

# NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH TRÍCH LY LECTIN TỪ RONG *CERATOPHYLLUM DEMERSUM*

● NGUYỄN NGỌC ĐỨC - PHẠM THỊ CẨM HOA - HOÀNG THỊ NGỌC NHƠN

## TÓM TẮT:

Nghiên cứu được thực hiện để khảo sát quá trình trích ly lectin từ rong *Ceratophyllum demersum*. Các tính chất như điều kiện của dung môi, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (NL/DM) và thời gian trích ly là các yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình trích ly được khảo sát để lựa chọn và phân tích. Nghiên cứu tiến hành khảo sát các điều kiện bao gồm loại dung môi (dung dịch đệm PBS, ethanol, dung dịch NaCl, dung dịch NaOH), tỷ lệ NL/DM (1/5, 1/10, 1/15, 1/20, 1/25, w/v), và thời gian trích ly (2, 4, 6, 8, 10 giờ). Hiệu quả của quá trình trích ly được đánh giá bởi hàm lượng protein tổng số, xác định thông qua đường chuẩn BSA bằng phương pháp quang phổ UV-Vis, cùng hoạt độ ngưng kết hồng cầu. Nhìn chung, các yếu tố này đều ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả trích ly, kết quả nghiên cứu thu được tốt nhất cho quá trình trích ly là dung môi NaOH, tỷ lệ NL/DM 1/10 (w/v) trong thời gian 6 giờ.

Từ khóa: lectin, *Ceratophyllum demersum*, trích ly.

## 1. Đặt vấn đề

*Ceratophyllaceae* là một họ thực vật phổ biến khắp nơi trên thế giới, được tìm thấy nhiều trong các ao, hồ, đầm lầy cũng như các dòng suối tại khu vực nhiệt đới và ôn đới. Nghiên cứu cho thấy trong dịch chiết *C. demersum*, tồn tại nhiều chất mang hoạt tính sinh học như: flavanoids, coumarin glycosides, steroids, terpenoids, đường, tannin, acid amin và một số các protein khác [1]. Ở nước ta, trữ lượng loại rong này rất lớn và mọc hoang dại trong các ao hồ nước lợ ở các vùng Đồng bằng sông Cửu Long, nhưng lại ít được khai

thác các hoạt chất sinh học phục vụ cho nhu cầu của con người.

Lectin là protein chứa ít nhất một trung tâm hoạt động, có khả năng tương tác đặc hiệu với mono, oligo-saccharide nằm trên bề mặt tế bào mà không làm thay đổi cấu trúc carbohydrate được liên kết [2]. Về ứng dụng của lectin, chúng được báo cáo rất tích cực như một công cụ tiện lợi trong lĩnh vực y tế bởi vì có thể phân biệt sự khác biệt trong cấu trúc carbohydrate và cho thấy các hoạt động sinh học khác nhau thông qua liên kết với carbohydrate và phát hiện đặc hiệu nhóm máu

người [3-5]. Bên cạnh đó, chúng cũng được sử dụng như một tác nhân kháng lại một số loài vi khuẩn [6]. Ngoài ra, lectin còn được biết đến với khả năng làm chết tế bào ung thư [7]. Tại Việt Nam, lectin gần đây đang được nghiên cứu nhiều hơn trên các loại rong biển nhằm tìm nguồn lợi khai thác tốt cho hoạt chất sinh học này [8]. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích nghiên cứu điều kiện thu nhận lectin từ rong *C. demersum*.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu

#### 2.1.1. Nguyên liệu

Rong *C. demersum* được thu nhận ở các ao nuôi tôm quảng canh ở xã Gia Thuận, huyện Gò Công Đông, tỉnh Tiền Giang. Rong được vận chuyển trong ngày đến phòng thí nghiệm. Sau đó rong được xử lý để loại bỏ tạp chất và sấy đến độ ẩm dưới 10%, xay mịn để thực hiện khảo sát trích ly ngay hoặc cho vào túi PE và cấp đông bảo quản ở  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.1.2. Hóa chất

