Soliera filiformis* [35], *Eucheuma serra* [18], và *Eucheuma denticulatum* [79] có đặc tính liên kết với glycoprotein dạng N-glycan high-mannose, nhưng không đặc hiệu với các monosaccharide. Lectin ESA-2 từ rong *E. serra* là lectin đầu tiên đã được xác định đặc tính liên kết với N-glycan dạng high-mannose [18]. Các lectin KAA tự nhiên và KAA tái tổ hợp (His-rKAA-1, rKAA-1) từ rong *Kappaphycus alvarezii* cũng cho thấy tính đặc hiệu đối với glycoprotein N-glycan dạng high-mannose chẳng hạn như yeast mannan [17]. Hoạt tính ngưng kết hồng cầu của các lectin KSA-1, KSA-2 và KSA-3 từ rong *K. striatum* [3] cũng đã bị ức chế mạnh bởi yeast mannan, thyroglobulin và các dẫn xuất asialo của chúng mang N-glycan dạng high-mannose trong phân tử. Hoạt tính ngưng kết hồng cầu của lectin EDA-1, EDA-2 và EDA-3 từ rong *E. denticulatum* bị ức chế bởi glycoprotein mang N-glycan dạng high-mannose nhưng không bị ức chế bởi monosaccharide [5].

Lectin đặc hiệu đường đơn (monosaccharide): Hầu hết các lectin từ rong đỏ chủ yếu có ái lực với các glycoprotein, tuy nhiên, và chỉ có một vài lectin từ rong đỏ thể hiện tính đặc hiệu đối với các monosaccharide.

Đặc tính của một số lectin từ rong đỏ như: khối lượng phân tử, điểm đẳng điện, các gốc acid amin, hàm lượng carbohydrate, sự phụ thuộc vào các ion kim loại được tóm tắt ở Bảng 1.5 [80].

Bảng 1.5. Tính chất của lectin từ một số loài rong đỏ.

Rong đỏ	Lectin	Tính chất của lectin
<i>Amansia multifida</i>	AML	Monome, MW 26,9 kDa, hàm lượng carbohydrate 2,9 %
<i>Bryothamnion seaforthii</i>	BSL	Monome, MW 4,5 kDa, hoạt tính ngưng kết hồng cầu không phụ thuộc cation hóa trị 2, bền nhiệt đến 90°C trong 30 phút
<i>B. triquetrum</i>	BTL	Monome, MW 3,5 kDa, 91 gốc acid amin, hoạt tính ngưng kết hồng cầu không phụ thuộc cation hóa trị 2, bền nhiệt đến 90°C trong 30 phút
<i>Eucheuma serra</i>	ESA	Monome, MW 29 kDa, bền pH từ 2,5 - 10,5, pI 4,95, bền nhiệt đến 60°C trong 1 giờ.
<i>E. denticulatum</i>	EDA	Monome, MW 29 kDa, bền pH từ 2,5 - 10,5, bền nhiệt đến 60°C trong 1 giờ.
<i>Gracilaria cornea</i>	GCL	Monome, MW 60 kDa, pI 4,3, hoạt tính ngưng kết hồng cầu không phụ thuộc cation hóa trị 2, bền nhiệt đến 40 °C trong 20 phút, hàm lượng carbohydrate 52,5%

<i>G. ornata</i>	GOL	Monome, MW 17 kDa, pI 5,4, giàu Asx, Glx, Ser, Glu, Ala, Cys, bền nhiệt đến 50°C trong 60 phút, hàm lượng carbohydrate 2,9%
<i>G. tikvahiae</i>	GTL	MW 29,7 kDa, hoạt tính ngưng kết hồng cầu không phụ thuộc cation hóa trị 2
<i>G. verrucosa</i>	GVL	Tetrame, MW 41 kDa, nhóm nhỏ MW 12 kDa and MW 10,5 kDa, bền pH 4 - 12, pI 4,8, hoạt tính ngưng kết hồng cầu không phụ thuộc cation hóa trị 2, bền nhiệt đến 40°C trong 30 phút
<i>Griffithsia sp.</i>	GRFT	Dime, MW 12,7 kDa, 121 gốc acid amin
<i>Hypnea cervicornis</i>	HCL	MW 9,1 kD
<i>H. japonica</i>	Hypnin	Đồng phân lectin MW 9,1 kDa, (hypnin-1 and hypnin-2)
<i>H. musciformis</i>	HMS	MW 9,3 kDa
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	KAA	Monome, MW 28 kDa, hoạt tính ngưng kết hồng cầu không phụ thuộc cation hóa trị 2, bền nhiệt đến 50°C trong 30 phút, bền pH từ 3 - 10.
<i>K. striatus</i>	KSA	Monome, MW 28 kDa, bền pH từ 3 - 10, bền nhiệt đến 60°C trong 30 phút.
<i>Pterocladia capillacea</i>	PCL	Monome, MW 5,8 kDa, hoạt tính ngưng kết hồng cầu không phụ thuộc cation hóa trị 2, bền nhiệt đến 60°C trong 30 phút, bền pH từ 7 - 10

<i>Ptilota filicina</i>	PFL	Trime đồng nhất, MW 56,9 kDa, hoạt tính ngưng kết hồng cầu phụ thuộc cation hóa trị 2, bền nhiệt đến 50°C trong 30 phút
<i>P. plumosa</i>	PPL	Trime đồng nhất, MW 52,5 kDa
<i>P. serrata</i>	PSL	Trime đồng nhất, MW 55,4 kDa.
<i>Serraticardia maxima</i>	SML	MW 25 kDa, bền pH từ 4 - 10, hoạt tính ngưng kết hồng cầu không phụ thuộc cation hóa trị 2
<i>Solieria filiformis</i>	SFL	MW 29 kDa
<i>Tichocarpus crinitus</i>	TCL	Monome, MW 41 kDa, pI 4,93, hoạt tính ngưng kết hồng cầu không phụ thuộc cation hóa trị 2, hàm lượng carbohydrate 6,9%

MW: Khối lượng phân tử trung bình, pI: điểm đẳng điện.

Lectin từ rong đỏ có điểm đẳng điện (pI) thấp và được liệt kê ở bảng 1.5. Các lectin từ rong đỏ chứa các acid amin có tính acid (aspartic, glutamic) và các acid amin có nhóm hydroxyl (serine, threonine) với hàm lượng cao; còn chứa các acid amin cơ bản như arginine, histidine và lysine với hàm lượng thấp [8]. Vì chứa hàm lượng lớn các acid amin có tính acid nên pI của chúng nghiêng về tính acid.

Trên cơ sở các đặc tính sinh hóa của lectin đã được tổng hợp công bố của Rogers và Hori 1993 [81] đã phân loại lectin từ rong đỏ thành ba loại: (a) Lectin đặc hiệu glycoprotein có khối lượng phân tử thấp và hoạt tính không phụ thuộc cation hóa trị hai, (b) lectin đặc hiệu monosaccharide và khối lượng phân tử trung bình và hoạt tính phụ thuộc cation hóa trị hai, (c) lectin đặc hiệu monosaccharide có phân tử lượng lớn MW > 64.000 và hoạt tính phụ thuộc cation hóa trị hai.

1.3.2.2. Khả năng ứng dụng của lectin từ rong đỏ

Do đặc tính liên kết carbohydrate và cấu trúc đa dạng, nên lectin từ rong đỏ hứa hẹn là nguồn tiềm năng sử dụng trong y học như kháng viêm, kháng khuẩn, kháng virus, kháng ung thư, chẩn đoán và điều trị chọn lọc các loại bệnh này.

Khả năng kháng khuẩn: Các lectin từ rong đỏ khác nhau có hoạt tính kháng vi khuẩn và can thiệp vào quá trình hình thành màng sinh học do có tính đặc hiệu của carbohydrate [82]. Sự ức chế vi khuẩn do tương tác của lectin với glycoprotein liên hợp mannan hoặc hapten của nó trên bề mặt thành vi khuẩn gram âm [83].

Khả năng kháng đau, kháng viêm: Lectin từ rong *Amansia multifida* có tiềm năng như một loại thuốc giảm đau vì nó là một hợp chất chống cảm thụ tự nhiên ở hệ thần kinh trung ương và ngoại vi [84]. Lectin HCA cô lập từ rong *Hypnea cervicornis* bao gồm khả năng kháng viêm hiệu quả trong kiểu phù nề chân và chứng viêm màng bụng [85].

Khả năng kháng virus: Một vài lectin từ rong biển đặc hiệu với dạng high-mannose, do đó chúng có tiềm năng kháng lại các virus gây bệnh như: lectin KAA-2 từ rong *K. alvarezii* có khả năng kháng virus cúm và HIV-1 [17], lectin Griffithsin từ rong *Griffithsia* sp. có khả năng kháng virus HIV-1, viêm gan C (HCV) và cúm SARS-CoV [34], lectin ESA-2 từ rong *Eucheuma serra* và lectin GLC từ rong *Grateloupia chianyii* có khả năng kháng virus cúm [14], [86], thông qua tương tác của lectin với các chuỗi đường high-mannose có mặt trên lớp vỏ virus, mà ở đó lectin ức chế virus xâm nhập vào tế bào vật chủ.

Khả năng kháng ung thư: Lectin với các đặc tính đặc hiệu carbohydrate có thể được ứng dụng như chất dò chẩn đoán ung thư. Nhiều lectin trong rong đã được báo cáo là có khả năng chống khối u, chống lại tế bào ung thư ở người. Lectin ESA từ rong đỏ *E. serra* liên kết đặc hiệu với các chuỗi đường high-mannose trên bề mặt tế bào ung thư biểu mô và làm tế bào ung thư tự chết theo chương trình. Lectin ESA từ rong *E. serra* gây chết tế bào ung thư ruột kết (Colo201) và ung thư cổ tử cung (Hela) ở người khi nồng độ trên 1,2 µg/mL và gây ra cái chết hoàn toàn tế bào Colo201 ở nồng độ 30 µg/mL (khoảng 1,07 µM) [13]. Lectin từ rong *E. serra* liên kết với các tế bào sarcoma cũng gây ra quá trình tự chết theo chương trình [87]. Các

lectin từ rong đỏ nhờ tính đặc hiệu carbohydrate, nó có thể phân biệt giữa các cấu trúc màng và hoạt động như một công cụ đánh dấu các tế bào ung thư. Lectin tinh chế từ rong *Solieria filiformis* có liên kết đặc hiệu với oligosaccharide high-mannose có trong tế bào ung thư vú MCF-7 với nồng độ ức chế 50% là 125 $\mu\text{g/mL}$ [35]. Lectin KSL từ rong *Kappaphycus striatus* có tác dụng chống ung thư trên 5 dòng tế bào ung thư HT29, Hela, MCF-7, SK-LU-1 và AGS [7, 12, 17].

1.4. Hạt vi nang carrageenan từ rong đỏ

1.4.1. Hoạt tính sinh học và khả năng ứng dụng của hạt vi nang carrageenan

Hiện nay, việc nâng cao hiệu quả của các chất có tính sinh học và thuốc và giảm tác dụng phụ là một khía cạnh cần thiết trong điều trị bệnh. Có hai cách tiếp cận chính thường được xem xét: cách 1 là sản xuất các loại thuốc mới với độ chọn lọc cao và cải thiện việc phân phối thuốc được kiểm soát, hoặc cách 2 là sử dụng các hệ phân phối dựa trên polymer. Cách tiếp cận thứ hai tạo thành ba cơ chế khác nhau để đạt được hiệu quả mong muốn của các phân tử thuốc [88]: (1) Sự khuếch tán của thuốc thông qua sự hình thành hydrogel (dạng màng, hạt vi nang, hạt nano), (2) Hình thành nền polymer bao gồm các phân tử thuốc (dạng hạt vi nang, hạt nano) và (3) Sự thủy phân các liên kết hóa học giữa các phân tử thuốc và polymer (ví dụ, liên hợp thuốc-polymer). Do đó, mối quan hệ giữa các phân tử thuốc và các polymer là rất quan trọng trong việc phát triển một hệ phân phối thuốc thích hợp. Để đạt được điều này, một số vật liệu cao phân tử dựa trên polysaccharide có thể được sử dụng làm chất mang của thuốc. Các vật liệu này phải tương thích sinh học, có thể phân hủy sinh học, không độc hại và có hiệu quả đối trong các điều kiện cụ thể (ví dụ: nhiệt độ và pH). Vì vậy, các polymer dựa trên polysaccharide tự nhiên như carrageenan đã được nghiên cứu ứng dụng trong các hệ phân phối thuốc tạo màng, tạo hạt [89].

Từ lâu các polysaccharide đã được dùng làm tá dược trong một số sản phẩm được truyền thống, chúng có các đặc tính hóa-lý dễ dàng được biến tính hóa học để hình thành các hạt với mục đích vận chuyển thuốc. Ngoài ra, các polysaccharide có thể nhắm các vị trí tế bào đích do nhận biết và liên kết với các thụ thể; nó vận chuyển thuốc và kết dính với niêm mạc; và nó có thể bị phân hủy bởi một số enzyme tại vị trí đích [90]. Khi sử dụng các hạt polysaccharide để mang và vận chuyển thuốc, thuốc có thể được hấp thụ vào các khoang hoặc liên kết với bề mặt bên ngoài của

polysaccharide [91]. Các hệ phân phối dạng hạt polysaccharide có thể nâng cao khả năng hòa tan trong nước của thuốc và tăng tính ổn định của thuốc và protein [92, 93].

Hiện nay các polysaccharide từ nguồn gốc từ biển như rong được ưu tiên trong nghiên cứu các chất tạo màng sinh học, đây được xem như một nguồn tài nguyên tái tạo. Các thành phần chính của thành tế bào của rong biển carrageenan, agar hoặc alginate chiếm từ 30% đến 75% trọng lượng khô của rong và có tiềm năng ứng dụng trong các hệ phân phối thuốc như chống viêm, chống ung thư [94]. Các hệ phân phối thuốc dạng gel này (bao gồm nanogel, microgel và hydrogel) có các cấu trúc liên kết chéo có thể mang nhiều loại thuốc khác nhau, do đó có tiềm năng cung cấp một loạt các ứng dụng trong lĩnh vực phân phối thuốc [95].

Tính năng phân phối thuốc của polysaccharide được thể hiện: có khả năng ngăn chặn quá trình opsonin hóa giúp kéo dài thời gian bán hủy tuần hoàn của các hệ phân phối thuốc; có sự ổn định sinh học ngăn chặn sự kết tụ và bảo vệ khỏi các hệ thống phân hủy trong cơ thể; các chất mang polysaccharide có thể nhận biết liên kết với các thụ thể glycoprotein, galectin, selectin, thụ thể mannose và các thụ thể acid hyaluronic trên màng các tế bào ung thư nhất định, do đó nó có thể được sử dụng để nhắm mục tiêu các khối u [92]; các polysaccharide được ứng dụng trong hệ phân phối các vacxin nhằm mục tiêu điều hòa miễn dịch và nhắm mục tiêu các mô hạch bạch huyết như dextran đã được sử dụng để phân phối CpG (một loại oligonucleotide DNA) có mục tiêu đến các hạch bạch huyết, do đó làm tăng hiệu quả chống khối u [96]; các hệ phân phối thuốc từ polysaccharide tự nhiên có thể kéo dài thời gian lưu trú và do đó tạo cơ hội cho thuốc đi qua biểu mô, tăng hấp thu thuốc vào hệ tuần hoàn; polysaccharide dạng hydrogel rất hữu ích trong việc phân phối thuốc vì chúng có thể bọc các loại thuốc khó tan trong dung dịch nước và các hệ phân phối thuốc này có thể được điều chỉnh cho các vị trí và tốc độ giải phóng mong muốn, tối ưu hóa việc phân phối thuốc [97].

Đối với nhiều hệ phân phối thuốc polysaccharide dạng nano, kích thước và hình thái của các hạt là rất quan trọng ảnh hưởng đến các đặc tính của chúng, kích thước các hạt polysaccharide có thể được điều chỉnh trong quá trình tổng hợp để tận dụng các hiệu ứng kích thước khác nhau. Ngoài ra, kích thước hạt cũng rất quan trọng trong việc nhắm mục tiêu và tăng cường tính thấm, sự lưu giữ tại vị trí đích [98]. Hơn

nữa, để phân phối thuốc qua đường miệng, sự thâm thấu thuốc ở hệ tiêu hóa (từ dạ dày xuống ruột) sẽ tăng lên khi giảm kích thước hạt của hệ phân phối thuốc và lý tưởng là các hạt có đường kính từ 50-300 nm [92, 99]. Kích thước các hạt nano càng nhỏ sẽ tăng khả năng bám vào các vi nhung mao của đường tiêu hóa, làm tăng thời gian cư trú của hệ phân phối thuốc [107].

Khả năng ứng dụng của các hạt vi nang carrageenan: Các phân tử có hoạt tính sinh học với bản chất là protein như lectin, insulin, cyclosporine, các hormone, ... hiện đang được quan tâm nghiên cứu để sử dụng qua đường uống. Tuy nhiên có những rào cản quan trọng trong việc tạo ra một hệ thống hiệu quả để cung cấp các chất này qua đường miệng, bao gồm khả dụng sinh học đường uống thấp do sự phân hủy của chúng trong môi trường dạ dày có tính acid cao, sự hiện diện của các enzyme tiêu hóa và tính thấm thấp của các đại phân tử này qua biểu mô ruột [100, 101, 102], vì vậy, cần có chất mang thích hợp để đóng gói và vận chuyển các hợp chất này. Carrageenan là polysaccharide có nguồn gốc từ rong đỏ với các đặc tính hóa lý, được tính là một chất mang đầy tiềm năng cho các hệ phân phối lectin và các chất có hoạt tính sinh học. Phân tử carrageenan có gốc sulfate trên có điện tích âm và có thể tương tác đại phân tử đa chức và protein lưỡng tính. Tính chất của carrageenan phụ thuộc vào điều kiện môi trường: khi pH môi trường dưới điểm đẳng điện, do tác động tĩnh điện của tích điện âm và dương nên carrageenan tạo kết tủa; ở pH môi trường trên điểm đẳng điện và có các cation đa hóa trị đóng vai trò là chất liên kết, carrageenan hình thành chất keo ưa nước; tại điểm đẳng điện, sự kết tủa xảy ra thông qua sự kết hợp của các cation đa hóa trị với carrageenan [95]. Mặc dù các carrageenan có khả năng bọc và phân phối thuốc, nhưng cần có chất vận chuyển để đảm bảo sự bọc hiệu quả và sau đó giải phóng thuốc vùng ruột để ngăn chặn sự phóng thích thuốc sớm và thoái hóa trong dạ dày. Biến tính hóa học của carrageenan được coi là một trong những con đường quan trọng nhất để tăng cường các đặc tính của các chất tạo màng sinh học này.

1.4.2. Phương pháp chế tạo hạt vi nang carrageenan

Có nhiều phương pháp để tạo hạt vi nang từ polysaccharide như: phương pháp gel hóa ion; phương pháp lắng đọng giữa các bề mặt hay phương pháp kết tủa nano; phương pháp nhũ tương. Trong đó phương pháp gel hóa ion thường được ứng dụng

để tạo hạt từ các vật liệu polysaccharide tự nhiên như alginate, gellan gum, chitosan và carboxymethyl cellulose để bọc thuốc, chất mang hoạt tính sinh học và thậm chí cả các tế bào [63, 64, 68, 69, 103, 104]. Các polysaccharide - polyelectrolyte tự nhiên có đặc tính là lớp phủ trên lõi thuốc và hoạt động như chất làm chậm tốc độ giải phóng có chứa một số anion trên cấu trúc hóa học của chúng, các anion này tạo nên cấu trúc mạng lưới bằng cách kết hợp với các cation đa hóa trị và tạo ra sự gel hóa bằng cách liên kết chủ yếu với các khối anion. Các hạt hydrogel được tạo bằng cách nhỏ giọt một dung dịch polysaccharide chứa thuốc vào dung dịch nước chứa cation, các cation khuếch tán vào các giọt polysaccharide chứa thuốc, tạo thành một mạng lưới ba chiều của nhóm liên kết ion bất chéo nhau. Các hạt hydrogel có thể được tạo ra bằng cách nhỏ dung dịch nước của dung dịch polyanion vào dung dịch cation thường là KCl và CaCl_2 . Mặc dù đây là một cách đơn giản và nhanh chóng để thu được chất mang thuốc dạng hạt, nhưng phương pháp này có một hạn chế lớn là có thể làm thất thoát thuốc trong quá trình chuẩn bị hạt.

Phương pháp gel hóa ion đã được nghiên cứu tạo hạt vi nang polysaccharide từ rong biển như carrageenan để bọc insulin hoặc lectin [67]. Mặc dù đây là một cách đơn giản và nhanh chóng để thu được hệ phân phối mang chất có hoạt tính dạng hạt, nhưng phương pháp này có một hạn chế lớn là có thể làm thất thoát chất trong quá trình chuẩn bị hạt. Tuy nhiên các hạt hydrogel thường rất dễ thấm và khó kiểm soát được sự giải phóng của các chất có hoạt tính dễ hòa tan. Do đó, các hạt hydrogel này thường được sử dụng trong việc phân phối các chất hoạt tính có độ hòa tan thấp, hoặc được kết hợp với các polyelectrolytes khác như alginate-pectin, alginate-chitosan, alginate-ethyl cellulose và alginate-Eudragit. Vì hầu hết các giọt nhỏ đều được tạo ra bằng kim tiêm nên kích thước hạt tương đối lớn (thường các hạt vi nang ở kích thước micro hoặc milimetre). Hiện nay các hạt vi nang có nguồn gốc từ kappa-carrageenan đang là một lựa chọn hấp dẫn cho các công thức dược phẩm. Tuy nhiên, sự giảm cấp của hạt vi nang trong các môi trường pH thay đổi đang là thách thức với việc giải phóng chất mang hoạt tính hiệu quả. Đã có các nghiên cứu khảo sát quá trình giảm cấp của hạt vi nang, tập trung vào cơ chế trương nở của và các yếu tố ảnh hưởng đến sự phân hủy của lớp carrageenan [105].

1.5. Tình hình nghiên cứu trên thế giới và ở Việt Nam liên quan đến nội dung nghiên cứu luận án

1.5.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Từ nghiên cứu đầu tiên của Boyd và cộng sự, 1966 [106] chứng minh lectin có trong rong biển, đến nay đã có rất đã có nhiều công bố về kết quả sàng lọc lectin từ rong biển. Trong đó các nghiên cứu về lectin từ rong đỏ đang rất được quan tâm, chúng chứa các hoạt tính có tiềm năng ứng dụng trong y học (Bảng 1.6).

Bảng 1.6. Tiềm năng y sinh của các lectin từ một số loài rong đỏ.

Rong đỏ	Tiềm năng y sinh	Tài liệu tham khảo
<i>Amansia multifida</i>	Kháng đau (cảm thụ)	Neves và cs (2007) [84]
<i>Eucheuma serra</i>	Kháng cúm	Sato và cs (2015) [14]
	Kháng ung thư	Sugahara và cs (2001) [13]
		Hayashi và cs (2012) [87]
	Kháng khuẩn	Liao và cs (2003) [107]
<i>Griffithsia sp.</i>	Kháng virus HIV	Mori và cs (2004) [31]
	Kháng virus viêm gan C	Meuleman và cs (2011) [32]
	Kháng virus corona SARS	O'Keefe và cs (2010) [34]
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	Kháng cúm	Sato và cs (2011) [16]
		Sato và cs (2015) [14]
	Kháng virus HIV	Hirayama và cs (2016) [17]
<i>Kappaphycus striatus</i>	Kháng ung thư	Le Dinh Hung và cs (2021) [8]
<i>Pterocladia capillacea</i>	Kháng đau, kháng viêm	Abreu và cs (2012) [108]
<i>Solieria filiformis</i>	Kháng đau, kháng viêm	Abreu và cs (2012) [108]
	Kháng khuẩn	Holanda và cs (2005) [83]
	Kháng ung thư	Chaves và cs (2018) [35]

Các lectin hiện đang được quan tâm nghiên cứu để sử dụng qua đường uống. Tuy nhiên, chúng có thể bị phân hủy trong môi trường dạ dày có tính acid cao, có mặt các enzyme tiêu hóa [100, 102]. Cần có chất mang thích hợp để đóng gói và vận chuyển các hợp chất này, các polysaccharide tự nhiên là ứng cử đầy tiềm năng làm hệ phân phối các chất mang hoạt tính sinh học.

Bảng 1.7. Các hệ chất mang có thành phần kappa-carrageenan và lĩnh vực ứng dụng đã được công bố.

Thành phần vật liệu	Ứng dụng
Hạt vi cầu trên nền dẫn xuất của chitosan và carrageenan [51]	Mang vitamin A, C , E ứng dụng trong mỹ phẩm
Hạt κ -carrageenan hydrogel [65]	Hệ phân phối curcumin ứng dụng trong thực phẩm, dược phẩm
κ -Car-Cur [109]	Hệ phân phối curcumin kháng ung thư
CM κ -CG/Cs hydrogels [68]	Băng vết thương, kỹ thuật mô
κ -CG/Cs lớp phủ nano [110]	Kiểm soát sự giải phóng của các chất mang hoạt tính sinh học
κ -CG/Na CMC (IPN) dạng hạt [111]	Hệ phân phối thuốc
Màng Alginate/ κ -CG composite [112]	Hệ phân phối thuốc
Bovine serum albumin/ κ -CG phức polymer [113]	Tạo microcapsule, vật liệu sinh học
κ -CG/poly vinyl pyrrolidone PVP)/polyethylene glycol [114]	Hạt vi nang trong ứng dụng y sinh
κ -CG/polydextrose [115]	Công nghiệp thực phẩm, dược phẩm
Polylysine/ κ -CG/pectin phức [116]	Hệ thống phân phối kháng sinh cho thực phẩm

Cs: chitosan; CG-carrageenan; CMC: carboxymethyl cellulose

Carrageenan là một polysaccharide có nguồn gốc từ rong đỏ, được ứng dụng rộng rãi trong công nghệ thực phẩm và y dược nhờ khả năng tạo gel và tính tương thích sinh học cao. Các nghiên cứu đã cho thấy tiềm năng của carrageenan như một tá dược và nền chất mang trong các hệ phân phối hoạt chất sinh học dưới dạng hạt nano, vi nang, vi cầu và hydrogel [52], được tóm tắt trong bảng 1.7. Các hạt hydrogel từ κ -carrageenan đã được phát triển để vận chuyển curcumin, hỗ trợ điều trị ung thư thông qua cơ chế gel hóa ion [65, 109]. Trong lĩnh vực mỹ phẩm, κ -carrageenan kết hợp với dẫn xuất của chitosan đã được sử dụng để tạo vi cầu mang vitamin A, C, E bằng phương pháp nhũ hóa - gel hóa ion, góp phần nâng cao hiệu quả phân phối và ổn định hoạt chất [51]. Bên cạnh đó, sự kết hợp κ -carrageenan với các polyme tự nhiên và tổng hợp khác đã mở rộng phạm vi ứng dụng: với chitosan tạo lớp phủ nano nhiều lớp bằng phương pháp layer-by-layer kiểm soát phóng thích hoạt chất [110]; với carboxymethyl cellulose hình thành hạt IPN thông qua gel hóa ion tạo liên kết chéo cho hệ phân phối thuốc có kiểm soát [111]; với alginate tạo màng composite [112]; với protein (BSA) thông qua đồng tụ điện tích để bảo vệ và ổn định hoạt chất [113]; với polyvinyl pyrrolidone, PEG và hạt nano bạc bằng phương pháp dung dịch tạo màng nhằm phát triển vật liệu kháng khuẩn y sinh [114]. Trong công nghệ thực phẩm, carrageenan còn được ứng dụng để tạo hạt vi nang chứa omega-3 bằng phương pháp sấy phun, giúp kiểm soát phóng thích trong quá trình tiêu hóa [115], đồng thời tương tác với các hợp chất kháng khuẩn tự nhiên như ϵ -polylysine và các polysaccharide khác, qua đó nâng cao hiệu quả bảo quản thực phẩm [116].

Các nhà khoa học đã nghiên cứu biến đổi hóa học carrageenan, để tạo hợp chất có hiệu quả cao trong phân phối thuốc, ngăn sự giải phóng chất có hoạt tính sinh học sớm, hoặc bị thoái hóa khi vận chuyển thuốc qua dạ dày. Có thể carboxymethyl hóa carrageenan, gắn thêm vào carrageenan nhóm $-\text{COOH}$, dẫn xuất của carrageenan có tiềm năng ứng dụng trong các hệ phân phối qua đường uống [67, 68, 117]. Các công trình nghiên cứu về carboxymethyl carrageenan đã được thực hiện: các báo cáo về đặc tính của carboxymethyl-kappa-carrageenan [39, 67]; nghiên cứu về hoạt tính sinh học, kháng oxy hóa, kháng khuẩn của carboxymethyl-kappa-carrageenan [69]; nghiên cứu carboxymethyl-kappa-carrageenan phân phối các chất có hoạt tính sinh học qua đường ruột [68].

1.5.2. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam

Việt Nam có một hệ thực vật rong biển đa dạng và phong phú, đây là nguồn lợi để khai thác những hợp chất có hoạt tính sinh học trong đó có lectin. Đã có nhiều công bố tách chiết và phân tích các lectin từ rong đỏ từ TS. Lê Đình Hùng và cộng sự (2009, 2011, 2012, 2015, 2020, 2021) tại Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang, Khánh Hòa như: lectin KSA-1, KSA-2, KSA-3 và KSL được tinh chế từ *Kappaphycus striatus* và lectin KAA-1 and KAA-2 được tinh chế từ *K. alvarezii*, lectin EDA-2 tinh chế từ *E. denticulatum*, lectin BGL được tinh chế từ rong *B. gelatinus*) [1-9]. Nghiên cứu cấu trúc và đặc tính các lectin từ rong đỏ cho thấy chúng có tính liên kết N-glycan dạng high-mannose và có cấu trúc tương tự với các đặc tính liên kết N-glycan dạng high-mannose và cấu trúc của các lectin kháng ung thư và virus (HIV, SARS-CoV và influenza-cúm) đã được công bố trên thế giới [13, 14, 16, 17, 33, 35, 118].

Phân tích các lectin KSL, EDA-2, KSA-2, KAA-1, KAA-2 có cấu trúc tương tự cấu trúc của các lectin ESA-2 [18], và lectin SfL-1, SfL-2 [35] đã được thông báo. Từ các công bố cho thấy các rong đỏ đang được nuôi trồng ở Việt Nam, *K. alvarezii*, *K. striatus* và *E. denticulatum*, hứa hẹn là một nguồn lectin giá trị có tiềm năng trong y học.

Hiện nay nguồn rong đỏ Carrageenophyte gồm *K. alvarezii*, *K. striatus*, *E. denticulatum* và *Betaphycus gelatinus* ở Việt Nam là nguồn carrageenan phong phú. Có nhiều công trình nghiên cứu quy trình thu nhận và tinh chế carrageenan từ rong đỏ, chủ yếu cho các ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm như: Phạm Hồng Hải và cộng sự (2007); Trần Thị Luyến (2010); Lê Thị Thúy Hằng và cộng sự (2013), Trần Đình Toại và cộng sự (2013); Ngô Ngọc Trinh và cộng sự (2015) [22-26]. Các dạng carrageenan từ rong đỏ này cũng đã được nghiên cứu cấu trúc và tính chất hóa lý [7, 39, 119]. Tuy nhiên hầu như chưa có công bố nào về nghiên cứu các dẫn xuất từ carrageenan như carboxymethyl-kappa-carrageenan và khả năng ứng dụng của nó trong thực phẩm hoặc y học. Việc nghiên cứu tạo hạt vi nang từ dẫn xuất carboxymethyl-carrageenan bọc lectin từ rong đỏ Carrageenophyte rất thiết thực, tận dụng nguồn bã rong sau khi chiết lectin tạo chất mang có tương thích sinh học, bảo

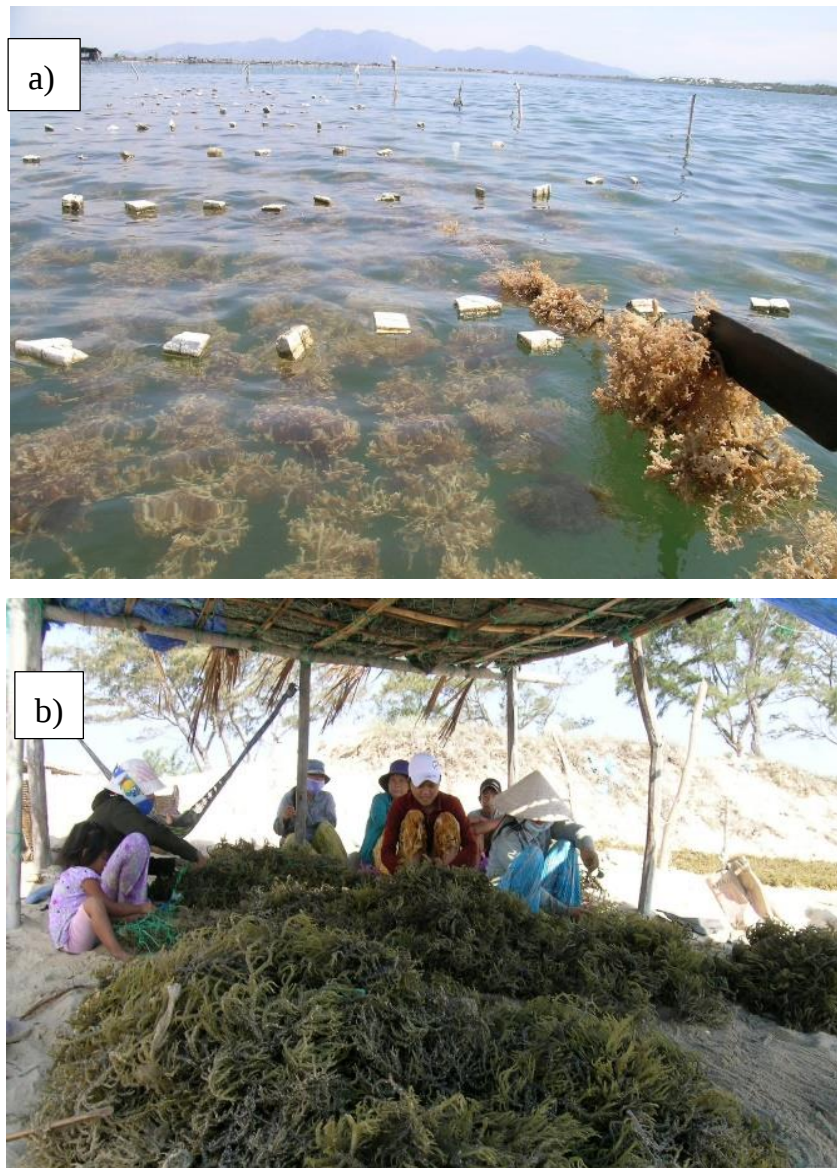
vệ các hoạt tính của lectin khi sử dụng qua môi trường có pH thay đổi như hệ tiêu hóa, và có khả năng tăng thời lưu trú, giải phóng tại các vị trí đích.

Kết luận: Dựa trên các công trình nghiên cứu về thu nhận và tinh chế lectin và carrageenan từ rong đỏ đã được công bố trong và ngoài nước, nghiên cứu sinh tiến hành thu nhận và tinh chế tích hợp lectin và carrageenan từ nguồn rong đỏ Carrageenophyte được nuôi trồng và thu hoạch tự nhiên tại vùng biển miền Trung Việt Nam. Việc nghiên cứu tạo hạt vi nang từ dẫn xuất carboxymethyl-carrageenan bọc lectin từ rong đỏ rất thiết thực, các hạt vi nang có đặc tính tương thích sinh học, bảo vệ các hoạt tính của lectin khi sử dụng qua môi trường có pH thay đổi như hệ tiêu hóa, và có khả năng tăng thời lưu trú, giải phóng tại các vị trí đích.

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu của luận án là carrageenan và lectin được thu nhận và tinh chế từ hai rong đỏ: *Kappaphycus striatus* và *Betaphycus gelatinus*. Các rong được nuôi trồng và thu hoạch tự nhiên ở miền trung Việt Nam, Hình 2.1 nuôi trồng rong đỏ *K. striatus* ở Vịnh Vân phong, Khánh Hòa. Sau khi thu hoạch, rong được rửa sạch bằng nước ngọt để loại bỏ tạp chất và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.



Hình 2.1. a) Vùng nuôi trồng và b) Thu hoạch rong *Kappaphycus striatus* tại vịnh Vân Phong, Khánh Hòa.

Rong đỏ *Kappaphycus striatus* (*Kappaphycus striatum*) dòng Sacol nâu thuộc loài (F. Schmitz) Doty ex P. C. Silva, 1996. Người định danh: TS. Lê Như Hậu và mẫu được lưu giữ trong bộ sưu tập rong biển của Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang nay là Viện Hải dương học (Hình 2.2).



Hình 2.2. Rong *Kappaphycus striatus*: a) rong tươi, b) rong khô, c) tiêu bản (Ký hiệu tiêu bản: Nitra A24.9.02)

Rong đỏ *Kappaphycus striatus* trong luận án này được thu thập tại Vịnh Vân Phong (120°29' Bắc, 109°10' Đông), tỉnh Khánh Hòa, Việt Nam vào tháng 08/2020 đến 03/2021.

Rong đỏ *Betaphycus gelatinus* (*Eucheuma gelatinae*) loài (Esper) Doty ex P. C. Silva, 1996. Người định danh: TS. Lê Như Hậu và mẫu được lưu giữ trong bộ sưu tập rong biển của Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang nay là Viện Hải dương học (Hình 2.3).



Hình 2.3. Rong *Betaphycus gelatinus*: a) rong tươi, b) rong khô, c) tiêu bản (Ký hiệu tiêu bản: Nitra A6.2.02)

Rong đỏ *Betaphycus gelatinus* trong luận án này được thu thập tại tỉnh Ninh Thuận (11°35' Bắc, 109°02' Đông) nay là tỉnh Khánh Hòa, Việt Nam trong khoảng thời gian tháng 4 đến tháng 6 năm 2022.

Thời gian thực hiện luận án: 01/2021-12/2024 tại Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang nay là Viện Hải dương học.

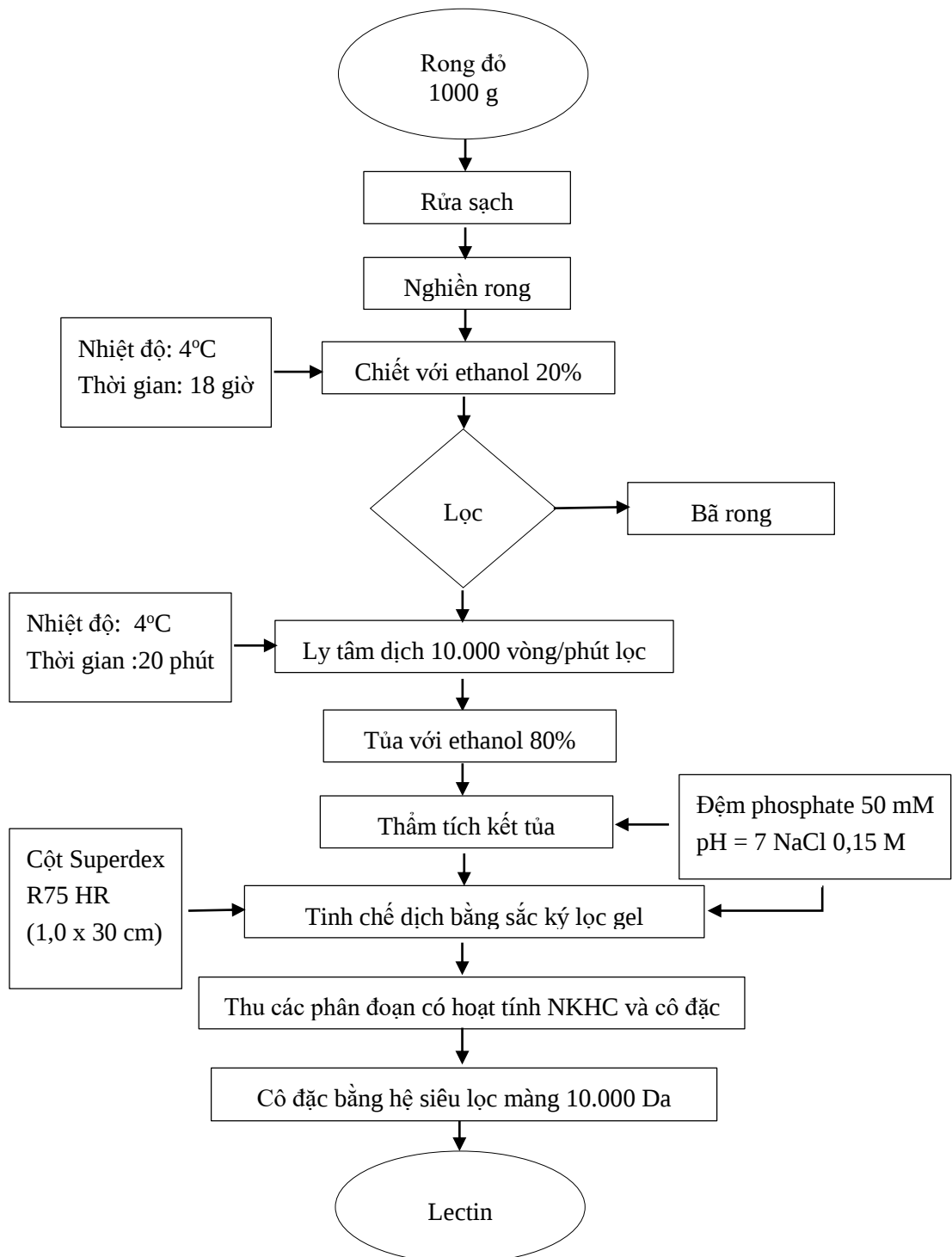
Hóa chất sử dụng: NaOH, KOH, HCl, H₂SO₄, ClCH₂COOH, Methanol, Ethanol, 2-propanol, CH₃COOH, Na₂SO₄, BaCl₂, NaHCO₃, NaH₂PO₄. 2H₂O, Na₂HPO₄. 12H₂O (Trung quốc); acid L-ascorbic, rhodizone natri, acetal, resorcinol, D-fructose (Merck, Đức). Các monosaccharide và yeast mannan từ Nakarai Chemical (Kyoto, Japan). Transferrin, fetuin, porcine thyroglobulin, bovine submaxillary mucin, porcine stomach mucin và 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl được mua từ Sigma (St. Louis, MO). Bovine thyroglobulin của WAKO (Osaka, Japan). Các dẫn xuất asialo-transferrin, asialo-fetuin và asialo-porcine stomach mucin được điều chế bằng cách thủy phân transferrin, fetuin và porcine stomach mucin với 0,05 M HCl trong 1 giờ ở 80 °C, sau đó thẩm tích với dung dịch NaCl 0,15 M qua đêm để loại acid thừa.

2.2. Chiết tách, tinh chế lectin và carrageenan từ rong đỏ

2.2.1. Chiết tách, tinh chế và xác định hàm lượng protein của lectin

Đầu tiên lectin được chiết từ rong đỏ, sau đó chiết polysaccharide từ bã rong. Lectin được chiết và tinh chế theo phương pháp của Lê Đình Hùng và cộng sự, 2011, 2015a [3, 5]. Rong đỏ sau khi thu hoạch được rửa sạch để loại tạp chất và sinh vật bám, 1000 g rong đỏ tươi được nghiền đồng nhất và được chiết với ethanol 20%, giữ ở 4°C trong 18 giờ với sự khuấy đảo liên tục. Lọc thô hỗn hợp qua túi vải để thu dịch lọc thô, thu hồi bã rong để chiết carrageenan. Ly tâm dịch lectin lọc thô ở 10.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C để thu kết tủa dịch lọc với ethanol 80%. Ly tâm thu tủa ở 10.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C và thẩm tích kết tủa trong dung dịch đệm phosphate 50 mM (pH = 7,0) có chứa 0,15 M NaCl. Dịch trong túi thẩm tích được tinh chế bằng sắc ký lọc gel trên cột Superdex R 75 HR (1,0 x 30 cm) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) và được rửa giải với tốc độ 1 mL/phút bằng dung dịch đệm photphat 50 mM (pH = 7,0) có chứa NaCl 0,15 M. Thu mỗi phân đoạn 1 mL và xác định hoạt tính ngưng kết hồng cầu của tất cả các phân đoạn, thu các phân đoạn có hoạt tính và cô đặc bằng hệ cô đặc siêu lọc (ultrafiltration) dùng màng 10.000 Da và thẩm tích dịch cô đặc trong nước cất và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng. Các phân đoạn rửa giải được quan sát cho độ hấp thụ ở 280 nm cho protein và cho hoạt tính ngưng kết hồng cầu với huyền phù 2% thể tích (v/v) của hồng cầu máu thỏ đã được xử lý bằng enzyme trypsin. Hình 2.4. mô tả sơ đồ quá trình chiết tách lectin từ

rong đỏ. Bã rong được phơi khô có dạng bột, được giữ ở -20°C , sau đó dùng để chiết carrageenan bằng phương pháp chiết tự nhiên hoặc xử lý kiềm.



Hình 2.4. Sơ đồ quá trình chiết lectin từ rong đỏ.

