

NGHIÊN CỨU BIẾN TÍNH POLYSACCHARIDE TỪ RONG *Ceratophyllum submersum* BẰNG PHƯƠNG PHÁP CARBOXYMETHYL HÓA

Trịnh Thị Bích Huyền, Trần Khánh Linh, Nguyễn Hoàn Phương Thùy,

Nguyễn Thị Thu Huyền, Hoàng Thị Ngọc Nhơn*

Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

*Email: nhonhtn@huitt.edu.vn

Ngày nhận bài: 01/12/2025; Ngày nhận bài sửa: 18/3/2026; Ngày chấp nhận đăng: 20/3/2026

TÓM TẮT

Polysaccharide là nhóm hợp chất sinh học cao phân tử có nhiều hoạt tính sinh học và được chú ý trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu nhờ tiềm năng ứng dụng như y sinh và dược phẩm. *Ceratophyllum submersum* là loài rong nước ngọt chứa hàm lượng polysaccharide đáng kể. Tuy nhiên, các nghiên cứu về biến tính cấu trúc để cải thiện hoạt tính sinh học của polysaccharide từ loài rong này vẫn còn khá ít. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu tìm ra điều kiện tối ưu cho quá trình biến tính polysaccharide bằng phương pháp carboxymethyl hóa và đánh giá ảnh hưởng của quá trình này đến hoạt tính sinh học. Nội dung khảo sát liên quan đến điều kiện carboxymethyl hóa bao gồm nồng độ acid chloroacetic (MCA), nhiệt độ phản ứng và thời gian phản ứng. Kết quả cho thấy điều kiện tối ưu đạt được tại nồng độ MCA 2,5 M, nhiệt độ 60 °C và thời gian phản ứng 4 giờ, cho mức độ thay thế DS tương ứng là $0,876 \pm 0,032$; $1,134 \pm 0,063$ và $1,313 \pm 0,038$. Đánh giá sự biến đổi cấu trúc bằng phổ FT-IR cho thấy sự xuất hiện của nhóm CH_2COO^- thay thế nhóm OH^- vào mạch carbon. Hoạt tính sinh học được đánh giá thông qua khả năng kháng oxy hóa bằng các phương pháp 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), nitric oxide (NO), khử sắt (III) thành sắt (II) (RP) và khả năng kháng khuẩn. Polysaccharide sau biến tính thể hiện khả năng bắt gốc tự do mạnh hơn với giá trị IC_{50} lần lượt là 181,65 $\mu\text{g/mL}$ (ABTS), 63,79 $\mu\text{g/mL}$ (NO), tính khử sắt thể hiện qua sự tăng độ hấp thụ, sau khi polysaccharide biến tính giá trị độ hấp thụ cao hơn so với khi chưa biến tính, đồng thời có khả năng ức chế *Salmonella* và *Staphylococcus aureus*. Kết quả nghiên cứu cho thấy việc biến tính cấu trúc polysaccharide bằng phương pháp carboxymethyl giúp cải thiện đáng kể hoạt tính sinh học, qua đó khẳng định tiềm năng ứng dụng của polysaccharide từ *Ceratophyllum submersum* trong các lĩnh vực y học, dược phẩm và thực phẩm chức năng.

Từ khóa: Biến tính, carboxymethyl, *Ceratophyllum submersum*, polysaccharide.

1. MỞ ĐẦU

Polysaccharide (PS) tự nhiên là các đại phân tử carbohydrate hiện diện trong cấu trúc tế bào của thực vật, động vật và vi sinh vật, là yếu tố quan trọng tạo nên chức năng sinh học của tế bào [1]. Các hợp chất này được kết nối từ các đơn phân tử monosaccharide thông qua liên kết glycosidic, trong đó các nhóm hydroxyl ($-\text{OH}$) góp phần quyết định đặc điểm cấu trúc cũng như tính chất hóa lý của polysaccharide [2]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng polysaccharide có nguồn gốc từ thực vật và rong biển sở hữu nhiều hoạt tính sinh học đáng chú ý, điển hình là hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng virus, chống đông máu, chống tế bào ung thư, điều hòa miễn dịch, nhờ đó thu hút sự quan tâm trong các lĩnh vực y sinh, dược phẩm và công nghệ thực phẩm [3-5]. Mặc dù có nhiều ưu điểm như độc tính thấp và hoạt tính sinh học đa dạng, polysaccharide tự nhiên vẫn tồn tại một số hạn chế, bao gồm hoạt tính sinh học còn yếu và độ hòa tan trong nước kém của một số polysaccharide, gây cản trở cho việc ứng dụng thực tiễn [6, 7]. Do đó, biến đổi hóa học được xem là một hướng tiếp cận hiệu quả nhằm nâng cao tính chất hóa lý và tăng cường hoạt tính sinh học của polysaccharide. Trong số các phương pháp biến tính, carboxymethyl hóa được quan tâm rộng rãi do khả năng làm tăng độ hòa tan trong nước

thông qua việc đưa nhóm carboxymethyl vào mạch polysaccharide, từ đó cải thiện đáng kể các hoạt tính sinh học như kháng oxy hóa, kháng khuẩn và ức chế tế bào ung thư [8, 9].