Chất chuẩn BSA 96%, Folin 99% (Merck). Các hóa chất khác đạt yêu cầu kỹ dùng trong phân tích.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình trích ly

Cân chính xác 1g nguyên liệu đã xử lý (tính theo % khối lượng chất khô), thực hiện ngâm tĩnh trong các dung môi (đệm PBS, ethanol, dung dịch NaCl, dung dịch NaOH) ở các tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (NL/DM) (1/5, 1/10, 1/15 1/20, 1/25 (w/v)) trong thời gian lần lượt là (2, 4, 6, 8, 10) giờ ở nhiệt độ thấp. Hỗn hợp thí nghiệm được lọc sau đó tiến hành xác định hàm lượng protein tổng bằng phương pháp quang phổ UV - Vis và hoạt độ ngưng kết hồng cầu. Từ đó lựa chọn được điều kiện thích hợp cho quá trình trích ly lectin.

#### 2.2.2. Phương pháp phân tích

Xác định hàm lượng lectin bằng phương pháp quang phổ. Đường chuẩn BSA được thiết lập dựa theo phương pháp của Lowry và cộng sự với một số điều chỉnh phù hợp, cụ thể [9]:

Lấy chính xác 0,5 mL dịch gốc BSA (20, 40, 60, 80, 100, 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) cho vào ống nghiệm, thêm vào đó 2,5 mL dung dịch C (dung dịch có được từ dung dịch A có NaOH và  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , hòa vào dung dịch B có  $\text{CuSO}_4$  với tỷ lệ A:B là 49:1), 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 xác định độ hấp thu của mẫu tại bước sóng 750 nm. Thực hiện thí nghiệm 3 lần, lấy giá trị trung bình, xây dựng phương trình hồi quy. Mẫu thí nghiệm cũng được chuẩn bị tương tự như đã nêu trên. Sau đó, đo độ hấp thu ở bước sóng 750 nm, đối chiếu với đồ thị chuẩn BSA để tính hàm lượng protein tổng trong các mẫu.

Hoạt độ ngưng kết hồng cầu được thực hiện dựa trên phương pháp của Hung Le Dinh và cộng sự có hiệu chỉnh cho phù hợp, cụ thể là [8]:

#### 2.2.2.1. Chuẩn bị

Huyền phù hồng cầu máu 2%: Mẫu hồng cầu sau khi đã tách huyết tương (hồng cầu lắng) được mang đi rửa 4 lần bằng đệm PBS 10mM, pH = 7,2 có NaCl 0,15M. Sau đó, được xử lý enzyme trypsin 0,5% (w/v) với tỷ lệ so với mẫu là 1/10 (v/v), trộn đều và được ủ ở  $37^{\circ}\text{C}$  trong 60 phút. Sau khi ủ, hồng cầu các mẫu máu được rửa 4 lần với dung dịch đệm PBS 10mM, pH = 7,2 có NaCl 0,15M và hòa lại bằng đệm PBS 10mM có chứa NaCl 0,15M, pH = 7,2, thu được huyền phù hồng cầu 2% đã xử lý enzyme.

#### 2.2.2.2. Phân tích hoạt tính lectin bằng phương pháp ngưng kết hồng cầu

Đầu tiên, cho 25  $\mu\text{L}$  dung dịch đệm PBS 10 mM có chứa NaCl 0,15M, pH = 7,2 vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng đáy chữ V. Tiếp đến cho 25  $\mu\text{L}$  mẫu dịch chiết lectin cần phân tích hoạt tính ngưng kết hồng cầu vào giếng đầu tiên, trộn đều, pha loãng sang các giếng tiếp theo với tỷ lệ pha loãng là  $1/2^n$  (n: số lần pha loãng) và giữ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau đó, tiếp tục thêm 25  $\mu\text{L}$  hồng cầu 2% đã xử lý vào tất cả các giếng, lắc nhẹ nhàng hỗn hợp và giữ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Kết quả thử nghiệm là âm tính khi tất cả

hồng cầu lắng xuống đáy giếng thành chấm nhỏ. Kết quả dương tính khi không có chấm đỏ nhỏ ở dưới đáy.