Xác định hàm lượng protein của lectin từ rong đỏ bằng phương pháp của Lowry và cộng sự, 1951 [120], dùng albumin huyết thanh bò (BSA – Bovine serum albumin) làm chất chuẩn. Phương pháp dựa trên cơ sở protein có khả năng phản ứng với thuốc thử Folin tạo phức chất có màu xanh da trời. Cường độ màu của dung dịch

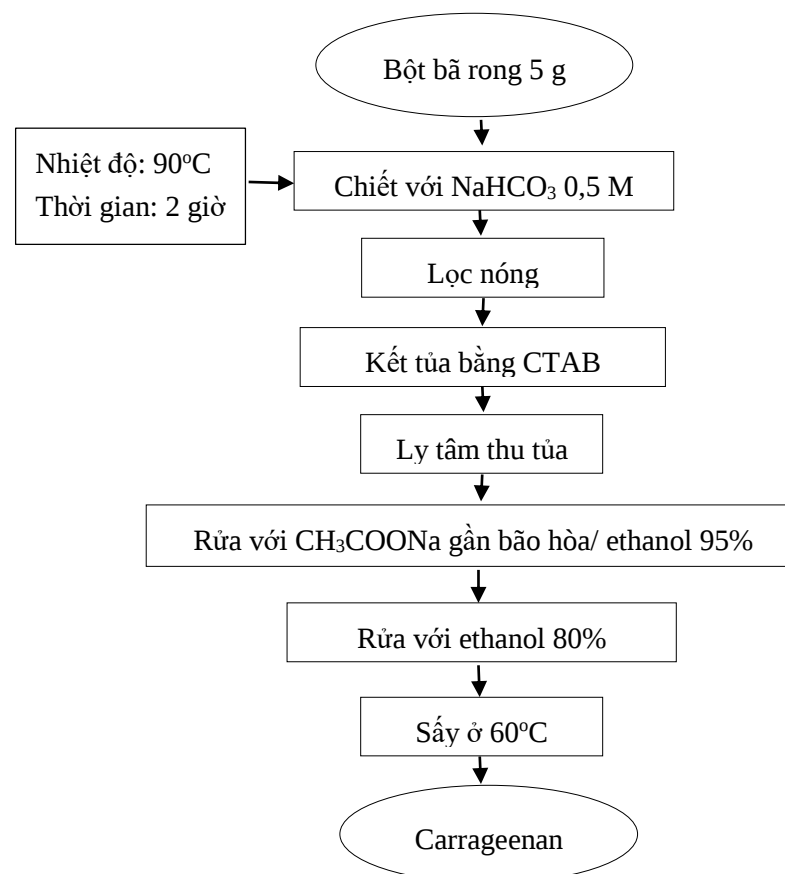
mẫu được đo bằng thiết bị đo quang phổ UV-Vis ở bước sóng 750 nm. Cường độ màu của dung dịch phân tích tỷ lệ thuận với nồng độ protein trong một phạm vi nhất định. Dựa vào đồ thị protein chuẩn (BSA) có thể xác định được hàm lượng protein ở nồng độ vài chục μg . (Đường chuẩn và phương pháp ở phần phụ lục 1, 2).

Kiểm tra độ tinh sạch và xác định trọng lượng phân tử lectin bằng phương pháp điện di SDS-PAGE: tiến hành chạy điện di các dịch lectin thu được qua từng bước tinh sạch trên gel polyacrylamide nồng độ 12,5 % với dòng điện ổn định có hiệu điện thế 100V. Thang protein chuẩn là những protein có trọng lượng phân tử từ 11 đến 190 kDa.

2.2.2. Chiết tách và tinh chế carrageenan

Từ bã rong thu được sau khi chiết lectin, carrageenan được chiết xuất theo phương pháp chiết tự nhiên của Craigie và Leigh, 1978 [20] và chiết xử lý với dung dịch kiềm của Ohno, 1994 [121], tham khảo các nghiên cứu đã công bố [22-26].

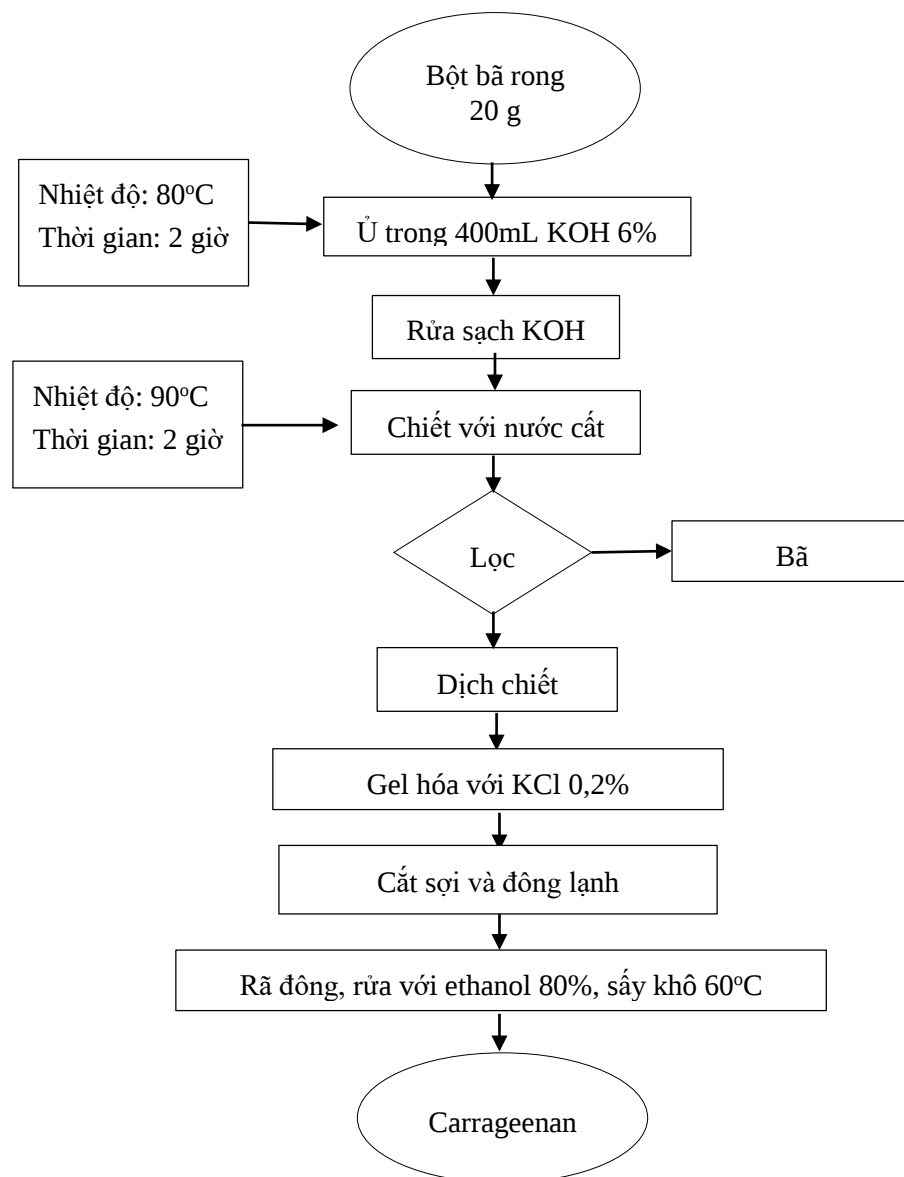
Phương pháp chiết carrageenan tự nhiên:



Hình 2.5. Sơ đồ quy trình chiết tự nhiên carrageenan từ bã rong.

Bột bã rong khô (5g) được chiết tách trong NaHCO_3 0,5 M ở 90°C với tỉ lệ 1÷100 về khối lượng (w/w) trong 2 giờ, hỗn hợp được khuấy mạnh. Hỗn hợp được lọc nóng chân không bằng chất trợ lọc Celite. Dịch lọc được kết tủa bằng cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 2% trong nước. Kết tủa được thu hồi bằng cách ly tâm. Bột được rửa ba lần bằng dung dịch CH_3COONa bão hòa trong ethanol 95% để loại bỏ cặn, và ba lần nữa bằng ethanol 80% để loại bỏ CH_3COONa . Carrageenan được thu hồi và sấy khô ở 60°C trong 24 giờ (Hình 2.5).

Phương pháp chiết carrageenan từ bã rong xử lý kiềm:



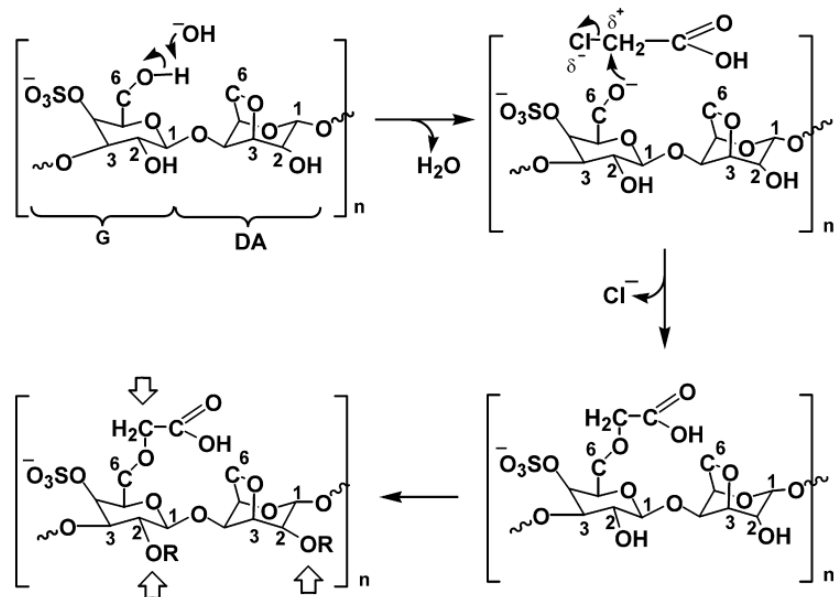
Hình 2.6. Sơ đồ quy trình chiết carrageenan từ bã rong xử lý kiềm.

Bột bã rong khô sau khi chiết lectin (20 g) được ủ trong 400 mL KOH 6% ở 80°C trong 2 giờ. Bã rong sau đó được rửa và chiết trong 400 mL nước cất ở 90°C trong 2 giờ. Sau đó, dung dịch được lọc và dịch chiết được gel hóa bằng KCl 0,2%. Cắt sợi gel, đông lạnh qua đêm rồi rã đông, rửa với ethanol 80% ba lần và sấy khô ở 60°C đến khối lượng không đổi. Hình 2.6. mô tả sơ đồ quá trình chiết tách carrageenan xử lý kiềm từ bã rong sau khi chiết tách lectin.

2.3. Chế tạo hạt vi nang carrageenan-lectin và đánh giá sự giải phóng lectin từ hạt vi nang carrageenan-lectin

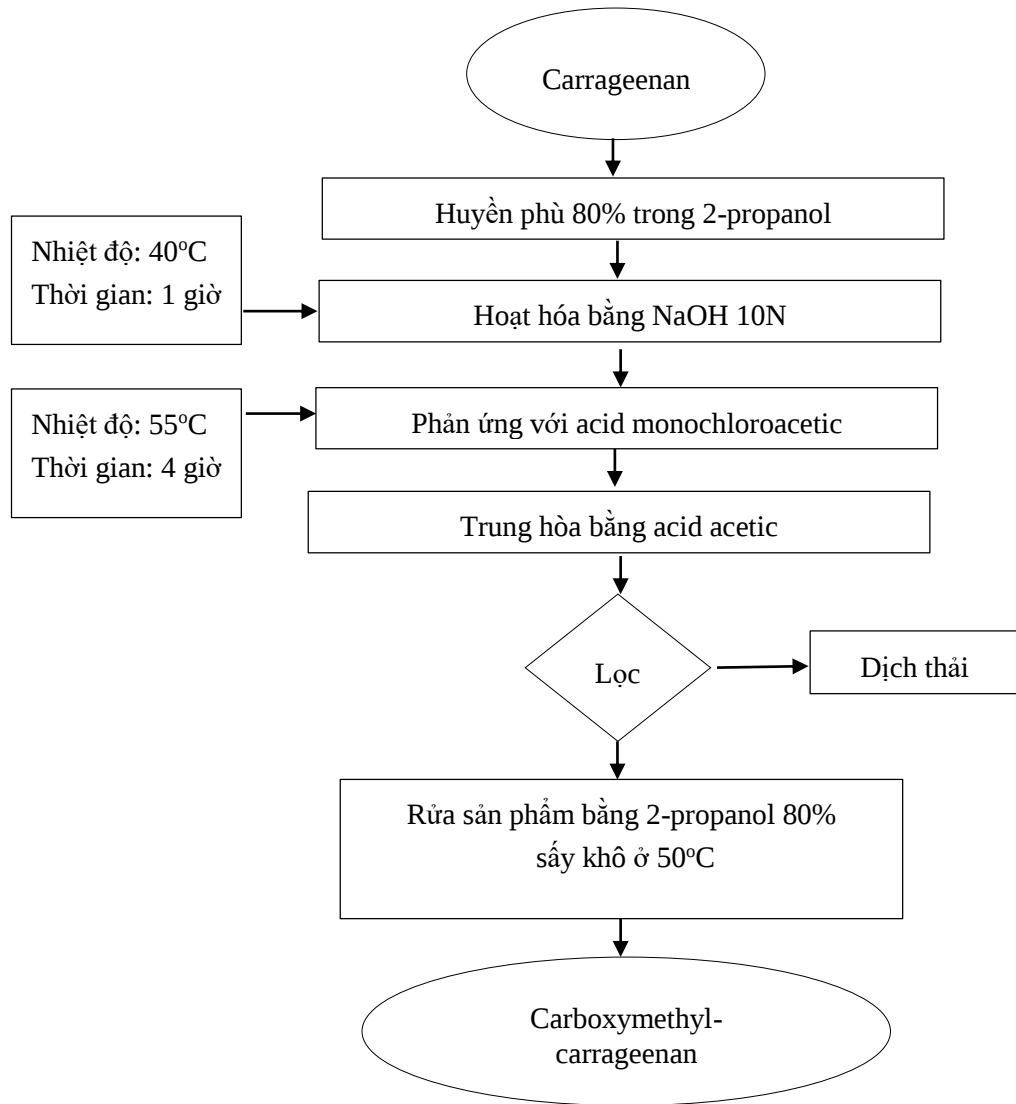
2.3.1. Tổng hợp dẫn xuất carboxymethyl-carrageenan

Quá trình carboxymethyl hóa của carrageenan sử dụng quy trình tổng hợp ether của Williamson [67, 68], phản ứng gồm 2 bước mô tả ở Hình 2.7. Phản ứng xảy ra với một kiềm mạnh chẳng hạn như natri hydroxide, khử proton của nhóm hydroxyl trong kappa-carrageenan để tạo thành các alkoxide, do đó làm tăng tính nucleophilin của chúng. Các nhóm carboxymethyl sau đó được hình thành trong phản ứng giữa các carrageenan alkoxide và acid monochloroacetic [68].



Hình 2.7. Tổng hợp carboxymethyl κ -carrageenan, DA là 3,6-anhydro- α -D-galactopyranose; G là β -D-galactopyranose-4-sulfate. Các số từ 1 đến 6 hiển thị số carbon. R: CH_2COOH hoặc H; n: số đơn vị lặp lại; mũi tên: các vị trí có thể có sự carboxymethyl hóa.

Quy trình tổng hợp: đầu tiên carrageenan (10 g) từ rong đỏ *K. striatus* được tạo huyền phù trong 200 mL 80% (w/v) 2-propanol trong bình phản ứng thủy tinh 3 cổ dung tích 1 L và khuấy ở nhiệt độ phòng. Sau đó, từ từ thêm từng giọt 20 mL NaOH 10 N bằng buret trong khoảng thời gian 15 phút. Khuấy được giữ ở 40°C trong 1 giờ nữa để hoạt hóa kiềm carrageenan và sau đó thêm acid monochloroacetic với các tỷ lệ mol khác nhau (giữa acid monochloroacetic và carrageenan) được thêm từng giọt vào hỗn hợp phản ứng. Hỗn hợp tiếp tục khuấy mạnh trong 4 giờ ở 55°C. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được trung hòa bằng acid acetic đậm đặc, lọc sản phẩm bằng phương pháp lọc chân không. Rửa sản phẩm 3 lần bằng 80% (w/v) 2-propanol và sấy khô ở 50°C (Hình 2.8).



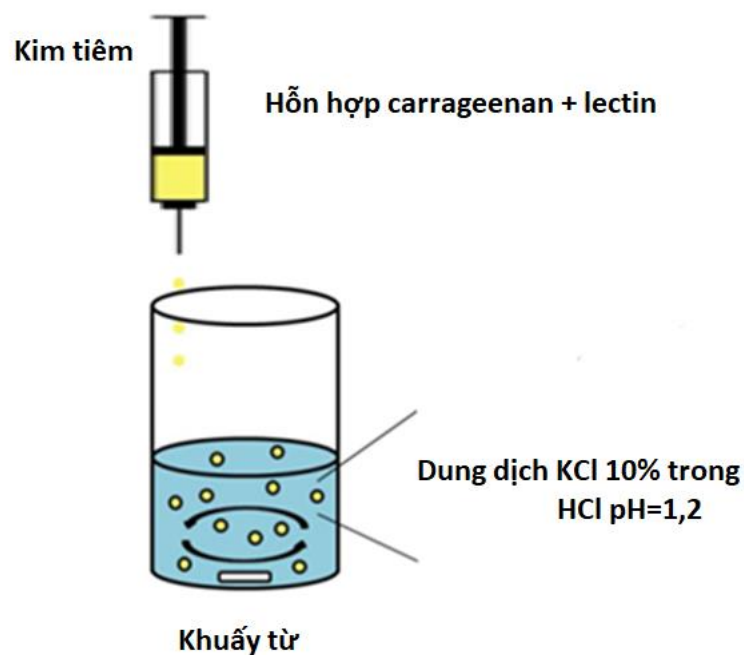
Hình 2.8. Sơ đồ quy trình tổng hợp carboxymethyl-carrageenan.

Kappa-carrageenan (KC) được xử lý trong cùng điều kiện mà không sử dụng acid monochloroacetic (MCA) dùng làm đối chứng và được ký hiệu là KC-0/1. Các tỷ lệ mol khác nhau của MCA (từ 1 mol đến 5 mol)/1 mol disaccharide của kappa-carrageenan đã được sử dụng trong nghiên cứu này và các dẫn xuất của chúng được ký hiệu là CMKC-1/1, CMKC-2/1, CMKC-3/1, CMKC-4/1 và CMKC-5/1.

Trước khi xác định các đặc tính và cấu trúc, carrageenan và các dẫn xuất của chúng được tinh chế lại bằng phương pháp lọc sử dụng màng Spectrapor có ngưỡng MW là 12.000 - 14.000 Da, với nước Milli-Q trong 24 giờ và thay nước thường xuyên. Sau khi lọc, mẫu được lọc bằng đầu lọc syringe (kích thước lỗ lọc 0,45 μm) và kết tủa bằng ethanol tuyệt đối, sấy khô ở 60°C và nghiền thành bột.

2.3.2. Chế tạo hạt vi nang carrageenan-lectin

Sử dụng phương pháp gel hóa ion theo O. Sipahigil và cộng sự, 2001 [64] và K.H. Leong và cộng sự, 2011b [73] để tạo hạt vi nang mang lectin, được mô tả ở hình 2.9 [104].



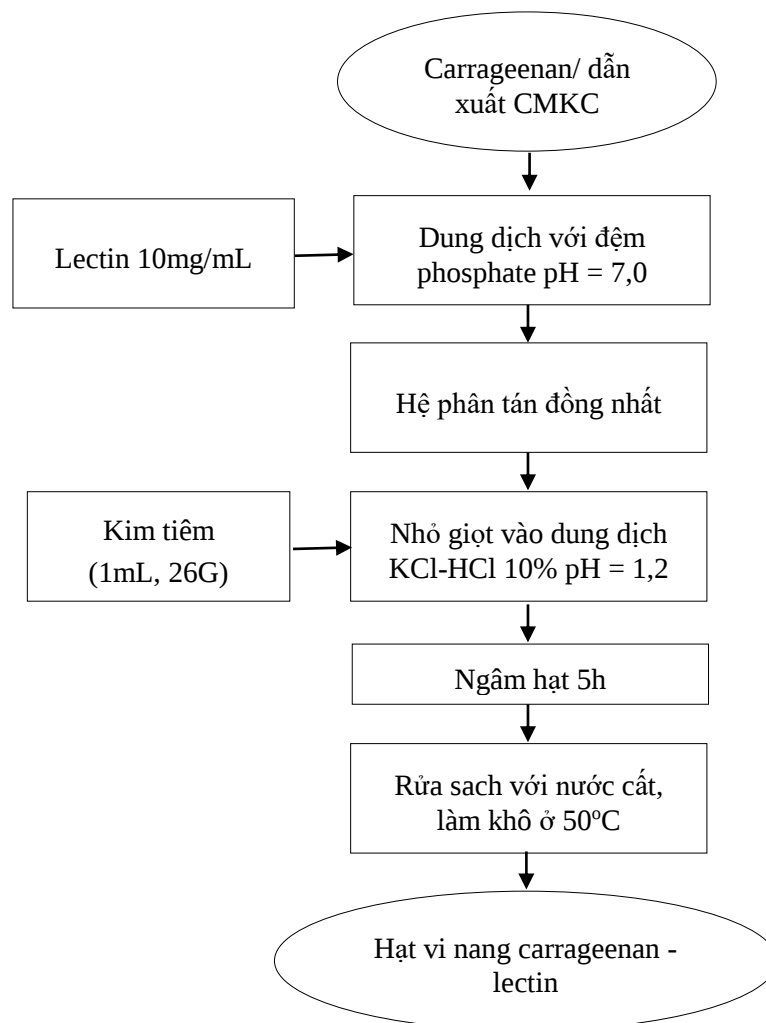
Hình 2.9. Mô tả phương pháp gel hóa ion.

Quy trình chế tạo hạt vi nang carrageenan-lectin/ dẫn xuất CMKC-lectin: Hòa tan hỗn hợp carrageenan và dẫn xuất carboxymethyl-carrageenan ở nồng độ khác nhau (2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4%) trong 4mL đệm phosphate pH = 7,0 ở nhiệt độ phòng.

Thêm 1mL lectin 10 mg/mL vào hỗn hợp và trộn đều ở nhiệt độ phòng để tạo một hệ phân tán đồng nhất. Dùng syringe (1 mL, 26G) với kích thước đường kính trong của đầu kim từ 0,4 - 0,5 mm để hút hỗn hợp và nhỏ từng giọt vào 20 mL dung dịch KCl - HCl 10% pH = 1,2, hạt được ngâm trong dung dịch 5 giờ, sau đó hạt được rửa nhiều lần với nước cất. Thu hồi hạt vi nang đã đóng gói lectin, làm khô ở 50°C và giữ ở 4°C. Sơ đồ quy trình tạo hạt được mô tả ở hình 2.10.

Để xác định hiệu suất bọc lectin của hạt carrageenan-lectin và cần xác định hàm lượng lectin trong dịch thải sau khi tạo hạt. Sử dụng phương pháp định lượng protein bằng phương pháp quang phổ UV-Vis tại bước sóng 750 nm. Hiệu suất bọc lectin của hạt nang được tính theo công thức (2.1) [73].

$$H = \frac{\text{lectin đưa vào (mg)} - \text{lectin tự do trong dịch thải (mg)}}{\text{lectin đưa vào (mg)}} \times 100\% \quad (\text{PT 2.1})$$



Hình 2.10. Sơ đồ quy trình tạo hạt carrageenan-lectin, CMKC-lectin.

2.3.3. Xác định sự giải phóng lectin từ hạt vi nang carrageenan-lectin

Đánh giá mức độ giải phóng lectin từ hạt vi nang carrageenan-lectin bằng phương pháp UV-Vis đo độ hấp thụ quang của protein ở bước sóng 280 nm của Harold Edelhoch, 1967 [122]. Hạt vi nang carrageenan - lectin 40 mg được ngâm trong 10mL dung dịch có pH = 1,2 (tương tự pH ở dạ dày) và pH = 7,4 (tương tự pH ở ruột), khuấy trộn hỗn hợp ở 37°C trong 30, 60, 120, 180 phút. Ở các mốc thời gian khác nhau dung dịch được đo độ hấp thụ của lectin ở bước sóng 280 nm, sau đó xác định hàm lượng lectin được giải phóng. Hàm lượng lectin giải phóng được xác định bằng tỷ lệ protein trong dịch ngâm hạt tại thời điểm xác định so với hàm lượng protein có trong hạt vi nang ban đầu.

2.4. Xác định thành phần hóa học và đặc trưng cấu trúc của carrageenan, carboxymethyl-carrageenan và hạt vi nang carrageenan – lectin

2.4.1. Xác định thành phần hóa học của carrageenan, carboxymethyl-carrageenan

Xác định trọng lượng phân tử trung bình: Trọng lượng phân tử (MW) của carrageenan và các dẫn xuất carboxymethyl hóa của chúng được xác định bằng sắc ký thẩm thấu gel (Shimadzu LC-20AD, Nhật Bản), sử dụng máy dò chỉ số khúc xạ và cột GPC/SEC Suprema Ultrahigh (8,0 mm × 300 mm, Đức). Bơm 20 µL dung dịch 0,2% của mỗi mẫu lên cột và rửa giải bằng LiNO₃ 0,1 M với tốc độ dòng 1,0 mL/phút ở 40°C. Dextran với trọng lượng phân tử khác nhau được sử dụng làm chất chuẩn.

Xác định hàm lượng 3,6-anhydro-D-galactose: Hàm lượng 3,6-Anhydrogalactose trong polysaccharide được xác định bằng phương pháp resorcinol của Yappe và Arsenault, 1965 [123] sử dụng D-fructose làm chất chuẩn. Quy trình tổng quát: lấy 2 mL mỗi dung dịch D-fructose ở các nồng độ khác nhau, polysaccharide (100 µg/mL), và nước cất được cho vào một ống nghiệm và được đầy bằng một viên bi thủy tinh. Các ống này được đặt trong bể nước đá, và thêm vào mỗi ống 10 mL thuốc thử resorcinol (9 mL resorcinol 1,36 mM, 1 mL acetal 2,78 mM và 100 mL HCl đậm đặc). Các thành phần đã được trộn và làm lạnh trong bể nước đá ít nhất 3 phút. Các ống này được đặt trong nồi cách thủy 20°C trong 4 phút và sau đó được gia nhiệt trong 10 phút ở 80°C. Sau đó, nó được làm lạnh trong 1,5 phút trong

bề nước đá, và độ hấp thụ được đo ở bước sóng 555nm, mẫu tránh tiếp xúc với ánh sáng mạnh. Hàm lượng 3,6-anhydrogalactose được xác định so với chuẩn D-fructose và nhân lên với giá trị 1,087. Các thí nghiệm được thực hiện ba lần và được đưa ra dưới dạng giá trị trung bình cho mỗi dung dịch thử nghiệm.

Xác định hàm lượng sulfate: Hàm lượng sulfate được xác định theo phương pháp Terho và Hartiala, 1972 [124] sử dụng Na_2SO_4 làm chất chuẩn. Một cách tổng quát, lấy 0,5 mL mỗi dung dịch chuẩn Na_2SO_4 ở các nồng độ khác nhau (4 – 24 μg sulfate/mL), polysaccharide (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), và nước cất được cho vào ống nghiệm và thêm vào mỗi ống 2,0 mL ethanol tuyệt đối, trộn đều. Tiếp theo, 1 mL dung dịch đậm BaCl_2 (gồm 10mL acid acetic 2 M, 2 mL BaCl_2 0,005 M, 8 mL NaHCO_3 0,02 M, và thêm ethanol tuyệt đối đến 100 mL) và 1,5 mL dung dịch natri rhodizionate (gồm 5 mg natri rhodizionate được hòa tan trong 20 mL nước cất, và thêm ethanol tuyệt đối thành 100 mL) được thêm vào mỗi ống và lắc đều. Các ống này được để trong bóng tối 10 phút ở nhiệt độ phòng, và đo độ hấp thụ ở bước sóng 520 nm trong 30 phút. Các thí nghiệm được thực hiện ba lần và tính kết quả trung bình cho mỗi dung dịch thử nghiệm. (Đường chuẩn sulfate ở Phụ lục 3)

Xác định nhiệt độ tạo gel, nhiệt độ tan gel và độ bền gel: Nhiệt độ tạo gel và nhiệt độ tan gel được xác định theo phương pháp của Craigie và Leigh, 1978 [20] bằng cách sử dụng dung dịch 1,5% carrageenan trong 0,2% KCl.

Nhiệt độ tạo gel được đo bằng cách đổ dung dịch carrageenan nóng (10 mL, w/v) vào ống nghiệm (đường kính 22 mm, cao 142 mm). Sau đó, một nhiệt kế (vạch chia $0,1^\circ\text{C}$) được đưa vào ống nghiệm, dung dịch được để nguội với tốc độ $0,5^\circ\text{C}/\text{phút}$. Các hạt thủy tinh (3,0 mm) được đưa định kỳ lên bề mặt của dung dịch. Nhiệt độ tạo gel được ghi nhận khi hạt không chìm qua gel.

Nhiệt độ tan gel được đo bằng cách đặt một hạt thủy tinh lên bề mặt của gel (mẫu gel được cân bằng qua đêm ở 20°C) trong một ống nghiệm được kẹp trong nồi cách thủy và được làm ấm ở tốc độ $0,5^\circ\text{C}/\text{phút}$. Nhiệt độ tan gel được ghi nhận lại khi hạt thủy tinh chìm xuống đáy. Các thí nghiệm được thực hiện ba lần và tính kết quả trung bình cho mỗi dung dịch thử nghiệm.

Độ bền gel được đo theo phương pháp của Ohno và cộng sự (1994). Dung dịch 1,5% (1,5 g carrageenan trong 100 mL KCl 0,2%) được đun nóng ở 90°C trong 30 phút. Sau đó, dung dịch được đổ vào đĩa petri (đường kính 94 mm và chiều cao 14 mm) và giữ ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Để đo độ bền gel, gel được ủ trước ở 20°C trong 2 giờ và được đo trên máy CR-500DX; Sun Scientific (Nhật Bản) với đường kính piston: 12 mm, độ dày gel: 10 mm và tốc độ bàn: 60 mm/phút. Các thí nghiệm được thực hiện ba lần và kết quả được tính giá trị trung bình.

2.4.2. Xác định đặc trưng cấu trúc của carrageenan, carboxymethyl-carrageenan và hạt vi nang carrageenan-lectin

Phương pháp phổ hồng ngoại FT-IR: Các mẫu kappa - carrageenan và các dẫn xuất của chúng được ghi lại trong phạm vi từ 4000 cm⁻¹ đến 500 cm⁻¹ trên máy quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier SHIMADZU, Nhật Bản.

Phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR: được đo ở 70°C trên máy quang phổ NMR Bruker Avance III (500MHz), nồng độ mẫu carrageenan là 3 mg/mL dung môi D₂O, sử dụng chất nội chuẩn DSS (4,4-dimethyl-4-silapentane-1-acid sulfonic). Sự thay đổi hóa học đã được hiệu chỉnh so với chất nội chuẩn DSS ($\delta = 0,000$ ppm cho cả NMR ¹H và ¹³C).

Xác định độ thay thế DS: Được xác định bằng hai phương pháp:

a) **Phương pháp chuẩn độ điện thế:** Giá trị DS của mỗi mẫu được ước tính từ chuẩn độ điện thế. Các mẫu chính xác 0,2 g được hòa tan trong HCl 0,1 mol/L (50 mL) và chuẩn độ bằng NaOH 0,1 mol/L. Các giá trị pH được đo bằng máy đo pH Hana Instrument (Rumania) khi tăng thêm các thể tích của dung dịch NaOH [70]. Giá trị DS được tính theo phương trình sau:

$$DS = 385A / (1000 - 80A), A = (V_2 - V_1)_{NaOH} \times C_{NaOH} / m_{CMKC} \text{ (PT 2.2)}$$

Trong đó A là tổng của - CH₂COOH và - CH₂COONa trên gram mẫu.

b) **Phương pháp tính tích phân diện tích từ phổ ¹H NMR:** Mức độ thay thế là số nhóm carboxymethyl trung bình trên đơn vị lặp lại carrageenan được xác định như mô tả được công bố trước đây của K.H. Leong và cộng sự, 2011a; Madruga và cộng sự, 2020 [68, 69]. Mức độ carboxymethyl hóa được tính toán từ phổ ¹H NMR bằng cách sử dụng tích phân của các đỉnh proton trong phạm vi dịch chuyển hóa học từ 3,4 ppm

đến 5,2 ppm, theo công thức phương trình PT 2.3 Đây là vùng diễn ra sự thay thế 2-O- và 6-O của đơn vị β -D-galactopyranose-4-sulfate (G) và sự thay thế 2-O của phần 3,6-anhydro-D-galactopyranose (DA) gây ra sự dịch chuyển trường thấp tương ứng của chúng.

$$X_i = \frac{(A(\text{proton(s)} \text{ của CMKC tại } O_i))}{(A[\text{proton(s)} \text{ của KC tại } O_i] + A[\text{proton(s)} \text{ của CMKC tại } O_i])} \quad (\text{PT 2.3})$$

Mức độ thay thế DS = $\sum x_i$

Trong đó A đại diện cho diện tích peak; O là nguyên tử oxy ở vị trí i (vị trí 2 và 6 của đơn vị β -D-galactopyranose-4-sulfate (G) và sự thay thế 2-O của nửa 3,6-anhydro-D-galactopyranose (DA)); x_i là DS riêng phần.

Xác định đặc trưng cấu trúc của hạt vi nang carrageenan – lectin: Hạt được đo kích thước trước và sau khi làm khô. Kích thước và đặc tính bề mặt của hạt nang được xác định bằng kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường (FE-SEM) S - 4800, HITACHI xác định kích thước hình dạng hạt ở độ phóng đại 100x, và xác định cấu trúc bề mặt hạt ở độ phóng đại 500x.

2.5. Đánh giá hoạt tính sinh học và độ trương của carrageenan, carboxymethyl-carrageenan và hạt vi nang carrageenan-lectin

2.5.1. Xác định hoạt tính chống oxy hóa của carrageenan và dẫn xuất carboxymethyl-carrageenan

Hoạt tính chống oxy hóa của kappa-carrageenan và các dẫn xuất carboxymethyl-kappa-carrageenan được thử nghiệm theo phương pháp được mô tả theo Shimada và cộng sự, 1992 [125], sử dụng 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Đầu tiên, dung dịch DPPH 0,1 mM trong dung môi MeOH-nước khử ion (1:1) được chuẩn bị và thêm 3 mL mỗi dung dịch mẫu trong 1 mL dung dịch này trong MeOH-nước khử ion (1:1) ở nồng độ 500 $\mu\text{g/mL}$. Acid ascorbic ở các nồng độ khác nhau (1 ÷ 10 $\mu\text{g/mL}$) trong MeOH-nước khử ion (1:1) được sử dụng làm đối chứng dương và MeOH-nước khử ion (1:1) làm đối chứng âm, các thí nghiệm được thực hiện như mô tả ở trên (Đường chuẩn hoạt tính chống oxy hóa của acid ascorbic ở phụ lục 4). Hỗn hợp được lắc mạnh và để yên ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó, độ hấp thụ được

đo ở 517 nm. Độ hấp thụ thấp hơn của hỗn hợp phản ứng cho thấy hoạt động bất gúc tự do cao hơn. Hiệu suất ức chế gúc tự do - RSA (%) được tính theo phương trình:

$$\text{RSA (\%)} = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100 \text{ (PT 2.4)}$$

Trong đó A_0 là độ hấp thụ của đối chứng và A_1 là độ hấp thụ của mẫu.

2.5.2. Xác định hoạt tính ngưng kết hồng cầu của lectin, carrageenan và hạt vi nang carrageenan-lectin

Đánh giá hoạt tính ngưng kết hồng cầu của lectin: Lectin sau khi được chiết tách và tinh chế từ rong đỏ được đánh giá hoạt tính ngưng kết hồng cầu (NKHC). Loại hồng cầu được sử dụng trong các thí nghiệm xác định NKHC của lectin là hồng cầu thỏ 2%, đã được xử lý enzyme trypsin.

Dung dịch huyền phù hồng cầu máu 2%: Đầu tiên mỗi mẫu máu được rửa với dung dịch NaCl 0,15 M (tỷ lệ 1/50 v/v) từ 3 đến 5 lần. Sau đó, thêm dung dịch đệm phosphate 0,02 M có chứa NaCl 0,15 M, pH = 7,0 để tạo huyền phù hồng cầu máu 2% (v/v) và được dùng như hồng cầu tự nhiên. Hồng cầu máu xử lý trypsin được chuẩn bị bằng cách thêm 1/10 thể tích của dung dịch trypsin 0,5% (w/v) vào huyền phù máu tự nhiên 2% (v/v), hỗn hợp được trộn đều và ủ ở 37°C trong 60 phút. Sau khi ủ, hồng cầu máu được rửa từ 3 đến 5 lần với dung dịch muối và hòa lại bằng dung dịch đệm phosphate 0,02 M có chứa NaCl 0,15 M, pH = 7,0, ta thu được huyền phù hồng cầu máu 2% đã xử lý enzyme [1].

Cách tiến hành đánh giá hoạt tính ngưng kết hồng cầu: Đầu tiên cho 25 μL dung dịch NaCl 0,15 M vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng đáy chữ V. Sau đó, 25 μL mẫu dịch chiết lectin cần kiểm tra hoạt tính ngưng kết hồng cầu được thêm vào giếng đầu tiên, trộn đều và pha loãng sang các giếng tiếp theo với tỷ lệ pha là 1/2n (n: số lần pha loãng). Tiếp tục cho 25 μL hồng cầu máu 2% đã xử lý bằng trypsin vào tất cả các giếng. Lắc nhẹ, giữ ở nhiệt độ phòng, sau 2 giờ kiểm tra kết quả. Kết quả âm tính là tất cả hồng cầu lắng xuống đáy giếng thành chấm nhỏ, và kết quả dương tính là hồng cầu trong giếng bị ngưng kết hơn 50%.

Đơn vị hoạt tính (HA): 1 đơn vị hoạt tính của lectin hay 1 đơn vị hoạt tính NKHC trên 1 mL (HU/mL) chính là giá trị nghịch đảo của độ pha loãng lớn nhất mà

dịch chiết lectin còn có khả năng làm ngưng kết hơn 50% lượng hồng cầu cho vào phản ứng. Hoạt tính lectin được xác định theo 2 chỉ số:

Hoạt tính tổng (HTTS): là tổng số đơn vị hoạt tính có trong một thể tích nhất định. Đơn vị: HU

$$HTTS = V \cdot 2^n \text{ (PT 2.5)}$$

Trong đó V: tổng thể tích (mL); n: số lần pha loãng

Hoạt tính riêng (HTR): là số đơn vị hoạt tính lectin có trong 1mg protein.

Đơn vị: HU/mg

$$HTR = \frac{HTTS}{\text{Protein}_{\text{tổng}}} \text{ (PT 2.6)}$$

Trong đó HTTS: tổng số đơn vị hoạt tính; Protein_{tổng}: tổng hàm lượng protein (mg).

LHC (Lowest hemagglutination concentration): nồng độ nhỏ nhất có khả năng gây ngưng kết hồng cầu đã được xử lý enzyme. Đơn vị : µg/mL

$$LHC = \frac{\text{Hàm lượng protein}}{HA} \text{ (PT 2.7)}$$

Xác định ảnh hưởng của cation hóa trị hai, nhiệt độ và pH đến hoạt tính ngưng kết hồng cầu của lectin

Để kiểm tra ảnh hưởng của cation hóa trị hai đến hoạt tính ngưng kết hồng cầu, lấy 1 mL dung dịch lectin thẩm tích trong 100 mL dung dịch đệm phosphate có chứa 50 mM EDTA (Ethylene diaminetetra acetic) qua đêm ở 4°C. Thu hồi phần trong túi thẩm tích và xác định hoạt tính ngưng kết hồng cầu với hồng cầu máu thỏ đã xử lý trypsin trong sự có mặt và vắng mặt của cation hóa trị hai (10 mM CaCl₂ hoặc MgCl₂) [1].

Để kiểm tra ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính ngưng kết hồng cầu, lấy 1 mL dung dịch lectin ủ ở các nhiệt độ khác nhau (30 đến 100°C) trong 30 phút, sau đó làm lạnh ngay bằng đá và xác định hoạt tính ngưng kết hồng cầu như ở trên [1].

Để kiểm tra ảnh hưởng của pH đến hoạt tính ngưng kết hồng cầu, lấy 1 mL dung dịch lectin thẩm tích qua đêm ở 4°C trong 100 mL của các dung dịch đệm (50 mM) ở các pH khác nhau (từ 3 đến 10) và sau đó thẩm tích trong dung dịch NaCl

0,15 M để loại ảnh hưởng của pH thừa. Thu hồi phần trong túi thẩm tích và xác định hoạt tính ngưng kết hồng cầu như đã mô tả ở trên. Các dung dịch đệm được sử dụng như sau: HCl có pH = 1 và 2, đệm acetate có pH = 3, 4 và 5, đệm phosphate có pH = 6 và 7, đệm Tris-HCl có pH = 8 và đệm carbonate có pH = 9 và 10 [1].

Phân tích đặc tính liên kết carbohydrate của lectin:

Tiến hành phân tích với các đường đơn (Monosaccharide 100 mM) như: Glucose, N-acetyl-D-glucosamine, D-galactose, N-acetyl-D-galactosamine, D-Mannose, N-acetyl-D-manosamine, Xylose, N-acetyl neuraminic acid; và các glycoprotein mang dạng N- và O-glycan (2000 µg/mL) như: Transferrin, Asialo-Transferrin, Fetuin, Asialo-Fetuin, Yeast mannan, Porcine thyroglobulin, Porcine stomach mucin, Asialo-porcine stomach mucin. Đặc tính liên kết carbohydrate của lectin được xác định bằng phương pháp đánh giá hoạt tính NKHC.

Đặc tính liên kết carbohydrate của dịch lectin được xác định dựa trên nghiên cứu của Hori và cộng sự, 1986 [78]. Đầu tiên, 25 µL đường hoặc glycoprotein được chuẩn bị trong nước muối được pha loãng gấp đôi theo chuỗi trên đĩa 96 giếng đáy chữ V. Thêm vào mỗi giếng 25 µL dung dịch lectin có hoạt tính NKHC là 4 HU, đĩa được trộn nhẹ nhàng và để yên ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Cuối cùng, thêm 25 µL hỗn dịch 2% hồng cầu thỏ đã xử lý bằng trypsin vào mỗi giếng, lắc nhẹ đĩa và ủ thêm 1 giờ nữa. Sự ức chế được quan sát thấy bằng mắt thường và hoạt động ức chế được thể hiện là nồng độ đường hoặc glycoprotein thấp nhất mà tại đó sự ức chế hoàn toàn sự ngưng kết hồng cầu đạt được. Nếu hoạt tính NKHC của lectin không thay đổi vậy lectin không có khả năng liên kết với đường hoặc glycoprotein được kiểm tra. Nếu hoạt tính NKHC của lectin giảm thì lectin đã liên kết với đường hoặc glycoprotein được kiểm tra. Nồng độ nhỏ nhất của đường (mM) hoặc glycoprotein (2000 µg/mL) mà tại đó hiện tượng NKHC do lectin gây ra bị ức chế hoàn toàn (nghĩa là lectin đã liên kết với đường hoặc glycoprotein kiểm tra), được tính theo công thức:

$$C_{\min} = \frac{C}{HI} \quad (\text{PT 2.8})$$

Trong đó $C_{\min}$: Nồng độ phản ứng nhỏ nhất của đường (mM) hoặc glycoprotein (µg/mL) mà tại đó hiện tượng NKHC do lectin gây ra bị ức chế hoàn toàn; C: Nồng độ của đường và glycoprotein (Nồng độ đường: 100 mM; Nồng độ glycoprotein:

2000 µg/mL); HI: Giá trị nồng độ pha loãng mà tại đó hoạt tính NKHC vẫn còn bị ức chế, sau khi lectin đã liên kết với đường hoặc glycoprotein.

Đánh giá hoạt tính ngưng kết hồng cầu của carrageenan: Carrageenan và các mẫu KC-0/1 và CMKC-1/1 ÷ 5/1 được pha với nồng độ 1%, sau đó được đánh giá hoạt tính NKHC với hồng cầu thỏ 2%, các bước phân tích trên đĩa 96 giếng đáy chữ V tương tự như đánh giá với lectin.

Đánh giá hoạt tính ngưng kết hồng cầu của lectin từ hạt vi nang CMKC – lectin: Trước khi tạo hạt vi nang CMKC-lectin, hỗn hợp CMKC-3/1 (2,0 ÷ 4,0 %)-Lectin cũng được đánh giá hoạt tính NKHC trên hồng cầu thỏ. Để đánh giá hoạt tính ngưng kết hồng cầu của lectin trong hạt vi nang carrageenan - lectin, cần đánh giá hoạt tính ngưng kết hồng cầu của hỗn hợp carrageenan và lectin để tạo hạt vi nang. Chuẩn bị hỗn hợp CMKC và lectin theo đúng các tỷ lệ tạo hạt, lấy 25 µL mẫu vào giếng của đĩa 96 giếng đáy chữ V đã có 25 µL dung dịch NaCl 0,85% và xác định hoạt tính ngưng kết hồng cầu với hồng cầu thỏ 2%. Sau đó so sánh hoạt tính ngưng kết hồng cầu của mẫu hạt vi nang và lectin ban đầu.

2.5.3. Xác định độ trương của hạt carrageenan và các dẫn xuất carboxymethyl-kappa-carrageenan

Độ trương của hạt carrageenan và các dẫn xuất carboxymethyl-kappa-carrageenan được xác định theo phương pháp của K.H. Leong và cộng sự, 2011 [68]. Các hạt được tạo theo phương pháp tạo hạt vi nang ở mục 2.3.2, không chứa lectin. Đánh giá độ trương của hạt trong môi trường có pH tương tự pH ở dạ dày là 1,2, và ở ruột là 7,4. Đầu tiên, 200 mg hạt được ngâm trong 20 mL dung dịch HCl pH = 1,2, hoặc dung dịch đệm phosphate 20mM pH = 7,4 ở nhiệt độ phòng. Tiếp theo, ở mỗi khoảng thời gian 20, 40, 60, 80, 100, 120 phút thu hạt gel, loại bỏ nước trên bề mặt hạt bằng giấy lọc và cân hạt. Độ trương theo thời gian được tính dựa vào phương trình:

$$\text{Độ trương} = \frac{M_t - M_0}{M_0} \quad (\text{PT 2.9})$$

Trong đó: M_0 là khối lượng mẫu ban đầu (mg); M_t khối lượng mẫu ở thời gian t (mg).

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả xác định thành phần hóa học, đặc trưng cấu trúc và đặc tính của lectin và carrageenan từ rong đỏ *Kappaphycus striatus*

3.1.1. Thành phần, đặc tính và cấu trúc của lectin từ rong đỏ *Kappaphycus striatus*

Theo nghiên cứu của Lê Đình Hùng và cộng sự (2011) [3] lectin chiết từ rong đỏ *K. striatus* có sự ngưng kết mạnh các hồng cầu của cừu và thỏ được xử lý bằng trypsin và papain, trong khi nó không có sự ngưng kết với các hồng cầu của gà và của người (ở các nhóm máu A, B và O), ngay cả khi hồng cầu được xử lý bằng enzyme (Bảng 3.1). Do đó trong nghiên cứu này, hoạt tính NKHC của *K. striatus* được xác định trên hồng cầu thỏ đã được xử lý trypsin.

Bảng 3.1. Phân tích hoạt tính ngưng kết hồng cầu của dịch lectin chiết thô từ rong đỏ *K. striatus* với các dạng hồng cầu khác nhau.