Biến tính polysaccharide là thay đổi cấu trúc phân tử của chúng bằng các phương pháp như vật lý, hóa học, enzyme... Trong đó, carboxymethyl hóa được đánh giá là có khả năng tăng cường tính hòa tan trong của polysaccharide bằng việc gắn nhóm carboxyl biến đổi cấu trúc từ đó cải thiện các hoạt tính sinh học chẳng hạn như hoạt tính kháng oxy hóa, ức chế tế bào ung thư, hoạt tính kháng khuẩn như ức chế đối với *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* và *B. subtilis*. Phản ứng carboxymethyl hóa polysaccharide diễn ra trong môi trường kiềm, trong đó sodium hydroxide khử proton của nhóm hydroxyl tạo thành alkoxide ($-O^-Na^+$). Nhóm này sau đó tham gia phản ứng thế nucleophilic (SN_2) với acid chloroacetic theo cơ chế tổng hợp ether Williamson, dẫn đến sự hình thành nhóm carboxymethyl trên mạch polysaccharide [7].

Ceratophyllum submersum (rong đuôi chồn) là loài thực vật thủy sinh phân bố rộng rãi trên thế giới, có sinh khối lớn và tốc độ sinh trưởng nhanh. Tại Việt Nam, loài rong này thường được sử dụng làm thức ăn cho động vật thủy sinh; tuy nhiên, khi phát triển quá mức, nó có thể gây ảnh hưởng tiêu cực đến các sinh vật trong nước. Các nghiên cứu cho thấy *Ceratophyllum* sp. chứa nhiều hợp chất có hoạt tính, trong đó polysaccharide là thành phần chiếm tỷ lệ cao (khoảng 50–76% khối lượng chất khô), cho thấy tiềm năng lớn trong khai thác và ứng dụng [10].

Các polysaccharide thu nhận từ *C. submersum* đã được báo cáo là polysaccharide dị hợp, với thành phần monosaccharide chủ yếu gồm glucose, galactose và mannose, cùng với một lượng nhỏ các monosaccharide trung tính khác [5]. Đặc điểm cấu trúc này tạo nên mật độ lớn các nhóm hydroxyl ($-OH$) trên mạch polysaccharide, đóng vai trò là vị trí phản ứng chính trong các quá trình biến tính hóa học. Do đó, việc khảo sát sự thay đổi cấu trúc và hoạt tính sinh học của polysaccharide sau biến tính cần được đặt trên nền tảng đặc điểm cấu trúc ban đầu của polysaccharide tự nhiên.

Nghiên cứu được thực hiện với mục đích tìm ra các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình carboxymethyl hóa polysaccharide thông qua ba yếu tố gồm nồng độ MCA, nhiệt độ và thời gian phản ứng. Cùng với đó, nghiên cứu cũng tiến hành đánh giá một số hoạt tính sinh học của polysaccharide sau biến tính như kháng oxy hóa và kháng khuẩn, cũng như so sánh sự thay đổi cấu trúc của polysaccharide trước và sau khi biến tính.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Rong *C. submersum* được cung cấp tại khu vực Cần Đước (Long An) và vận chuyển về phòng thí nghiệm trong ngày để xử lý. Mẫu rong được loại bỏ tạp chất như lá cây, ốc và sỏi đá, sau đó rửa nhiều lần bằng nước máy. Rong sau khi làm sạch được sấy trong tủ sấy ở 60 °C đến khi độ ẩm giảm xuống dưới 10%. Mẫu khô được nghiền bằng máy xay cơ học Philips và rây qua rây có kích thước lỗ 80 mesh để thu bột rong đồng nhất. Bột rong sau khi rây được cho vào túi PET (25 × 35 cm) và đặt vào tủ đông ở -20 °C để bảo quản cho đến khi sử dụng.