Hoạt tính của lectin (HU/mL) được thể hiện như là một tiêu chuẩn và là giá trị nghịch đảo của độ pha loãng lớn nhất mà dịch chiết lectin còn có khả năng làm ngưng kết hồng cầu cho vào phản ứng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Hoạt tính lectin được xác định theo 2 chỉ số:

Hoạt tính tổng ( $U_{tổng}$ ): là tổng số đơn vị hoạt tính có trong một thể tích nhất định (HU).

$$U_{tổng} = V \cdot 2^n$$

Trong đó:

V: tổng thể tích (mL);

n: số lần pha loãng

Hoạt tính riêng ( $U_{riêng}$ ): là số đơn vị hoạt tính lectin có trong 1mg protein (HU/mg).

$$U_{riêng} = \frac{U_{tổng}}{Protein_{tổng}}$$

Trong đó:

$U_{tổng}$ : tổng số đơn vị hoạt tính;

$Protein_{tổng}$ : tổng hàm lượng protein.

### 2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, kết quả được trình bày trung bình  $\pm$  SD. Sử dụng phần mềm IBM SPSS Statistics 20.0 để phân tích thống kê số liệu thí nghiệm và đánh giá sự khác biệt giữa các mẫu ( $p < 0,05$ ). Biểu đồ được vẽ bằng phần mềm Microsoft Excel 2016.

## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Khảo sát dung môi trích ly

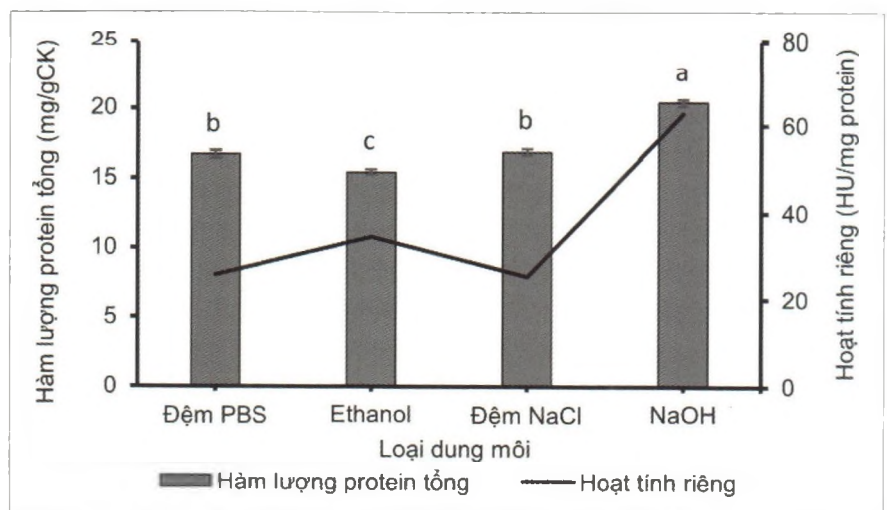
Những yếu tố ảnh hưởng thuận lợi cho quá trình trích ly là những yếu tố làm tăng khả năng khuếch tán của hợp chất cần thu nhận vào dung môi. Ở thí nghiệm này khảo

sát các loại dung môi dựa trên tính tan của protein, tan trong các loại dung môi: dung dịch đệm, dung dịch muối loãng, dung dịch kiềm loãng và dung dịch cồn loãng (ethanol 20%). Kết quả khảo sát (Hình 1) cho thấy, có sự khác biệt có nghĩa về hàm lượng protein tổng số giữa các loại dung môi trích ly. Dung môi NaOH cho hàm lượng protein tổng (20,420  $\pm$  0,396 mg/gCK) và hoạt tính riêng cao nhất (62,699 HU/mg protein) và hàm lượng thấp nhất là ethanol (15,443  $\pm$  0,308 mg/g). Tuy nhiên, kết quả kiểm định ANOVA cho thấy, có sự khác biệt không có nghĩa về hàm lượng và hoạt tính riêng giữa các loại dung môi còn lại, nhưng lại có sự khác biệt có nghĩa giữa các loại dung môi đó với NaOH ( $p < 0,05$ ). Từ đó, chọn dung môi là NaOH cho các khảo sát tiếp theo. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Bạch Ngọc Minh và cộng sự về tác nhân trích ly phù hợp đối với nguyên liệu rong lục là dung dịch kiềm loãng NaOH [10].