Hồng cầu	Hoạt tính ngưng kết hồng cầu (HU/mL)		
	N ^a	T ^b	P ^c
Thỏ	32	1024	2048
Cừu	32	1024	2048
Gà	- ^d	-	-
Nhóm máu A	-	-	-
Nhóm máu B	-	-	-
Nhóm máu O	-	-	-

^a Hồng cầu tự nhiên; ^b Hồng cầu được xử lý enzyme trypsin; ^c Hồng cầu được xử lý enzyme papain; ^d Không có sự ngưng kết hồng cầu.

Hàm lượng protein trong dịch lectin chiết từ 1000 g rong và hoạt tính ngưng kết hồng cầu của dịch lectin từ rong đỏ *K. striatus* được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký lọc gel được trình bày ở Bảng 3.2. Từ 1000 g rong *K. striatus* tươi chiết được 19,4 mL dịch lectin sau kết tủa có lượng protein tổng trong dịch lectin là 33,56 (mg), hoạt tính riêng của protein là 148,87 (HU/mL) và nồng độ nhỏ nhất gây NKHC là 6,76 (µg/mL). Sau khi được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký lọc gel, vì một lượng protein không có hoạt tính NKHC đã bị loại bỏ làm cho giá trị protein tổng giảm

xuống còn 31,80 mg nên hoạt tính riêng của protein lại tăng lên (150,95 HU/mL). Từ kết quả ở Bảng 3.2 cũng cho thấy nồng độ nhỏ nhất gây NKHC của protein (LHC) cũng giảm dần qua các bước tinh sạch (từ 16,39 µg/mL trong dịch chiết thô xuống 6,76 µg/mL ở dịch lectin sau rửa và còn 6,63 µg/mL trong dịch thu được sau sắc ký lọc gel). Sau khi kiểm tra độ tinh sạch của các bước tinh chế lectin bằng phương pháp điện di xác định được lectin từ rong *K.striatus* có khối lượng phân tử ~ 28,5 kDa (Kết quả điện di ở Phụ lục 5).

Bảng 3.2. Hàm lượng protein và hoạt tính NKHC của lectin chiết từ rong đỏ *K. striatus*

Lectin từ <i>K.striatus</i>	Dịch thô	Dịch sau kết rửa	Dịch sau SKLG
Thể tích (mL)	800	19,4	600
Protein (mg/mL)	1,77	1,73	0,053
Protein tổng (mg)	1416,00	33,56	31,80
HA (HU/mL)	128	256	8
HTTS (HU)	102400	4996	4800
HTR (HU/mL)	72,31	148,87	150,95
LHC(µg/mL)	16,39	6,76	6,63

HA: Hoạt tính của 1 mL dịch lectin; HTTS: Hoạt tính tổng số; HTR: Hoạt tính riêng LHC (Lowest hemagglutination concentration): nồng độ nhỏ nhất gây NKHC; SKLG: Sắc ký lọc gel.

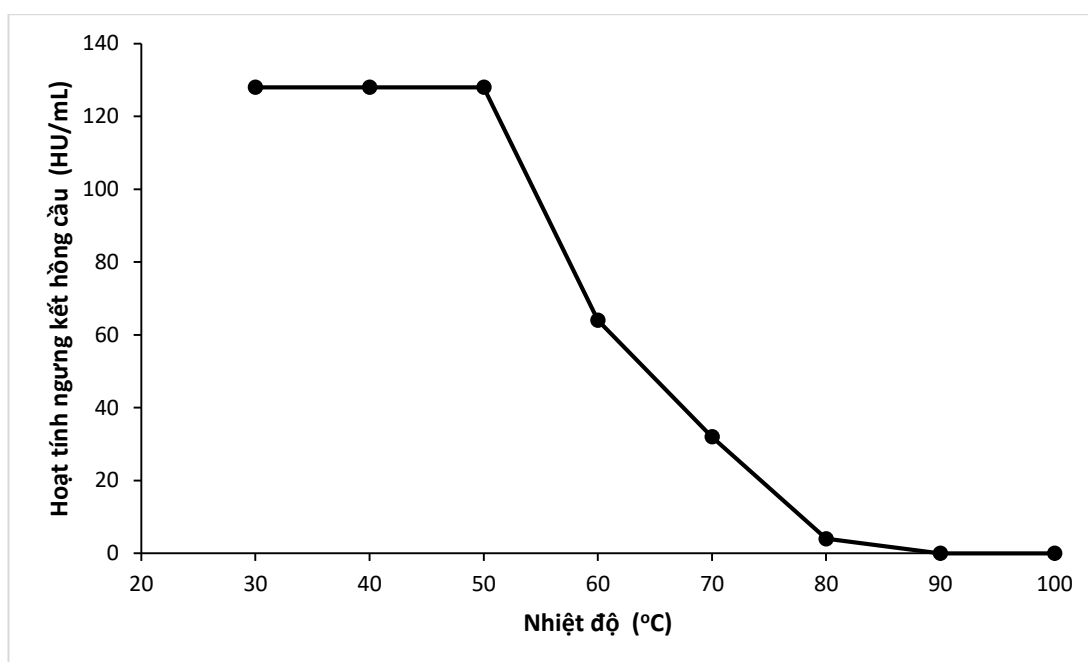
Tùy vào loại rong và thời điểm thu hoạch rong, rong sẽ có hàm lượng carrageenan và lectin khác nhau, nên các giá trị hàm lượng protein tổng trong dịch lectin có thể thay đổi [7]. Lectin từ rong đỏ *K. striatus* sau tinh sạch bằng sắc ký lọc gel được cô đặc và xác định lại hàm lượng protein, sau đó dịch lectin được pha loãng tới nồng độ 10mg/mL trong dung dịch đệm phosphate pH = 7,0, NaCl 0,15 M để tạo hạt vi nang carrageenan - lectin.

Phân tích các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính NKHC của lectin, cho thấy hoạt NKHC của lectin từ rong đỏ *K. striatus* không bị ảnh hưởng sau khi lectin được thẩm tích với EDTA, và khi có mặt các hai cation kim loại Ca^{2+} và Mg^{2+} sau thẩm tích

(Bảng 3.3). Kết quả khảo sát trên đây cho thấy sự có mặt của các ion kim loại không làm ảnh hưởng đến hoạt tính ngưng kết hồng cầu của lectin từ rong *K. striatus*.

Bảng 3.3. Kết quả thí nghiệm ảnh hưởng của cation hóa trị hai đến hoạt tính ngưng kết hồng cầu của lectin từ rong *K. striatus*.

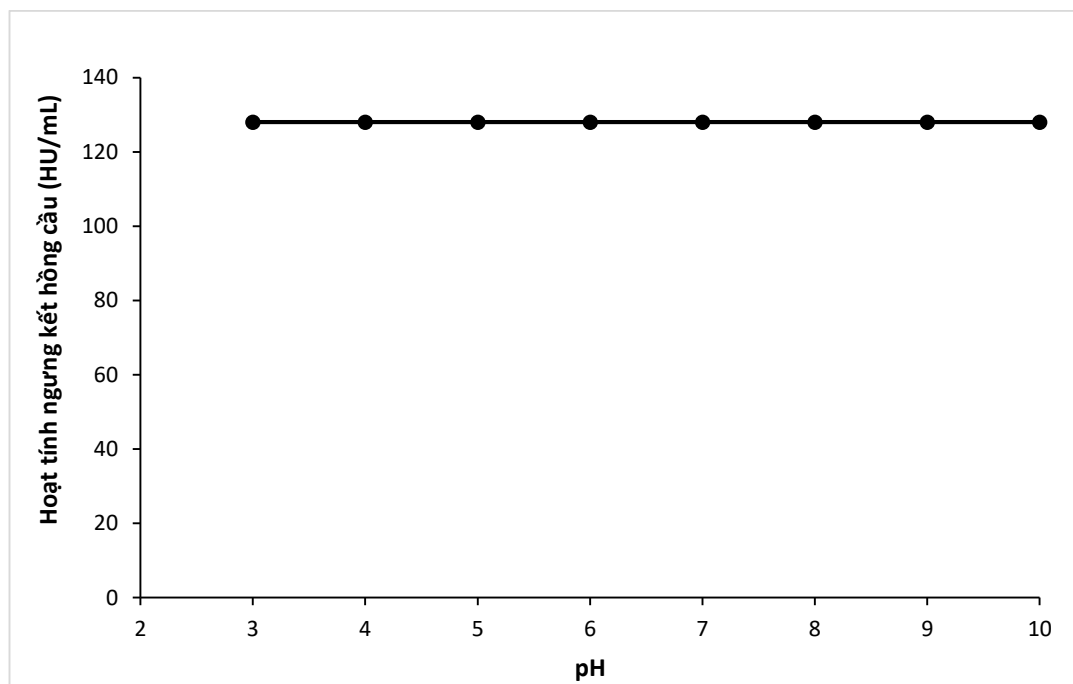
Mẫu	Hoạt tính NKHC (HU/mL)	Hoạt tính NKHC (%)
Mẫu không kim loại	128	100
EDTA	128	100
Ca ²⁺	128	100
Mg ²⁺	128	100



Hình 3.1. Hoạt tính NKHC của lectin từ *K. striatus* thay đổi theo nhiệt độ.

Kết quả phân tích ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính NKHC của lectin từ rong đỏ *K. striatus* được trình bày ở Hình 3.1. Lectin từ rong đỏ *K. striatus* không bị mất hoạt tính khi nhiệt độ lên đến 50°C trong 30 phút; khi nhiệt độ tiếp tục tăng hoạt tính của lectin giảm dần từ 60°C và lectin bị mất hẳn hoạt tính khi nhiệt độ lớn hơn 80°C. Khả năng chịu nhiệt của lectin từ rong đỏ *K. striatus* tương tự với một số lectin được tinh chế từ các loài rong đỏ *Eucheuma serra* [15], *Pterocladia capillacea*

[126], *Palmaria palmate* [127]. Để đảm bảo hoạt tính của lectin từ *K. striatus*, các biến đổi để ứng dụng lectin cần chú ý nhiệt độ sử dụng dưới 60°C.



Hình 3.2. Hoạt tính NKHC của lectin từ *K. striatus* ở các giá trị pH.

Kết quả phân tích ảnh hưởng của pH đến hoạt tính NKHC của lectin từ rong đỏ *K. striatus* được trình bày ở Hình 3.2. Hoạt tính của lectin từ rong đỏ *K. striatus* không bị ảnh hưởng ở cả ba môi trường acid, trung tính và base; hoạt tính của lectin ổn định trong khoảng pH khá rộng từ pH từ 3 đến 10. Tính chất này của lectin từ rong đỏ *K. striatus* tương tự lectin từ rong đỏ *Kappaphycus alvarezii* [15], hay hoạt tính của lectin từ rong đỏ *E. serra* không thay đổi khoảng pH từ 2,5 đến 10,5 [15]. Kết quả phân tích lectin từ rong đỏ *K. striatus* với đặc tính ổn định hoạt tính trong khoảng pH rộng tạo điều kiện cho các nghiên cứu ứng dụng y sinh.

Đặc hiệu liên kết carbohydrate của lectin từ rong đỏ *Kappaphycus striatus*

Khả năng đặc hiệu liên kết carbohydrate của lectin từ rong đỏ *K. striatus* đối với các đường monosaccharide và glycoprotein, và nồng độ đường monosaccharide và glycoprotein nhỏ nhất có khả năng ức chế hoạt tính ngưng kết hồng cầu của lectin từ rong đỏ *K. striatus* được trình bày ở Bảng 3.4.

Kết quả phân tích cho thấy hoạt tính ngưng kết hồng cầu của lectin từ rong đỏ *K. striatus* không bị ức chế bởi các monosaccharide như glucose, D-mannose, D-galactose, xylose, N-acetyl-glucosamine, N-acetyl-D-mannosamine, N-

acetylgalactosamine, N-acetyl-neuraminic acid và glycoprotein như transferrin, asialo-transferrin và fetuin. Tuy nhiên lectin từ rong đỏ *K. striatus* bị ức chế bởi asialo-fetuin, porcine stomach mucin và asialo-porcine stomach mucin, và đặc biệt bị ức chế mạnh bởi các glycoprotein mang dạng N-glycan high-mannose như yeast mannan và porcine thyroglobulin, cho thấy lectin này đặc hiệu cho N-glycan dạng high-mannose.

Bảng 3.4. Nồng độ đường monosaccharide và glycoprotein nhỏ nhất có khả năng ức chế hoạt tính ngưng kết hồng cầu của các lectin từ rong đỏ *K. striatus*.

STT	Monosaccharide và Glycoprotein	Nồng độ nhỏ nhất
	Monosaccharide	C_{min} (mM)
1	Glucose	-
2	N-acetyl-D-glucosamine	-
3	D-galactose	-
4	N-acetyl-D- galactosamine	-
5	D-mannose	-
6	N-acetyl-D-manosamine	-
7	Xylose	-
8	N-acetyl neuraminic acid	-
	Glycoprotein	C_{min} (μg/mL)
9	Transferrin	-
10	Asialo-Transferrin	-
11	Fetuin	-
12	Asialo-Fetuin	31,2
13	Yeast mannan	7,8
14	Porcine thyroglobulin	7,8
15	Porcine stomach mucin	62,5
16	Asialo-porcine stomach mucin	62,5

“-”: Đường 100mM hay glycoprotein 2000 μ g/mL không có khả năng gây ức chế hoạt tính ngưng kết hồng cầu của lectin. “ C_{min} ”: nồng độ nhỏ nhất của đường (mM) hoặc glycoprotein (μ g/mL) có khả năng gây ức chế hoạt tính ngưng kết hồng cầu.

Hoạt tính NKHC của các lectin từ rong đỏ từ rong đỏ *K. striatus* không bị ức chế bởi các glycoprotein như transferrin và fetuin, bởi transferrin chỉ mang N-glycan dạng phức và fetuin mang cả hai dạng phức N-glycan và O-glycan. Tuy nhiên, asialo-fetuin ức chế hoạt tính NKHC của lectin từ rong đỏ *K. striatus* với nồng độ thấp nhất là 31,2 $\mu\text{g/mL}$, cho thấy sự loại bỏ các gốc acid sialic của fetuin đã tăng hoạt tính ức chế so với fetuin ban đầu.

Lectin từ rong đỏ từ rong đỏ *K. striatus* bị ức chế bởi yeast mannan, porcine thyroglobulin mang dạng N-glycan, porcine stomach mucin mang dạng O-glycan và dẫn xuất asialo của nó. Sự loại bỏ gốc acid sialic của porcine stomach mucin không làm thay đổi hoạt tính ức chế, vậy các gốc acid sialic cuối cùng của chuỗi cacbohydrate trong porcine stomach mucin không ảnh hưởng đến hoạt tính ngưng kết hồng cầu của các lectin. Yeast mannan mang N-glycan dạng high-mannose với liên kết ($\alpha 1-6$) trong cấu trúc lõi và liên kết ($\alpha 1-3$) trong các chuỗi nhánh, cho thấy lectin từ rong đỏ *K. striatus* và có thể nhận biết các gốc mannose được liên kết ở vị trí ($\alpha 1-6$) và ($\alpha 1-3$) trong cấu trúc của yeast mannan (Hình 3.3). Porcine thyroglobulin là glycoprotein có cấu tạo gồm các chuỗi oligosaccharide chứa cả dạng high-mannose (nhóm dạng A) và dạng phức (nhóm dạng B):

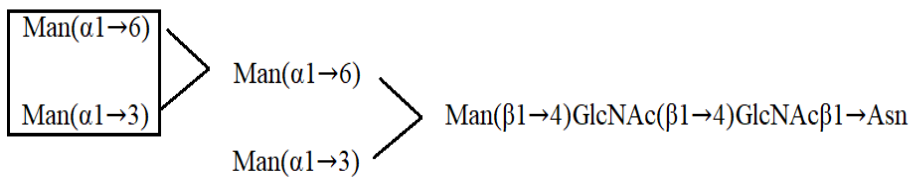
- Nhóm dạng A có cấu trúc là N-glycan high-mannose chứa $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ với các gốc $\text{Man}(\alpha 1-6)$ và $\text{Man}(\alpha 1-3)$ bị phân nhánh tại vị trí $\text{Man}(\alpha 1-6)$ của lõi pentasaccharide [128].

- Nhóm dạng B có dạng chính của N-glycan chứa ít nhất 9 cấu trúc khác nhau, bao gồm các gốc monosialyl, disialyl được gắn ở vị trí ($\alpha 1-6$) trong gốc fucose và kết thúc bằng các gốc acid sialic liên kết ở vị trí ($\alpha 2-3$) hoặc ($\alpha 2-6$) [129].

Từ các kết quả phân tích cho thấy lectin từ rong đỏ *K. striatus* có thể tương tác với các gốc $\text{Man}(\alpha 1-3)$ hoặc $\text{Man}(\alpha 1-6)$ ở vị trí cuối cùng trong cấu trúc của yeast mannan và porcine thyroglobulin (nhóm dạng A) (Hình 3.3). Các công bố nghiên cứu về lectin từ rong biển như EDA từ rong *E. denticulatum* [5], KAA từ rong *K. alvarezii* [16, 17], lectin ESA từ rong *E. Serra* [18], và SfL từ rong *S. filiformi* [35] có hoạt tính kháng virus HIV, virus cúm, kháng ung thư và kháng khuẩn, tất cả các lectin này đều có liên kết đặc hiệu với N-glycan dạng high-mannose, hoạt tính NKHC của chúng đều bị ức chế với yeast mannan và porcine thyroglobulin. Lectin từ rong

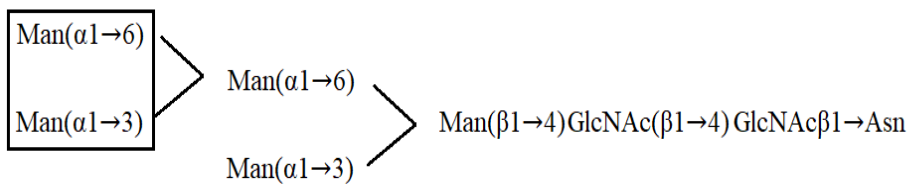
đỏ *K. striatus* và cho thấy có liên kết đặc hiệu với N-glycan dạng high-mannose. Các kết quả phân tích cho thấy các lectin chiết tách từ rong đỏ *K. striatus* và có hoạt tính NKHC trên hồng cầu thỏ, có đặc hiệu liên kết carbohydrate với các glycoprotein asialo-fetuin, porcine stomach mucin, asialo-porcine stomach mucin, và đặc biệt bị ức chế mạnh bởi yeast mannan và porcine thyroglobulin mang dạng N-glycan dạng high-mannose.

Yeast mannan

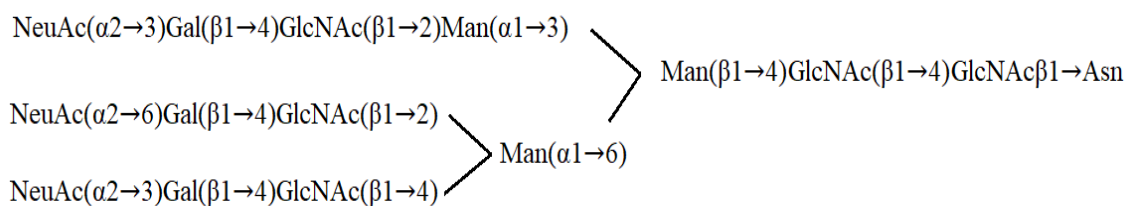


Thyroglobulin

Nhóm dạng A



Nhóm dạng B



Hình 3.3. Lectin từ rong đỏ *K. striatus* và *B. gelatinus* liên kết với các gốc đường mannose của yeast mannan và porcine thyroglobulin (trong khung vuông). Man: Mannose; Gal: Galactose; Fuc: Fucose; GlcNAc: N- acetyl -D-glucosamine; GalNAc: N-acetyl-D-galactosamine, NeuAc: Nacetylneuraminic acid; Asn: Asparagine; Ser/Thr: Serine/Threonine.

KSL	MGRYTVQN QWGGSSAPW NDAGLWILGS RGNQ NVMAIDVNSSDGGANLNGTMTYSG EGP IGFKGARRGE	68
KSA-2	MGRYTVQN QWGGSSAPW NDAGLWILGS RGNQ NVMAIDVNSSDGGANLNGTMTYSG EGP IGFKGARRGE	68
EDA-2	MGRYTVQN QWGGSSAPW NDAGLCILGS RGNQ NVIAVDVTSSDGGANLGGTMTYSG EGP IGFKGARRGE	68
ESA-2	MGRYTVQN QWGGSSAPW NDAGLWILGS RGNQ NVMAVDVNSSDGGANLNGTMTYSG EGP IGFKGARRGE	68
KAA-1	MGRYTVQN QWGGSSAPW NDAGLWILGS RSNQ NVMAIDVNSSDGGANLNGTMTYSG EGP IGFKGARRGE	68
KAA-2	MGRYTVQN QWGGSSAPW NDAGLWILGS RGNQ NVMAIDVNSSDGGANLNGTMTYSG EGP IGFKGARRGD	68
SfL-1	MGRYTVQN QWGGSSAPW NDAGLWLLGS RANQ NVMDVSVTSSDGGATLTGTMTYSG EGP IGFKGTRRGD	68
SfL-2	MGRYTVQN QWGGSSAPW NDAGVFVLGG RANQ NVMAIDVNSSDGGKTLTGTMYS EGP IGFKGTRRGE	68
*****: ;**.*.***: ;.*.***** . * *****:***;		
KSL	SNVYDVEN QWGGSSAPW HAGGQFVIGS RSQ QVLAVNITSSDGGKTLTGTMTYER EGP IGFKGTQSG	135
KSA-2	SNVYDVEN QWGGSSAPW HAGGQFVIGS RSQ QVLAVNITSSDGGKTLTGTMTYER EGP IGFKGTQSG	135
EDA-2	SNVYDVEN QWGGSSAPW HAGGQFVIGS RSQ QVLTALSVTSSDGGKTLTGTMTYER EGP IGFKGTQSG	135
ESA-2	SNVYDVEN QWGGSSAPW HAGGQFVIGS RSQ QVLAVNITSSDGGKTLTGTMTYER EGP IGFKGTQSG	135
KAA-1	SNVYDVEN QWGGSSAPW HAGGQFVIGS RSQ QVLAVNITSSDGGKTLTGTMTYER EGP IGFKGTQSG	135
KAA-2	SNVYDVEN QWGGSSAPW HAGGQFVIGS RSQ QVLAVNITSSDGGKTLTGTMTYER EGP IGFKGTQSG	135
SfL-1	SNNYDVEN QWGGSSAPW HAGGTFVIGS RSQ QVAVDVVNSSDGGKTLTGTMTYAN EGP IGFKGTQSG	135
SfL-2	SNNYEVEN QWGGSSAPW HPAGTFVIGS RSQ QAVVAMNVTSHDGGKTLTSGHMTYEN EGP IGFKGTQAE	135
** *:***** . * *****.* *:.;* *****:* *** .*****:		
KSL	GDTYNVEN QWGGSSAPW NKAGI WALGD RSQ QAMIAMDVSSDGGKTLLEGTMQYK EGP IGFRGKLSG	202
KSA-2	GDTYNVEN QWGGSSAPW NKAGI WALGD RSQ QAMIAMDVSSDGGKTLLEGTMQYK EGP IGFRGKLSG	202
EDA-2	GDTYNVEN QWGGSSAPW NKAGI WALGD RNG QAMIAMDVSSDGGQTLLEGTMQYK EGP IGFRGKLSG	202
ESA-2	GDTYNVEN QWGGSSAPW NKAGI WALGD RSQ QAMIAMDVSSDGGKTLLEGTMQYK EGP IGFRGKLSG	202
KAA-1	GDTYNVEN QWGGSSAPW NKAGI WALGD RSQ QAMIAMDVSSDGGKTLLEGTMQYK EGP IGFRGKLSG	202
KAA-2	GDTYNVEN QWGGSSAPW NKAGI WALGD RSQ QAMIAMDVSSDGGKTLLEGTMQYK EGP IGFRGKLSG	202
SfL-1	GDSYNVEN QWGGSSAPW NKAGAWALGD RDQ QGVIGVDVTSSDGGKTLTGTMQYQ NEG PIGFKGTSTG	202
SfL-2	GDTYNVEN QWGGSSAPW NKAGVWALGS RASQ GVVKLDVSSDGGKTLTGTMQYQ NEG PIGFRGTLTG	202
:**** *****.* .*:.;*:*****:* *****:*****:*. :*		
KSL	ANNYSVEN QWGGSSAPW NKAGDWLIGD RHNQ NITAVKVSSDNDGKNLDGTCTYES EGA IGFKGVAS-	268
KSA-2	ANNYSVEN QWGGSSAPW NKAGDWLIGD RHNQ NITAVKVSSDNDGKNLDGTCTYER EGP IGFKGVATS	269
EDA-2	ANNYAVEN QWGGSSAPW NKAGDWLIGD RYNQ NITAVKVSSDNDGKNLDGTCTYER EGP IGFKGVATS	269
ESA-2	ANNYSVEN QWGGSSAPW NAAGDWLIGD RHNQ NITAVKVSSDNDGKNLDGTCTYER EGP IGFKGVATS	269
KAA-1	ANNYSVEN QWGGSSAPW NKAGDWLIGD RHNQ NITAVKVSSDNDGKNLDGTCTYES EGP IGFKGVAS-	268
KAA-2	ANNYSVEN QWGGSSAPW NKAGDWLIGD RHNQ NITAVKVSSDNDGKNLDGTCTYER EGP IGFKGVATS	269
SfL-1	GSNYKVEN QWGGSSAPW NPAGNWLIGD RHNQ NIVAVKVTSSDNGKTLGGTCTYER EGP IGFKGTAI-	268
SfL-2	ANNYKAEN QWGGSSGAW NPAGLWLIGD RHNQ NIIGVKVTSDDNGKTLLEGTCCTYR EGP IGFKGVAN-	268
..** .*****. ** ** *****:**** .***:*.:***.* ***** ** *****.*		

Hình 3.4. Cấu trúc bậc 1 của các lectin từ rong đỏ KSL, KSA-2 từ rong *K. striatus*, ESA-2 từ rong *Eucheuma serra*, EDA-2 từ rong *E. denticulatum*, KAA-1 và KAA-2 từ rong *K. alvarezii*, SfL-1 và SfL-2 từ rong *Solieria filiformis*. Các acid amin giống nhau được đánh dấu sao. Các gốc màu đỏ là các acid amin (E: glutamic acid, W: Tryptophan, G: Glycine, R: Arginine, P: Proline).

Hơn nữa, từ lectin thô của *K. striatus* sau đó có thể được tinh chế tách lectin KSA-1, KSA-2, KSA-3 và KSL [3, 6, 7, 8]. Các lectin KSL, EDA-2, KSA-2, KAA-1, KAA-2 đã được nghiên cứu có cấu trúc bậc 1 tương tự cấu trúc của các lectin ESA-2 theo báo cáo của Hori và cộng sự, 2007 [18], lectin SfL-1, SfL-2 trong nghiên cứu của R.P. Chaves và cộng sự, 2018 [35]. Cấu trúc của lectin được phân bố trong bốn miền lặp lại liên tiếp, mỗi vùng chứa từ 67 đến 68 acid amin (Hình 3.4) dẫn đến cấu trúc giống như thùng β đơn lẻ có liên kết chặt chẽ với oligomannoside [10, 11]. Trong

cấu trúc ở Hình 3.4. các lectin có các gốc màu đỏ là các acid amin (E: glutamic acid, W: Tryptophan, G: Glycine, R: Arginine, P: Proline) có thể tương tác với các cấu trúc oligomannose trong Man9GlcNAc2 trên lớp vỏ của virus HIV và virus cúm [1, 144]. Do đó các lectin có khả năng kháng các virus, mở ra các tiềm năng ứng dụng trong y học.

3.1.2. Thành phần, tính chất và đặc trưng cấu trúc của carrageenan từ rong đỏ *Kappaphycus striatus*

Hàm lượng carrageenan, hàm lượng 3,6-anhydrogalactose, sulfate, nhiệt độ tạo gel và nhiệt độ nóng chảy, độ bền gel, và trọng lượng phân tử trung bình của carrageenan chiết tách từ rong *K. striatus* được thể hiện trong Bảng 3.5.

Bảng 3.5. Hàm lượng và thành phần của carrageenan được chiết từ rong *K. striatus* theo phương pháp chiết carrageenan từ bã rong xử lý kiềm.

Thành phần	Carrageenan từ <i>K. striatus</i>
<i>Phương pháp chiết carrageenan tự nhiên</i>	
Hàm lượng carrageenan (% rong khô w/w)	45,8 ± 2,8
<i>Phương pháp chiết carrageenan xử lý kiềm</i>	
Hàm lượng carrageenan (% rong khô w/w)	31,3 ± 3,5
Hàm lượng DA (% carrageenan w/w)	27,7 ± 0,7
Hàm lượng Sulfate (% carrageenan w/w)	27,7 ± 0,9
Nhiệt độ tạo gel (°C)	44,5 ± 0,5
Nhiệt độ tan gel (°C)	61,5 ± 0,5
Độ bền gel (g/cm ²)	595 ± 10
MW (kDa)	791 ± 9,3

DA: 3,6-anhydro-D-galactose; MW: trọng lượng phân tử trung bình xác định theo phương pháp sắc ký thẩm thấu gel. Số liệu tính trung bình ± SEM (n = 3)

Hiệu suất chiết carrageenan trên bột bã rong khô theo phương pháp chiết tự nhiên của rong *K. striatus* là 45,8 ± 2,8%; và theo phương pháp chiết từ bã rong xử lý với dung dịch kiềm là 31,3 ± 3,5%. Hiệu suất chiết có thay đổi phụ thuộc vào điều kiện trồng thời gian thu hoạch rong khác nhau [7, 119, 131]. Carrageenan chiết theo phương pháp chiết xử lý bã rong với dung dịch kiềm có màu trắng hơn so với

carrageenan chiết tự nhiên và có hiệu suất chiết thấp hơn (Hình 3.5), do dung dịch kiềm sẽ hòa tan các sắc tố, protein, muối khoáng và các tạp chất có trong rong.

Trong nghiên cứu này các số liệu của carrageenan chiết tách từ rong đỏ *K. striatus* nằm trong phạm vi các giá trị được báo cáo cho các carrageenan chiết từ rong đỏ *Kappaphycus* và *Eucheuma* với hàm lượng carrageenan từ 18,8 đến 58,3%, hàm lượng 3,6-anhydro-D-galactose từ 15 đến 40 %, hàm lượng ester sulfate từ 23,1 đến 34,5% và độ bền gel 145 đến 1158 g/cm² theo các nghiên cứu của Lê Đình Hùng và cộng sự, 2019 [7], M. Ohno và cộng sự, 1996 [21], Santos, 1989 [132], Mendoza và cộng sự, 2002 [133], Hurtado và cộng sự, 2008 [134], và Periyasamy và cộng sự, 2014 [135].



Hình 3.5. Hình ảnh carrageenan chiết tách từ rong *K. striatus* theo phương pháp tự nhiên và phương pháp chiết xử lý kiềm.

Tuy nhiên có một số chênh lệch về nhiệt độ tạo gel, nhiệt độ tan gel và trọng lượng phân tử trung bình của carrageenan chiết tách từ *K. striatus* ở vịnh Vân Phong so với các kết quả đã được báo cáo. Nhiệt độ tạo gel, nhiệt độ tan gel và trọng lượng phân tử của các kết quả nghiên cứu đã công bố lần lượt trong khoảng 32,7 đến 34,5°C, 52 đến 56°C, và 100 đến 700 kDa, trong khi đó carrageenan tách chiết từ *K. striatus* ở vịnh Vân Phong có các giá trị hơi cao hơn tương ứng là $44,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$, $61,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ và $791 \pm 9,3$ kDa. Theo báo cáo đã công bố kappa-carrageenan tách chiết và tinh chế từ *K. striatum* được thu ở Philippines của Mendoza và cộng sự, 2002 có nhiệt độ tạo

gel là $34,5 \pm 0,9^{\circ}\text{C}$, nhiệt độ tan gel là $56,2 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, và trọng lượng phân tử trung bình là $717 \pm 48 \text{ kDa}$.) [133]. Sự khác biệt về hàm lượng, trọng lượng phân tử, tính chất lý hóa giữa các mẫu carrageenan có thể do phương pháp chiết xuất được sử dụng trong mỗi nghiên cứu và thời điểm thu hoạch rong [7], [119], [136].

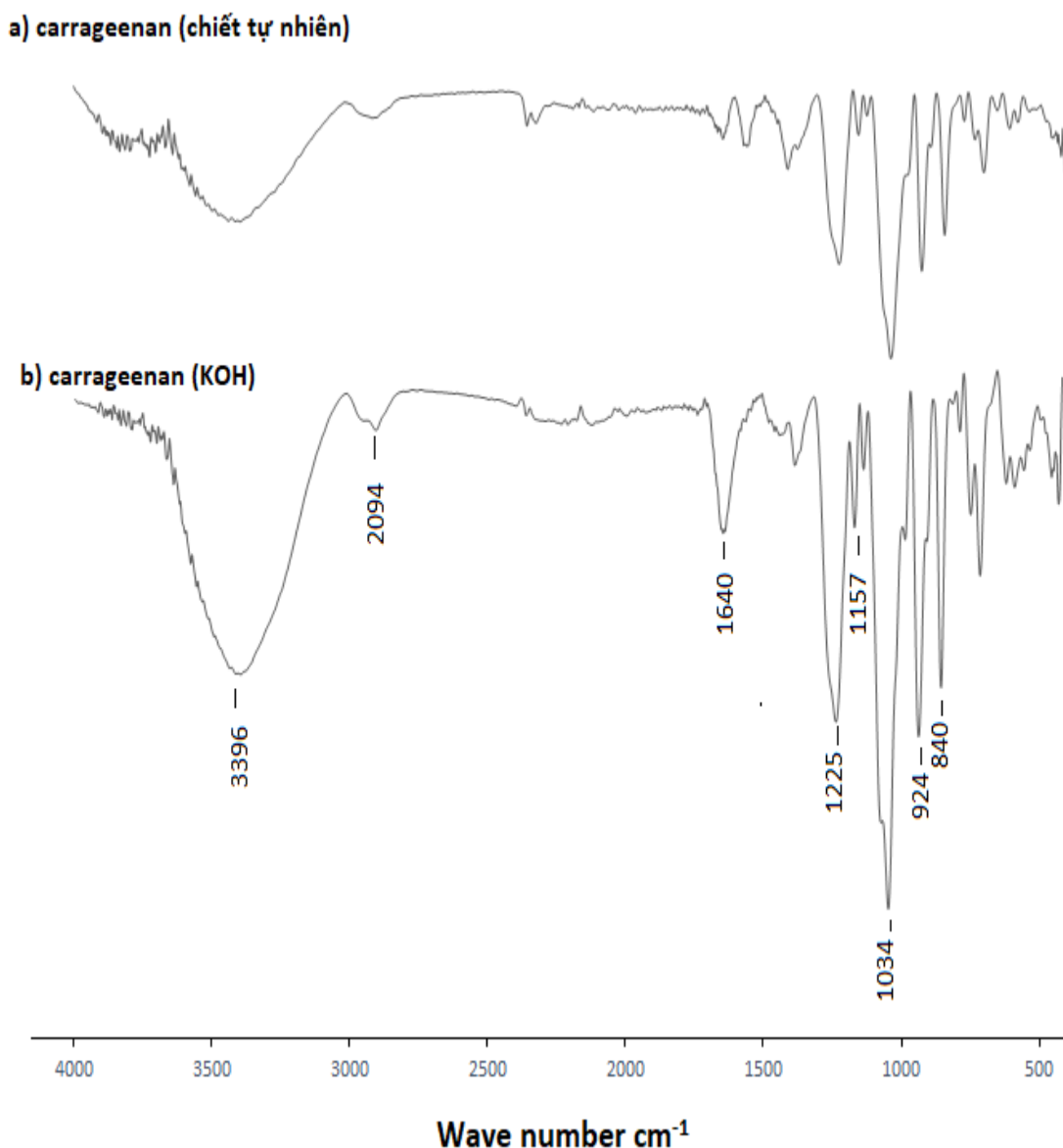
Đặc trưng cấu trúc của carrageenan từ rong đỏ *Kappaphycus striatus* được đánh giá dựa vào kết quả phân tích phổ hồng ngoại (FT-IR) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR:

Phổ hồng ngoại (FT-IR) của carrageenan từ rong đỏ *K. striatus*

Quan sát phổ hồng ngoại (FT-IR) (Hình 3.6. a và b) của carrageenan từ rong đỏ *K. striatus* từ hai phương pháp chiết tự nhiên và chiết xử lý kiềm (KOH) cho thấy các dải hấp thụ điển hình của polysaccharide sulfate kappa-carrageenan. Quá trình xử lý bột rong bằng KOH giúp loại các tạp chất và tăng độ đồng nhất của carrageenan, nên phổ FT-IR của carrageenan xử lý kiềm các dải hấp thụ đặc trưng có cường độ hấp thụ cao hơn so với carrageenan chiết tự nhiên.

Các dải hấp thụ ở số sóng 1225 cm^{-1} và 840 cm^{-1} tương ứng với dao động đối xứng của liên kết $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ và dao động hóa trị của $\text{C}_4\text{-O-S}$, đặc trưng cho nhóm $-\text{SO}_4$ của $\beta\text{-D-galactose}$ của carrageenan, các giá trị này gần với các số liệu đã được công bố theo Santos, 1989 (1250 cm^{-1} và 845 cm^{-1}) [132], Mendoza và cộng sự, 2002 (1250 cm^{-1} và 848 cm^{-1}) [133], Aguilan và cộng sự, 2003 (1240 cm^{-1} và $840\text{-}845 \text{ cm}^{-1}$) [137], Chiovitti và cộng sự, 2008 (1240 cm^{-1} và 845 cm^{-1}) [152], Arman và Qader, 2012 (1222 cm^{-1} và 840 cm^{-1}) [139], Souza và cộng sự, 2018 (1238 cm^{-1} và 850 cm^{-1}) [140]. Dải hấp thụ ở 924 cm^{-1} tương ứng với sự tồn tại của liên kết C-O-C của 3,6-anhydro-D-galactose của kappa-carrageenan, gần với các giá trị trong các công bố của Santos, 1989 (930 cm^{-1}) [132], Mendoza và cộng sự, 2002 (930 cm^{-1}) [133], Aguilan và cộng sự, 2003 (930 cm^{-1}) [137], Chiovitti và cộng sự, 2008 (939 cm^{-1}) [152], Arman và Qader, 2012 (928 cm^{-1}) [139]. Dải hấp thụ ở 1157 cm^{-1} và 1034 cm^{-1} cũng đã được báo cáo cho dao động hóa trị của cầu nối $-\text{O}-$ và dao động hóa trị của liên kết C-O của kappa-carrageenan, tương ứng với các giá trị đã công bố của Arman và Qader, 2012 (1125 cm^{-1} và 1040 cm^{-1}) [139], Souza và cộng sự, 2018 (1159 cm^{-1} và 850 cm^{-1}) [140]. Dải hấp thụ ở 1640 cm^{-1} đặc trưng cho cấu trúc nước còn trong mẫu theo thông báo của Kacurakova và Wilson, 2001 [141]. Sự hiện diện của

các dải ở 2904 cm^{-1} và 3396 cm^{-1} đặc trưng cho dao động của hóa trị của C-H, O-H tồn tại trong mẫu carrageenan tương tự theo công bố Souza và cộng sự, 2018 (2934 cm^{-1} và 3441 cm^{-1}) [140].



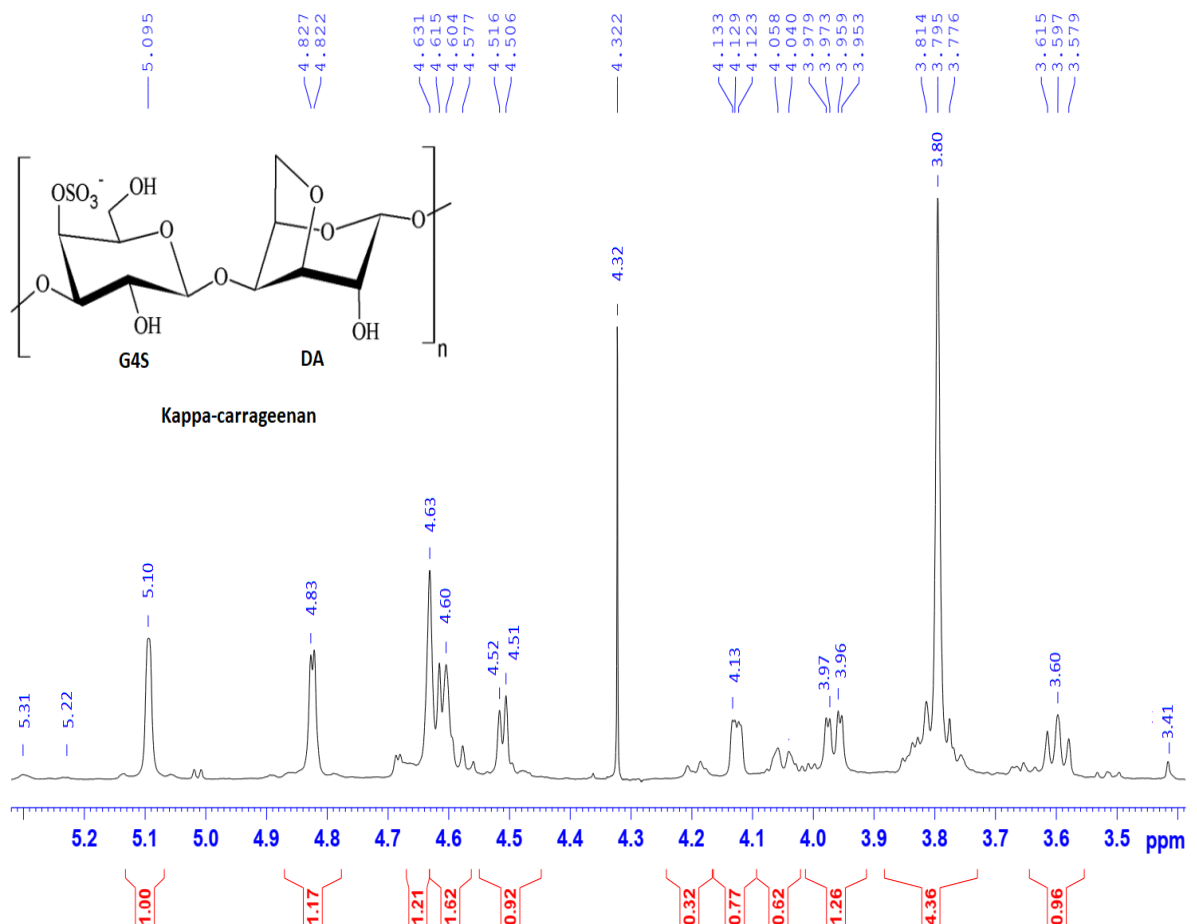
Hình 3.6. Phổ FT-IR của carrageenan từ rong *K. striatus*: a) carrageenan chiết tự nhiên, b) carrageenan chiết xử lý kiềm (KOH).

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân của carrageenan từ rong đỏ *K. striatus*

Phổ ^1H NMR của carrageenan từ rong đỏ *Kappaphycus striatus*

Kết quả phổ ^1H NMR (Hình 3.7) và độ chuyển dịch của carrageenan chiết từ rong *K. striatus* cho thấy sự chuyển dịch hóa học của các tín hiệu mạnh của proton

trong các nhóm disaccharide lặp lại, chúng tương ứng với các giá trị đã được công bố của kappa-carrageenan từ rong đỏ của Usov và cộng sự, 1984 [142], Villanueva và cộng sự, 2003 [143], Cosenza và cộng sự, 2014 [144]. Bảng 3.6 thể hiện sự chuyển hóa học và của các proton tương ứng trong disaccharide, so sánh với các tài liệu tham khảo đã được báo cáo của kappa-carrageenan chiết tách từ rong đỏ kappa-carrageenan thương mại [142], *Kappaphycus striatus* ở Philippines [143], và *Hypnea musciformis* (Wulfen) ở Brazil [144].



Hình 3.7. Phổ ^1H NMR của carrageenan từ rong *K. striatus*.

Các tín hiệu ở 5,10 và 4,63 ppm tương ứng của các proton α -anomeric của 3,6-anhydro- α -D-galactose (DA) và β -D-galactose-4-sulfate (G4S) đã được báo cáo đối với kappa-carrageenan từ rong đỏ *K. striatus* thu được ở vùng biển Philippines (Villanueva và Montano, 2003 tín hiệu ở 5,10 và 4,63 ppm [143], *H. musciformis* ở Brazil (Cosenza và cộng sự, 2014 tín hiệu ở 5,15 và 4,70 ppm) [144] và các nguồn tham khảo khác [39, 137].

Bảng 3.6. Độ chuyển dịch hóa học trong phổ ^1H NMR (ppm) của carrageenan chiết xuất từ rong đỏ *K. striatus* và kappa-carrageenan trong tài liệu tham khảo.

Đơn vị đường	Proton	Carrageenan từ <i>K. striatus</i>	Kappa-carrageenan (TLTK)		
			Usov và cs.1984 [142]	Villanueva và cs. 2003 [143]	Cosenza và cs. 2014 [144]
D- Galactose- 4-sulfate (G4S)	H1	4,63	4,611	4,63	4,70
	H2	3,60	3,595	3,61	3,65
	H3	3,97	3,952	3,97	4,06
	H4	4,83	4,814	4,82	4,91
	H5	3,80	3,769	3,80	3,87
	H6	3,96	3,805	3,80	3,86
	H- OCH ₃	3,41	3,40-3,65	3,42	~3,40
3,6- Anhydro- D- galactose (DA)	H1	5,10	5,091	5,10	5,15
	H2	4,13	4,125	4,15	4,19
	H3	4,51	4,505	4,51	4,58
	H4	4,52	4,625	4,63	4,65
	H5	4,60	4,605	4,63	4,70
	H6	4,32	4,187	4,15	4,19

H1-6: cho biết số proton

Các tổ hợp tín hiệu proton ở 3,60, 3,97, 4,83, 3,80 và 3,96 ppm của β -D-galactose-4- sulfate, và ở 4,13, 4,51, 4,52, 4,60 và 4,32 ppm của 3,6-anhydro- α -D-galactose tương ứng với các tín hiệu phổ ^1H NMR cho kappa-carrageenan đã được báo cáo trong Bảng 3.6 (Aguilan và cộng sự, 2003; V.L. Campo và cộng sự, 2009; Cosenza và cộng sự, 2014) [39, 137, 144].

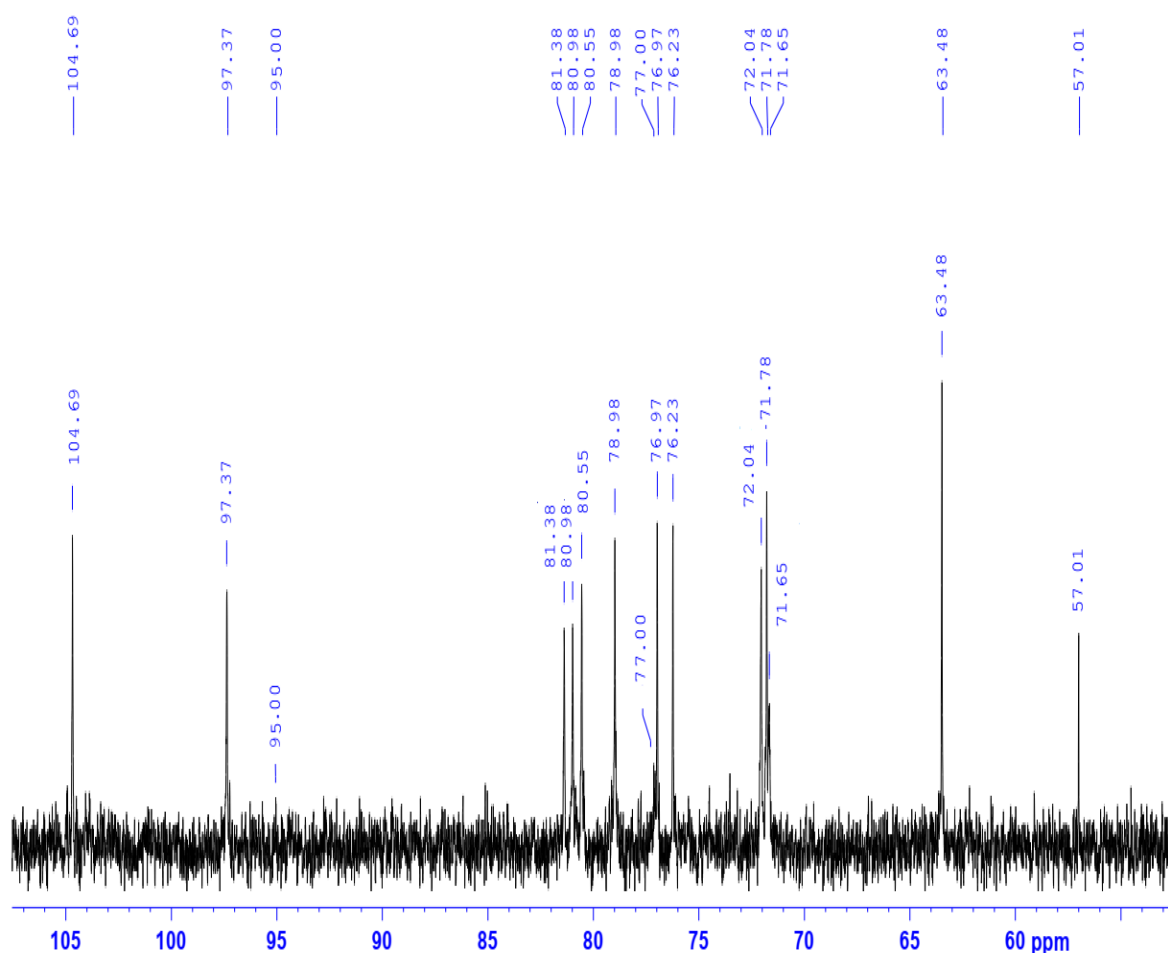
Tín hiệu yếu của proton ở 3,41 ppm trong phổ ^1H NMR, cho thấy sự methyl hoá (O-CH₃) ở vị trí C-6 của D-galactose-4-sulfate của kappa-carrageenan, giá trị này tương tự các báo cáo của Mendoza và cộng sự, 2002, Aguilan và cộng sự, 2003, và Villanueva và Montano, 2003 là 3,42 ppm [133, 137, 143]. Ngoài ra, một tín hiệu

yếu ở 5,22 ppm (Hình 3.7) chỉ ra proton anomeric của gốc 4 liên kết α -D-galactose-6-sulfate của tiền chất sinh học của kappa-carrageenan [133, 137].

Ngoài ra, tín hiệu yếu ở 5,31 ppm là của proton α -anomeric ở C-2 của 3,6-anhydro- α -D-galactose-2-sulfate [133, 137], cho thấy sự hiện diện của iota-carrageenan trong thành phần carrageenan của rong *K. striatus*.

Phổ ^{13}C NMR của carrageenan từ rong đỏ *Kappaphycus striatus*

Kết quả phân tích phổ ^{13}C NMR ở Hình 3.8 của polysaccharide từ rong đỏ *K. striatus* tương ứng với tín hiệu của các nguyên tử carbon trong đơn vị lặp lại disaccharide của carrageenan, độ chuyển dịch hóa học trong phổ ^{13}C NMR (ppm) của carrageenan chiết xuất từ rong đỏ *K. striatus* và kappa-carrageenan của các tài liệu tham khảo được tổng hợp ở Bảng 3.7.



Hình 3.8. Phổ ^{13}C NMR của carrageenan từ rong *K. striatus*.

Bảng 3.7. Độ chuyển dịch hóa học trong phổ ^{13}C NMR (ppm) của carrageenan chiết xuất từ rong đỏ *K. striatus*.

Đơn vị đường	Carbon	Carrageenan từ <i>K. striatus</i>	Kappa-carrageenan		
			Villanueva và cs. 2003 [143]	Cosenza và cs. 2014 [144]	Van de Velde và cs. 2004 [137]
D- Galactose-4- sulfate (G4S)	C1	104,69	102,4	102,5	104,70
	C2	71,78	69,9	69,4	71,72
	C3	80,98	78,9	78,2	80,98
	C4	76,23	74,1	73,7	76,25
	C5	76,97	74,7	74,8	77,00
	C6	63,48	61,2	61,2	63,49
	C- OCH ₃	57,01	58,8	-	59,00
3,6- Anhydro-D- galactose (DA)	C1	97,37	95,2	94,7	97,34
	C2	72,04	69,9	69,7	72,11
	C3	81,38	79,1	79,2	81,41
	C4	80,55	78,2	78,4	80,54
	C5	78,98	76,7	76,7	79,07
	C6	71,65	69,4	69,7	71,72

C1-6: cho biết số carbon

Các tín hiệu chính ở 104,69 và 97,37 ppm được đặc trưng cho các carbon anomeric tương ứng của β -D-galactose-4- sulfate và 3,6-anhydro- α -D-galactose, giá trị này tương tự với các công bố của Mendoza và cộng sự, 2002 (102,6 ppm và 95,2 ppm) [133]; Aguilan và cộng sự, 2003 (102,5 ppm và 95,2 ppm) [137]; Chiovitti và cộng sự, 2008 (102,6 ppm và 95,3 ppm) [138]; Villanueva và Montano, 2003 (102,4 ppm và 95,2 ppm) [143]; Cosenza và cộng sự 2014 (102,5ppm và 94,7 ppm) [144]; và Van de Velde và cộng sự, 2004 (104,7 ppm và 97,34 ppm) [145]. Mặt khác, các tín hiệu carbon ở 71,78, 89,98, 76,23, 76,97 và 63,48 ppm của D-galactose-4-sulfate, và ở 72,04, 81,38, 80,55, 78,98 và 71,65 ppm của 3,6-anhydro-D-galactose tương ứng đối với C-2, C-3, C-4, C-5 và C-6 trong phổ ^{13}C NMR của kappa-carrageenan

gần với các giá trị đã công bố như Van de Velde và cộng sự 2004 (71,72, 80,98, 76,25, 77,00, 63,49 ppm của D-galactose-4-sulfate và 72,11, 81,41, 80,54, 79,07, 71,72 ppm của 3,6-anhydro-D-galactose) [145].

Tín hiệu ở 57,01 ppm được nhìn thấy trong phổ này, là của nhóm methoxyl trên C-6 của β -D-galactose-4-sulfate [133, 137]. Các nghiên cứu đã công bố cho thấy carrageenan chiết xuất từ *Kappaphycus* có thành phần chủ yếu là kappa-carrageenan và một lượng nhỏ iota-carrageenan. Trên thực tế, các tín hiệu ở 95,00 và 77,00 ppm trong phổ ^{13}C NMR (Hình 3.8) là của carbon anomeric C-1 và C-2 tương ứng của 3,6-anhydro- α -D-galactose-2-sulfate của iota-carrageenan, tương tự trong các báo cáo của Mendoza và cộng sự, 2002, Aguilan và cộng sự, 2003 [133, 137], cho thấy sự hiện diện của iota-carrageenan trong thành phần carrageenan của rong *K. striatus* được nghiên cứu.

Các số liệu chuyển dịch hóa học trong phổ NMR của polysaccharide chiết từ rong đỏ *K. striatus* trong nghiên cứu của đề tài giống và phù hợp với các số liệu của kappa-carrageenan đã được công bố của Aguilan và cộng sự, 2003 [137], Campo và cộng sự, 2009 [39]. Cho thấy carrageenan từ rong đỏ *K. striatus* dòng Sacol nâu có thành phần chủ yếu là kappa-carrageenan với một lượng nhỏ iota-carrageenan. Các giá trị chuyển dịch hóa học trong các phổ NMR cũng đã được công bố có sự chênh lệch có thể do mẫu được thu ở các nguồn khác nhau hoặc các thí nghiệm được tiến hành trong các điều kiện khác nhau [7, 119].

Từ kết quả phân tích của phổ hồng ngoại FT-IR và phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR, xác định polysaccharide chiết tách từ đối tượng rong *Kappaphycus striatus* nuôi trồng lại vịnh Vân Phong có chứa thành phần chủ yếu là kappa-carrageenan và một lượng nhỏ iota-carrageenan.

3.2. Kết quả xác định thành phần, tính chất và đặc trưng cấu trúc của lectin và carrageenan từ rong đỏ *Betaphycus gelatinus*

3.2.1 Thành phần và đặc tính của lectin từ rong đỏ *Betaphycus gelatinus*

Kết quả phân tích hàm lượng protein và hoạt tính NKHC của lectin chiết tách từ rong đỏ *B. gelatinus* được trình bày ở Bảng 3.8. Hoạt tính NKHC của lectin chiết tách từ *B. gelatinus* cũng được xác định trên hồng cầu thỏ đã được xử lý trypsin. Từ

1000 g rong *B. gelatinus* tươi chiết được 307,5 mL dịch lectin sau rửa có hàm lượng protein tổng là 386,68 mg, hàm lượng protein trong dịch lectin 1,26 (mg/mL), hoạt tính NKHC là 256 (HU/mL) và nồng độ nhỏ nhất gây NKHC là 4,91 ($\mu\text{g/mL}$) (Bảng 3.8). Và dịch lectin sau sắc ký lọc gel có hàm lượng protein là 0,034 (mg/mL), hoạt tính NKHC là 8 (HU/mL) và nồng độ nhỏ nhất gây NKHC là 4,10 ($\mu\text{g/mL}$).

Bảng 3.8. Hàm lượng protein và hoạt tính NKHC của lectin chiết từ rong đỏ *B. gelatinus*.

Lectin từ <i>B.gelatinus</i>	Dịch thô	Dịch sau kết tủa	Dịch sau SKLG
Thể tích (mL)	1650	307,5	1320
Protein (mg/mL)	1,31	1,26	0,034
Protein tổng (mg)	2161,50	386,86	44,88
HA (HU/mL)	64	256	8
HTTS (HU)	105600	78720	10560
HTR (HU/mL)	48,85	203,57	235,29
LHC($\mu\text{g/mL}$)	8,44	4,91	4,10

HA: Hoạt tính của 1 mL dịch lectin; HTTS: Hoạt tính tổng số; HTR: Hoạt tính riêng LHC (Lowest hemagglutination concentration): nồng độ nhỏ nhất gây NKHC; SKLG: Sắc ký lọc gel.

Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính NKHC của lectin từ rong đỏ *B. gelatinus* cho thấy sự có mặt của các ion kim loại như Ca^{2+} , Mg^{2+} và EDTA không ảnh hưởng khả năng gây ngưng kết tế bào hồng cầu của lectin. Và nhiệt độ tối ưu để không ảnh hưởng đến hoạt tính NKHC của lectin từ *B. gelatinus* là từ 20°C đến 60°C, do khi tăng nhiệt độ lên trên 60°C cấu trúc phân tử bị biến tính nên làm giảm hoạt tính của lectin, và hoạt tính mất hoàn toàn khi nhiệt độ tăng lên trên 80°C. Tính chất này thường gặp của hầu hết các lectin từ rong biển, độ bền nhiệt của lectin từ rong *B. gelatinus* tương tự lectin từ một số loài rong đỏ như *E. serra* và *K. striatus*. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy hoạt tính NKHC của lectin từ *B. gelatinus* không hề bị ảnh hưởng bởi sự thay đổi của pH ở cả 3 môi trường acid, trung tính và base.

Đặc hiệu liên kết carbohydrate của lectin từ rong đỏ *Betaphycus gelatinus*

Kết quả khảo sát đặc hiệu liên kết carbohydrate của lectin từ rong đỏ và *Betaphycus gelatinus* đối với các đường monosaccharide và glycoprotein được trình bày ở Bảng 3.9.

Bảng 3.9. Nồng độ đường monosaccharide và glycoprotein có khả năng ức chế hoạt tính ngưng kết hồng cầu của các lectin từ *B. gelatinus*.

STT	Monosaccharide và Glycoprotein	Nồng độ nhỏ nhất
	Monosaccharide	C_{min} (mM)
1	Glucose	-
2	N-acetyl-D-glucosamine	-
3	D-galactose	-
4	N-acetyl-D- galactosamine	-
5	D-mannose	-
6	N-acetyl-D-manosamine	-
7	Xylose	-
8	N-acetyl neuraminic acid	-
	Glycoprotein	C_{min} ($\mu\text{g/mL}$)
9	Transferrin	-
10	Asialo-Transferrin	-
11	Fetuin	-
12	Asialo-Fetuin	125
13	Yeast mannan	7.8
14	Porcine thyroglobulin	7.8
15	Porcine stomach mucin	125
16	Asialo-porcine stomach mucin	250

“-”: Đường 100mM hay glycoprotein 2000 $\mu\text{g/mL}$ không có khả năng gây ức chế hoạt tính ngưng kết hồng cầu của lectin. “ C_{min} ”: nồng độ nhỏ nhất của đường (mM) hoặc glycoprotein ($\mu\text{g/mL}$) có khả năng gây ức chế hoạt tính ngưng kết hồng cầu.

Từ bảng kết quả cho thấy hoạt tính ngưng kết hồng cầu của lectin từ rong đỏ rong *B. gelatinus* không bị ức chế bởi các monosaccharide như glucose, D-mannose, D-galactose, xylose, N-acetyl-glucosamine, N-acetyl-D-mannosamine, N-acetylgalactosamine, N-acetyl-neraminic acid và glycoprotein như transferrin, asialo-transferrin và fetuin. Đồng thời hoạt tính NKHC của các lectin từ rong đỏ *B. gelatinus* không bị ức chế bởi các glycoprotein như transferrin và fetuin, bởi transferrin chỉ mang N-glycan dạng phức và fetuin mang cả hai dạng phức N-glycan và O-glycan.

Tuy nhiên, asialo-fetuin ức chế hoạt tính NKHC của lectin từ rong đỏ *K. striatus* và *B. gelatinus* với nồng độ thấp nhất là 125 µg/mL, cho thấy sự loại bỏ các gốc acid sialic của fetuin đã tăng hoạt tính ức chế so với fetuin ban đầu. Lectin từ rong *B. gelatinus* bị ức chế bởi yeast mannan, porcine thyroglobulin mang dạng N-glycan, porcine stomach mucin mang dạng O-glycan và dẫn xuất asialo của nó. Sự loại bỏ gốc acid sialic của porcine stomach mucin không làm thay đổi hoạt tính ức chế, vậy các gốc acid sialic cuối cùng của chuỗi cacbohydrate trong porcine stomach mucin không ảnh hưởng đến hoạt tính ngưng kết hồng cầu của các lectin. Các kết quả phân tích cho thấy lectin từ rong đỏ *B. gelatinus* cũng tương tự như lectin từ rong đỏ *K. striatus* có thể tương tác với các gốc Man(α 1–3) hoặc Man(α 1–6) ở vị trí cuối cùng trong cấu trúc của yeast mannan và porcine thyroglobulin (nhóm dạng A) (Hình 3.2). Lectin từ rong *B. gelatinus* cho thấy có liên kết đặc hiệu với N-glycan dạng high-mannose, đây là tính chất quan trọng đến ứng dụng của lectin trong y học như kháng virus, kháng ung thư.

3.2.2. Thành phần và tính chất và đặc trưng cấu trúc của carrageenan từ rong đỏ *Betaphycus gelatinus*

Kết quả phân tích thành phần cho biết các số liệu về hàm lượng carrageenan, hàm lượng 3,6-anhydro-D-galactose và sulfate của carrageenan được chiết từ rong *B. gelatinus* theo từng thời gian thu hoạch được tổng hợp ở Bảng 3.10. Nhận thấy có sự thay đổi nhỏ theo các tháng thu hoạch về hàm lượng carrageenan, hàm lượng 3,6-anhydro-D-galactose và sulfate; các giá trị hàm lượng được ghi nhận vào tháng 5 đối với carrageenan chiết tự nhiên (lần lượt là 73,1%, 24,8% và 20,3%) và đối với carrageenan chiết xử lý kiềm (lần lượt là 31,5%, 43,9% và 8,6%) (Bảng 3.10). Trong khi đó hiệu suất chiết carrageenan từ rong đỏ *Eucheuma gelatinae* thu thập tại đảo

Hải Nam của Trung Quốc cũng được Greer và Yaphe, 1984 báo cáo với hàm lượng 61% trọng lượng khô của rong và hàm lượng 3,6-anhydro-D-galactose là 32% trên tổng carbohydrate từ chiết tự nhiên và hàm lượng 3,6-anhydro-D-galactose 48% từ carrageenan chiết xử lý kiềm [146]. Trong số các mẫu carrageenan được thu thập từ tháng 4 đến tháng 6, mẫu vào tháng 5 được xác định có hàm lượng 3,6-anhydro-D-galactose và hàm lượng carrageenan cao hơn một chút ở cả dạng chiết tự nhiên và xử lý kiềm, đã được chọn để đánh giá các đặc điểm cấu trúc và trọng lượng phân tử bằng phổ hồng ngoại FT-IR, phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^1H và ^{13}C NMR, và sắc ký GPC.

Bảng 3.10. Hàm lượng và thành phần của carrageenan được chiết từ *B. gelatinus* theo từng thời gian thu hoạch.

Tháng	Chiết tự nhiên			Chiết xử lý kiềm		
	Hàm lượng ^a	DA ^b	Sufate ^b	Hàm lượng ^a	DA ^b	Sufate ^b
Bốn	68,2 ± 2,1	23,1 ± 0,5	17,9 ± 1,7	24,2 ± 1,7	42,3 ± 0,6	8,7 ± 0,4
Năm	73,1 ± 2,3	24,8 ± 0,6	20,3 ± 0,6	31,5 ± 1,8	43,9 ± 0,7	8,6 ± 0,5
Sáu	68,4 ± 2,2	23,4 ± 0,4	20,0 ± 0,7	23,7 ± 1,6	41,6 ± 0,6	8,8 ± 0,5

^a tính trên % trọng lượng khô của rong, ^b tính trên % trọng lượng carrageenan

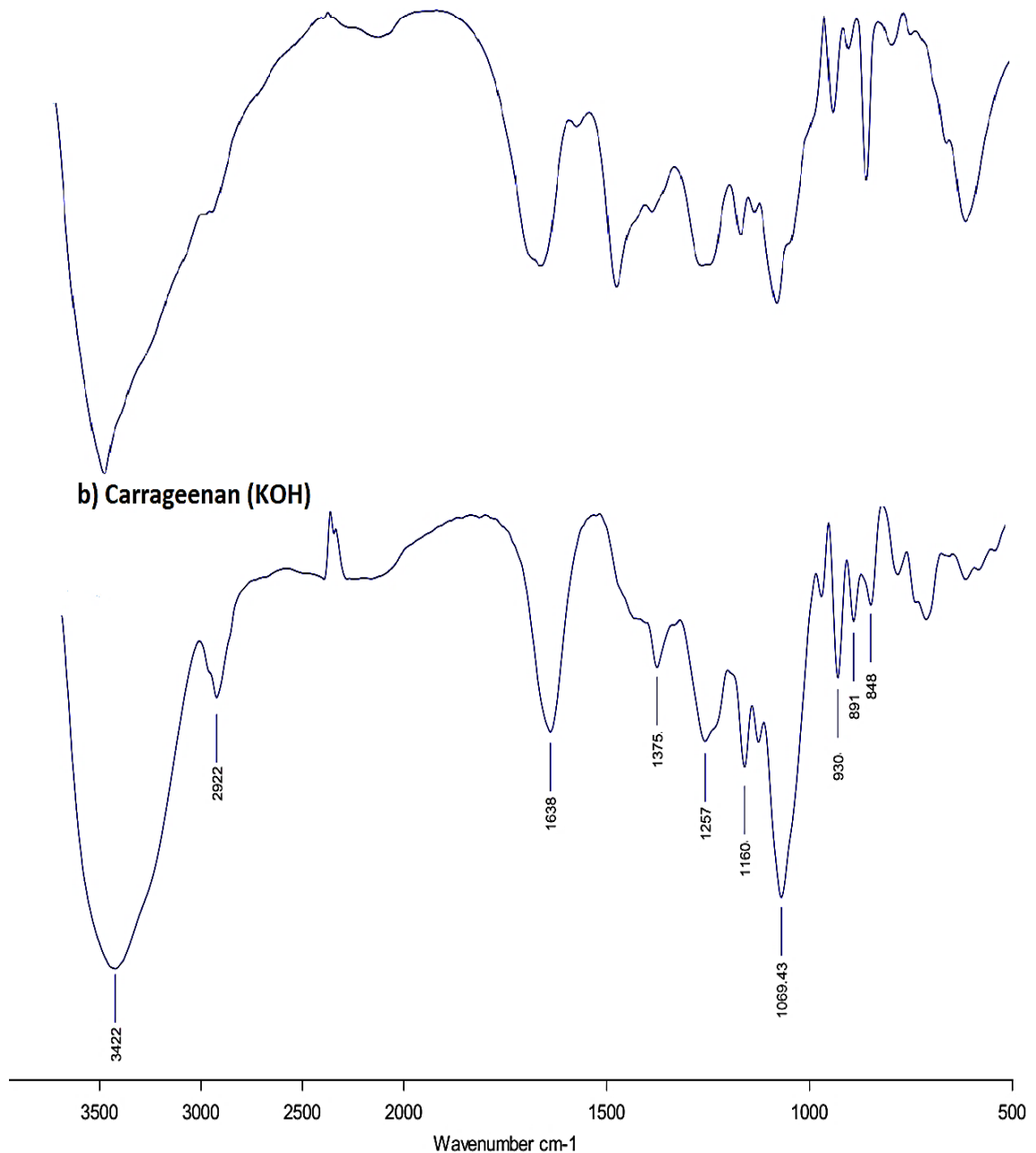
DA: 3,6-anhydro-D-galactose, số liệu tính trung bình ± SEM (n = 3)

Trọng lượng phân tử của carrageenan chiết tự nhiên từ rong *B. gelatinus* được xác định là $876 \pm 8,5$ kDa, trọng lượng phân tử của carrageenan chiết xử lý kiềm không được xác định do sự hình thành gel ngay ở nồng độ 2 mg/mL. Các mẫu carrageenan chiết tự nhiên được thu hoạch từ tháng 4 đến tháng 6 không tạo gel (dạng natri). Nhiệt độ tạo gel và nóng chảy, cũng như độ bền gel của carrageenan chiết xử lý kiềm 1,5% (dạng kali) từ tháng 4 đến tháng 6 không cho thấy sự khác biệt đáng kể, với các giá trị được ghi nhận lần lượt là $40,8 \pm 0,8^\circ\text{C}$, $74,5 \pm 0,7^\circ\text{C}$ và 310 ± 15 g cm⁻². Trong khi beta-carrageenan được tách chiết và tinh chế từ *E. gelatinae* thu thập được từ vùng biển Philippines và Đảo Hải Nam của Trung Quốc được báo cáo có nhiệt độ tạo gel và tan gel dao động từ 31 đến 33°C và 63 đến 70°C [146], [147]. Có sự khác biệt về thành phần và tính chất các mẫu carrageenan trong đề tài và các nghiên cứu đã công bố có thể do phương pháp chiết xuất được sử dụng trong mỗi nghiên cứu và các phương pháp đánh giá khác nhau [7, 119, 136].

Đặc trưng cấu trúc của carrageenan từ rong đỏ *Betaphycus gelatinus* được đánh giá dựa vào kết quả phân tích phổ hồng ngoại (FT-IR) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR:

Phổ hồng ngoại (FT-IR) của carrageenan từ rong đỏ *B. gelatinus*

a) Carrageenan tự nhiên



Hình 3.9. Phổ FT-IR của carrageenan từ rong *B. gelatinus*: a) carrageenan chiết tự nhiên, b) carrageenan chiết xử lý với dung dịch kiềm (KOH).

Kết quả phổ phổ FT-IR carrageenan từ rong *B. gelatinus* chiết tự nhiên và xử lý với dung dịch kiềm cho thấy các dải hấp thụ điển hình liên quan đến polysaccharide sulfate của carrageenan (Hình 3.9. a, b). Phổ FT-IR của carrageenan xử lý kiềm cho thấy rõ các dải hấp thụ hơn so với mẫu carrageenan tự nhiên. Các dải hấp thụ điển hình ở số sóng 930, 848 và 1257 cm^{-1} của carrageenan đã xác nhận sự hiện diện của C-O-C của 3,6-anhydro-D-galactose, dao động kéo dài C4-O-S và dao động đối xứng O=S=O của β -D-galactose-4-sulfate tương ứng đối với kappa-carrageenan trong các công bố của Greer và Yaphe, 1984; Santos, 1989; Mendoza và cộng sự, 2002; Aguilan và cộng sự, 2003; Chiovitti và cộng sự, 2008 [132, 133, 137, 138, 146].

Quan sát phổ FT-IR (Hình 3.9) có dao động ở số sóng 891 cm^{-1} được tương ứng với liên kết 3- β -D-galactose không chứa sulfate, cho thấy polysaccharide cũng chứa một thành phần beta-carrageenan tương ứng các giá trị đã công bố của Liao và cộng sự, 1993 ($890\text{--}900\text{ cm}^{-1}$) [148], và Chiovitti và cộng sự, 2008 (890 cm^{-1}) [138].

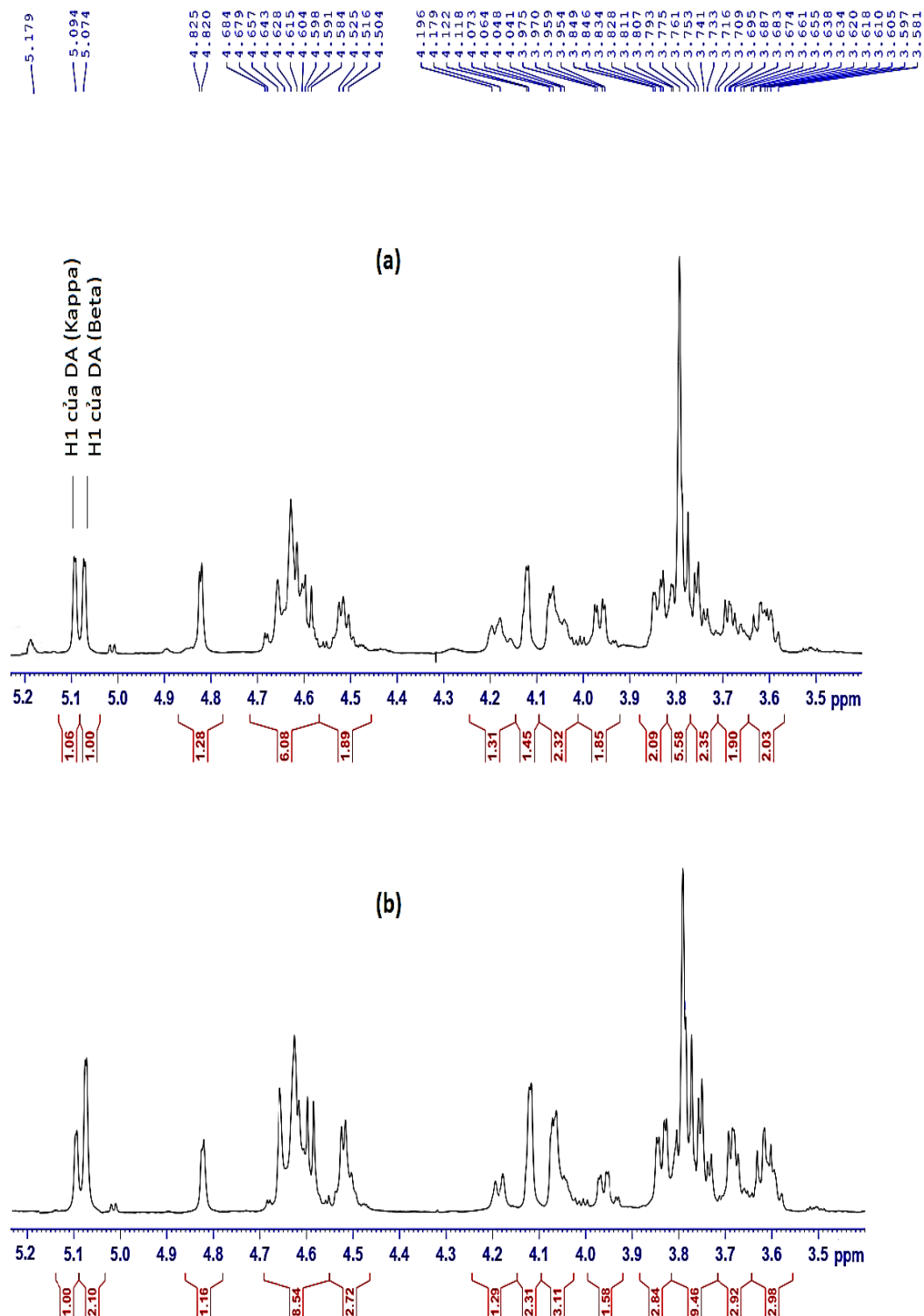
Phổ cộng hưởng từ hạt nhân của carrageenan từ rong đỏ *B. gelatinus*

Phổ ^1H NMR của carrageenan từ rong đỏ *B. gelatinus*

Quan sát phổ ^1H NMR của polysaccharide từ rong đỏ *Betaphycus gelatinus* ở Hình 3.10. a, b, có sự phức tạp trong việc xác định các dịch chuyển hóa học trong phổ ^1H NMR do tính không đồng nhất của thành phần các carrageenan có trong rong.

Phổ NMR ^1H của carrageenan chiết tự nhiên và xử lý kiềm từ *B. gelatinus* hiển thị các tín hiệu chính đối với các proton α -anomeric của DA ở tín hiệu 5,094 ppm đối với kappa-carrageenan và 5,074 ppm đối với beta-carrageenan (Hình 3.10), tương tự với số liệu được báo cáo trong nghiên cứu của Van de Velde và cộng sự, 2004 [145]. Ngoài ra, tín hiệu 5,179 ppm trong carrageenan chiết tự nhiên từ *B. gelatinus* (Hình 3.10.a) có thể được quy cho các proton α -anomeric của các gốc 4-liên kết- α -D-galactopyranosyl-6-sulfate của các disaccharide của gamma-carrageenan ("tiền chất" của các đơn vị beta-carrageenan). Điều này đã được báo cáo ở tín hiệu 5,20 ppm đối với các disaccharide của gamma-carrageenan trong các carrageenan lai tự nhiên từ *Furcellaria lumbricalis* và *Tichocarpus crinitus* (Correc và cộng sự, 2012) [149]. Tín hiệu này không xuất hiện trong phổ ^1H NMR của mẫu carrageenan chiết xử kiềm từ *B. gelatinus* (Hình 3.10.b) cho thấy sự chuyển đổi các gốc 4-liên kết- α -D-

galactopyranosyl-6-sulfate thành các đơn vị 4-liên kết-3,6-anhydro-D-galactose sau khi xử lý kiềm.



Hình 3.10. Phổ ^1H NMR của carrageenan từ rong đỏ *Betaphycus gelatinus*: a) carrageenan chiết tự nhiên, b) carrageenan chiết xử lý kiềm (KOH).

Quan sát phổ cho thấy diện tích đỉnh của proton α -anomeric của DA đối với các đơn vị beta-carrageenan (5,074 ppm) tăng đáng kể sau khi xử lý kiềm (Hình 3.10.b) so với carrageenan tự nhiên (Hình 3.10. a), trong khi không có sự thay đổi đáng kể nào về diện tích đỉnh của proton α -anomeric của DA đối với các đơn vị kappa-carrageenan (5,094 ppm) giữa phổ carrageenan tự nhiên và xử lý kiềm (Hình 3.10). Những kết quả này chỉ ra rằng quá trình xử lý kiềm chuyển đổi từ gamma-carrageenan (tiền chất 6-sulfate của beta-carrageenan) thành beta-carrageenan, chứ không phải của kappa-carrageenan. Độ dịch chuyển hóa học ^1H NMR của các proton α -anomeric của carrageenan chỉ hơi khác một chút so với những độ dịch chuyển trong các nghiên cứu đã công bố [151, 156, 163].

Phổ ^{13}C NMR của carrageenan từ rong đỏ *B. gelatinus*

Trong phổ ^{13}C NMR, độ dịch chuyển hóa học của DSS lớn hơn (trung bình 2,1ppm) so với độ dịch chuyển hóa học của dimethyl sulfoxide (DMSO) đã được báo cáo trước đây của Usov và cộng sự, 1980 [150]; Van de Velde và cộng sự, 2002, 2004 [145, 150, 151]. Khi đề cập đến độ dịch chuyển hóa học của các nguyên tử carbon trong phổ ^{13}C NMR so với chất chuẩn nội DSS, các tín hiệu độ dịch chuyển hóa học của các nguyên tử carbon của carrageenan từ *B. gelatinus* trong nghiên cứu này (Hình 3.11. Bảng 3.11) tương tự như những tín hiệu đã được báo cáo trong nghiên cứu của Van de Velde và cộng sự, 2004 [151].

Phổ ^{13}C NMR của cả carrageenan chiết tự nhiên và xử lý kiềm từ *B. gelatinus* cho thấy các tín hiệu chính của carbon anomeric ở C-1 của β -D-galactose (G) (tại 104,81 ppm) và 3,6 anhydro- α -D-galactose (DA) (tại 96,78 ppm) đối với beta-carrageenan và ở C-1 của β -D-galactose-4-sulfate (G4S) (tại 104,68 ppm) và 3,6 anhydro- α -D-galactose (DA) (tại 97,33 ppm) đối với kappa-carrageenan đã được công bố (Liao và cộng sự, 1993; Mendoza và cộng sự, 2002; Villanueva và Montano, 2003; Aguilan và cộng sự, 2003; Van de Velde và cộng sự, 2004; Chiovitti và cộng sự, 2008; Cosenza, và cộng sự 2014) [133, 137, 138, 143, 144, 145, 147].

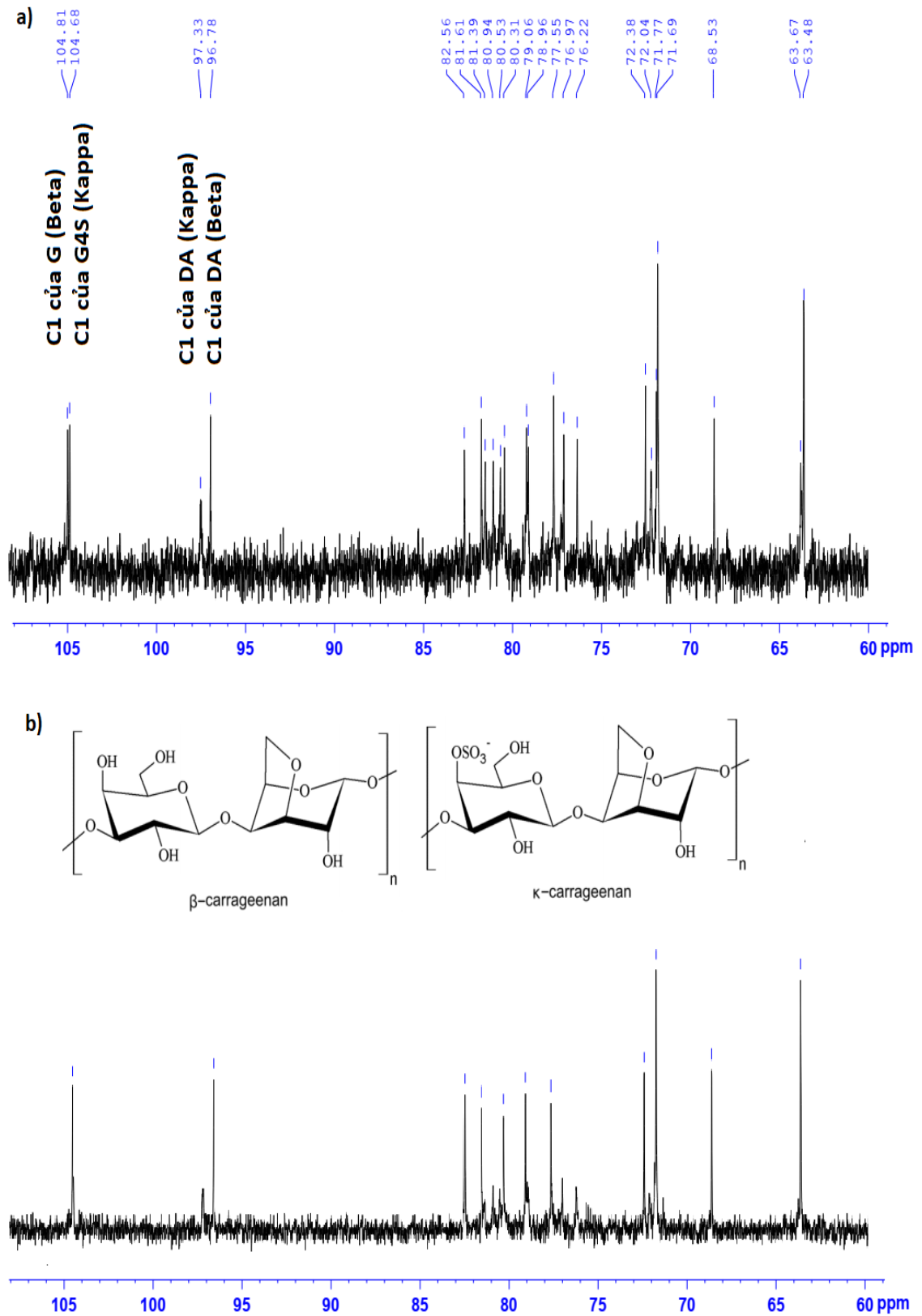
Sự dịch chuyển hóa học của các nguyên tử carbon anomeric đo được trong dung môi DMSO của kappa/beta carrageenan lai hóa đã được thông báo trong các công bố, từ dịch chiết nóng của *E. gelatinae* đối với beta-carrageenan là 102,5 ppm và 94,6 ppm, và kappa-carrageenan là 102,5 ppm và 95,3 ppm [146, 150]; từ

polysaccharide biến tính bằng kiềm của *Tylotus obtusatus* của beta-carrageenan là 102,7 ppm và 94,7 ppm, và kappa-carrageenan là 102,7 ppm và 95,3 ppm [147]; từ *Hennedya Crispa* cho beta-carrageenan là 102,6 ppm và 94,7 ppm, và kappa-carrageenan là 102,6 ppm và 95,3 ppm [138].

Bảng 3.11. Độ chuyển dịch hóa học trong phổ ^{13}C NMR (ppm) của carrageenan chiết xuất từ rong đỏ *B. gelatinus*.

Đơn vị đường	Carbon	Beta-carrageenan/ TLTK	Kappa-carrageenan/ TLTK
D-Galactose- 4-sulfate (G4S)	C1	104,81/ 104,81	104,68/ 104,70
	C2	71,69/ 71,72	71,77/ 71,72
	C3	82,56/ 82,58	80,94/ 80,98
	C4	68,53/ 68,56	76,22/ 76,25
	C5	77,55/ 77,55	76,97/ 77,00
	C6	63,67/ 63,49	63,48/ 63,49
3,6-Anhydro- D-galactose (DA)	C1	96,78/ 96,81	97,33/ 97,34
	C2	72,38/ 72,40	72,04/ 72,11
	C3	81,61/ 81,64	81,39/ 81,41
	C4	80,31/ 80,33	80,53/ 80,54
	C5	79,06/ 79,26	78,96/ 79,07
	C6	71,77/ 71,72	71,69/ 71,72

C1-6: cho biết số carbon



Hình 3.11. Phổ ^{13}C NMR của carrageenan từ rong đỏ *Betaphycus gelatinus*: a) carrageenan chiết tự nhiên, b) carrageenan chiết xử lý kiềm (KOH).

Hơn nữa, độ dịch chuyển hóa học của carbon C-2, C-3, C-4, C-5 và C-6 của β -D-galactose (G) và 3,6-anhydro-D-galactose (DA) của beta-carrageenan và của β -D-galactose-4-sulfate (G4S) và 3,6-anhydro-D-galactose (DA) của kappa-carrageenan trong nghiên cứu này tương ứng với C-2, C-3, 4, C-5 và C-6 của beta-carrageenan (G và DA) và kappa-carrageenan (G4S và DA) từ *T. obtusatus* đã được Liao và cộng sự, 1993 công bố, *Acrotylus australis*, *Amphiplexia hymenocladoides*, *Antrocentrum nigrescens* và *H. Crispa* đã được Chiovitti và cộng sự, 2008 công bố [138].

Ngoài ra, một tín hiệu yếu ở 5,179 ppm (Hình 3.10. a) được cho là do proton anomeric của các gốc 4-liên kết- α -D-galactose-6-sulfate của carrageenan (Greer và Yaphe, 1984; Mendoza và cộng sự, 2002; Aguilan và cộng sự, 2003) [133, 139, 146]. Sự vắng mặt của tín hiệu này trong phổ ^1H NMR của mẫu carrageenan xử lý kiềm (Hình 3.10. b) phản ánh sự chuyển đổi các gốc 6-sulfate galactose thành 3,6-anhydro-D-galactose khi xử lý kiềm. So sánh diện tích peak của proton α -anomeric của DA đối với kappa-carrageenan tại 5,094 ppm trong phổ carrageenan chiết tự nhiên, và carrageenan xử lý kiềm đều không có thay đổi đáng kể (Hình 3.10. a và b), cho thấy các gốc 4-liên kết- α -D-galactose-6-sulfate chủ yếu có trong beta-carrageenan của carrageenan chiết tự nhiên, và được định nghĩa là tiền chất beta-carrageenan sulfate 6 [146].

Sự phân bố của beta/kappa-carrageenan lai hóa từ rong đỏ *E. gelatinae* đã được nghiên cứu thông qua quá trình phân hủy carrageenan bằng enzyme của Greer và Yaphe, 1984 [146]. Trong nghiên cứu này, sự phân bố của beta/kappa-carrageenan trong carrageenan từ rong đỏ *B. gelatinus* được ước tính dựa trên tính toán diện tích đỉnh của tín hiệu proton α -anomeric của DA (5,094 ppm đối với kappa-carrageenan và 5,074 ppm đối với beta-carrageenan) trong phổ ^1H NMR (Hình 3.10. a, b) và cường độ tín hiệu của các carbon anomeric tại C-1 (104,81 ppm và 96,78 ppm đối với beta-carrageenan; 104,68 ppm và 97,33 ppm đối với kappa-carrageenan) trong phổ NMR ^{13}C (Hình 3.11). Kết quả hàm lượng beta-carrageenan khá cao (68,6%) so với hàm lượng kappa-carrageenan (31,4%). Kết quả tương tự đã được báo cáo đối với carrageenan từ *E. gelatinae*, sau khi thủy phân với enzyme, thu được hàm lượng 66% bao gồm các đơn vị beta- và gamma-carrageenan, trong khi carrageenan xử lý kiềm

về cơ bản có thành phần là beta-carrageenan [147]. Sự khác biệt về sự phân bố các hàm lượng beta-carrageenan trong carrageenan từ rong đỏ *E. gelatinae* và *B. gelatinus* có thể là do phương pháp được sử dụng khi thu thập mẫu trong mỗi nghiên cứu.

Từ các kết quả phân tích cho thấy thành phần carrageenan xử lý kiềm được chiết tách từ rong đỏ *B. gelatinus* là carrageenan lai hóa gồm beta-carrageenan và kappa-carrageenan, trong đó hàm lượng kappa-carrageenan tương đối thấp và khó tách riêng hai loại carrageenan này. Trong đề tài nghiên cứu này do thành phần không đồng nhất của carrageenan từ *B. gelatinus*, nên dẫn xuất carboxymethyl-carrageenan được tiến hành tổng hợp từ kappa-carrageenan chiết tách từ rong đỏ *K. striatus*.

3.3. Kết quả xác định đặc tính và đặc trưng cấu trúc của carboxymethyl-kappa-carrageenan và hạt vi nang carrageenan-lectin

3.3.1. Thành phần và tính chất của carboxymethyl-kappa-carrageenan

Thành phần và trọng lượng phân tử lượng trung bình của kappa-carrageenan và các dẫn xuất carboxymethyl-kappa-carrageenan được trình bày trong Bảng 3.12.

Bảng 3.12. Thành phần của các mẫu carboxymethyl-kappa-carrageenan.

Mẫu	Hàm lượng DA (% w/w)	Hàm lượng sulfate (%w/w)	MW (kDa)
KC	27,7 ± 0,7	27,7 ± 0,9	791 ± 9,3
KC-0/1	28,5 ± 0,8	23,9 ± 0,7	747,4 ± 8,3
CMKC-1/1	27,5 ± 0,6	23,8 ± 0,7	756,1 ± 7,5
CMKC-2/1	26,2 ± 0,6	23,7 ± 0,6	772,8 ± 7,3
CMKC-3/1	23,6 ± 0,5	23,4 ± 0,5	779,6 ± 9,9
CMKC-4/1	19,5 ± 0,4	22,5 ± 0,5	775,0 ± 6,2
CMKC-5/1	18,4 ± 0,4	22,3 ± 0,5	774,3 ± 6,3

DA: 3,6-anhydro-D-galactose; MW: trọng lượng phân tử trung bình xác định theo phương pháp sắc ký thẩm thấu gel. Số liệu tính trung bình ± SEM (n = 3)

Hàm lượng 3,6-anhydro-D-galactose (DA) trong KC-0/1 tăng nhẹ trong khi hàm lượng sulfate giảm so với kappa-carrageenan ban đầu, cho thấy rằng xử lý với kiềm dẫn đến việc loại bỏ nhóm sulfate tại C-6 của α-D-galactopyranose thành nhóm

hydroxyl tự do và chuyển thành 3,6-anhydro-D-galactose như đã báo cáo trong công bố của Aguilan và cộng sự, 2003 [137] và Tranquilan-Aranilla và cộng sự, 2012 [67].