### 3.2. Khảo sát tỷ lệ NL/DM trích ly

Tỷ lệ NL/DM cũng là một yếu tố ảnh hưởng nhiều đến quá trình trích ly các chất mang hoạt tính sinh học. Việc tìm ra được một tỷ lệ phù hợp giữa dung môi và nguyên liệu sẽ làm tăng hiệu quả trích ly thông qua lượng chất hòa tan thu được

Hình 1. Ảnh hưởng của dung môi đến hàm lượng protein tổng và hoạt tính riêng của lectin



Ghi chú: Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có nghĩa về mặt thống kê ở  $p < 0,05$ . Chú thích này dùng cho tất cả các biểu đồ.

cao và xét cả hiệu quả về kinh tế. (Hình 2)

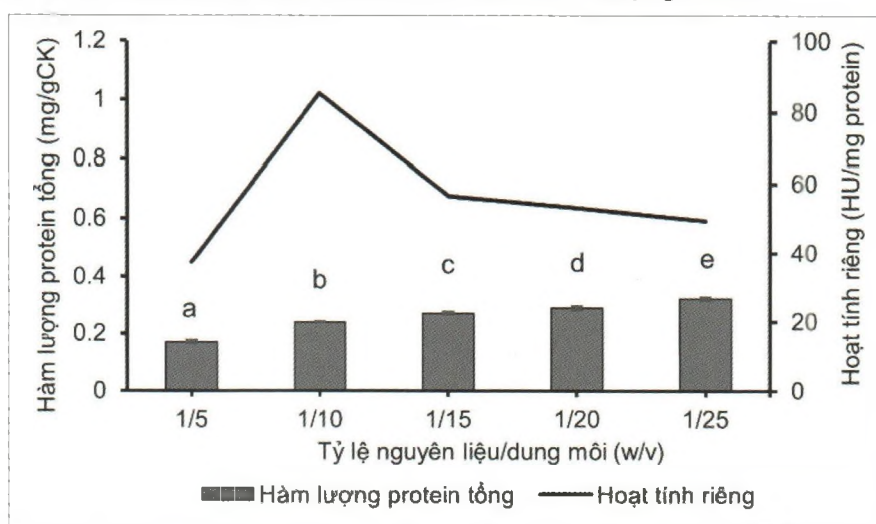
Động lực của quá trình trích ly bằng dung môi là sự chênh lệch gradient nồng độ chất mang hoạt tính sinh học cần thu nhận trong tế bào và ngoài dung môi. Sự chênh lệch nồng độ càng lớn, dẫn đến hàm lượng chất cần thu nhận cũng như tốc độ khuếch tán qua dung môi càng tăng [11]. Từ đó, cho phép quá trình trích ly diễn ra hiệu quả và nhanh chóng. Tuy nhiên, khi đạt đến trạng thái cân bằng, hàm lượng chất tan không có sự thay đổi đáng kể khi tăng lượng dung môi, sẽ làm giảm hiệu quả kinh tế. Kết quả cho thấy, sự tăng dần và khác biệt có nghĩa về hàm lượng protein tổng giữa các tỷ lệ NL/DM với giá trị thấp nhất ở tỷ lệ 1/5 ( $14,174 \pm 0,566$  mg/gCK) và giá trị cao nhất ở tỷ lệ 1/25 ( $26,767 \pm 0,836$  mg/gCK). Tuy nhiên, xét về

hoạt tính riêng thì tỷ lệ 1/10 cho hoạt tính riêng cao nhất (85,223 HU/mg protein). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Võ Văn Song Toàn và cộng sự [12]. Còn ở các tỷ lệ thể tích lớn hơn 1/10 thì hoạt tính ngưng kết hồng cầu có sự khác biệt không có nghĩa với nhau, nhưng do hàm lượng protein không có hoạt tính ngưng kết cũng được trích ly ra ngoài, dẫn đến tăng lên nên gây ra sự giảm hoạt tính riêng của dịch trích ly. Từ đó, chọn tỷ lệ NL/DM là 1/10 cho các khảo sát tiếp theo.