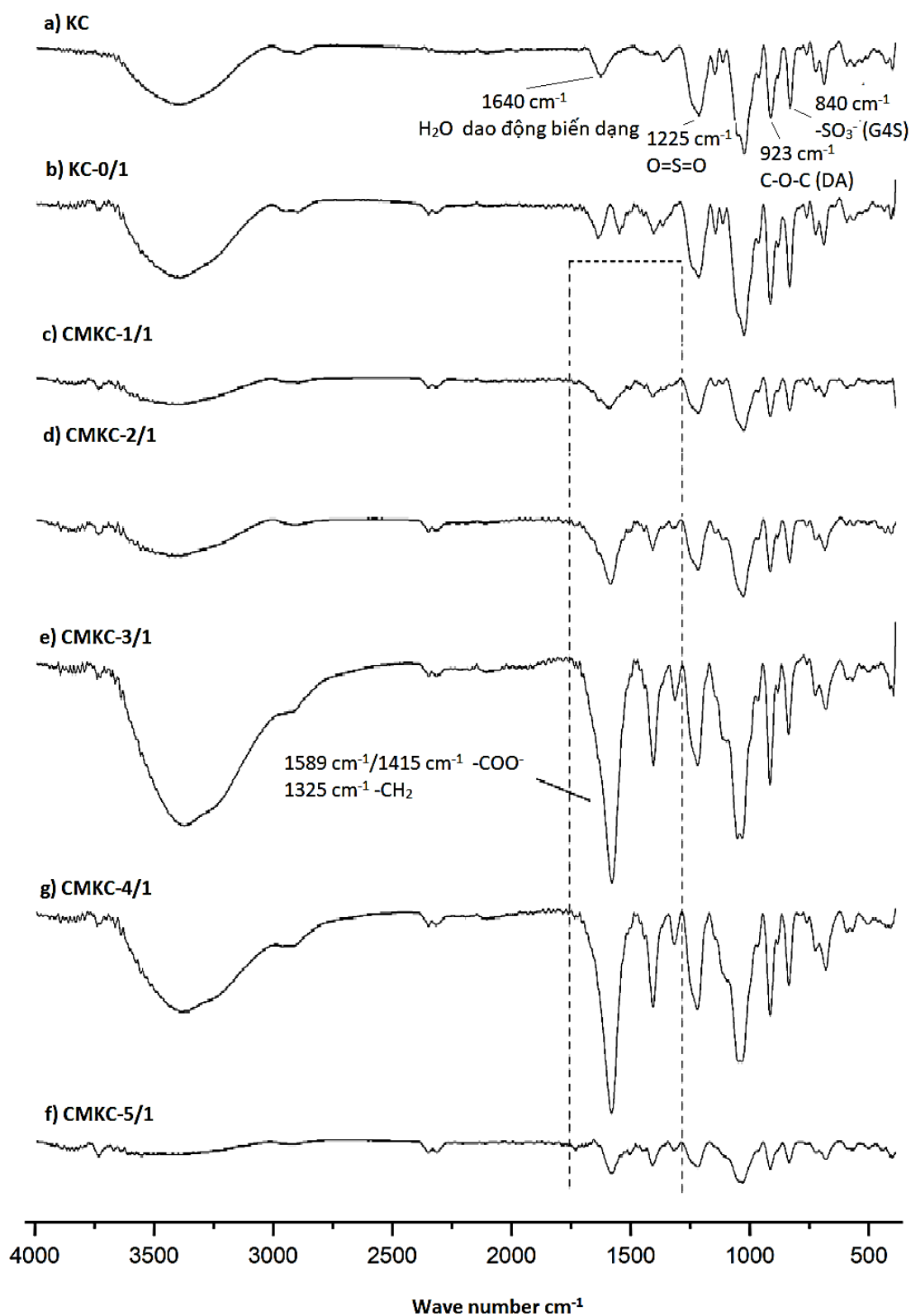
Trong nghiên cứu chỉ xem xét ảnh hưởng của các tỷ lệ mol khác nhau của acid monochloroacetic (MCA) với KC-0/1 đối với mức độ thay thế (DS). Kết quả cho thấy việc tăng tỷ lệ mol nMCA/nKC-0/1 trong quá trình carboxymethyl hóa carrageenan gây ra hiệu ứng khử, dẫn đến thủy phân SO_3^- ở C-4 của β -D-galactose và có thể phá vỡ cầu nối 3,6-anhydro của 3,6-anhydro- α -D-galactose như đã báo cáo [67].

Trọng lượng phân tử của KC-0/1 giảm so với KC, trong đó KC-0/1 được tổng hợp trong điều kiện xử lý kiềm mà không có acid monochloroacetic. Sự khử xảy ra trong quá trình xử lý kiềm, bằng chứng là sự giảm trọng lượng phân tử như đã báo cáo đối với kappa-carrageenan và các polysaccharide khác. Tuy nhiên, trong bước tiếp theo để carboxymethyl hóa KC, trọng lượng phân tử của các dẫn xuất carboxymethyl-kappa-carrageenan tăng lên sau khi tăng mức độ thay thế so với KC-0/1 (Bảng 3.12) trọng lượng phân tử các mẫu CMKC tăng từ 756,1 kDa đến 779,6 kDa, trong đó mẫu CMKC-3/1 có trọng lượng phân tử cao nhất. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận đối với việc tăng trọng lượng phân tử của các dẫn xuất carboxymethyl-kappa-carrageenan tổng hợp từ kappa-carrageenan đã được công bố bởi Tranquilan-Aranilla và cộng sự, 2012 [67].

3.3.2. Đặc trưng cấu trúc của carboxymethyl-kappa-carrageenan từ rong *Kappaphycus striatus*

Phổ FT-IR của carboxymethyl-kappa-carrageenan

Kết quả phân tích phổ của các mẫu carboxymethyl-kappa-carrageenan so với mẫu kappa-carrageenan ban đầu được trình bày ở Hình 3.12.



Hình 3.12. Phổ FT-IR của các mẫu carboxymethyl-kappa-carrageenan: a) KC-0/1, b) CMKC-1/1, CMKC-2/1, CMKC-3/1, CMKC-4/1, CMKC-5/1. (1/1 đến 5/1 là các tỷ lệ mol khác nhau của MCA/KC)

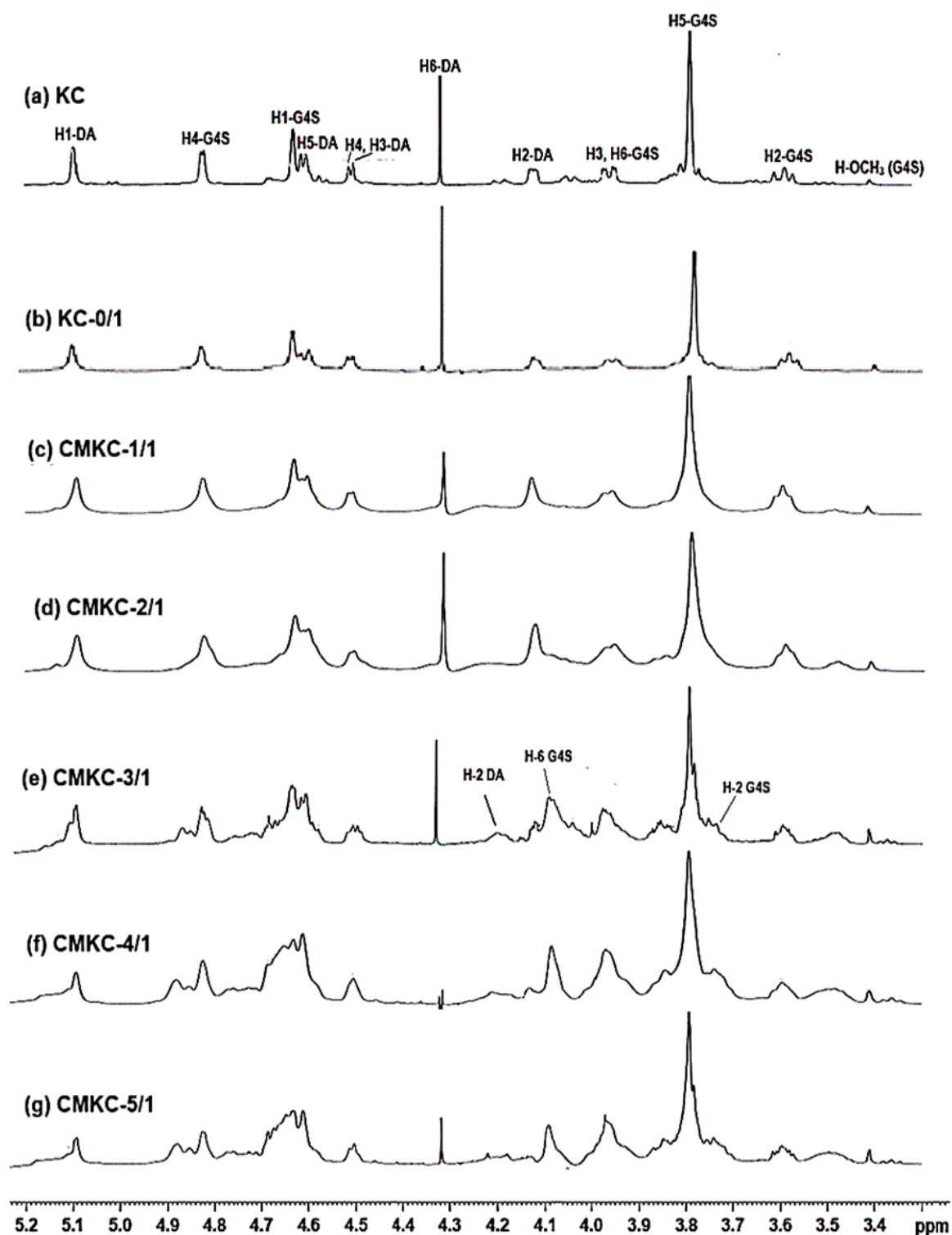
Trong phổ FT-IR của các mẫu CMKC (Hình 3.12. c, d, e, f, g), sự xuất hiện của các dải mới tại 1589 cm^{-1} và 1415 cm^{-1} được cho là tương ứng với các dao động kéo dài đối xứng và không đối xứng của các anion carboxylate ($-\text{COO}^-$) và dải tại 1325 cm^{-1} đã được báo cáo báo là dao động kéo của $-\text{CH}_2-$ trong nhóm carboxymethyl [67, 70]. Sự hiện diện của ba dải mới xác cho thấy quá trình carboxymethyl hóa kappa-carrageenan đã thành công tạo carboxymethyl-kappa-carrageenan.

Phổ NMR của carboxymethyl-kappa-carrageenan

Độ dịch chuyển hóa học trong cấu trúc của kappa-carrageenan (KC), KC-0/1 và các dẫn xuất từ phổ NMR ^1H và ^{13}C được thể hiện trong Hình 3.13 và 3.15. Hình 3.13. a và b từ phổ ^1H NMR cho thấy các tín hiệu dịch chuyển giống nhau của kappa-carrageenan (KC) và KC-0/1 của mười hai nguyên tử hydro và proton của nhóm $-\text{OCH}_3$, và Hình 3.13. a và b từ phổ ^{13}C NMR cho thấy mười hai nguyên tử carbon và carbon của nhóm $-\text{OCH}_3$ tại C-6 của β -D-galactose-4-sulfate trong đơn vị lặp lại disaccharide. Độ dịch chuyển hóa học của proton và carbon của KC-0/1 và CMKC-3/1 được đưa ra trong Bảng 3.11 và 3.13 gần giống với các giá trị đã công bố của Van de Velde và cộng sự, 2004 [151], Tranquilan-Aranilla và cộng sự, 2012 [67].

Phổ ^1H NMR của carboxymethyl-kappa-carrageenan

Hình 3.13 cho thấy sự so sánh độ dịch chuyển hóa học giữa các mẫu KC, KC-0/1 (Hình 3.13. a, b) và CMKC (Hình 3.13. c, d, e, f, g) từ phổ ^1H NMR. Trong số các phổ ^1H NMR của các mẫu CMKC, phổ CMKC-3/1 được chọn để thể hiện các đỉnh proton mới (Hình 3.13. e), do mức độ thay thế cao nhất. So sánh các giá trị độ chuyển dịch của KC ở Bảng 3.6, KC-0/1 ở Bảng 3.13, và mẫu CMKC-3/1 ở Bảng 3.13 cho thấy sự xuất hiện của các đỉnh proton mới ở $\delta = 3,77, 4,08$ và $4,24\text{ ppm}$, được xác định cho các proton methylene trong nhóm thế carboxymethyl tại các vị trí C-2 và C-6 của đơn vị β -D-galactopyranose-4 sulfate (đơn vị G4S) và vị trí C-2 của đơn vị 3,6-anhydro- α -D-galactopyranose (đơn vị DA) tương ứng, và các đỉnh này không có trong phổ KC-0/1, chỉ ra rằng các nhóm hydroxyl của KC-0/1 đã được carboxymethyl hóa.



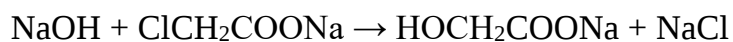
Hình 3.13. Phổ ^1H NMR của kappa-carrageenan (KC), KC-0/1 và carboxymethyl-kappa-carrageenan (CMKC-1/1 đến CMKC-5/1). 1/1 đến 5/1 là các tỷ lệ mol khác nhau của MCA/KC-0/1. DA: 3,6-anhydro- α -D-galactose; G4S: β -D-galactose-4-sulfate.

Bảng 3.13. Độ chuyển dịch hóa học trong phổ ^1H NMR (ppm) của các mẫu carboxymethyl-kappa-carrageenan KC-0/1, CMKC-3/1.

Đơn vị đường	Proton	KC-0/1	CMKC-3/1
D-Galactose-4-sulfate (G4S)	H1	4,46	4,61
	H2	3,60	3,60
	H3	3,97	3,97
	H4	4,84	4,82
	H5	3,79	3,79
	H6	3,96	3,96
	H-OCH ₃	3,41	3,41
3,6-Anhydro-D-galactose (DA)	H1	5,09	5,09
	H2	4,13	4,13
	H3	4,51	4,51
	H4	4,52	4,52
	H5	4,61	4,61
	H6	4,32	4,33
Nguyên tử chức hóa	H-6 G4S		4,08
	H-2 G4S		3,77
	H-2 DA		4,22

Độ thay thế DS của nhóm carboxymethyl

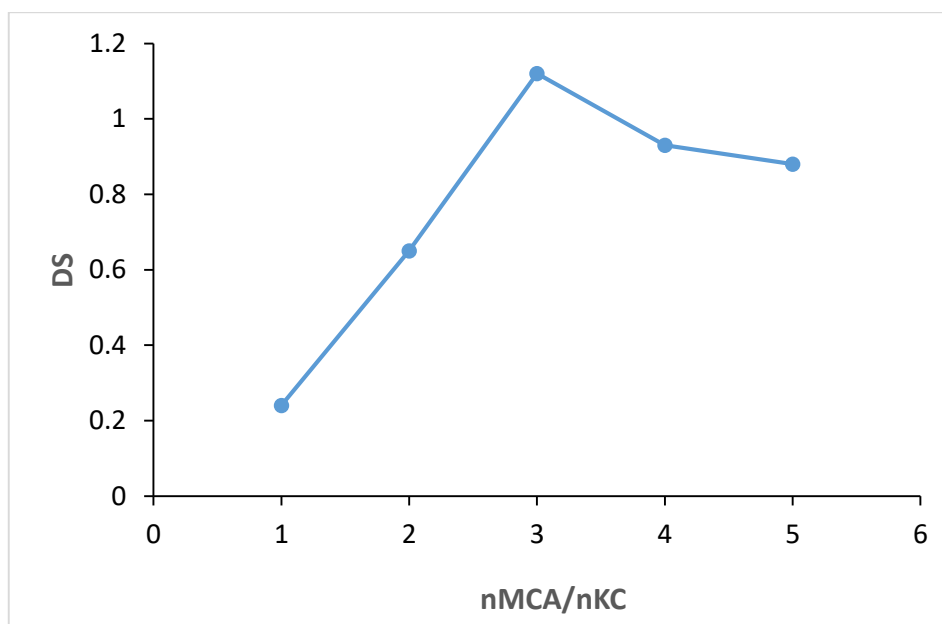
Độ thay thế DS của nhóm carboxymethyl trong các dẫn xuất carboxymethyl-kappa-carrageenan được xác định theo 2 phương pháp chuẩn độ điện thế và tính tích phân từ phổ ^1H NMR và được thể hiện trong Bảng 3.14. Giá trị DS được phân tích mang tính tương đối, và các giá trị DS đo được từ hai phương pháp có sự chênh lệch nhỏ. Độ thay thế (DS) được tính dựa vào phổ ^1H NMR dao động từ 0,24 đến 1,12. Sự thay thế tối đa đạt được ở tỷ lệ mol MCA/KC (3/1), với tỷ lệ mol cao hơn làm giảm DS. Nguyên nhân của sự giảm DS ở tỷ lệ mol MCA/KC tăng cao (>3) là do phản ứng phụ từ natri monochloroacetate ($\text{ClCH}_2\text{COONa}$) và NaOH, dẫn đến sự hình thành natri glycolate [68, 70].



Bảng 3.14. Giá trị DS của các mẫu carboxymethyl-kappa-carrageenan theo hai phương pháp xác định.

Mẫu	PP chuẩn độ điện thế	PP phổ ^1H NMR
CMKC-1/1	0,27	0,24
CMKC-2/1	0,70	0,65
CMKC-3/1	1,18	1,12
CMKC-4/1	1,00	0,93
CMKC-5/1	0,95	0,88

Khi tăng tỷ lệ mol MCA/KC, nồng độ MCA tăng lên, làm giảm lượng NaOH phản ứng với KC để tạo thành ankoxide (do thể tích NaOH không đổi), dẫn đến giảm DS [63] Hình 3.14.



Hình 3.14. Độ thay thế (DS) của các mẫu carboxymethyl-kappa-carrageenan (CMKC-1/1 đến CMKC-5/1).

Ngoài ra, NaOH cung cấp môi trường kiềm cho phản ứng cũng như đóng vai trò là tác nhân trương nở để tạo điều kiện cho sự khuếch tán và thâm nhập của tác nhân ete hóa vào bên trong các mảnh kappa-carrageenan. Vì vậy, tỷ lệ mol MCA/KC

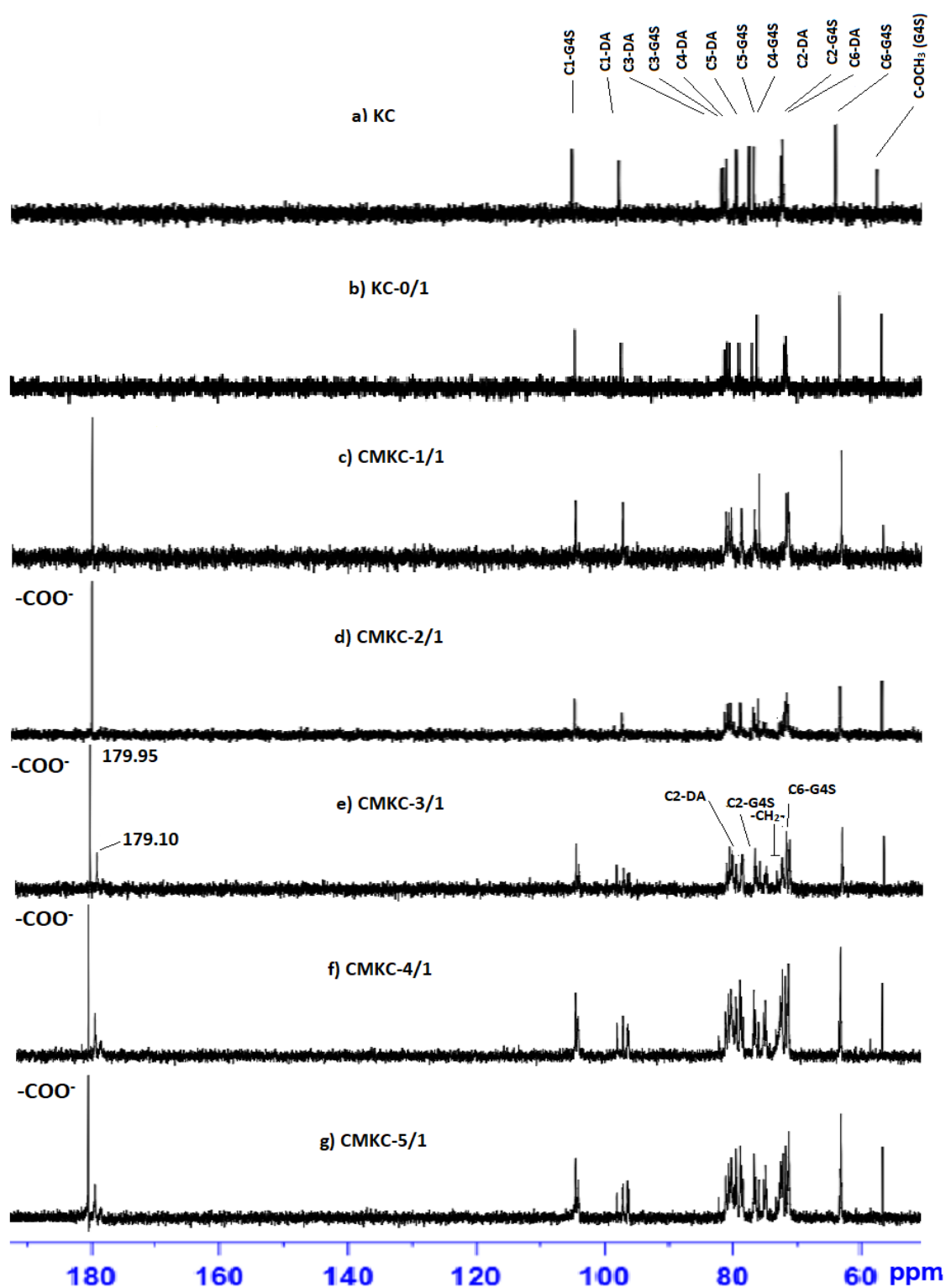
tăng có thể dẫn đến tăng phản ứng phụ tạo natri glycolate, trong khi trong điều kiện phản ứng thể tích NaOH không thay đổi nên làm giảm NaOH trong dung dịch để phản ứng, dẫn đến độ thể DS giảm [70].

Phổ ^{13}C NMR của carboxymethyl-kappa-carrageenan

Quan sát phổ ^{13}C NMR ở Hình 3.15 cho thấy sự so sánh các dịch chuyển hóa học giữa các mẫu KC, KC-0/1 (Hình 3.15. a, b) và CMKC (Hình 3.15. c, d, e, f, g). Tương tự như phổ ^1H NMR của Hình 3.13, phổ ^{13}C NMR của CMKC-3/1 được chọn để thể hiện các đỉnh carbon mới (Hình 3.15. e).

Bảng 3.15. Độ chuyển dịch hóa học trong phổ ^{13}C NMR (ppm) của các mẫu carboxymethyl-kappa-carrageenan KC-0/1, CMKC-3/1.

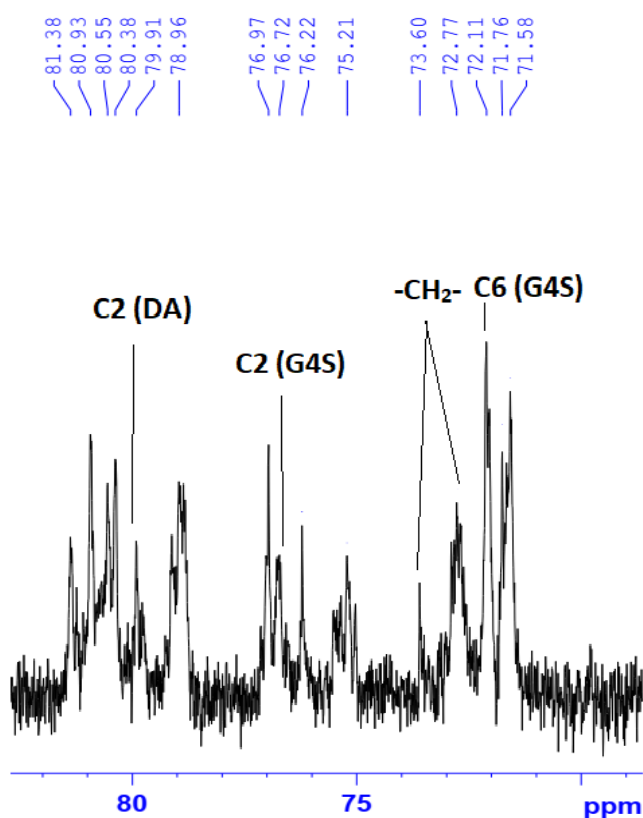
Đơn vị đường	Carbon	KC-0/1	CMKC-3/1
D-Galactose-4-sulfate (G4S)	C1	104,67	104,66
	C2	71,79	71,75
	C3	81,00	80,90
	C4	76,23	76,20
	C5	76,97	76,95
	C6	63,48	63,47
	C-OCH ₃	57,01	57,00
3,6-Anhydro-D-galactose (DA)	C1	97,39	97,28
	C2	72,03	72,05
	C3	81,37	81,36
	C4	80,56	80,51
	C5	78,99	78,90
	C6	71,65	71,55
Carboxymethyl group	-COO ⁻		179,95; 179,10
	-CH ₂		72,77; 73,60
Nguyên tử chức hóa	C-6 G4S		72,14
	C-2 G4S		76,72
	C-2 DA		79,91



Hình 3.15. Phổ ^{13}C NMR của kappa-carrageenan (KC), KC-0/1 và carboxymethyl-kappa-carrageenan (CMKC-1/1 đến CMKC-5/1). 1/1 đến 5/1 là các tỷ lệ mol khác nhau của MCA/KC-0/1. DA: 3,6-anhydro- α -D-galactose; G4S: β -D-galactose-4-sulfate.

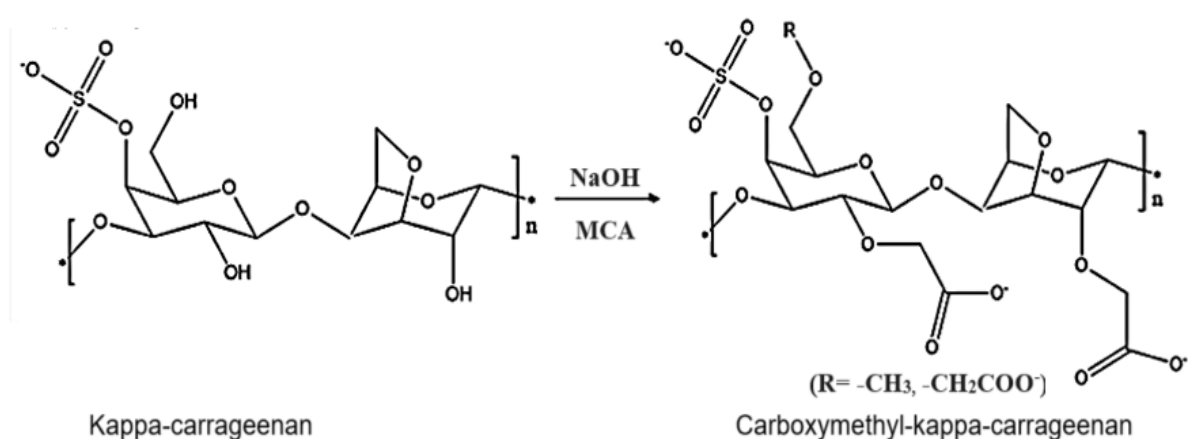
Các giá trị độ dịch chuyển của các carbon trên các disaccharide của các mẫu KC-0/1 và CMKC-3/1 được tổng hợp trong Bảng 3.15. Các tín hiệu đỉnh nổi bật xuất hiện ở $\delta = 179,95$ và $179,10$ ppm được biểu thị cho carbon của nhóm carboxylate (COO^-), và được quy cho các vị trí khác nhau của nhóm thế carboxymethyl trên KC-0/1. Sự xuất hiện của tín hiệu từ $177,7 - 182,6$ ppm cũng đã được báo cáo đối với các nhóm thế carboxymethyl trong kappa-carrageenan [67, 68, 70].

Quan sát đoạn phổ ^{13}C NMR của CMKC-3/1 (Hình 3.16), nguyên tử carbon methylene ($-\text{CH}_2$) của các nhóm thế carboxymethyl được gán cho các đỉnh ở $\delta = 72,77$ và $73,60$ ppm như đã công bố bởi Tranquilan-Aranilla và cộng sự, 2012, [62]; Madruga và cộng sự, 2020 [69]. Ở độ dịch chuyển thấp hơn, sự thay thế carboxymethyl ($-\text{CH}_2\text{COO}^-$) ở $\delta = 72,14$ ppm tương ứng cho C-6 của G4S và ở $\delta = 76,72$ và $79,91$ ppm cho C-2 của các gốc G4S và DA. Độ chuyển dịch của nhóm thế carboxymethyl tương tự với các giá trị đã báo cáo của sự chuyển dịch trong quá carboxymethyl hóa [62].



Hình 3.16. Trích đoạn phổ ^{13}C NMR của CMKC-3/1.

Dựa trên tỷ lệ cường độ đỉnh của ^{13}C NMR và giá trị DS từ ^1H NMR chỉ ra rằng các nhóm hydroxyl trong KC-0/1 đã được carboxymethyl hóa thành công và khả năng phản ứng của các nhóm OH được sắp xếp theo thứ tự $\text{O-C2(G4S)} > \text{O-C6(G4S)} > \text{O-C2(DA)}$ và những kết quả này phù hợp với các nghiên cứu đã công bố [67]. Vị trí có thể có của các nhóm thế carboxymethyl trên kappa-carrageenan được mô tả ở Hình 3.17.

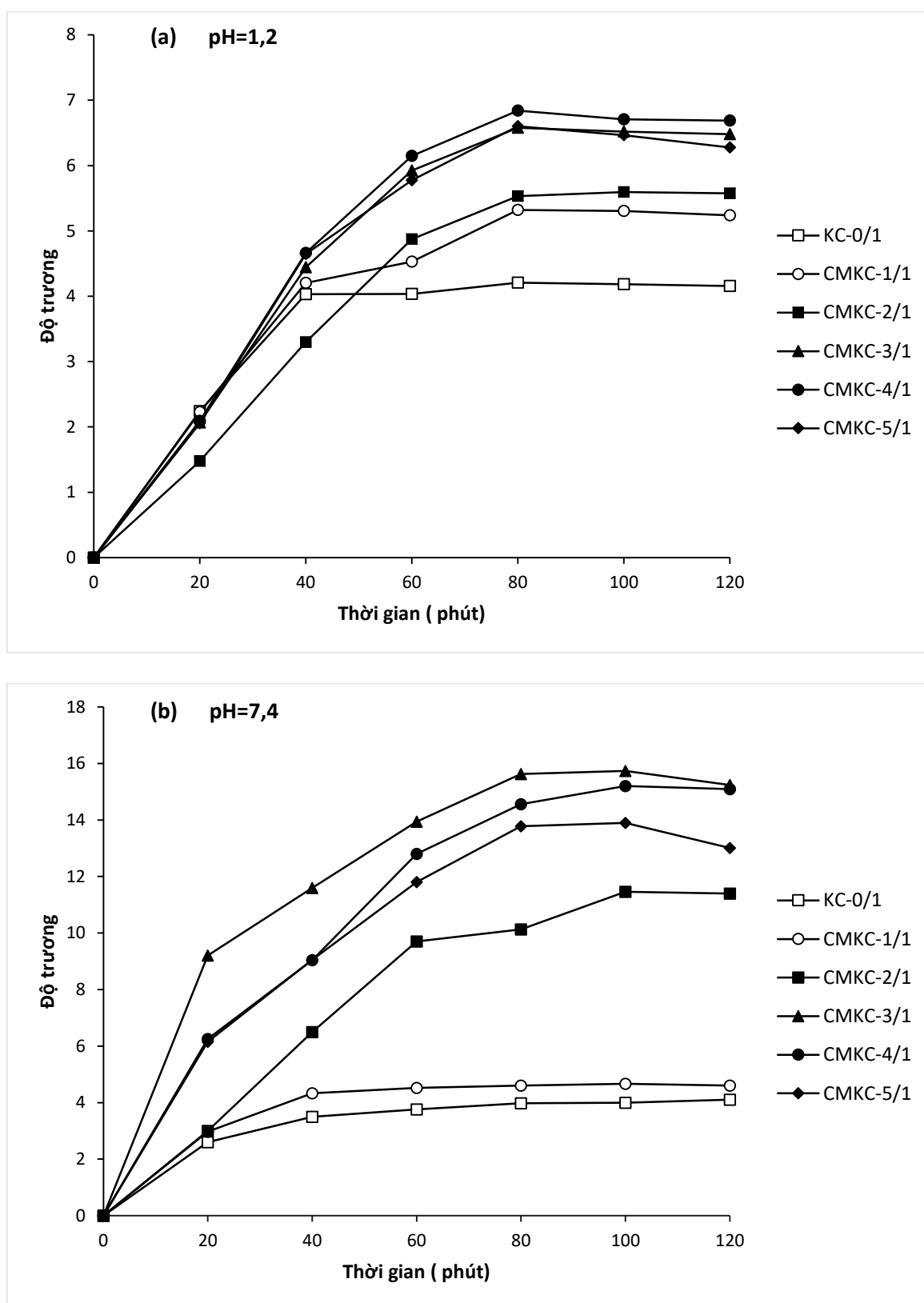


Hình 3.17. Tổng hợp carboxymethyl-kappa-carrageenan.

3.3.3. Xác định độ trương của hạt carrageenan và các dẫn xuất carboxymethyl-kappa-carrageenan

Độ trương của các hạt từ kappa-carrageenan và các dẫn xuất carboxymethyl-kappa-carrageenan ở các môi trường pH thay đổi, trong dung dịch HCl ($\text{pH} = 1,2$), hoặc dung dịch đệm phosphate 20mM ($\text{pH} = 7,4$) được trình bày ở đồ thị Hình 3.18.

Kết quả phân tích cho thấy hạt KC-0/1 có độ trương theo thời gian ít thay đổi ở môi trường $\text{pH} = 1,2$ (từ 1,73 đến 5,16), và ở môi trường $\text{pH} = 7,4$ (từ 2,6 đến 4,1). Tuy nhiên, các hạt carboxymethyl-kappa-carrageenan (CMKC-1/1 đến CMKC-5/1) lại có độ trương thấp hơn ở môi trường $\text{pH} = 1,2$ (từ 1,47 đến 6,84), và có độ trương cao hơn nhiều ở môi trường $\text{pH} = 7,4$ (từ 2,97 đến 15,74). Ban đầu khi các hạt KC-0/1 được ngâm $\text{pH} = 1,2$ ở thời gian ngắn 20 phút có độ trương cao hơn so với các hạt CMKC, nhưng khi tăng thời gian ngâm hạt độ trương có phần giảm nhẹ so với độ trương của các hạt CMKC, do trong môi trường acid mạnh trong thời gian dài carrageenan bị thủy phân một phần [44], dẫn đến khối lượng hạt sau khi trương bị giảm.



Hình 3.18. Độ trương của các hạt KC-0/1 và carboxymethyl-kappa-carrageenan (CMKC-1/1 đến CMKC-5/1) ở môi trường: (a) pH = 1,2, (b) pH = 7,4.

Sự thay đổi độ trương của các hạt CMKC khi thay đổi môi trường pH do sự có mặt của nhóm carboxymethyl trên kappa-carrageenan [66], [68]. Các nhóm thế carboxymethyl có sự ion hóa khi pH của môi trường cao hơn pKa của nhóm carboxylic ($\sim 3,4 - 3,7$), vì vậy trong môi trường pH thấp (1,2), các nhóm carboxyl được proton hóa để thúc đẩy sự hình thành các liên kết hydro với nhau, do đó làm giảm độ trương. Ở pH cao hơn (7,4), các nhóm carboxyl bị mất proton, và các hạt sẽ trương nhiều hơn do lực đẩy tĩnh điện giữa các nhóm acid ($-\text{COOH}$) ion hóa [68]. Sự trương phụ thuộc vào pH tương tự đã được quan sát thấy trong các polysaccharide chứa các nhóm thế acid carboxylic như alginate [71] hay chitosan [152].

Các hạt CMKC được tổng hợp với các tỷ lệ MCA/KC từ 1/1 đến 5/1 có ít sự khác biệt độ trương ở pH = 1,2, và độ trương thấp hơn hạt KC-0/1 ở thời điểm ngâm được 20 phút. Tuy nhiên trong môi trường pH = 7,4 độ trương của hạt tăng cao ở các mẫu CMKC-3/1, 4/1, 5/1, trong đó cao nhất ở hạt CMKC -3/1 (độ trương 15,74). Sự tăng độ trương của các hạt CMKC tương ứng với độ thế của các nhóm carboxymethyl trên kappa-carrageenan, độ thế của CMKC tăng dẫn đến độ trương của các hạt tăng. Hạt CMKC-3/1 có độ thế DS cao nhất và độ trương cao nhất tương ứng. Đặc tính trương phụ thuộc vào pH của dẫn xuất carboxymethyl-kappa-carrageenan cho thấy tiềm năng ứng dụng trong các hệ phân phối các chất có hoạt tính sinh học có kiểm soát tại các vị trí đích.

Luận án đã nghiên cứu tổng hợp thành công carboxymethyl-kappa-carrageenan từ kappa-carrageenan của rong đỏ *K. striatus*. Phân tích tính chất, đặc trưng cấu trúc, hoạt tính của các mẫu carboxymethyl-kappa-carrageenan (có tỷ lệ số mol MCA/KC tổng hợp từ 1/1 đến 5/1). Trong các mẫu CMKC, mẫu CMKC-3/1 (có tỷ lệ số mol MCA/KC tổng hợp là 3/1) có độ thay thế DS là cao nhất (1,12), hoạt tính chống oxy hóa cao hơn các mẫu còn lại và có hoạt tính ngưng kết hồng cầu trên máu thỏ và các nhóm máu người. Vì vậy CMKC-3/1 được chọn để tạo hạt vi nang bọc lectin chiết tách từ rong *K. striatus*.

3.3.4. Đặc trưng cấu trúc của hạt vi nang carrageenan-lectin

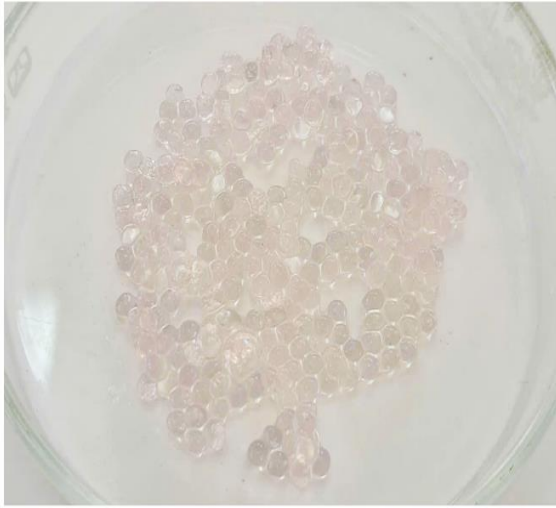
Hạt nang vi nang kappa-carrageenan bọc lectin (Ký hiệu: KC-L) và carboxymethyl-kappa-carrageenan tỷ lệ 3/1 bọc lectin (Ký hiệu: CMKC-3/1-L) sau khi tạo có dạng hình cầu, trong suốt và có màu hồng của dịch lectin. Sau đó các hạt

được làm khô, hạt có độ xốp, màu sắc của hạt có sự thay đổi đậm nhạt phụ thuộc vào tỉ lệ của carrageenan và lectin. Hình ảnh, kích thước của hạt vi nang CMKC-3/1-L (nồng độ CMKC-3/1 là $2,0 \div 3,5\%$.) ở dạng hạt ướt và dạng hạt sấy khô được trình bày trong Bảng 3.16 và Hình 3.19. Dịch thải sau khi tạo hạt là dung dịch không màu trong suốt, và hiệu xuất bọc của CMKC-3/1 đối với lectin khoảng 90%.

Bảng 3.16. Kích thước và trọng lượng của các hạt vi nang KC-L (KC 3%), CMKC-3/1-L với các nồng độ khác nhau của CMKC-3/1 ở dạng ướt và khô.

Hạt vi nang		$d_{\text{ướt}}$ (mm)	$m_{\text{ướt}}$ (mg)	$d_{\text{khô}}$ (mm)	$m_{\text{khô}}$ (mg)	$H_{\text{bọc}}$ (%)
KC-L		2,14	2,27	0,94	0,445	90,1
CMKC-3/1-L	2,0%	2,30	2,30	0,97	0,450	90,5
	2,5%	2,30	2,33	0,97	0,450	91,0
	3,0%	2,14	2,35	1,00	0,455	91,4
	3,5%	2,14	2,36	1,00	0,455	91,2

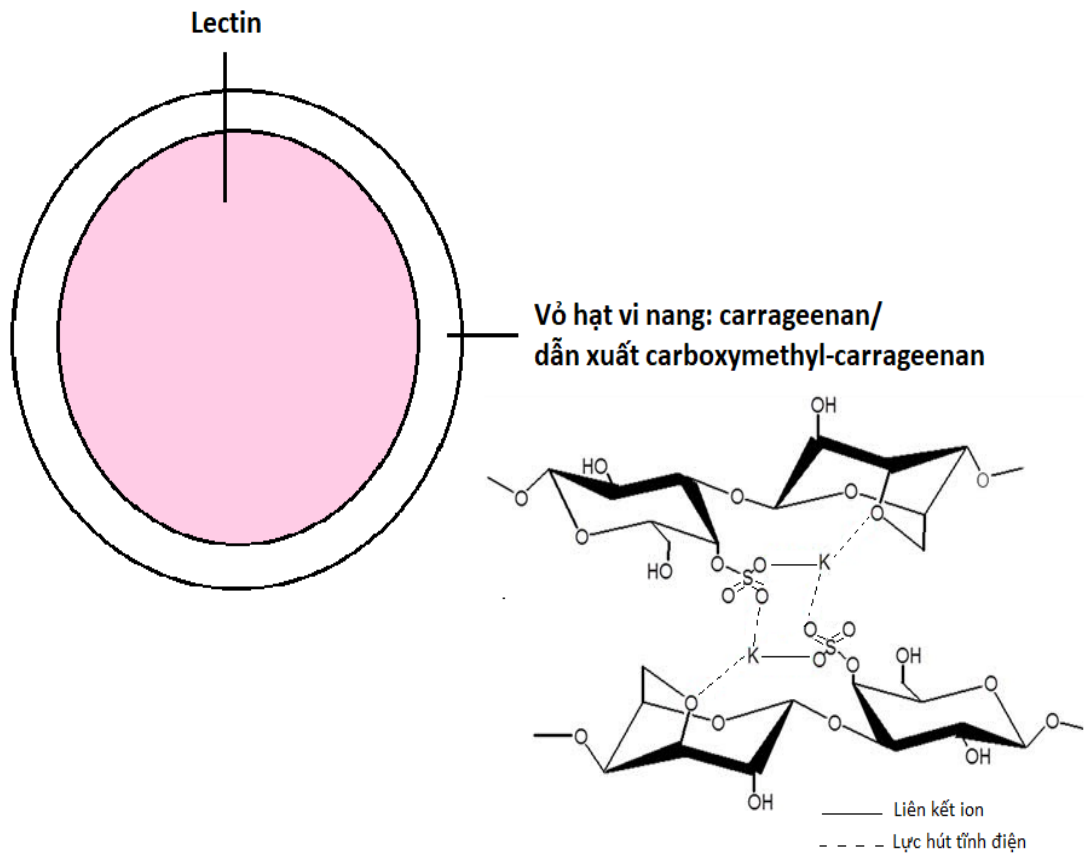
Với các nồng độ CMKC-3/1 trong dung dịch đệm pH = 7,0 được khảo sát để tạo hạt, nồng độ trên 4,0% dung dịch đặc khó phân tán dịch lectin và gây bít đầu kim. Dịch thải sau tạo hạt trong suốt, kiểm tra dư lượng lectin bằng phương pháp đo độ hấp phụ của protein tại bước sóng 280 nm. Các hạt nang KC-L và CMKC-3/1-L ở dạng ướt có kích thước ít sai biệt từ $2,14 \div 2,30$ mm, hạt KC-L dạng khô có $d = 0,94$ mm, và các hạt CMKC-3/1-L khô với các nồng độ $2,0 \div 4,0\%$ có kích thước $0,94 \div 1,03$ mm. Trọng lượng của các hạt ướt ($2,27 \div 2,36$ mg) lớn hơn nhiều so với các hạt khô ($0,445 \div 0,455$ mg), sau khi sấy khô các hạt vi nang có dạng ít hình cầu hơn và có cấu trúc xốp.



a) hạt CMKC-3/1-lectin ướt

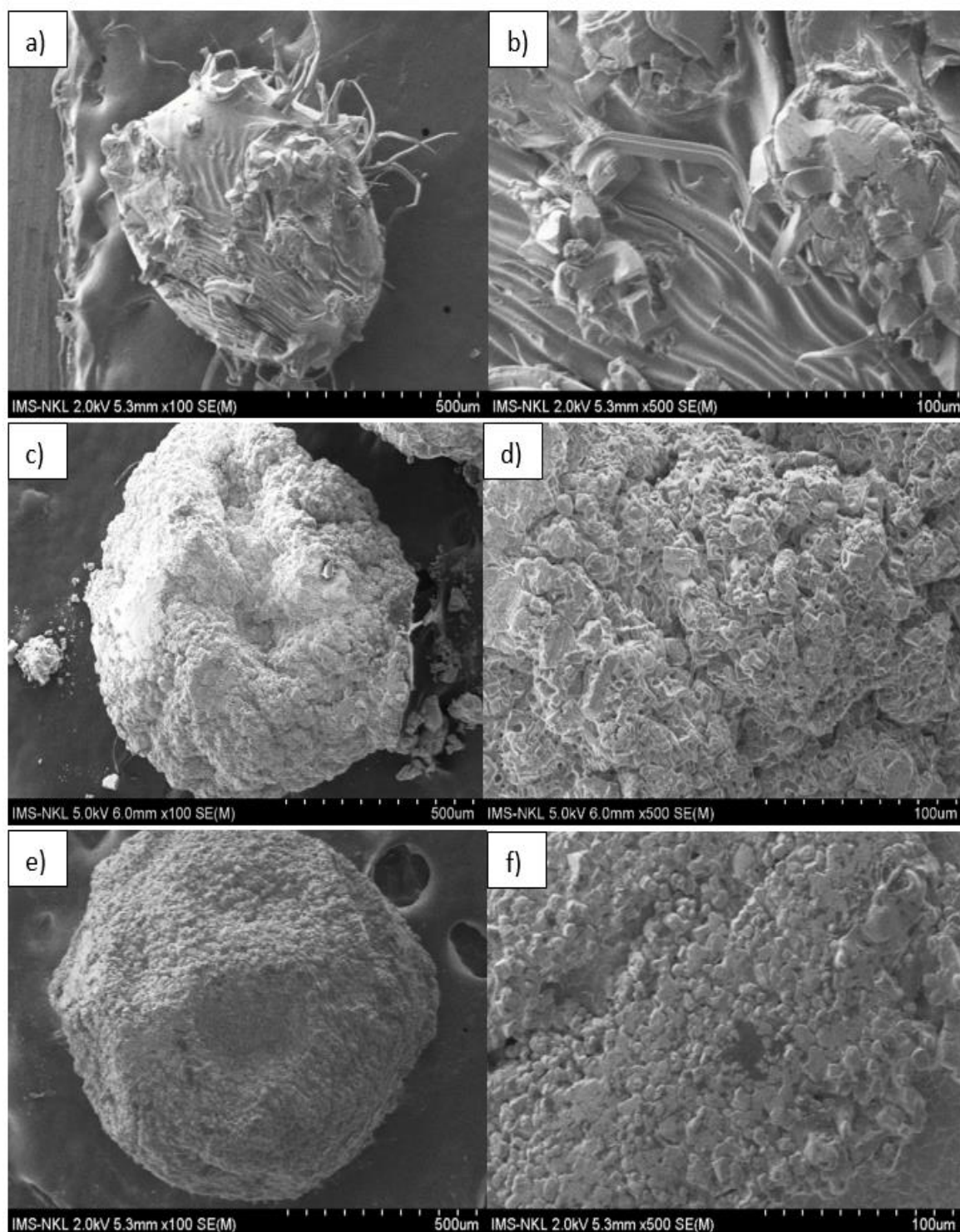


b) Hạt CMKC-3/1-lectin khô



c) Mô phỏng hạt carrageenan-lectin

Hình 3.19. Hạt vi nang CMKC-3/1-L dạng: a) hạt ướt, b) hạt sấy khô, c) mô phỏng hạt vi nang carrageenan-lectin. Nồng độ CMKC-3/1 là 3,0%.



Hình 3.20. Ảnh SEM của (a) hạt KC-L, (b) bề mặt hạt KC-L, (c) hạt CMKC-3/1 không có lectin, (d) bề mặt hạt CMKC-3/1 không có lectin (e) Hạt CMKC-3/1- L, (f) bề mặt hạt CMKC-3/1- L.

Quan sát bề mặt của hạt KC-L hạt CMKC-3/1 không có lectin và hạt CMKC-3/1 (3,0%)-L có bọc lectin bằng kính hiển vi điện tử quét SEM độ phóng đại 100x và 500x (Hình 3.20). Các hạt đều có dạng hình cầu, bề mặt của hạt KC-L, CMKC-3/1

không có lectin và CMKC-3/1 bọc lectin có sự khác biệt. Hạt được tạo bởi CMKC-3/1 có nhiều cấu trúc nhỏ hình thành trên bề mặt hạt, do đó có thể giúp tăng khả năng bám dính tại các vị trí đích (trên nhung mao đường tiêu hóa - trong các ứng dụng bọc được phẩm được sử dụng qua đường miệng) của các hạt so với các hạt tạo từ KC (Hình 3.20. a, b, e, f) [70, 109, 124]. Với hạt khi đã bọc lectin như hạt CMKC-3/1-L bề mặt hạt vẫn giữ cấu trúc tương tự các hạt không mang lectin (Hình 3.20. c, d), cho thấy lectin được bọc bên trong các hạt vi nang, đồng thời các hạt vi nang có dạng hình cầu hơn.

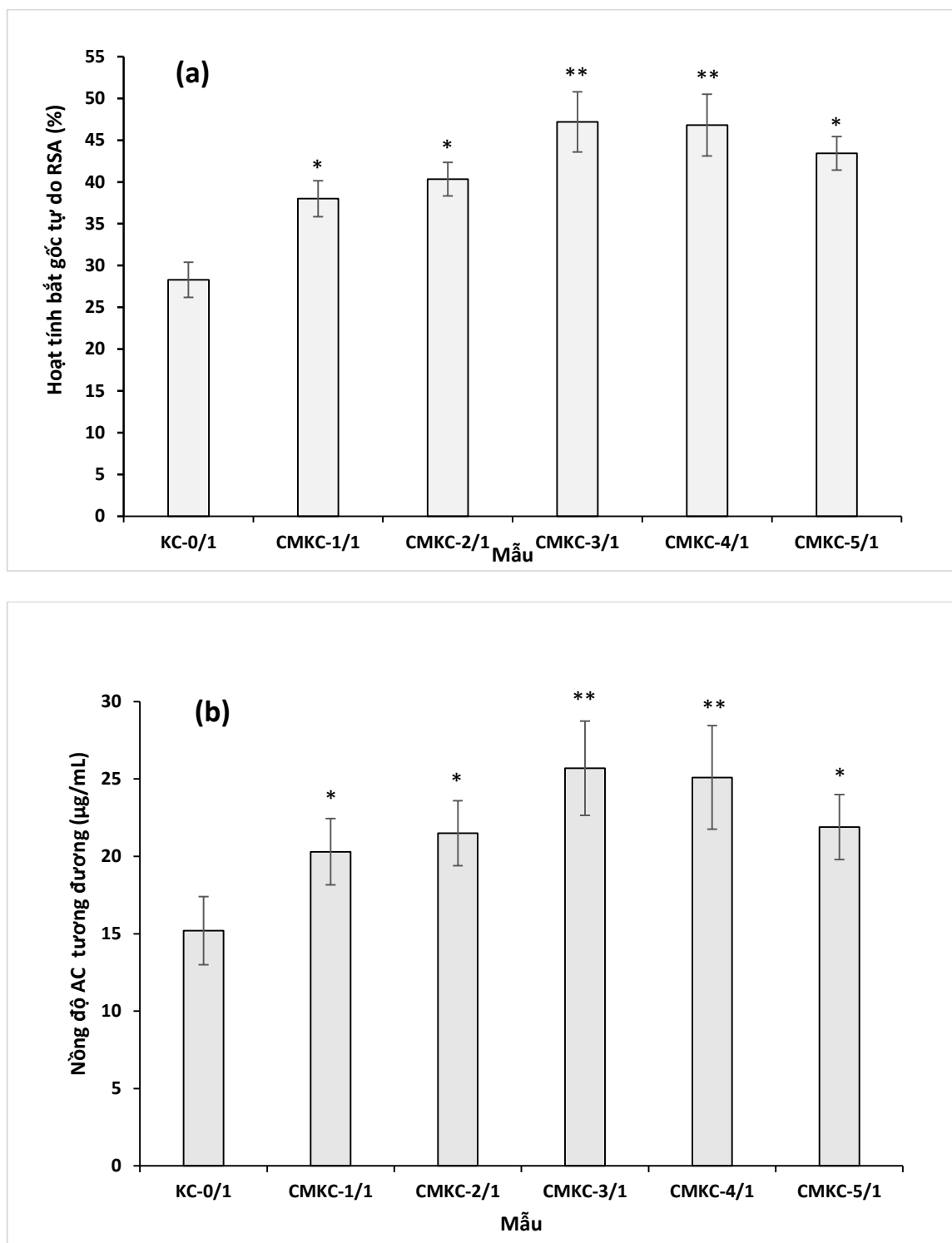
3.4. Kết quả đánh giá hoạt tính sinh học của carrageenan, carboxymethyl-kappa-carrageenan và hạt vi nang carrageenan-lectin

3.4.1. Hoạt tính chống oxy hóa

Khả năng bắt gốc tự do DPPH của các mẫu KC, KC-0/1 và CMKC ở nồng độ 500 $\mu\text{g/mL}$ được biểu thị dưới dạng phần trăm ức chế RSA (%) ở Bảng 3.17 và Hình 3.21.a. RSA cao nhất đạt được ở CMKC-3/1, có DS cao nhất (1,12), chỉ ra rằng quá trình carboxymethyl hóa làm tăng RSA của KC. Các mẫu CMKC (500 $\mu\text{g/mL}$) được ghi nhận giá trị bắt gốc tự do RSA tương đương với nồng độ acid ascorbic dao động từ 15,2 - 25,8 $\mu\text{g/mL}$ (Hình 3.21. b). Giá trị RSA và đương lượng acid ascorbic của KC tương tự như giá trị của KC-0/1, do đó không được biểu thị trên Hình 3.21.

Bảng 3.17. Hoạt tính chống oxy hóa của KC-0/1 và carboxymethyl-kappa-carrageenans (CMKC-1/1 đến CMKC-5/1) ở nồng độ (500 $\mu\text{g/mL}$).

Mẫu	Hoạt tính bắt gốc tự do RSA (%) của DPPH	Hoạt tính tương đương nồng độ acid ascorbic ($\mu\text{g/mL}$)
KC-0/1	$28,3 \pm 2,1$	$15,2 \pm 2,2$
CMKC-1/1	$38,0 \pm 2,2$	$20,3 \pm 2,2$
CMKC-2/1	$40,3 \pm 2,0$	$21,5 \pm 2,1$
CMKC-3/1	$47,2 \pm 3,6$	$25,8 \pm 3,1$
CMKC-4/1	$46,8 \pm 3,7$	$25,1 \pm 3,4$
CMKC-5/1	$43,4 \pm 2,0$	$21,9 \pm 2,1$



Hình 3.21. Hoạt tính chống oxy hóa của KC-0/1 và carboxymethyl-kappa-carrageenans (CMKC-1/1 đến CMKC-5/1) ở nồng độ (500 µg/mL). (a) Hoạt tính bắt gốc tự do - RSA (%) của DPPH và (b) Hoạt tính tương đương nồng độ acid ascorbic (AC). Các giá trị là giá trị trung bình $\pm$ SD (n = 3). Sự khác biệt được chỉ ra bằng dấu hoa thị. *P < 0,05 và **P < 0,01 đối với CMKC so với KC-0/1.

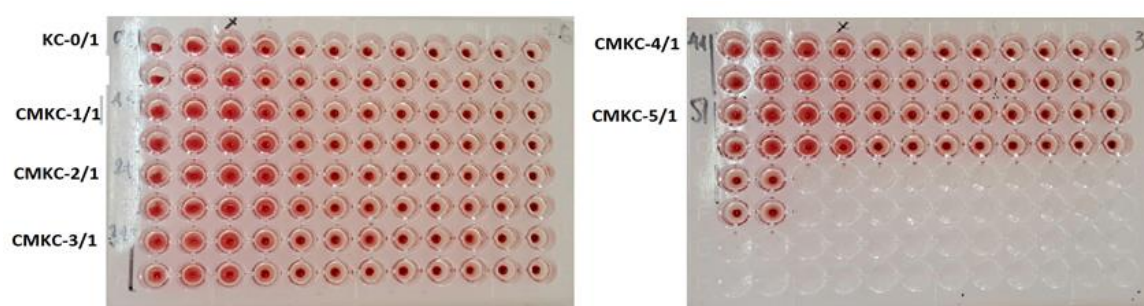
Việc thêm các nhóm carboxyl và các nhóm sulfate đã có trong cấu trúc cho phép CMKC ổn định các gốc tự do như DPPH được công bố [69, 153, 154]. Kappa-carrageenan có nhóm hydroxyl có hoạt tính chống oxy hóa, và việc thêm nhóm carboxymethyl vào cấu trúc kappa-carrageenan có khả năng cộng hưởng giữa hai nguyên tử oxy, dẫn đến những thay đổi về mật độ đám mây electron và khả năng hút electron của polysaccharide, do đó làm tăng tương tác với các phân tử sinh học mang tích điện dương và có thể cải thiện hoạt động chống oxy hóa của polysaccharide so với polysaccharide tự nhiên [64]. Vai trò của anion carboxylate trong hoạt động chống oxy hóa của acid gallic đã được báo cáo có khả năng bắt gốc tự do [153].

Các carrageenan đã được chứng minh là chất chống oxy hóa tiềm năng để ngăn ngừa tổn thương oxy hóa ở các sinh vật sống. Và hầu hết các polysaccharide carboxymethyl hóa đều có khả năng chống oxy hóa tốt hơn bằng cách trực tiếp bắt các gốc tự do, và đây là một đặc tính quan trọng để ổn định thực phẩm và dược phẩm và thúc đẩy các ứng dụng của chúng [154].

3.4.2. Hoạt tính ngưng kết hồng cầu

3.4.2.1. Hoạt tính ngưng kết hồng cầu của carrageenan và carboxymethyl-kappa-carrageenan

Hoạt tính ngưng kết hồng cầu của carboxymethyl-kappa-carrageenan trên các nhóm máu A, B, AB, O của người



Hình 3.22. Sự ngưng kết hồng cầu nhóm máu A của các mẫu KC-0/1 và các mẫu CMKC (theo các nồng độ pha loãng từ nồng độ đầu là 10 mg/mL).

Quan sát Hình 3.22. cho thấy hiện tượng NKHC khi phân tích hoạt tính NKHC của các mẫu carrageenan và dẫn xuất trên hồng cầu nhóm máu A của người, mẫu KC-0/1 và các mẫu CMKC (1/1 ÷ 5/1) theo các nồng độ pha loãng từ nồng độ đầu là 10

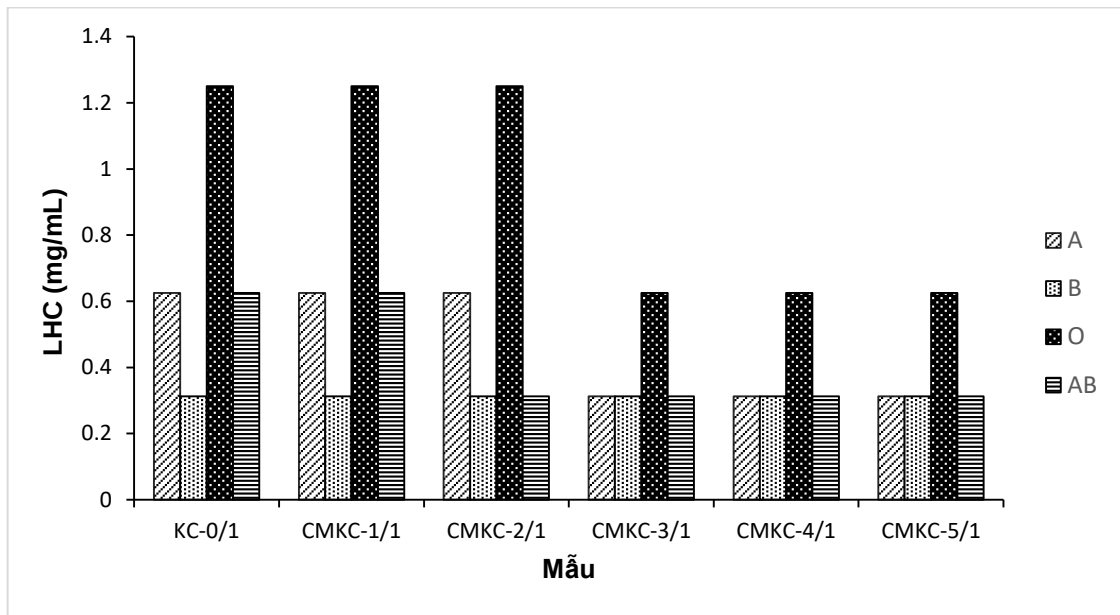
mg/mL (ở các giếng không có hiện tượng NKHC, sau thời gian 2 giờ hồng cầu sẽ lắng xuống đáy giếng).

Kết quả phân tích hoạt tính ngưng kết hồng cầu của các mẫu CMKC trên các nhóm máu A, B, AB, O của người được thể hiện ở Bảng 3.18 và Hình 3.23. Quan sát đồ thị ở Hình 3.23 cho thấy KC-0/1 và các dẫn xuất carboxymethyl hóa của chúng cho thấy sự khác biệt nhỏ về hoạt động ngưng kết hồng cầu trên các nhóm máu người A, B, O và AB với nồng độ ngưng kết hồng cầu thấp nhất dao động từ 0,315 - 1,25 mg/ mL (Bảng 3.18). Hoạt động ngưng kết hồng cầu của KC tương tự như của KC-0/1, do đó không được biểu diễn trên Hình 3.23. Nồng độ ngưng kết hồng cầu thấp nhất của tất cả các mẫu được ghi nhận trên nhóm máu B (0,315 mg/ mL). Kết quả chỉ ra rằng việc có mặt các nhóm carboxymethyl vào kappa-carrageenan đã thúc đẩy hoạt tính ngưng kết hồng cầu. Hoạt tính ngưng kết hồng cầu của CMKC phụ thuộc vào mức độ thay thế nhóm carboxymethyl trong kappa-carrageenan, được chứng minh bằng sự giảm hoạt tính ngưng kết hồng cầu từ CMKC-3/1 đến CMKC-5/1, trong đó sự thay thế nhóm carboxymethyl trong kappa-carrageenan giảm từ 1,12 - 0,88.

Bảng 3.18. Nồng độ ngưng kết hồng cầu thấp nhất đối (LHC) mg/mL của mẫu KC, KC-0/1 và các mẫu CMKC đối với mỗi nhóm máu.

Mẫu	LHC đối với nhóm máu (mg/mL)			
	A	B	O	AB
KC	0,625	0,315	1,25	0,625
KC-0/1	0,625	0,315	1,25	0,625
CMKC-1/1	0,625	0,315	1,25	0,625
CMKC-2/1	0,625	0,315	1,25	0,315
CMKC-3/1	0,315	0,315	0,625	0,315
CMKC-4/1	0,315	0,315	0,625	0,315
CMKC-5/1	0,315	0,315	0,625	0,315

LHC (Lowest hemagglutination concentration): nồng độ nhỏ nhất gây NKHC.



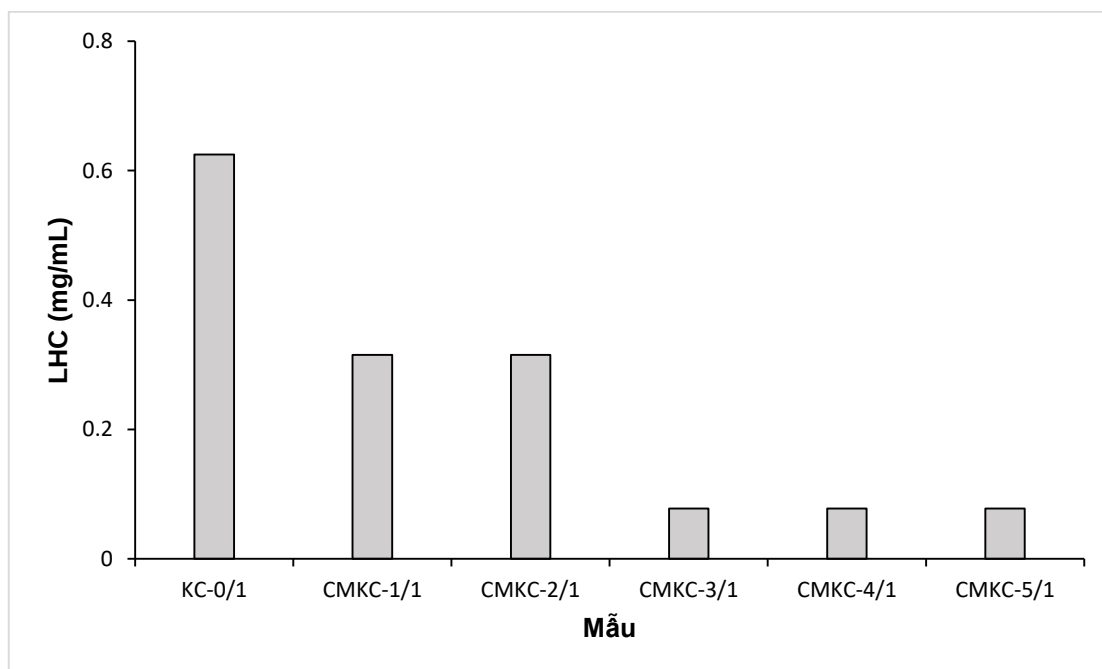
Hình 3.23. Nồng độ ngưng kết hồng cầu thấp nhất (LHC) (mg/mL) của KC-0/1 và CMKC (CMKC-1/1 đến CMKC-5/1) trên các nhóm máu người. Nồng độ ban đầu của mỗi mẫu KC-0/1 hoặc CMKC là 10 mg/mL, sử dụng phương pháp pha loãng hai lần theo chuỗi.

Trong nghiên cứu này, nồng độ của các mẫu KC-0/1 hoặc CMKC cao có khả năng hình thành các tập hợp có trọng lượng phân tử lớn hơn trong môi trường chứa huyết thanh, do sự tạo ra các điện tích âm bởi các nhóm sulfate và carboxyl có khả năng liên kết với protein với ái lực cao [155]. Khả năng này của các mẫu KC-0/1 hoặc CMKC có thể cho phép chúng tạo ra những thay đổi trong protein và tế bào và cũng có thể đến được hệ tuần hoàn máu, nơi chúng có thể tương tác với hồng cầu [156]. Người ta đưa ra giả thuyết rằng các điện tích dương của màng hồng cầu có thể bị thu hút bởi mật độ điện tích âm cao của kappa-carrageenan hoặc các dẫn xuất carboxymethyl-kappa-carrageenan và làm tăng khả năng bám dính và hình thành kết tụ của hồng cầu [157]. Tuy nhiên, các nghiên cứu in vivo sẽ là cần thiết để chứng thực cho giả thuyết này. Điều này có thể giải thích tại sao trong nghiên cứu này, nồng độ cao ban đầu của kappa-carrageenan hoặc CMKC (10 mg/mL) được sử dụng để ngưng kết hồng cầu. Hoạt tính ngưng kết hồng cầu của cá tráp biển của lamda-carrageenan cũng đã được báo cáo ở nồng độ cao 1000 $\mu\text{g/mL}$, và ở nồng độ thấp hơn 1000 $\mu\text{g/mL}$ sẽ không đủ để quan sát quá trình ngưng kết hồng cầu [158]. Ngoài ra, tính chất hóa học của CMKC tương tự với các phân tử sinh học như

glycosaminoglycan có trong cơ thể con người, và có số lượng lớn các nhóm liên kết hydro có trên phân tử CMKC có thể thúc đẩy tương tác protein-CMKC [159].

Hoạt tính ngưng kết hồng cầu của carboxymethyl-kappa-carrageenan trên máu thỏ đã xử lý trypsin: Kiểm tra hoạt tính NKHC của các mẫu KC-0/1 và các mẫu CMKC (1/1 đến 5/1) theo các nồng độ pha loãng từ nồng độ đầu là 10mg/mL trên máu thỏ. Cho thấy các mẫu KC-0/1 và CMKC có hoạt tính NKHC đối với hồng cầu máu thỏ, nồng độ thấp nhất gây ngưng kết hồng cầu của các mẫu được thể hiện Hình 3.24 (và bảng ở Phụ lục 18).

Kết quả phân tích cho thấy hoạt tính ngưng kết hồng cầu của CMKC trên hồng cầu thỏ cũng phụ thuộc vào mức độ thay thế nhóm carboxymethyl trong kappa-carrageenan, các mẫu CMKC-1/1, CMKC-2/1 với độ thế DS thấp có nồng độ thấp nhất để có hoạt tính NKHC là 0,315 mg/mL, các mẫu CMKC-3/1, 4/1, 5/1 với độ thế cao hơn có nồng độ thấp nhất gây NKHC là 0,078 mg/mL. Các dẫn xuất carboxymethyl-kappa-carrageenan có nhiều nhóm thế carboxymethyl có thể sẽ tăng khả năng bám dính và hình thành kết tụ của hồng cầu trong máu thỏ [157].

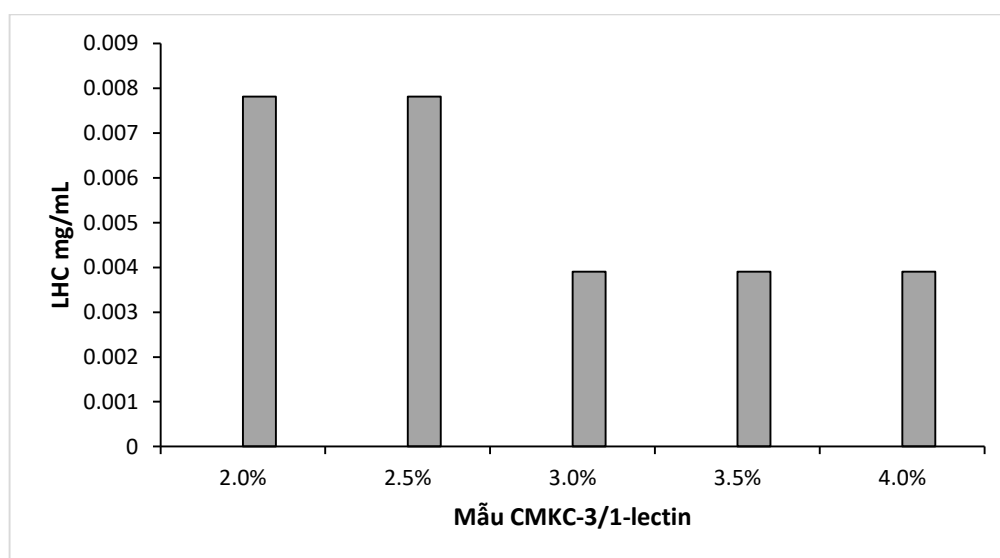


Hình 3.24. Nồng độ ngưng kết hồng cầu thấp nhất (LHC) (mg/mL) của KC-0/1 và carboxymethyl-kappa-carrageenan (CMKC-1/1 đến CMKC-5/1) trên hồng cầu thỏ.

3.4.2.2. Hoạt tính ngưng kết hồng cầu của dung dịch carboxymethyl-kappa-carrageenan và lectin

Sự liên kết giữa KC và CMKC với lectin: Để phân tích sự liên kết giữa kappa-carrageenan và các mẫu CMKC-(1/1 đến 5/1) với lectin, tiến hành thí nghiệm tương tự phân tích đặc hiệu liên kết carbohydrate của lectin với các đường và glycoprotein. Các mẫu KC, CMKC-(1/1 đến 5/1) được xác định có nồng độ thấp nhất gây NKHC với máu thỏ là 0,315mg/mL (mục 3.4.2.1, Bảng 3.18), do đó trong thí nghiệm này sử dụng nồng độ các mẫu là 0,20 mg/mL (không đủ gây NKHC). Lectin được sử dụng với nồng độ 0,007mg/mL (nồng độ thấp nhất gây NKHC). Kết quả phân tích cho thấy vẫn có hiện tượng NKHC, chỉ ra rằng giữa KC, CMKC-(1/1 đến 5/1) với lectin không có các liên kết đặc hiệu.

Hoạt tính ngưng kết hồng cầu của dung dịch carboxymethyl-kappa-carrageenan và lectin: Dung dịch hỗn hợp của CMKC-3/1 (2,0 ÷ 4,0%) và lectin trước khi tạo hạt với hàm lượng protein của dung dịch là 2,0 mg/mL được đánh giá hoạt tính NKHC với máu thỏ. Kết quả nồng độ thấp nhất gây NKHC của lectin trong các hỗn hợp được trình bày trong đồ thị ở Hình 3.25.



Hình 3.25. Nồng độ thấp nhất gây NKHC trên hồng cầu thỏ của CMKC-3/1 và lectin trong hỗn hợp CMKC-3/1-lectin.

Từ đồ thị Hình 3.25. cho thấy hoạt tính NKHC của hỗn hợp tăng khi tăng nồng độ CMKC-3/1 từ 2,0% đến 3,0%, tiếp tục tăng nồng độ CMKC-3/1 đến 4,0% hoạt tính không đổi (nồng độ gây NKHC thấp nhất của CMKC-3/1 và lectin của từng mẫu

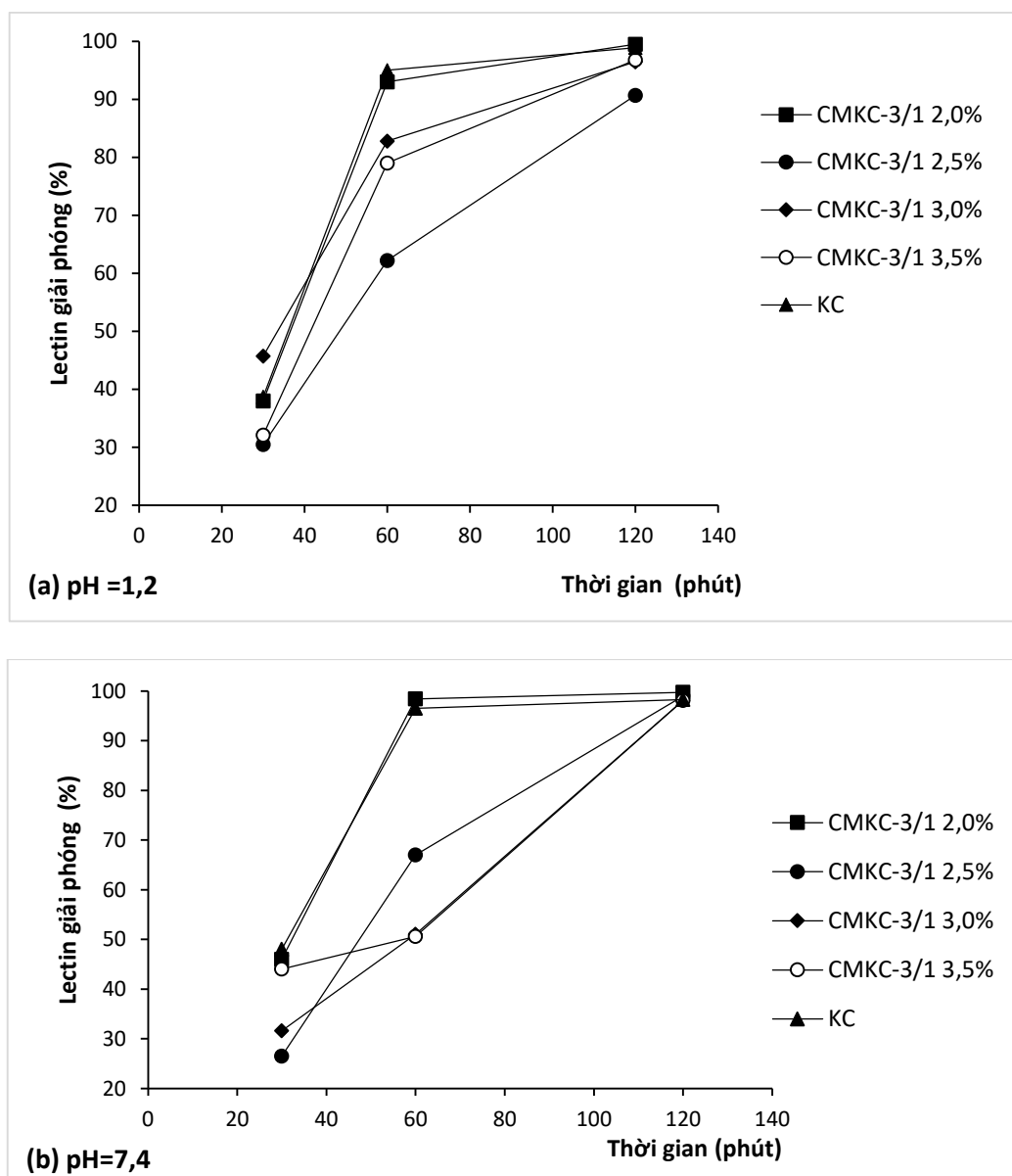
được tổng hợp thể hiện trong bảng ở Phụ lục 19). Kết quả phân tích cho thấy nồng độ thấp nhất gây NKHC của lectin ở các mẫu có nồng độ CMKC-3/1 2,0% và 2,5% là 7,81 $\mu\text{g/mL}$ ít có sự chênh lệch so với kết quả ở Bảng 3.2 (LHC của lectin từ *K. striatus* là 6,63 $\mu\text{g/mL}$). Chỉ ra rằng hoạt tính NKHC của lectin trong hỗn hợp với CMKC-3/1 không bị giảm đi. Hơn thế, khi tăng nồng độ của CMKC-3/1 trên 3% cho thấy sự tăng hoạt tính NKHC của hỗn hợp, và nồng độ thấp nhất gây NKHC (LHC) của lectin được tính lại là 3,91 ($\mu\text{g/mL}$). Do khi nồng độ CMKC-3/1 cao trên 4,0% hỗn hợp đặc hơn, ảnh hưởng đến quá trình NKHC.

3.5. Đánh giá sự giải phóng lectin từ hạt vi nang carrageenan-lectin

Quan sát sự giải phóng lectin theo thời gian của các hạt vi nang trong dung dịch đệm có pH = 1,2 và pH = 7,4, dịch ngâm ban đầu không màu sau đó chuyển dần sang màu hồng của lectin. Lượng lectin được giải phóng theo thời gian ở các pH khác nhau của các mẫu hạt được trình bày ở Hình 3.26 a, b. Về cơ chế giải phóng lectin ở hai môi trường khác nhau, trong môi trường acid pH = 1,2 là cơ chế khuếch tán - kiểm soát, trong môi trường kiềm pH = 7,4 là cơ chế trương nở - kiểm soát [68]. Khảo sát hạt từ KC có sự giải phóng lectin trong môi trường pH = 1,2 nhanh hơn so với các hạt tạo từ CMKC. Khi ngâm hạt vi nang ở môi trường pH thấp các hạt từ CMKC có nhóm carboxyl được proton hóa và thúc đẩy sự hình thành của các liên kết hydro với nhau, do đó làm giảm tỷ lệ trương nở so với các hạt từ KC, đồng thời KC dễ bị thủy phân ở môi trường pH thấp, nên sự giải phóng của lectin từ các hạt từ CMKC sẽ chậm hơn so với các hạt từ KC [44].

Hạt KC-L có hàm lượng lectin giải phóng sau 60 phút ngâm trong dung dịch pH = 1,2 là 95,0%, và trong dung dịch pH = 7,4 là 96,5%. Hạt tạo từ dẫn xuất carboxymethyl-kappa-carrageenan nồng độ 2% có sự giải phóng lectin tương tự với hạt từ KC. Các hạt tạo từ CMKC-3/1 với nồng độ trên 2,0% có thời gian giải phóng lectin chậm hơn trong cả hai môi trường: ở môi trường pH = 1,2 sau 60 phút hàm lượng giải phóng là 60 - 80%; ở môi trường pH = 7,4 sau 60 phút hàm lượng giải phóng là 45 - 65%. Điều này giúp hạn chế sự phân hủy lectin ở môi trường pH thấp và tăng thời gian lưu trú ở môi trường kiềm. Khi tăng nồng độ CMKC-3/1 thì hàm lượng lectin được giải phóng sẽ chậm hơn, do hàm lượng CMKC-3/1 tăng sẽ làm

tăng mật độ liên kết bề mặt hạt, cần có thêm thời gian để CMKC-3/1 khuếch tán trong dung dịch ở pH = 1,2, và trương nở ở môi trường pH = 7,4.



Hình 3.26. Lectin được giải phóng (%) từ hạt vi nang KC-L, các hạt CMKC-3/1 (2,0 – 3,5%)- L qua thời gian tại các môi trường (a) pH = 1,2, (b) pH = 7,4.

Nghiên cứu đã chế tạo hạt vi nang KC-L và CMKC-3/1-L, phân tích được đặc trưng kích thước và cấu tạo bề mặt hạt vi nang. Đánh giá bước đầu sự giải phóng lectin từ hạt vi nang trong các môi trường pH = 1,2 và pH = 7,4: lectin từ hạt vi nang dẫn xuất carboxymethyl-kappa-carrageenan có sự giải phóng chậm hơn so với các hạt từ kappa-carrageenan theo thời gian.

KẾT LUẬN

Luận án đã hoàn thành các mục tiêu đã đặt ra và thu được một số kết quả chính như sau:

1. Đây là công trình nghiên cứu khoa học đầu tiên ở Việt Nam thu nhận tích hợp lectin và carrageenan từ hai đối tượng rong đỏ: *Kappaphycus striatus* được trồng tại vịnh Vân Phong tỉnh Khánh Hòa và *Betaphycus gelatinus* được thu hoạch tự nhiên tại vùng biển tỉnh Ninh Thuận (nay thuộc tỉnh Khánh Hòa). Luận án đã phân tích đặc tính cấu trúc và hoạt tính sinh học của các lectin và carrageenan chiết tách từ các đối tượng rong đỏ:

- Thành phần của rong đỏ *Kappaphycus striatus* chủ yếu là kappa-carrageenan với một phần nhỏ iota-carrageenan, trong khi đó thành phần hóa học của carrageenan từ rong *Betaphycus gelatinus* là carrageenan lai hóa gồm beta-carrageenan (68,6%) và kappa-carrageenan (31,4%).

- Các lectin từ rong đỏ *Kappaphycus striatus* và *Betaphycus gelatinus* được xác định thành phần và có hoạt tính ngưng kết hồng cầu trên hồng cầu thỏ.

2. Lần đầu tiên tổng hợp dẫn xuất carboxymethyl-kappa-carrageenan từ kappa-carrageenan của rong đỏ *Kappaphycus striatus* nuôi trồng tại vịnh Vân Phong tỉnh Khánh Hòa, Việt Nam. Kappa-carrageenan và dẫn xuất CMKC từ rong đỏ *Kappaphycus striatus* được phân tích cấu trúc và cho thấy có hoạt tính NKHC và chống oxy hóa. Các dẫn xuất CMKC có độ trương nở phụ thuộc vào pH của môi trường. Trong đó, mẫu CMKC-3/1 có độ thể cao nhất ($DS = 1,12$) với các hoạt tính cao hơn các mẫu còn lại; đồng thời hạt vi nang tạo từ CMKC-3/1 có độ trương nở thấp ở môi trường pH = 1,2 và độ trương nở cao hơn các mẫu còn lại ở môi trường pH = 7,4.

3. Đã tạo được hạt vi nang từ kappa-carrageenan và dẫn xuất CMKC-3/1 chứa lectin từ rong đỏ *Kappaphycus striatus*, sử dụng nồng độ dẫn xuất là 3% để đạt hiệu suất bọc cao; lectin vẫn giữ được hoạt tính ngưng kết hồng cầu trong quá trình tạo hạt vi nang; và đã bước đầu đánh giá khả năng giải phóng lectin của hạt vi nang ở các môi trường pH thay đổi 1,2 và 7,4 cho thấy lectin từ hạt vi nang dẫn xuất CMKC có sự giải phóng chậm hơn so với các hạt từ KC theo thời gian.

KIẾN NGHỊ

1. Tiếp tục đánh giá động học giải phóng lectin của các hạt vi nang ở các môi trường pH thay đổi.
2. Xác định các hoạt tính của lectin được giải phóng khỏi hạt vi nang tại các môi trường pH thay đổi.
3. Nghiên cứu tạo hạt vi nang từ carboxymethyl-kappa-carrageenan bọc các chất mang hoạt tính sinh học khác như curcumin từ củ nghệ, beta-carotene từ gấc, mục đích tăng tính độ hòa tan khi sử dụng qua đường tiêu hóa.

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN

1. Le Dinh Hung, **Hoang Thi Trang Nguyen**, and Vo Thi Dieu Trang, 2021, Kappa carrageenan from the red alga *Kappaphycus striatus* cultivated at Vanphong Bay, Vietnam: physicochemical properties and structure, *Journal of applied phycology*, 33, 1819–1824. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02415-1> (Q2, IF- 2,8)
2. Le Dinh Hung, **Hoang Thi Trang Nguyen**, Vo Thi Dieu Trang, Le Trong Nghia, Dinh Thanh Trung, Thanh Thi Thu Thuy, 2024, Hybrid beta/kappa/gamma-carrageenan from the red alga *Betaphycus gelatinus* in Vietnam, *Journal of applied phycology*, 36, 3689–3695. <https://doi.org/10.1007/s10811-024-03336-5> (Q2, IF- 2,8)
3. **Hoang Thi Trang Nguyen**, Dinh Thanh Trung, Vo Thi Dieu Trang, Pham Duc Thinh, Thanh Thi Thu Thuy, Le Dinh Hung, 2025, Carboxymethyl-kappa-carrageenan derivatives synthesized from kappa-carrageenan of the red alga *Kappaphycus striatus* cultivated in Vietnam: Characterization, structure and biological activity, *Journal of Applied Phycology*, 37, 527–537. <https://doi.org/10.1007/s10811-024-03381-0> (Q2, IF- 2,8)
4. **Hoàng Thị Trang Nguyên**, Lê Đình Hùng, Thành Thị Thu Thủy, 09/2024, Nghiên cứu carboxymethyl-kappa-carrageenan bọc lectin từ rong đỏ *Kappaphycus striatus*, *Tạp chí hóa học và ứng dụng*, 3B (71), 281-287
5. **Hoàng Thị Trang Nguyên**, Lê Đình Hùng, 2022, Kappa carrageenan từ rong đỏ *Kappaphycus striatus*, *Hội nghị quốc tế “Biển Đông 2022”*, 508-518. (ISBN: 978-604-357-067-0)
6. Le Dinh Hung, **Hoang Thi Trang Nguyen**, 2022, The red algae, carrageenophytes: source of potential lectins for application, *Hội nghị quốc tế “Biển Đông 2022”*, 444-455. (ISBN: 978-604-357-067-0).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. L.D. Hung, K. Hori, and N.H. Quang, 2009a, Screening and preliminary characterization of hemagglutinins in Vietnamese marine algae, *Journal of applied phycology*, 21(1), pp. 89–97.
2. L.D. Hung, T. Sato, H. Shibata, and K. Hori, 2009b, Biochemical comparison of lectins among three different color strains of the red alga *Kappaphycus alvarezii*, *Fisheries Science*, 75(3), pp. 723–730.
3. L.D. Hung, Y. Sato, and K. Hori, 2011, High-mannose N-glycan-specific lectin from the red alga *Kappaphycus striatum* (Carrageenophyte), *Phytochemistry*, 72(9), pp. 855–861.
4. L.D. Hung, B. M. Ly, V.T.D. Trang, N.T.D. Ngoc, L.T. Hoa, and P.T.H. Trinh, 2012, A new screening for hemagglutinins from Vietnamese marine macroalgae, *Journal of applied phycology*, 24(2), pp.227–235.
5. L.D. Hung, M. Hirayama, B.M. Ly, and K. Hori, 2015a, Purification, primary structure, and biological activity of the high-mannose N-glycan-specific lectin from cultivated *Eucheuma denticulatum*, *Journal of applied phycology*, 27(4), pp. 1657–1669.
6. L. D. Hung, M. Hirayama, B. M. Ly, and K. Hori, 2015b, Biological activity, cDNA cloning and primary structure of lectin KSA-2 from the cultivated red alga *Kappaphycus striatum* (Schmitz) Doty ex Silva, *Phytochemistry Letters*, 14, pp. 99–105.
7. L.D. Hung, L.T. Hoa, L.N. Hau, and D.T. Trung, 2019, The lectin accumulation, growth rate, carrageenan yield, and quality from the red alga *Kappaphycus striatus* cultivated at Camranh Bay, Vietnam, *Journal of applied phycology*, 31(3), 1991–1998.
8. L.D. Hung and P.T.H. Trinh, 2021, Structure and anticancer activity of a new lectin from the cultivated red alga, *Kappaphycus striatus*, *Journal of Natural Medicines*, 75(1), pp. 223–231.
9. L.D. Hung and L.T.D. Thuc, 2020, High-mannose type N-glycan binding specificity of a novel lectin from the red alga (*Betaphycus gelatinus*), *Vietnam Journal of Biotechnology*, 17(4), 709.
10. A. Barre, M. Simplicien, H. Benoist, E.J.M. Van Damme, and P. Rougé, 2019, Mannose-Specific Lectins from Marine Algae: Diverse Structural Scaffolds Associated to Common Virucidal and Anti-Cancer Properties, *Marine Drugs*, 17(8), pp. 440.

11. A. Barre, E.J.M.V. Damme, M. Simplicien, H. Benoist, and P. Rougé, 2020, Man-Specific, GalNAc/T/Tn-Specific and Neu5Ac-Specific Seaweed Lectins as Glycan Probes for the SARS-CoV-2 (COVID-19) Coronavirus, *Marine Drugs*, 18(11), pp. 543.
12. M. Suhail, M.A. Kamal, F. Ahmad, and E.I. Azhar, 2020, The Emergence of Human Patho. S.S. Sohrab genic Coronaviruses: Lectins as Antivirals for SARS-CoV-2, *Curr Pharm Des*, 26(41), pp. 5286–5292.
13. T. Sugahara, Y. Ohama, A. Fukuda, M. Hayashi, A. Kawakubo, and K. Kato, 2001, The cytotoxic effect of *Eucheuma serra* agglutinin (ESA) on cancer cells and its application to molecular probe for drug delivery system using lipid vesicles, *Cytotechnology*, 36(1), pp. 93–99.
14. Y. Sato et al., 2015, Entry Inhibition of Influenza Viruses with High Mannose Binding Lectin ESA-2 from the Red Alga *Eucheuma serra* through the Recognition of Viral Hemagglutinin, *Marine Drugs*, 13(6), pp. 3454–3465.
15. A. Kawakubo, H. Makino, J. Ohnishi, H. Hirohara, and K. Hori, 1997, The marine red alga *Eucheuma serra* J. Agardh, a high yielding source of two isolectins, *Journal of Applied Phycology*, 9(4), pp. 331–338.
16. Y. Sato, K. Morimoto, M. Hirayama, and K. Hori, 2011, High mannose-specific lectin (KAA-2) from the red alga *Kappaphycus alvarezii* potently inhibits influenza virus infection in a strain-independent manner, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 405(2), pp. 291–296.
17. M. Hirayama, H. Shibata, K. Imamura, T. Sakaguchi, and K. Hori, 2016, High-Mannose Specific Lectin and Its Recombinants from a Carrageenophyta *Kappaphycus alvarezii* Represent a Potent Anti-HIV Activity Through High-Affinity Binding to the Viral Envelope Glycoprotein gp120, *Mar Biotechnol*, 18(1), pp. 144–160.
18. K. Hori, Y. Sato, K. Ito, Y. Fujiwara, Y. Iwamoto, H. Makino, A. Kawakubo, 2007, Strict specificity for high-mannose type N-glycans and primary structure of a red alga *Eucheuma serra* lectin, *Glycobiology*, 17(5), pp. 479–491.
19. R. Yegappan, V. Selvaprithiviraj, S. Amirthalingam, and R. Jayakumar, 2018, Carrageenan based hydrogels for drug delivery, tissue engineering and wound healing, *Carbohydrate polymers*, 198, pp. 385–400.
20. J. S. Craigie, Carrageenans and agars, 1978, *Handbook of phycological methods: physiological and biochemical methods*.
21. M. Ohno, D.B. Largo, and T. Ikumoto, 1994, Growth rate, carrageenan yield and gel properties of cultured kappa-carrageenan producing red alga *Kappaphycus*

alvarezzi (Doty) Doty in the subtropical waters of Shikoku, Japan, *Journal of Applied Phycology*, 6(1), pp. 1–5.