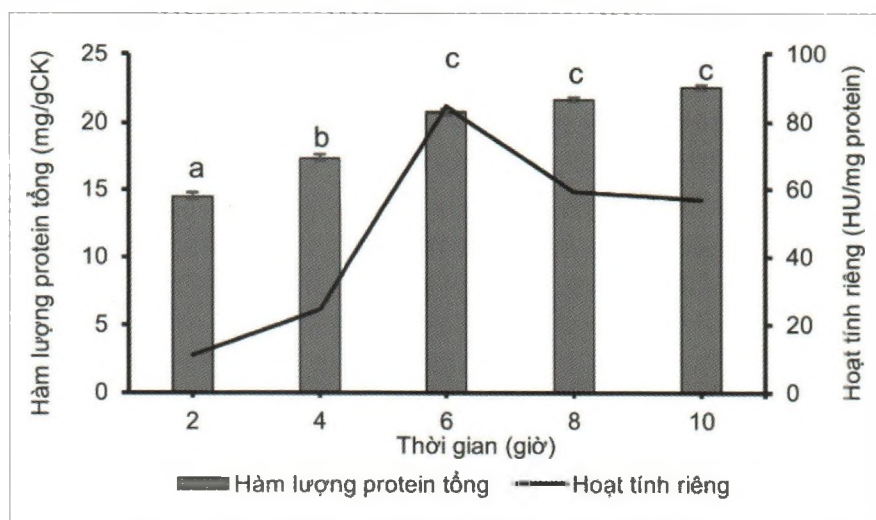
### 3.3. Khảo sát thời gian trích ly

Thời gian là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly, là một yếu tố cần thiết để có

Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ NL/DM đến hàm lượng lectin



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian đến trích ly lectin



thể xác định được khoảng thời gian ít nhất để có thể thu được hàm lượng chất tan nhiều nhất để mang lại hiệu quả kinh tế [13]. (Hình 3)

Kết quả cho thấy, thời gian tăng lên thì hàm lượng protein tổng số cũng tăng theo và khác biệt có nghĩa ở các mức 2, 4, 6 giờ. Nhưng nếu tiếp tục ở khoảng thời gian 8 giờ và 10 giờ thì hàm lượng protein tổng số không có sự khác biệt có nghĩa với khoảng thời gian 6 giờ. Tại khoảng thời gian 6 giờ tuy không cho hàm lượng protein tổng cao nhất nhưng cho hoạt tính riêng cao nhất (84,625 HU/mg protein). Từ đó, chọn thời gian trích ly là 6 giờ. Nếu thời gian trích ly chưa đủ dài, chất tan mong

muối chưa hòa tan hết vào dung môi, nhưng khoảng thời gian quá dài, quá thời điểm cân bằng nồng độ bên trong nguyên liệu và ngoài dung môi, sẽ ảnh hưởng thu nhận hoạt chất sinh học và kém hiệu quả kinh tế [13].

#### **4. Kết luận**

Nghiên cứu đã chứng minh NaOH 0,1N là dung môi phù hợp để trích ly lectin từ rong *C. demersum*. Các điều kiện trích ly thích hợp cho trích ly thông qua hàm lượng protein tổng (mg/g

chất khô nguyên liệu) và khả năng ngưng kết hồng cầu. Kết quả nghiên cứu thu được dung môi trích ly là NaOH, tỷ lệ NL/DM là 1/10 (w/v) với thời gian trích ly 6 giờ. Với những điều kiện này, hàm lượng protein tổng thu được là  $20,721 \pm 0,358$  mg/gCK với hoạt tính riêng là 84,625 HU/mg protein. Hàm lượng và hoạt tính riêng này cao hơn so với một số nghiên cứu trước đây từ các loài rong lục. Do vậy, cần nghiên cứu sâu hơn để thu nhận và ứng dụng được lectin từ nguyên liệu này ■