22. Phạm Hồng Hải, Nguyễn Xuân Nguyên, Nguyễn Bích Thủy, Trần Đình Toại, 2007, Một số ứng dụng của carrageenan và khả năng sử dụng carragenan từ rong biển Việt Nam trong bảo quản chế biến thực phẩm, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 45(4), tr. 87-93.

23. Trần Thị Luyến, 2010, Nghiên cứu xác lập quy trình sản xuất carrageenan bán tinh chế (Semirefined carrageenan-SRC) từ rong sụn *Kappaphycus alvarezii* Cam Ranh-Khánh Hòa, *Tạp chí Khoa học-Công nghệ Thủy sản*, 2010, 1, tr. 3-10.

24. Lê Thị Thúy Hằng, Vũ Ngọc Bội, 2013, nghiên cứu sử dụng viscozyme l trong sản xuất carrageenan từ rong sụn (*kappaphycus alvarezii* (doty) doty), *Tạp chí khoa học – công nghệ thủy sản*, 2, tr. 107-111.

25. Ngô Ngọc Trinh, Phan Thị Khánh Vinh, 2015, Nghiên cứu thu nhận Kappa-Carrageenan từ rong sủ *Kappaphycus Striatus* trồng tại Cam Ranh, *Tạp chí Khoa học-Công nghệ Thủy sản*, 2, tr. 72-77.

26. Trần Đình Toại, Phạm Hồng Hải, Nguyễn Văn Thiết, 2013, Nghiên cứu ứng dụng carrageenan oligosaccharide từ rong biển có hoạt tính sinh học trong chế biến và bảo quản thực phẩm, *Tuyển tập Hội nghị Khoa học toàn quốc về sinh học biển và phát triển bền vững*, tr. 677-683.

27. T.V. Nguyen, N.H. Le, S.M. Lin, F. Steen, and O.D. Clerck, 2013, Checklist of the marine macroalgae of Vietnam, *Botanica Marina*, 56(3), pp. 207–227.

28. M.N. García-Casal, A.C. Pereira, I. Leets, J. Ramírez, and M.F. Quiroga, 2007, High Iron Content and Bioavailability in Humans from Four Species of Marine Algae^{1,2}, *The Journal of Nutrition*, 137(12), pp. 2691–2695.

29. S. Yu, A. Blennow, M. Bojko, F. Madsen, C.E. Olsen, and S. B. Engelsen, 2002, Physico-chemical Characterization of Floridean Starch of Red Algae, *Starch - Stärke*, 54(2), pp. 66–74.

30. L. Hayashi, R.P. Reis, A.A. Santos, B. Castelar, D. Robledo, G.B. Vega, F.E. Msuya, K. Eswaran, S.Md. Yasir, M.K.M. Ali, and Anicia Q. Hurtado, 2017, The cultivation of *Kappaphycus* and *Eucheuma* in tropical and sub-tropical waters, *Tropical seaweed farming trends, problems and opportunities: focus on Kappaphycus and Eucheuma of commerce*, pp. 55-90.

31. T. Mori et al., 2005, Isolation and characterization of griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia* sp, *J Biol Chem*, 280(10), pp. 9345–9353.

32. P. Meuleman, Anna Albecka, Sandrine Belouzard, Koen Vercauteren, Lieven Verhoye, Czeslaw Wychowski, Geert Leroux-Roels, Kenneth E. Palmer, Jean Dubuisson, 2011, *Griffithsin* Has Antiviral Activity against Hepatitis C Virus, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), pp. 5159–5167.
33. J. Mu, M. Hirayama, Y. Sato, K. Morimoto, and K. Hori, 2017, A Novel High-Mannose Specific Lectin from the Green Alga *Halimeda renschii* Exhibits a Potent Anti-Influenza Virus Activity through High-Affinity Binding to the Viral Hemagglutinin, *Mar Drugs*, 15(8), pp. 255.
34. B.R. O’Keefe, B. Giomarelli, D.L. Barnard, S.R. Shenoy, P.K.S. Chan, J.B. McMahon, K.E. Palmer, B.W. Barnett, D.K. Meyerholz, Christine L. Wohlford-Lenane, P. B. McCray Jr, 2010, Broad-spectrum in vitro activity and in vivo efficacy of the antiviral protein griffithsin against emerging viruses of the family Coronaviridae, *J Virol*, 84(5), pp. 2511–2521.
35. R.P. Chaves, S.R. Silva., L.G. N. Neto, R.F. Carneiro, A.L. Coelhoda Silva, A.H. Sampaio, B.L. Sousa, M.G. Cabral, P.A. Videira, E.H. Teixeira, C.S. Nagano, 2018, Structural characterization of two isolectins from the marine red alga *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W. Gabrielson and their anticancer effect on MCF-7 breast cancer cells, *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, pp. 1320–1329.
36. F. Rindi and L. Morrison, 2014, AlgaeBase: An On-line Resource for Algae, *Cryptogamie, Algologie*, 35(2), pp. 105-115.
37. K. M. Zia, S. Tabasum, M. Nasif, N. Sultan, N. Aslam, A. Noreen, M. Zuber, 2017, A review on synthesis, properties and applications of natural polymer base carrageenan blends and composites, *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, pp. 282–301.
38. J. Necas and L. Bartosikova, 2013, Carrageenan: a review, *Veterinarni medicina*, 58(4), pp. 187–205.
39. V. L. Campo, D. F. Kawano, D. B. da Silva, and I. Carvalho, 2009, Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review, *Carbohydrate Polymers*, 77(2), pp. 167–180.
40. S. Nanaki, E. Karavas, L. Kalantzi, and D. Bikiaris, 2010, Miscibility study of carrageenan blends and evaluation of their effectiveness as sustained release carriers, *Carbohydrate Polymers*, 79(4), pp. 1157–1167.
41. L. Cunha and A. Grenha, 2016, Sulfated Seaweed Polysaccharides as Multifunctional Materials in Drug Delivery Applications, *Mar Drugs*, 14(3), pp. 42.

42. T. Barbeyron, G. Michel, P. Potin, B. Henrissat, and B. Kloareg, 2000, Iota-Carrageenases constitute a novel family of glycoside hydrolases, unrelated to that of kappa-carrageenases, *J Biol Chem*, 275(45), pp. 35499–35505.
43. N. Rhein-Knudsen, M. T. Ale, and A. S. Meyer, 2015, Seaweed Hydrocolloid Production: An Update on Enzyme Assisted Extraction and Modification Technologies, *Marine Drugs*, 13(6), pp. 3340–3359.
44. L. G. Ekström, J. Kuivinen, and G. Johansson, 1983, Molecular weight distribution and hydrolysis behaviour of carrageenans, *Carbohydrate Research*, 116(1), pp. 89–94.
45. G. Zhou, Y. Sun, H. Xin, Y. Zhang, Z. Li, and Z. Xu, 2004, In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*, *Pharmacol Res*, 50(1), pp. 47–53.
46. H. Yuan, J. Song, X. Li, N. Li, and J. Dai, 2006, Immunomodulation and antitumor activity of κ -carrageenan oligosaccharides, *Cancer Letters*, 243(2), pp. 228–234.
47. W. Wang, P. Zhang, C. Hao, X.-E. Zhang, Z.-Q. Cui, and H.-S. Guan, 2011, In vitro inhibitory effect of carrageenan oligosaccharide on influenza A H1N1 virus, *Antiviral Research*, 92(2), pp. 237–246.
48. M. C. Rocha de Souza, C. T. Marques, C. M. Guerra Dore, F. R. Ferreira da Silva, H. A. Oliveira Rocha, and E. L. Leite, 2007, Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds, *Journal of Applied Phycology*, 19(2), pp. 153–160.
49. L. N. Panlasigui, O. Q. Baello, J. M. Dimatangal, and B. D. Dumelod, 2003, Blood cholesterol and lipid-lowering effects of carrageenan on human volunteers, *Asia Pac J Clin Nutr*, 12(2), pp. 209–214.
50. S. Chakraborty, 2017, Carrageenan for encapsulation and immobilization of flavor, fragrance, probiotics, and enzymes: A review, *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 36(1), pp. 1–19.
51. K. Lewicka, A. Smola-Dmochowska, P. Dobrzyński, N. Śmigiel-Gac, K. Jelonek, M. Musiał-Kulik, and P. Rychter, 2024, Microspheres Based on Blends of Chitosan Derivatives with Carrageenan as Vitamin Carriers in Cosmeceuticals, *Polymers*, 16(13), pp. 1815.
52. I. J. Ogaji, E. I. Nep, and J. D. Audu-Peter, 2012, Advances in Natural Polymers as Pharmaceutical Excipients, *Pharm Anal Acta*, 3(1), pp. 146.

53. M. R. Bagherinejad, H. Korbekandi, N. Tavakoli, and D. Abedi, 2012, Immobilization of penicillin G acylase using permeabilized *Escherichia coli* whole cells within chitosan beads, *Res Pharm Sci*, 7(2), pp. 79–85.
54. S. Takamatsu and T. Tosa, 1993, Production of L-alanine and D-aspartic acid, *Bioprocess Technol*, 16, pp. 25–35.
55. M. Álvarez-Viñas, S. Souto, N. Flórez-Fernández, M. D. Torres, I. Bandín, and H. Domínguez, 2021, Antiviral Activity of Carrageenans and Processing Implications, *Mar Drugs*, 19(8), pp. 437.
56. R. Spieler, 2002, Seaweed compound's anti-HIV efficacy will be tested in southern Africa, *Lancet*, 359 (9318), pp. 1675.
57. M. Koenighofer et al., 2014, *Carrageenan nasal spray in virus confirmed common cold: individual patient data analysis of two randomized controlled trials*, *Multidiscip Respir Med*, 9(1), pp. 57.
58. M. Morokutti-Kurz, M. Fröba, P. Graf, G. Maximilian, G. Andreas, A. Janina, S. Ulrich, Eva Prieschl-Grassauer, 2021, Iota-carrageenan neutralizes SARS-CoV-2 and inhibits viral replication in vitro, *PLoS One*, 16(2), e0237480.
59. S. Raveendran, Y. Yoshida, T. Maekawa, and D. S. Kumar, 2013, Pharmaceutically versatile sulfated polysaccharide based bionano platforms, *Nanomedicine*, 9(5), pp. 605–626.
60. E.M. Pacheco-Quito, R. Ruiz-Caro, and M.D. Veiga, 2020, Carrageenan: Drug Delivery Systems and Other Biomedical Applications, *Mar Drugs*, 18(11), pp. 583.
61. A. V. Briones and T. Sato, 2010, Encapsulation of glucose oxidase (GOD) in polyelectrolyte complexes of chitosan–carrageenan, *Reactive and Functional Polymers*, 70(1), pp. 19–27.
62. K. Tomoda, M. Asahiyama, E. Ohtsuki, T. Nakajima, H. Terada, M. Kanebako, T. Inagi, K. Makino, 2009, Preparation and properties of carrageenan microspheres containing allopurinol and local anesthetic agents for the treatment of oral mucositis, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 71(1), pp. 27–35.
63. A. M. Garcia and E. S. Ghaly, 1996, Preliminary spherical agglomerates of water soluble drug using natural polymer and cross-linking technique, *Journal of Controlled Release*, 40(3), pp. 179–186.
64. O. Sipahigil and B. Dortunç, 2001, Preparation and in vitro evaluation of verapamil HCl and ibuprofen containing carrageenan beads, *International Journal of Pharmaceutics*, 228(1), pp. 119–128.

65. P. Dahal and S. Janaswamy, 2024, Hydrocolloid-based nutraceutical delivery systems: Potential of κ -carrageenan hydrogel beads for sustained release of curcumin, *Food Research International*, 183, 114223.
66. N. A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, and H. Ichikawa, 2000, Hydrogels in pharmaceutical formulations, *Eur J Pharm Biopharm*, 50(1), pp. 27–46.
67. C. Tranquilan-Aranilla, N. Nagasawa, A. Bayquen, and A. Dela Rosa, 2012, Synthesis and characterization of carboxymethyl derivatives of kappa-carrageenan, *Carbohydrate Polymers*, 87(2), pp. 1810–1816.
68. K.H. Leong, L.Y. Chung, M.I. Noordin, K. Mohamad, M. Nishikawa, Y. Onuki, M. Morishita, K. Takayama, 2011, Carboxymethylation of kappa-carrageenan for intestinal-targeted delivery of bioactive macromolecules, *Carbohydrate Polymers*, 83(4), pp. 1507–1515.
69. L. Y. C. Madruga, R. M. Sabino, E. C. G. Santos, K. C. Popat, R. de C. Balaban, and M. J. Kipper, 2020, Carboxymethyl-kappa-carrageenan: A study of biocompatibility, antioxidant and antibacterial activities, *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, pp. 483–491.
70. L. Fan, L. Wang, S. Gao, P. Wu, M. Li, W. Xie, S. Liu, and W. Wang, 2011, Synthesis, characterization and properties of carboxymethyl kappa carrageenan, *Carbohydrate Polymers*, 86(3), pp. 1167–1174.
71. Z. Mohamadnia, M. J. Zohuriaan-Mehr, K. Kabiri, A. Jamshidi, and H. Mobedi, 2007, pH-Sensitive IPN Hydrogel Beads of Carrageenan-Alginate for Controlled Drug Delivery, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 22(3), pp. 342–356.
72. P. Sahoo, K. H. Leong, S. Nyamathulla, Y. Onuki, K. Takayama, and L. Y. Chung, 2017, Optimization of pH-responsive carboxymethylated iota-carrageenan/chitosan nanoparticles for oral insulin delivery using response surface methodology, *Reactive and Functional Polymers*, 119, pp. 145–155.
73. K. H. Leong, L. Y. Chung, M. I. Noordin, Y. Onuki, M. Morishita, and K. Takayama, 2011, Lectin-functionalized carboxymethylated kappa-carrageenan microparticles for oral insulin delivery, *Carbohydrate Polymers*, 86(2), pp. 555–565.
74. V. Aparna, A. R. Melge, V. K. Rajan, R. Biswas, R. Jayakumar, and C. Gopi Mohan, 2018, Carboxymethylated ι -carrageenan conjugated amphotericin B loaded gelatin nanoparticles for treating intracellular *Candida glabrata* infections, *International Journal of Biological Macromolecules*, 110, pp. 140–149.
75. N. Sharon and H. Lis, 2001, The Structural Basis for Carbohydrate Recognition By Lectins, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 1–16

76. J. Calvete, F.H.F. Costa, S. Saker-Sampaio, M.P.M. Murciano, C.S. Nagano, B. S. Cavada, T.B. Grangeiro, M.V. Ramos, C. Bloch Jr, S.B. Silveira, B.T. Freitas and A. H. Sampaio, 2000, The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(2), pp. 343–350.
77. N. Sharon and H. Lis, 1972, Lectins: Cell-Agglutinating and Sugar-Specific Proteins, *Science*, 177 (4053), pp. 949–959.
78. K. Hori, K. Miyazawa, and K. Ito, 1986, Preliminary characterization of agglutinins from seven marine algal species, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 52(2), pp. 323–331.
79. A. H. Sampaio, D. J. Rogers, C. J. Barwell, S. Saker-Sampaio, F. H. F. Costa, and M. V. Ramos, 1998, A new isolation procedure and further characterisation of the lectin from the red marine alga *Ptilota serrata*, *Journal of Applied Phycology*, 10(6), pp. 539–546.
80. R. S. Singh and A. K. Walia, 2018, Lectins from red algae and their biomedical potential, *Journal of Applied Phycology*, 30(3), pp. 1833–1858.
81. D. J. Rogers and K. Hori, 1993, Marine algal lectins: new developments, *Hydrobiologia*, 260(1), pp. 589–593.
82. M. A. Vasconcelos, F.V.S. Arruda, V.A. Carneiro, H.C. Silva, K.S. Nascimento, A.H. Sampaio, B. Cavada, E.H. Teixeira, M. Henriques; M.O. Pereira, 2014, Effect of Algae and Plant Lectins on Planktonic Growth and Biofilm Formation in Clinically Relevant Bacteria and Yeasts, *Biomed Res Int*, 2014, 365272.
83. M. L. Holanda, V. M. M. Melo, L. M. C. M. Silva, R. C. N. Amorim, M. G. Pereira, and N. M. B. Benevides, 2005, Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria, *Braz J Med Biol Res*, 38, pp. 1769–1773.
84. S. A. Neves et al., 2007, Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux, *Braz J Med Biol Res*, 40, pp. 127–134.
85. R. S. Singh, S. R. Thakur, and P. Bansal, 2015, Algal lectins as promising biomolecules for biomedical research, *Crit Rev Microbiol*, 41(1), pp. 77–88.
86. H. J. Hwang, J.W. Han, H. Jeon, K. Cho, J. Kim, D.S. Lee, J.W. Han, 2020, Characterization of a Novel Mannose-Binding Lectin with Antiviral Activities from Red Alga, *Grateloupia chiangii*, *Biomolecules*, 10(2), pp. 333.
87. K. Hayashi, T. Miyazaki, K. Sakayama, A. Nakamura, K. Kameda, S. Masuda, H. Umakoshi, K. Kat, 2012, Active Targeting to Osteosarcoma Cells and Apoptotic

Cell Death Induction by the Novel Lectin *Eucheuma serra* Agglutinin Isolated from a Marine Red Alga, *Journal of Drug Delivery*, 2012(1), 842785.

88. V. Popa, Polysaccharides in Medicinal and Pharmaceutical Applications, *Smithers Rapra*, 2011.

89. O. Pillai and R. Panchagnula, 2001, Polymers in drug delivery, *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(4), pp. 447–451.

90. T. G. Barclay, C. M. Day, N. Petrovsky, and S. Garg, 2019, Review of polysaccharide particle-based functional drug delivery, *Carbohydrate Polymers*, 221, pp. 94–112.

91. Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, and Z. Zhang, 2008, Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(15), pp. 1650–1662.

92. B. Kang, T. Opatz, K. Landfester, and F. R. Wurm, 2015, Carbohydrate nanocarriers in biomedical applications: functionalization and construction, *Chemical Society Reviews*, 44(22), pp. 8301–8325.

93. J. Tan et al., 2011, Dual-stimuli sensitive nanogels fabricated by self-association of thiolated hydroxypropyl cellulose, *Polymer Chemistry*, 2(3), pp. 672–678,

94. W. Wang, S.-X. Wang, and H.-S. Guan, 2012, The Antiviral Activities and Mechanisms of Marine Polysaccharides: An Overview, *Marine Drugs*, 10(12), pp. 2795–2816.

95. H. Zhong, X. Gao, C. Cheng, C. Liu, Q. Wang, and X. Han, 2020, The Structural Characteristics of Seaweed Polysaccharides and Their Application in Gel Drug Delivery Systems, *Marine Drugs*, 18(12), 658.

96. W. Zhang, M. An, J. Xi, and H. Liu, 2017, Targeting CpG Adjuvant to Lymph Node via Dextran Conjugate Enhances Antitumor Immunotherapy, *Bioconjugate Chemistry*, 28(7), pp. 1993–2000.

97. S. Saremi, R. Dinarvand, A. Kebriaeezadeh, S. N. Ostad, and F. Atyabi, 2013, Enhanced oral delivery of docetaxel using thiolated chitosan nanoparticles: preparation, in vitro and in vivo studies, *BioMed Research International*, 2013, 150478

98. K. Park et al., 2007, Effect of polymer molecular weight on the tumor targeting characteristics of self-assembled glycol chitosan nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, 122(3), pp. 305–314.

99. M. P. Desai, V. Labhasetwar, G. L. Amidon, and R. J. Levy, 1996, Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size, *Pharmaceutical Research*, 13(12), pp. 1838–1845.

100. S. Chadwick, C. Kriegel, and M. Amiji, 2010, Nanotechnology solutions for mucosal immunization, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62 (4–5), pp. 394–407.
101. D. T. Page and S. Cudmore, 2001, Innovations in oral gene delivery: challenges and potentials, *Drug Discov Today*, 6(2), pp. 92–101.
102. M. L. Tan, P. F. M. Choong, and C. R. Dass, 2010, Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery, *Peptides*, 31(1), pp. 84–193.
103. L. Xie, M. Shen, Z. Wang, and J. Xie, 2021, Structure, function and food applications of carboxymethylated polysaccharides: A comprehensive review, *Trends in Food Science & Technology*, 118, pp. 539–557.
104. S. Deng, M. R. Gigliobianco, R. Censi, and P. Di Martino, 2020, Polymeric Nanocapsules as Nanotechnological Alternative for Drug Delivery System: Current Status, Challenges and Opportunities, *Nanomaterials (Basel)*, 10(5), 847.
105. M. Soraya, H. Laksono, R.P.G. Putri, I. Royanti, D.D. Perwatasari, R.A.P. Dewi, H. Purwoto, 2025, Exploring disintegration and swelling dynamics in Kappa-Carrageenan-based seaweed capsule shells, *South African Journal of Chemical Engineering*, 53, pp. 96–102.
106. W. C. Boyd and E. Shapleigh, 1954, Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins), *Science*, 19 (3091), pp. 419–419.
107. W.R. Liao, J.Y. Lin, W.Y. Shieh, W.L. Jeng, and R. Huang, 2003, Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 30(7), pp. 433–439.
108. T.M. Abreu, L.M.C.M. Silva, E.S.O. Vanderlei, C.M.L. de Melo, V.R.A. Pereira, N.M.B. Benevides, 2012, Cytokine production induced by marine algae lectins in BALB/c mice splenocytes. *Protein Pept Lett*, 19, pp. 975–981.
109. M. Sathuvan et al., 2017, κ -Carrageenan: An effective drug carrier to deliver curcumin in cancer cells and to induce apoptosis, *Carbohydrate Polymers*, 160, pp. 184–193.
110. A. C. Pinheiro, A. I. Bourbon, M. A. C. Quintas, M. A. Coimbra, and A. A., 2012, Vicente, K-carrageenan/chitosan nanolayered coating for controlled release of a model bioactive compound, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, pp. 227–232.
111. A. Lohani, G. Singh, S. S. Bhattacharya, R. Rama Hegde, and A. Verma, 2016, Tailored-interpenetrating polymer network beads of κ -carrageenan and sodium carboxymethyl cellulose for controlled drug delivery, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 31, pp. 53–64.

112. V. Paşcalău, V. Popescu, G.L. Popescu, M.C. Dudescu, G. Borodi, A. Dinescu, I. Perhaiţa, M. Paul, 2012, The alginate/ κ -carrageenan ratio's influence on the properties of the cross-linked composite films, *Journal of Alloys and Compounds*, 536, S418–S423.
113. C. J. F. de Souza, A. V. Ramos, P. B. S. Câmara, E. S. Gulão, M. F. de Campos, and E. E. Garcia-Rojas, 2015, Polymeric complexes obtained from the interaction of bovine serum albumin and κ -carrageenan, *Food Hydrocolloids*, 45, pp. 286–290.
114. M. M. G. Fouda, M. R. El-Aassar, G. F. El Fawal, E. E. Hafez, S. H. D. Masry, and A. Abdel-Megeed, 2015, κ -Carrageenan/poly vinyl pyrrolidone/polyethylene glycol/silver nanoparticles film for biomedical application, *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, pp. 179–184.
115. V. D. Paramita, A. Bannikova, and S. Kasapis, 2015, Release mechanism of omega-3 fatty acid in κ -carrageenan/polydextrose undergoing glass transition, *Carbohydrate Polymers*, 126, pp. 141–149.
116. Y. Chang, L. McLandsborough, and D. J. McClements, 2014, Interaction of cationic antimicrobial (ϵ -polylysine) with food-grade biopolymers: Dextran, chitosan, carrageenan, alginate, and pectin, *Food Research International*, 64, pp. 396–401.
117. T. Yagi, N. Nagasawa, A. Hiroki, M. Tamada and C. Aranilla, 2010, Method of manufacturing gel using polysaccharides as raw materials, *United States Patent Application Publication*, 20,100,314,580A1T.
118. Y. Sato, M. Hirayama, K. Morimoto, N. Yamamoto, S. Okuyama, and K. Hori, 2011, High mannose-binding lectin with preference for the cluster of alpha1-2-mannose from the green alga *Boodlea coacta* is a potent entry inhibitor of HIV-1 and influenza viruses, *J Biol Chem*, 286(22), pp.19446–19458.
119. V. T. N. T. Bui, B. T. Nguyen, F. Renou, and T. Nicolai, 2019, Structure and rheological properties of carrageenans extracted from different red algae species cultivated in Cam Ranh Bay, Vietnam, *Journal of Applied Phycology*, 31(3), pp. 1947–1953.
120. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), pp. 265–275.
121. M. Ohno, D. B. Largo, and T. Ikumoto, 1994. Growth rate, carrageenan yield and gel properties of cultured kappa-carrageenan producing red alga *Kappaphycus alvarezzi* (Doty) Doty in the subtropical waters of Shikoku, Japan, *Journal of Biological Chemistry*, 6(1), pp. 1–5.

122. H. Edelhoch, 1967, Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins, *Biochemistry*, 6(7), pp. 1948–1954.
123. W. Yaphe and G. P. Arsenault, 1965, Improved resorcinol reagent for the determination of fructose, and of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides, *Analytical Biochemistry*, 13(1), pp. 143–148.
124. T. T. Terho and K. Hartiala, 1971, Method for determination of the sulfate content of glycosaminoglycans, *Analytical Biochemistry*, 41(2), pp. 471–476.
125. K. Shimada, K. Fujikawa, K. Yahara, and T. Nakamura, 1992, Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion, *J Agric Food Chem*, 40(6), pp. 945–948.
126. S. R. M. Oliveira, A. E. Nascimento, M. E. P. Lima, Y. F. M. M. Leite, and N. M. B. Benevides, 2002, Purification and characterisation of a lectin from the red marine alga *Pterocladia capillacea* (S.G. Gmel.) Santel. & Hommers., *Rev. bras. Bot.*, 25(4), pp. 397–403.
127. H. Kamiya, K. Ogata, and K. Hori, 1982, Isolation and Characterization of a New Agglutinin in the Red Alga *Palmaria palmata* (L.) O. Kuntze, *Botanica Marina*. XXV, pp. 537-540
128. T. Tsuji, K. Yamamoto, T. Irimura, T. Osawa, 1981, Structure of carbohydrate unit A of porcine thyroglobulin, *J Biochem*, 195, pp. 691–699.
129. K. Yamamoto, T. Tsuji, T. Irimura, T. Osawa, 1981, The structure of carbohydrate unit B of porcine thyroglobulin, *J Biochem*, 195, pp.70–713.
130. M. J. Whitley, W. Furey, S. Kollipara, and A. M. Gronenborn, 2013, Burkholderia oklahomensis agglutinin is a canonical two-domain OAA-family lectin: structures, carbohydrate binding and anti-HIV activity, *FEBS J*, 280 (9), pp. 2056–2067.
131. L. D. Hung, K. Hori, H. Q. Nang, T. Kha, and L. T. Hoa, 2009, Seasonal changes in growth rate, carrageenan yield and lectin content in the red alga *Kappaphycus alvarezii* cultivated in Camranh Bay, Vietnam, *Journal of Applied Phycology*, 21(3), 265–272.
132. G. A. Santos, 1989, Carrageenans of species of Eucheuma J. Agardh and Kappaphycus Doty (Solieriaceae, Rhodophyta), *Aquatic Botany*, 36(1),55–67.
133. W. G. Mendoza, N. E. Montaña, E. T. Ganzon-Fortes, and R. D. Villanueva, 2002, Chemical and gelling profile of ice-ice infected carrageenan from *Kappaphycus striatum* (Schmitz) Doty ‘sacol’ strain (Solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta), *Journal of Applied Phycology*, 14(5), pp. 409–418.

134. A. Q. Hurtado, A. T. Critchley, A. Trespoey, and G. Bleicher-Lhonneur, 2008, Growth and carrageenan quality of *Kappaphycus striatum* var. sacol grown at different stocking densities, duration of culture and depth, *Journal of Applied Phycology*, 20(5), pp. 551–555.
135. C. Periyasamy, P. Anantharaman, T. Balasubramanian, and P. V. S. Rao, 2014, Seasonal variation in growth and carrageenan yield in cultivated *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty on the coastal waters of Ramanathapuram district, Tamil Nadu, *Journal of Applied Phycology*, 26(2), pp. 803–810.
136. W. H. Zuldin, S. Yassir, and R. Shapawi, 2016, Growth and biochemical composition of *Kappaphycus* (Rhodophyta) in customized tank culture system, *Journal of Applied Phycology*, 28(4), pp. 2453–2458.
137. Aguilan, J. Broom, J. Hemmingson, F. Dayrit, N. Montano, M. Dancel, 2003, Structural analysis of carrageenan from farmed varieties of Philippine seaweed, *Bot Mar*, 46, pp. 179–192.
138. A. Chiovitti, Kraft, Gerald T., Bacic, Antony, Craik, David J., and M.L. Liao, 2008, Kappa-/beta-carrageenans from Australian red algae of the *Acrotylaceae* (Gigartinales, Rhodophyta), *Phycologia*, 47(1), pp. 35–40.
139. M. Arman and S. A. U. Qader, 2012, Structural analysis of kappa-carrageenan isolated from *Hypnea musciformis* (red algae) and evaluation as an elicitor of plant defense mechanism, *Carbohydrate Polymers*, 88(4), pp.1264–1271.
140. R. B. Souza, A.F. Frota, J. Silva, C. Alves, A. Z. Neugebauer, S. Pinteus, J.A. G. Rodrigues, E.M.S. Cordeiro, R.R. Almeida, R. Pedrosa, N.M.B. Benevides, 2018, In vitro activities of kappa-carrageenan isolated from red marine alga *Hypnea musciformis*: Antimicrobial, anticancer and neuroprotective potential, *Int J Biol Macromol*, 112, pp. 1248–1256.
141. M. Kačuráková and R. H. Wilson, 2001, Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates, *Carbohydrate Polymers*, 44(4), pp. 291–303.
142. A. I. Usov, 1984, NMR Spectroscopy of Red Seaweed Polysaccharides: Agars, Carrageenans, and Xylans, 27(5), pp. 189–202.
143. R. D. Villanueva and M. N. E. Montaña, 2003, Fine Chemical Structure of Carrageenan from the Commercially Cultivated *Kappaphycus Striatum* (sacol Variety) (solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta), *Journal of Phycology*, 39(3), pp. 513–518.
144. V. A. Cosenza, D. A. Navarro, E. N. Fissore, A. M. Rojas, and C. A. Stortz, 2014, Chemical and rheological characterization of the carrageenans from *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamoroux, *Carbohydrate Polymers*, 102, pp. 780–789.

145. F. van de Velde, L. Pereira, and H. S. Rollema, 2004, The revised NMR chemical shift data of carrageenans, *Carbohydr Res*, 339(13), pp. 2309–2313.
146. C. W. Greer and W. Yaphe, 1984, Characterization of Hybrid (Beta-Kappa-Gamma) Carrageenan from *Eucheuma gelatinae* J. Agardh (*Rhodophyta*, *Solieriaceae*) Using Carrageenases, Infrared and ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 27(10), pp. 473–478.
147. D. W. Renn et al., 1993, β -carrageenan: Isolation and characterization, *Carbohydrate Polymers*, 22(4), pp. 247–252.
148. M. L. Liao, G. T. Kraft, S. L. A. Munro, D. J. Craik, and A. Bacic, 1993, Beta/Kappa-Carrageenans as Evidence for Continued Separation of the Families *Dicranemataceae* and *Sarcodiaceae* (*gigartinales*, *Rhodophyta*), *Journal of Phycology*, 29(6), pp. 833–844.
149. G. Correc, A. Barabanova, R. Tuvikene, K. Truus, I. Yermak, and W. Helbert, 2012, Comparison of the structures of hybrid κ - β -carrageenans extracted from *Furcellaria lumbricalis* and *Tichocarpus crinitus*, *Carbohydrate Polymers*, 88(1), pp. 31–36.
150. A. I. Usov, S. V. Yarotsky, and A. S. Shashkov, 1980, ¹³C-nmr spectroscopy of red algal galactans, *Biopolymers*, 19(5), pp. 977–990.
151. F. van de Velde, S. H. Knutsen, A. I. Usov, H. S. Rollema, and A. S. Cerezo, 2002, ¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry, *Trends in Food Science & Technology*, 13(3), pp. 73–92.
152. Z. Shariatnia, 2018, Carboxymethyl chitosan: Properties and biomedical applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, pp. 1406–1419.
153. S. Alavi Rafiee, R. Farhoosh, and A. Sharif, 2018, Antioxidant Activity of Gallic Acid as Affected by an Extra Carboxyl Group than Pyrogallol in Various Oxidative Environments, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120, 11, 1800319.
154. Y. Sun et al., 2015, Structural characterization and antioxidant activities of κ -carrageenan oligosaccharides degraded by different methods, *Food Chemistry*, 178, pp. 311–318.
155. J. M. McKim, 2014, Food additive carrageenan: Part I: A critical review of carrageenan in vitro studies, potential pitfalls, and implications for human health and safety, *Crit Rev Toxicol*, 44(3), pp. 211–243.
156. F.R.F. Silva, C.M.P.G. Dore, C.T. Marques, M.S. Nascimento, N.M.B. Benevides, H.A.O. Rocha, S.F. Chavante, E.L. Leite, 2010, Anticoagulant activity,

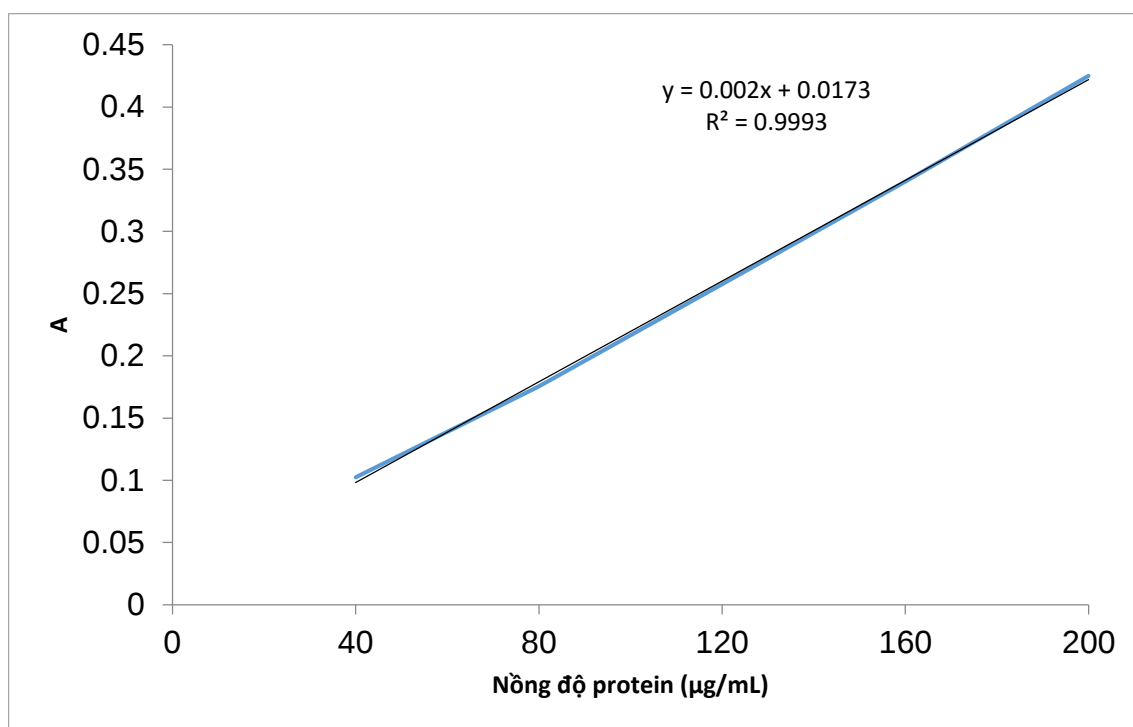
paw edema and pleurisy induced carrageenan: Action of major types of commercial carrageenans, *Carbohydrate Polymers*, 79(1), pp. 26–33.

157. Y. Wang, P. Yang, Z. Yan, Z. Liu, Q. Ma, Z. Zhang, Y. Wang, Y. Su, 2021, The Relationship between Erythrocytes and Diabetes Mellitus, *Journal of Diabetes Research*, 2021 (1), 6656062.

158. J.C. Campos-Sánchez, F.A. Guardiola, and M.Á. Esteban, 2024, In vitro effects of a natural marine algae polysaccharide (λ -carrageenan) on seabream erythrocytes, tumour cell lines and marine bacterial pathogens, *Journal of Applied Phycology*, 36(1), pp. 399–409.

159. S.N. Rodrigues, I.C. Gonçalves, M.C.L. Martins, M.A. Barbosa, and B.D. Ratner, 2006, Fibrinogen adsorption, platelet adhesion and activation on mixed hydroxyl-/methyl-terminated self-assembled monolayers, *Biomaterials*, 27 (31), pp. 5357–5367.

PHỤ LỤC



Phụ lục 1. Đồ thị đường chuẩn nồng độ protein (µg/mL).

Phụ lục 2. Phương pháp của Lowry và cộng sự (1951) [120]

Dùng albumin huyết thanh bò (BSA – Bovine serum albumin) làm chất chuẩn. Dựa trên cơ sở protein có khả năng phản ứng với thuốc thử Folin tạo phức chất có màu xanh da trời. Cường độ màu tỷ lệ thuận với nồng độ protein trong một phạm vi nhất định. Đo cường độ màu bằng thiết bị đo màu quang điện ở bước sóng 750 nm. Dựa vào đồ thị protein chuẩn (BSA) có thể xác định được hàm lượng protein ở nồng độ vài chục µg.

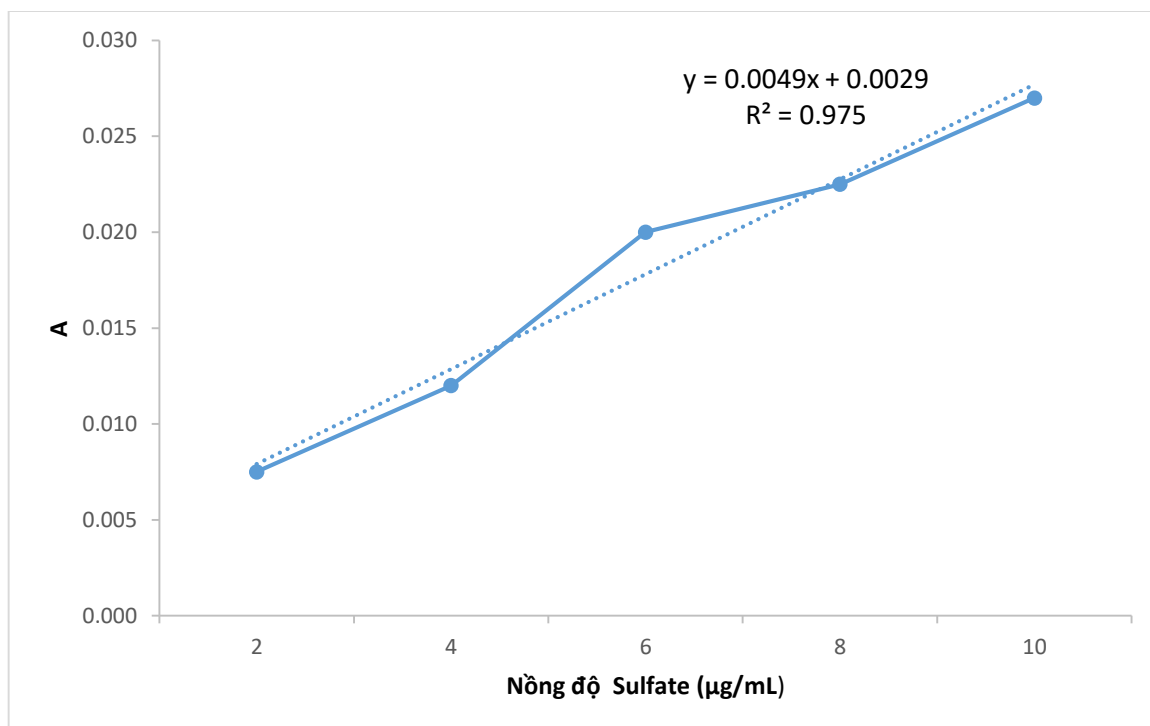
Chuẩn bị các dung dịch: Dung dịch A: 4g NaOH (0,1M) và 20g Na₂CO₃ (2 %) pha trong 1000mL nước cất; Dung dịch B: 0,5g CuSO₄.5H₂O (0,5 %) pha trong dung dịch Natri Xitrat (1 %) hoặc trong dung dịch Natri- Kali Tactrat 1%.; Dung dịch C: hỗn hợp của 2 dung dịch A và B theo tỉ lệ 49:1 (v/v), pha trước khi sử dụng. Thuốc thử Folin được pha loãng 2 lần với nước cất trước khi sử dụng. Dung dịch gốc là Albumin huyết thanh bò (BSA) 1 mg/mL.

Các bước tiến hành

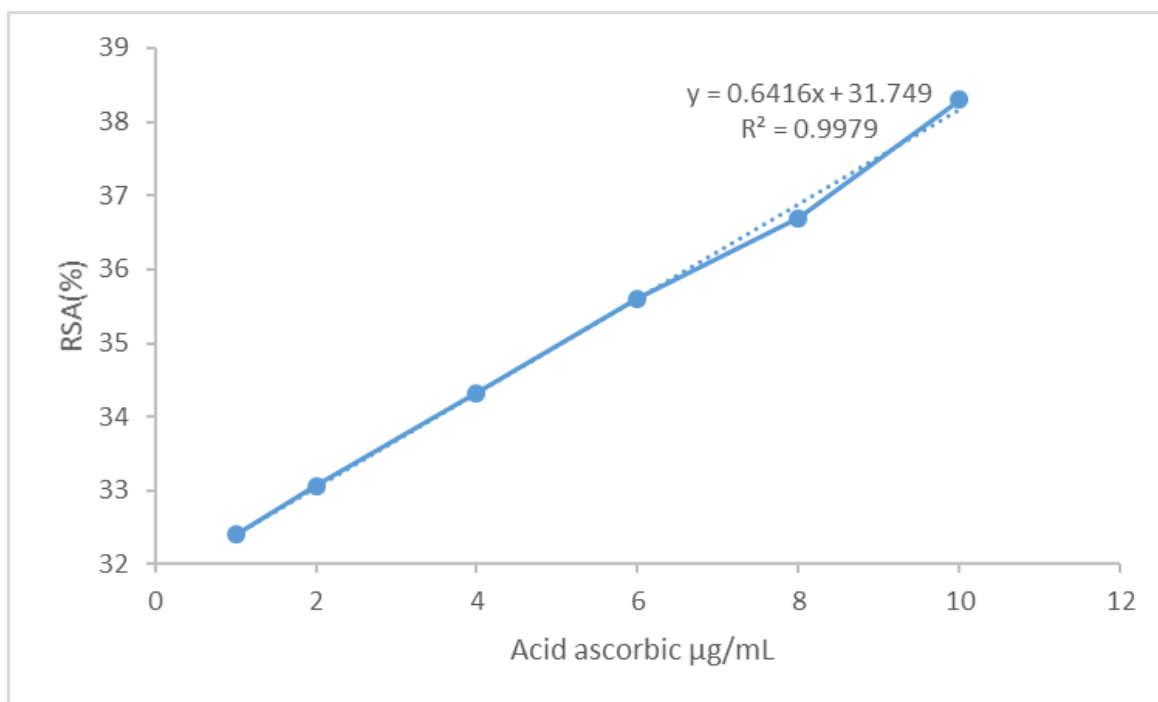
- Chuẩn bị dung dịch gốc: Cân 10 mg BSA hòa tan trong 10mL nước cất, thu được dung dịch gốc có nồng độ 1 mg/mL. Sau đó, pha loãng dung dịch gốc bằng nước cất thành các nồng độ 20, 40, 60, 80, 100 và 120 $\mu\text{g/mL}$ để tiến hành xây dựng đường chuẩn.

- Chuẩn bị dung dịch mẫu đo: Lấy chính xác 0,5 mL dịch chứa protein với các nồng độ khác nhau cho vào ống nghiệm, thêm vào đó 2,5 mL dung dịch C, lắc đều để yên trong 20 phút. Sau đó, thêm vào hỗn hợp trong ống nghiệm 0,25 mL thuốc thử Folin đã pha loãng 2 lần, lắc đều và để yên trong 60 phút.

- Đo độ hấp thụ của các mẫu dung dịch gốc ở bước sóng 750nm. Thực hiện thí nghiệm với mẫu kép, lấy giá trị trung bình, xây dựng đường hồi quy. Kết quả được xử lý theo phương pháp thống kê thông thường. Kết quả hàm lượng protein được tính toán từ đường chuẩn BSA đã xây dựng. Sau khi đã xây dựng đường chuẩn. Mẫu thí nghiệm cũng được chuẩn bị tương tự như đã nêu trên. Sau đó, đo hấp thụ ở bước sóng 750 nm, đối chiếu với đồ thị chuẩn BSA để tính hàm lượng protein trong các mẫu. Làm thí nghiệm với mẫu kép và lấy giá trị trung bình.



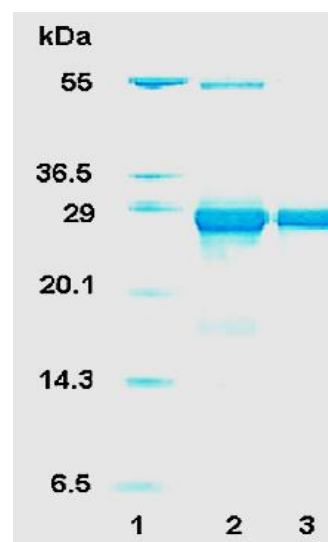
Phụ lục 3. Đồ thị đường chuẩn nồng độ sulfate ($\mu\text{g/mL}$).