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO:**

1. I. Syed, H. Fatima, A. Mohammed, and M. A. Siddiqui. (2018). *Ceratophyllum demersum* a free-floating aquatic plant: A Review. *Indian Journal of Pharmaceutical Biological Research*, 6(2), 10-17.
2. H. Rüdiger and H.-J. J.G. Gabius. (2001). Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate Journal*, 18(8), 589-613.
3. W.C. Boyd and E. Shapleigh. (1954). Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, 119(3091), 419-419.
4. I. Goldstein and R.D. Poretz. (2012). Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate - binding specificity of lectins. *The lectins*, 233-247.
5. I. Liener (2012). *The lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine*. Elsevier: Holland.
6. M. Oliveira, C. Andrade, N. Santos, Magalhães et al. (2008). Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. *Letters in applied microbiology*, 46(3), 371-376.
7. Z. Shi, R. Sun, T. Yu et al. (2016). Identification of novel pathways in plant lectin-induced cancer cell apoptosis. *International journal of molecular sciences*, 17(2), 228.
8. H.L. Dinh, K. Hori, and N.H. Quang. (2009). Screening and preliminary characterization of hemagglutinins in Vietnamese marine algae. *Journal of applied phycology*, 21(1), 89-97.
9. O. H. Lowry. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
10. B.N. Minh, H.H. My, H.K. Anh, and N.K. Suong. (2019). Optimization of protein extraction from green algae *Chaetomorpha* sp. by response surface methodology. *Science Technology Development Journal Natural Sciences*, 3(3), 136-143.
11. J. Cacace and G. Mazza (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59(4), 379-389.
12. V.V.S. Toàn, T.K. Nguyễn, K.T.T. Xương, N.T.B. Trân, N.H. Thịnh, and T.V. Hà (2021). Khảo sát điều kiện trích ly và tinh sạch lectin từ đậu ma (*Pueraria phaseoloides*) bằng sắc ký ái lực. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 57(6), 151-159.
13. T.T.T. Linh và N.M. Thủy (2014). Ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình trích ly các hoạt chất sinh học từ cây thuốc dòi (*Pouzolzia zeylanica* L. Benn). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 1, 68-75.

Ngày nhận bài: 25/4/2022

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 19/5/2022

Ngày chấp nhận đăng bài: 11/6/2022

Thông tin tác giả:

1. NGUYỄN NGỌC ĐỨC<sup>1</sup>

2. PHẠM THỊ CẨM HOA<sup>1</sup>

3. HOÀNG THỊ NGỌC NHƠN<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh

\*Email: nhonhtn@fst.edu.vn

## A STUDY ON THE EXTRACTION OF LECTIN FROM *CERATOPHYLLUM DEMERSUM*

- NGUYEN NGOC DUC<sup>1</sup>
- PHAM THI CAM HOA<sup>1</sup>
- HOANG THI NGOC NHON<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Ho Chi Minh City University of Food Industry

### ABSTRACT:

The study was carried out to extract lectin from *Ceratophyllum demersum* algae. Solvent conditions, material/solvent ratio and extraction time are factors that directly affect the extraction process, which are investigated for selection and analysis. The study investigated the conditions including solvent type (PBS buffer, ethanol, NaCl, NaOH solution), solvent material ratio (1/5, 1/10, 1/15, 1/20, 1/25, w/v), and extraction time (2, 4, 6, 8, 10 hours). The efficiency of the extraction process was evaluated by the total protein content, determined through the BSA standard curve by UV-Vis spectroscopy, and the erythrocyte agglutination activity. In general, these factors all significantly affect the extraction efficiency, the best results obtained for the extraction process are NaOH solvent, the materials/solvent ratio 1/10 (w/v) in 6 hours.

**Keywords:** lectin, *Ceratophyllum demersum*, extraction.