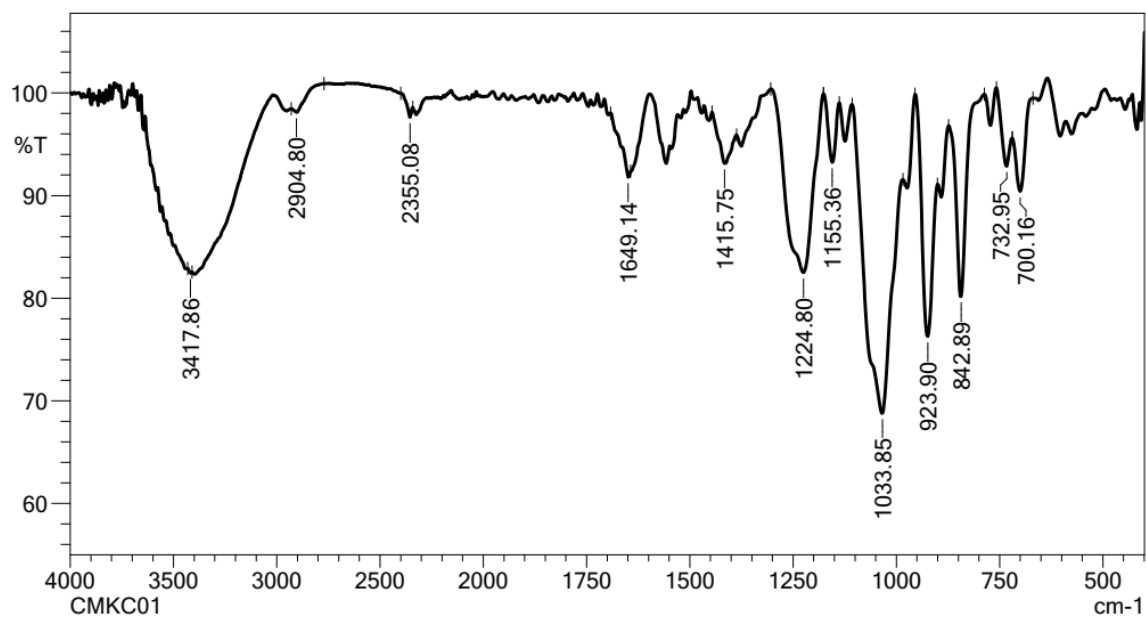


Phụ lục 4. Đồ thị đường chuẩn nồng độ ức chế DPPH của acid ascorbic (µg/mL).

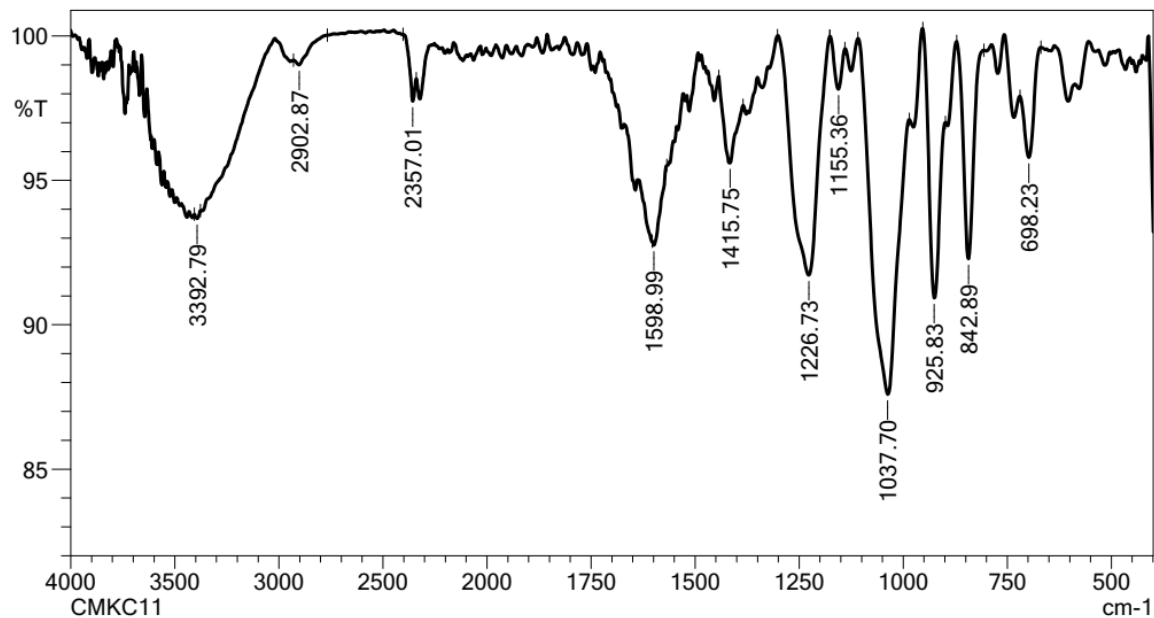
Phụ lục 5. Kết quả điện di lectin từ rong *K. striatus*

SDS-PAGE của lectin tinh chế từ rong đỏ *K. striatus*. SDS-PAGE được bằng gel polyacrylamide 10%. Các dải protein được nhuộm bằng thuốc thử Coomassie Brilliant blue R-250. Lane1: hỗn hợp protein tham chiếu; Lane 2: dịch lectin kết tủa ethanol 80%; Lane 3: dịch lectin thu được từ quá trình sắc ký lọc gel sắc ký lọc gel.

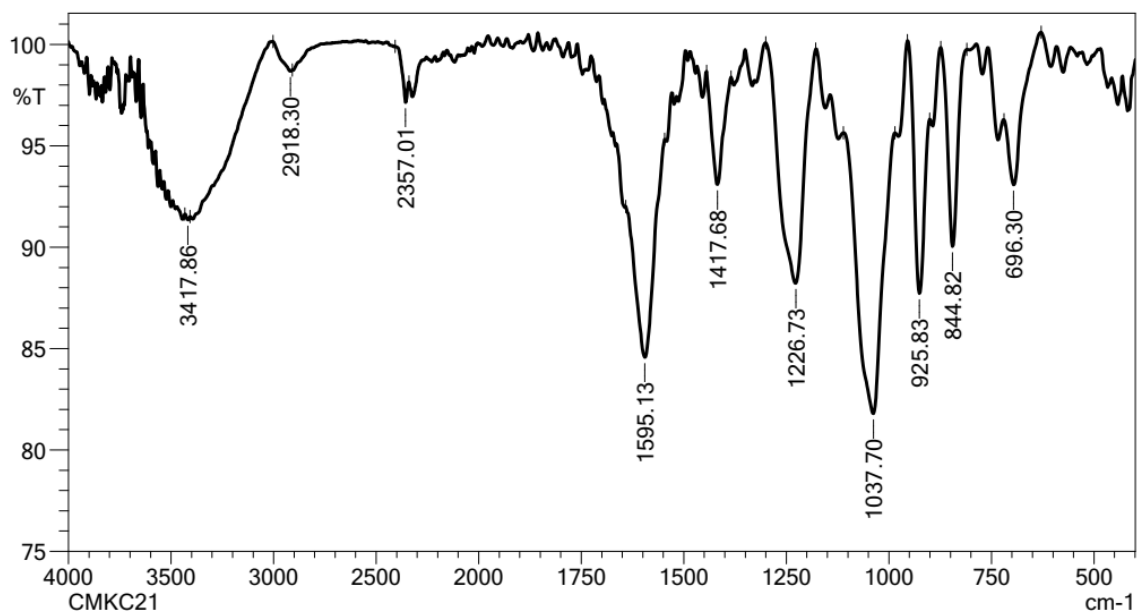




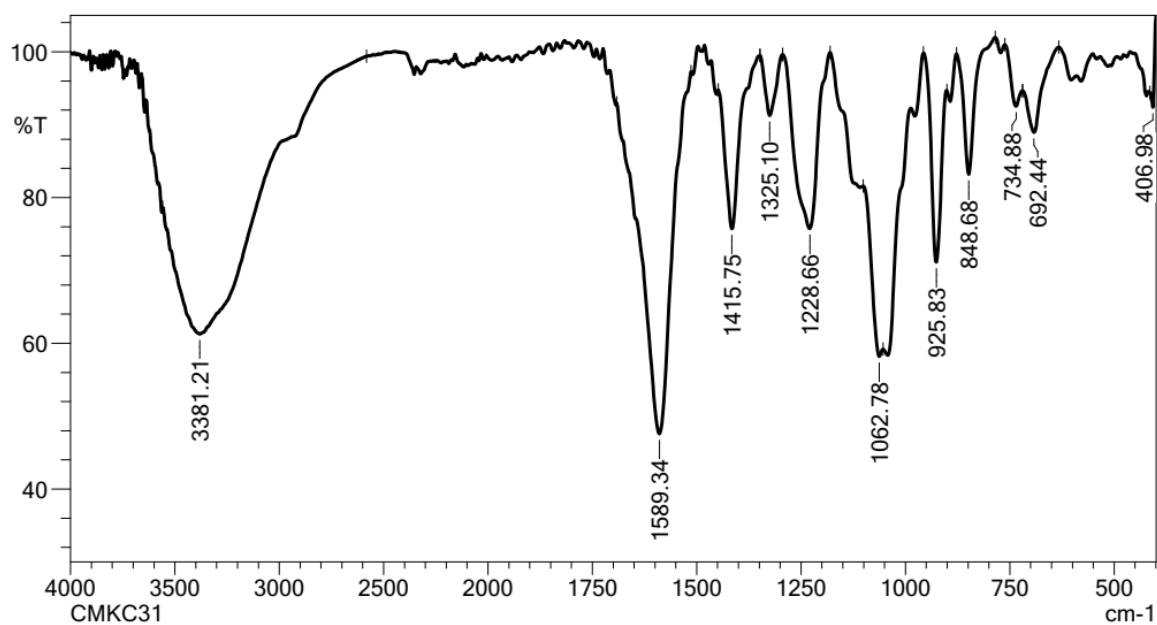
Phụ lục 6. Phổ FT- IR của KC-0/1



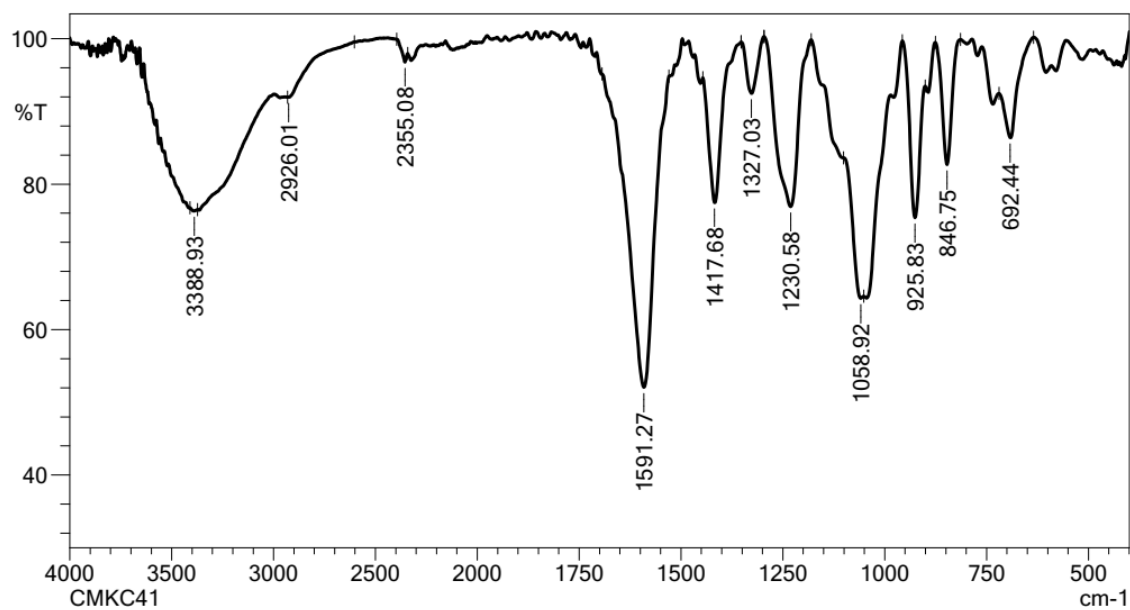
Phụ lục 7. Phổ FT- IR của CMKC-1/1



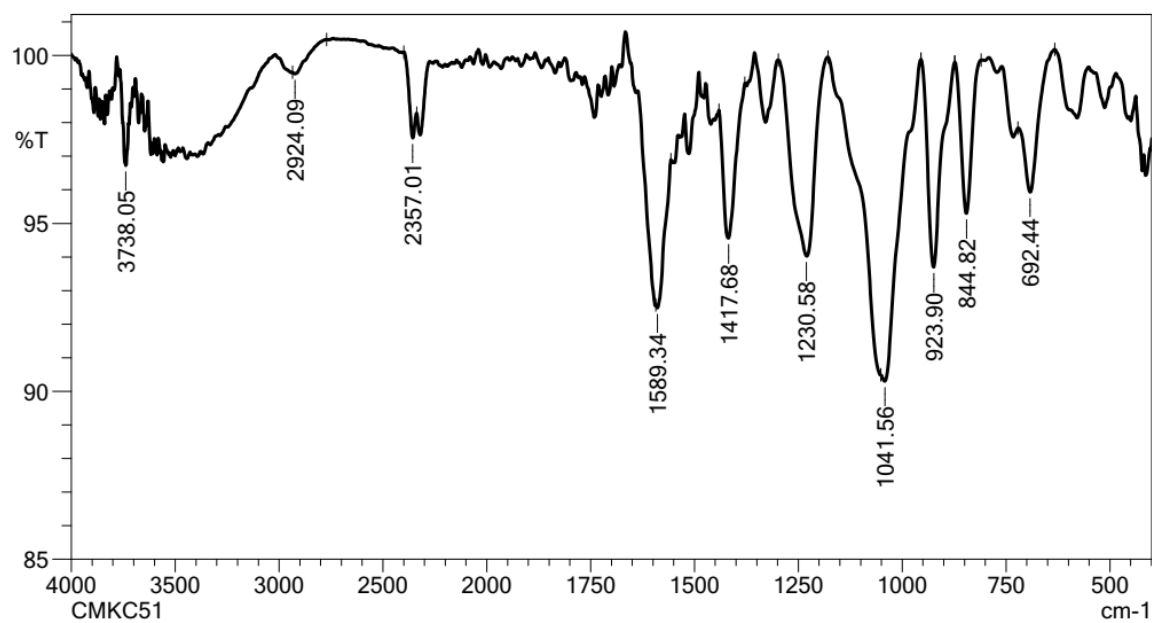
Phụ lục 8. Phổ FT- IR của CMKC-2/1



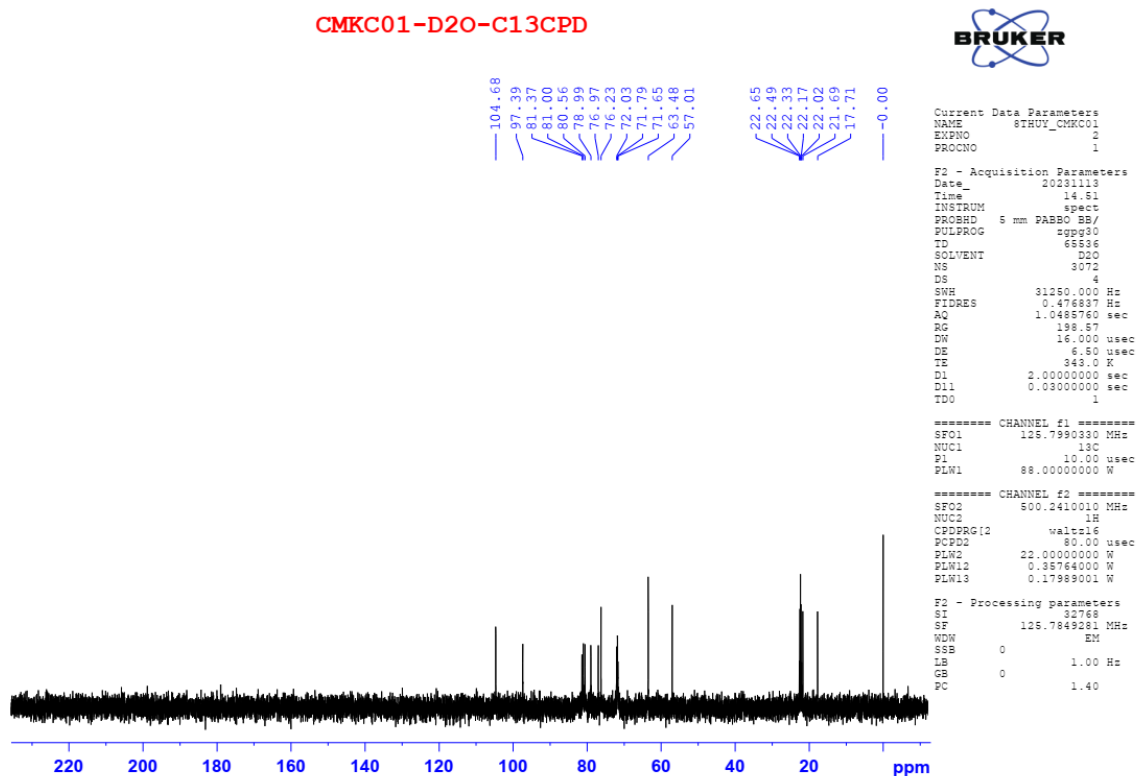
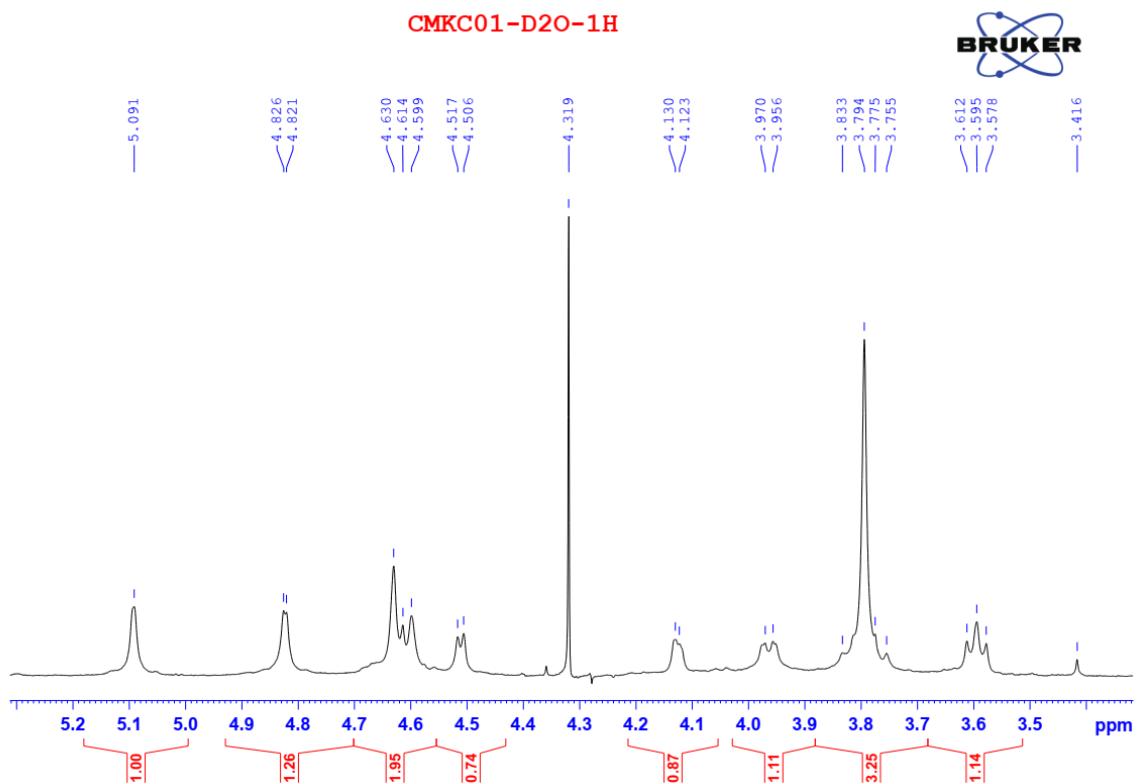
Phụ lục 9. Phổ FT- IR của CMKC-3/1



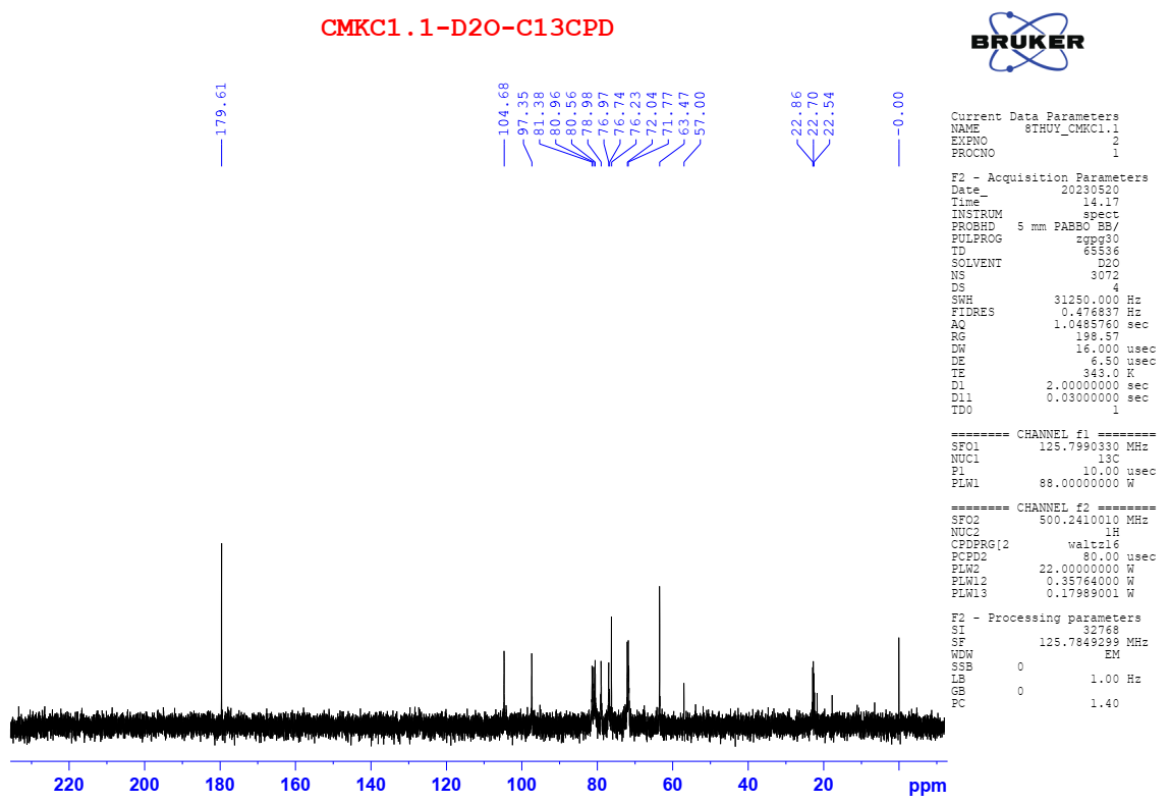
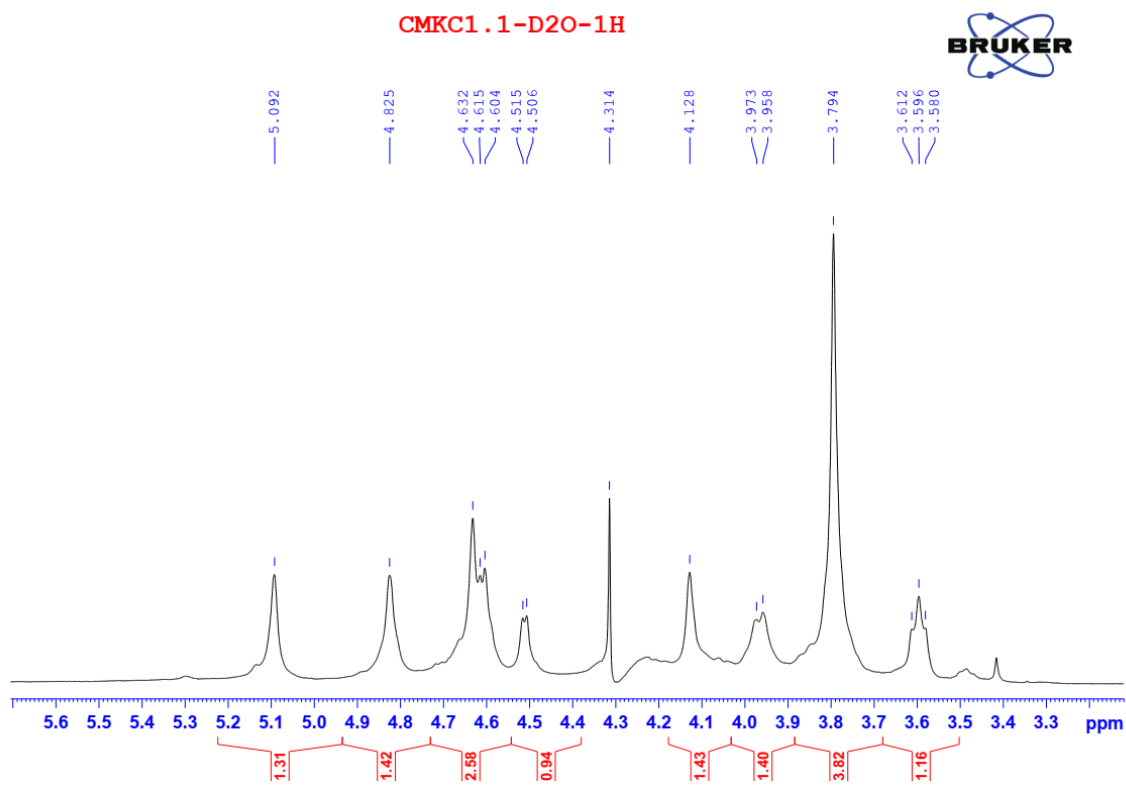
Phụ lục 10. Phổ FT- IR của CMKC-4/1



Phụ lục 11. Phổ FT- IR của CMKC-5/1

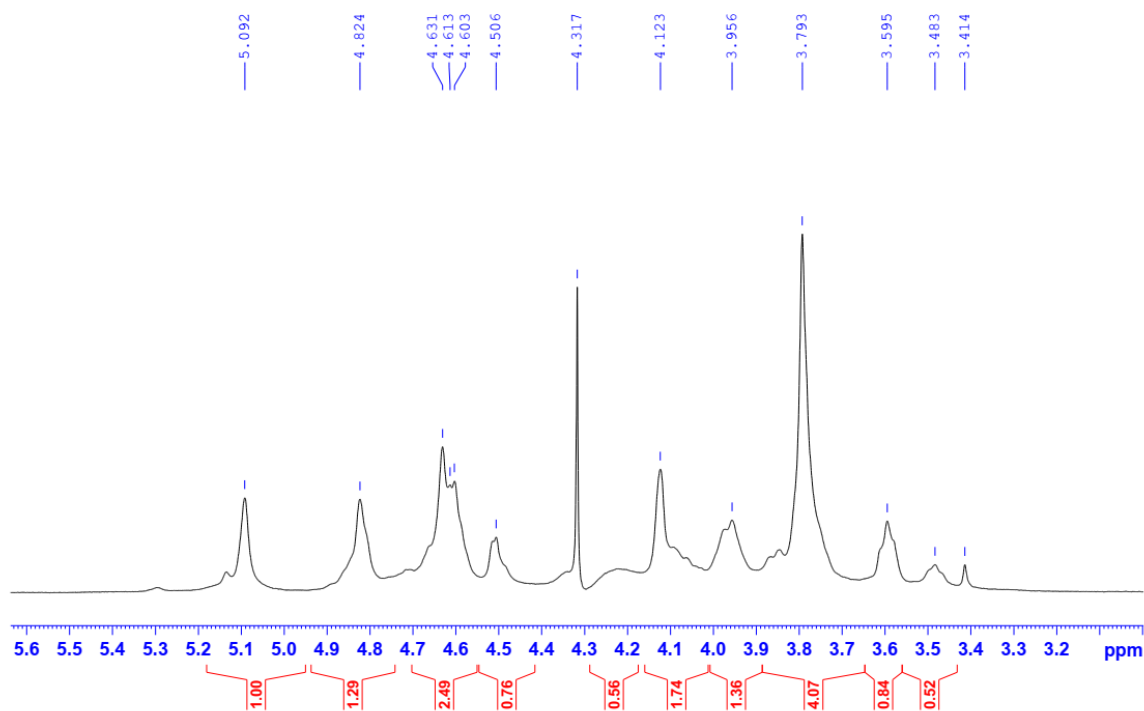


Phụ lục 12. Phổ NMR ^1H và ^{13}C của KC-0/1.

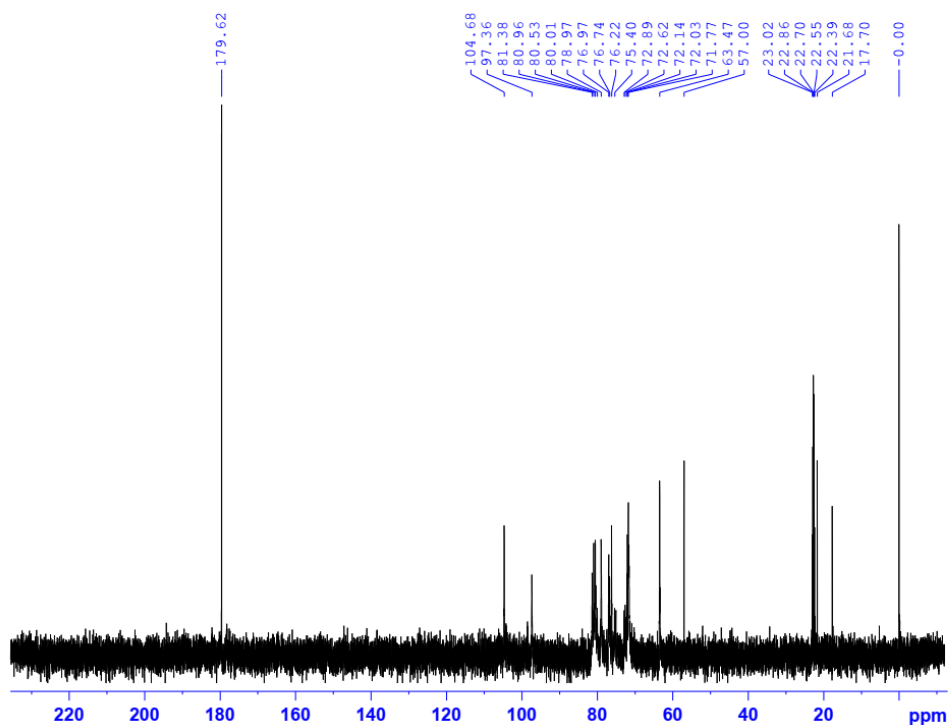


Phụ lục 13. Phổ NMR ^1H và ^{13}C của CMKC-1/1.

623CMKC21-D2O-1H



623CMKC21-D2O-C13CPD



Current Data Parameters
NAME 623CMKC21
EXPNO 2
PROCNO 1

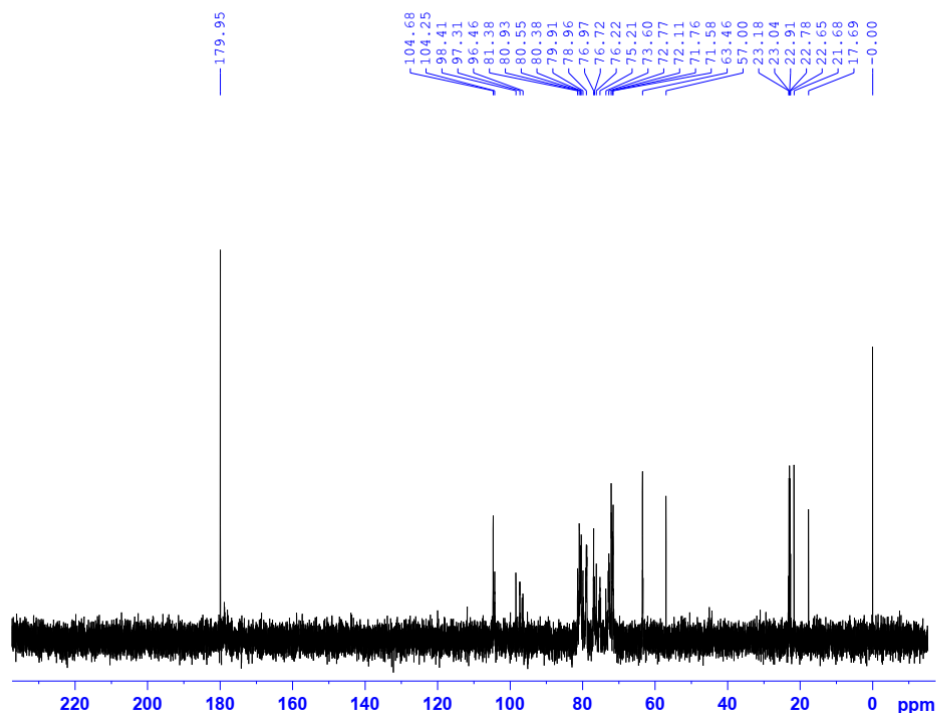
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20230624
Time 21.29
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB/
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 6144
DS 4
SWH 31250.000 Hz
FIDRES 0.476837 Hz
AQ 1.0485760 sec
RG 198.57
DM 16.000 usec
DE 6.50 usec
TE 343.0 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1 125.7990330 MHz
NUC1 13C
P1 10.00 usec
PLW1 88.00000000 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2 500.2410010 MHz
NUC2 1H
CPDPRG2 waltz16
PCPD2 80.00 usec
PLW2 22.00000000 W
PLW12 0.35764000 W
PLW13 0.17989001 W

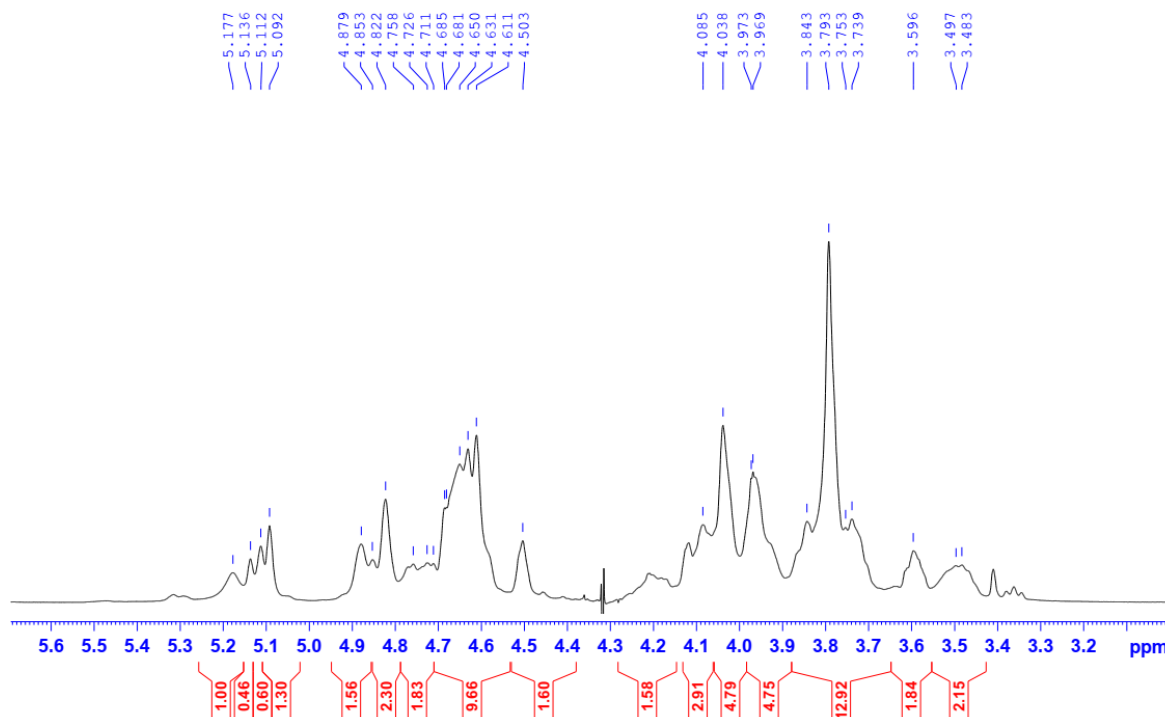
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 125.7849298 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Phụ lục 14. Phổ NMR ^1H và ^{13}C của CMKC-2/1.

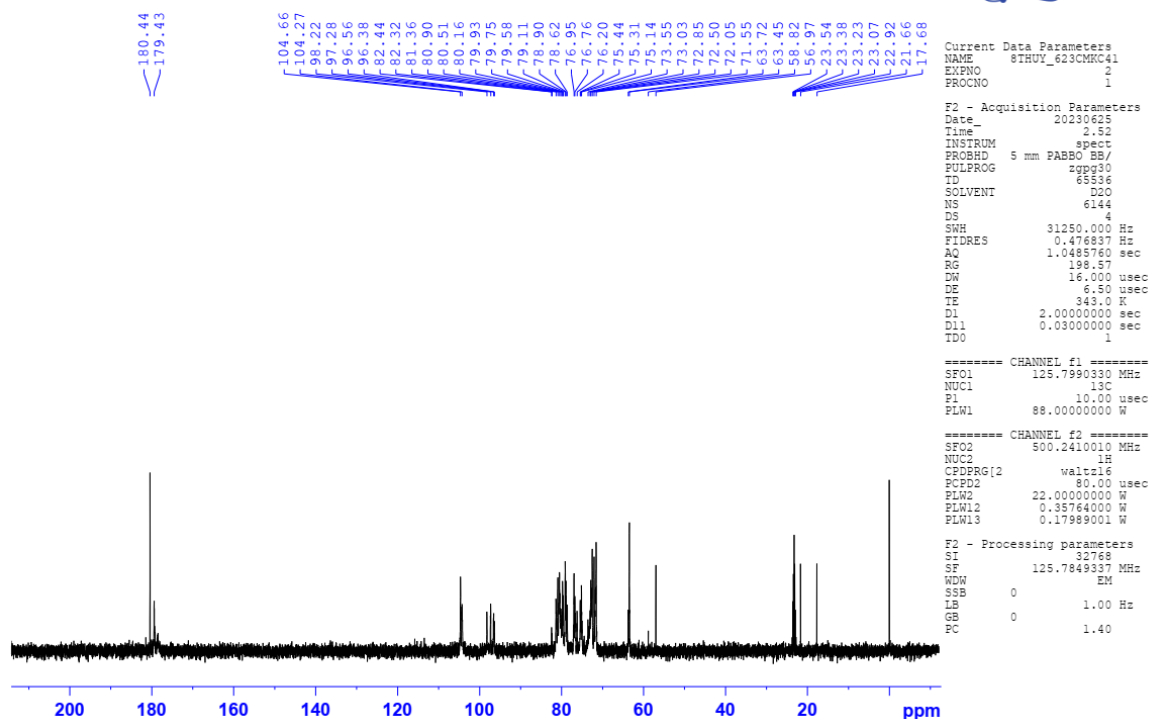


Phụ lục 15. Phổ NMR ^1H và ^{13}C của CMKC-3/1.

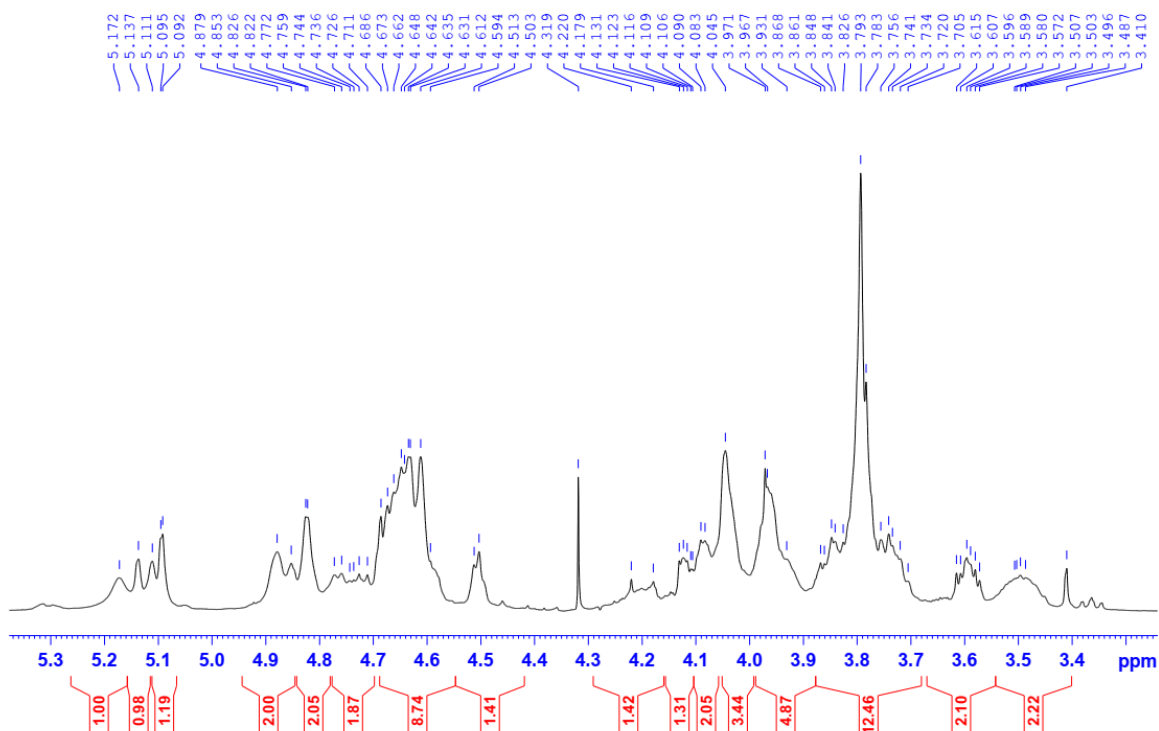
623CMKC41-D2O-1H



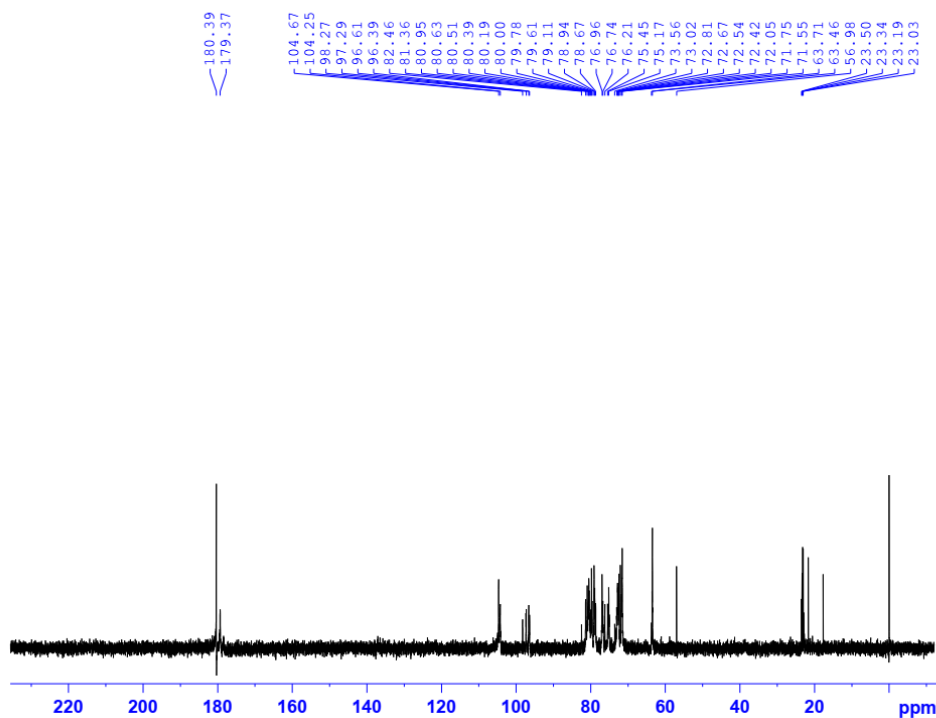
623CMKC41-D2O-C13CPD

Phụ lục 16. Phổ NMR ^1H và ^{13}C của CMKC-4/1.

623CMKC51-D2O-1H



623CMKC51-D2O-C13CPD



Current Data Parameters
 NAME 8THUP_623CMKC51
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20230625
 Time 8.15
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PABBO BB/
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT D2O
 NS 6144
 DS 4
 SNH 31250.000 Hz
 FIDRES 0.476837 Hz
 AQ 1.0485760 sec
 RG 198.57
 DW 16.000 usec
 DE 6.50 usec
 TE 343.0 K
 D1 2.00000000 sec
 D11 0.03000000 sec
 TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
 SFO1 125.7990330 MHz
 NUC1 13C
 P1 10.00 usec
 PLW1 88.00000000 W

===== CHANNEL f2 =====
 SFO2 500.2410010 MHz
 NUC2 1H
 CPDPRG2 waitc16
 PCPD2 80.00 usec
 PLW2 22.00000000 W
 PLW12 0.35764000 W
 PLW13 0.17989001 W

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 125.7849327 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

Phụ lục 17. Phổ NMR ^1H và ^{13}C của CMKC-5/1.

Phụ lục 18. Nồng độ ngưng kết hồng cầu thấp nhất (LHC) (mg/ mL) của KC-0/1 và carboxymethyl-kappa-carrageenan (CMKC-1/1 đến CMKC-5/1) trên hồng cầu thỏ.

Mẫu	LHC (mg/ mL)
KC-0/1	0.625
CMKC-1/1	0.315
CMKC-2/1	0.315
CMKC-3/1	0.078
CMKC-4/1	0.078
CMKC-5/1	0.078

LHC (Lowest hemagglutination concentration): nồng độ nhỏ nhất gây NKHC.

Phụ lục 19. Hoạt tính ngưng kết hồng cầu của hỗn hợp CMKC-3/1-lectin với nồng độ CMKC-3/1 (2,0 ÷ 4,0%).

CMKC-3/1-	2,0%	2,5%	3,0%	3,5%	4,0%
HA (HU/mL)	256	256	512	512	512
LHC lectin (µg/mL)	7,81	7,81	3,91	3,91	3,91

LHC (Lowest hemagglutination concentration): nồng độ nhỏ nhất gây NKHC.