2.2. Các phương pháp hóa học

2.2.1. Quy trình thu nhận và biến tính polysaccharide từ rong *C. submersum* bằng phương pháp carboxymethyl

Rong sau khi sấy đến độ ẩm dưới 10% được nghiền và rây qua rây có kích thước lỗ 80 mesh. Mẫu sau đó được trích ly bằng nước dưới sự hỗ trợ của vi sóng với công suất 270 W. Dịch chiết thu được sau quá trình trích ly được ly tâm ở 5000 rpm trong 20 phút và lọc qua giấy lọc đường kính Φ110. Dịch lọc tiếp tục được cô quay để loại bỏ dung môi, sau đó tiến hành kết tủa bằng EtOH 96% ở 4 °C. Phần tủa được tinh sạch bằng dung dịch Sevag và ly tâm ở 5000 rpm trong 20 phút. Sau ly tâm, hỗn hợp tách thành ba lớp và lớp trên cùng được thu hồi, đây là phần polysaccharide thô (CP).

Polysaccharide thu được được hòa tan trong hỗn hợp DMSO và NaOH 2 M, khuấy ở 40 °C trong 3 giờ. Sau đó, phản ứng carboxymethyl hóa được tiến hành bằng cách bổ sung acid chloroacetic và khuấy ở 55 °C trong 4 giờ. Hỗn hợp phản ứng được trung hòa bằng dung dịch HCl 2 M, sau đó kết tủa bằng EtOH 96% ở 4 °C trong 12 giờ. Tiến hành ly tâm ở 5000 rpm 20 phút. Phần tủa được thu bằng ly

tâm ở 5000 rpm trong 20 phút, tiếp theo thẩm tách bằng nước cất trong 48 giờ và đông khô để thu chế phẩm carboxymethyl polysaccharide (C-CP) [11].

2.2.2. Khảo sát nồng độ MCA tới mức độ carboxymethyl hóa polysaccharide (DS)

Cân 0,5 g CP (tính theo khối lượng khô) cho vào cốc thủy tinh 100 mL. Thêm 12,5 mL DMSO và 5,0 mL NaOH 2 M vào cốc khuấy đều ở nhiệt độ 40 °C trong 3 giờ. Nồng độ MCA khảo sát lần lượt là 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 M. Khuấy đều hỗn hợp ở 55 °C trong 4 giờ. Sau phản ứng, hỗn hợp được đặt trong bể nước đá ở nhiệt độ thường. Trung hòa hỗn hợp bằng acid HCl 2 M, sau đó rửa hỗn hợp bằng EtOH 96% ở 4 °C trong 12 giờ. Tiến hành ly tâm ở 5000 rpm trong 20 phút. Rửa được thẩm tách bằng nước cất trong 48 giờ và đông khô thu được carboxymethyl polysaccharide (C-CP). Tiến hành xác định mức độ thay thế carboxymethyl (DS) bằng phương pháp chuẩn độ ngược [12].

2.2.3. Khảo sát nhiệt độ phản ứng tới mức độ carboxymethyl hóa polysaccharide (DS)

Cân 0,5 g CP (tính theo khối lượng khô) cho vào cốc thủy tinh 100 mL. Thêm 12,5 mL DMSO và 5,0 mL NaOH 2 M vào cốc khuấy đều ở nhiệt độ 40 °C trong 3 giờ. Nồng độ MCA (kết quả thí nghiệm 1) được thêm vào. Khuấy đều hỗn hợp ở nhiệt độ khảo sát 50, 55, 60, 65, 70 °C trong 4 giờ. Sau phản ứng, hỗn hợp được đặt trong bể nước đá ở nhiệt độ thường. Trung hòa hỗn hợp bằng acid HCl 2 M, sau đó rửa hỗn hợp bằng EtOH 96% ở 4 °C trong 12 giờ. Tiến hành ly tâm ở 5000 rpm trong 20 phút. Rửa được thẩm tách bằng nước cất trong 48 giờ và đông khô thu được carboxymethyl polysaccharide (C-CP). Tiến hành xác định mức độ thay thế carboxymethyl (DS) bằng phương pháp chuẩn độ ngược [12].

2.2.4. Khảo sát thời gian phản ứng tới mức độ carboxymethyl hóa polysaccharide (DS)

Cân 0,5 g CP (tính theo khối lượng khô) cho vào cốc thủy tinh 100 mL. Thêm 12,5 mL DMSO và 5,0 mL NaOH 2 M vào cốc khuấy đều ở nhiệt độ 40 °C trong 3 giờ. Nồng độ MCA được thêm vào theo kết quả ở thí nghiệm 1. Khuấy đều hỗn hợp ở nhiệt độ theo kết quả thí nghiệm 2, thời gian phản ứng khảo sát gồm 1, 2, 3, 4, 5 giờ. Sau phản ứng, hỗn hợp được đặt trong bể nước đá ở nhiệt độ thường. Trung hòa hỗn hợp bằng acid HCl 2 M, sau đó rửa hỗn hợp bằng EtOH 96% ở 4 °C trong 12 giờ. Rửa được thẩm tách bằng nước cất trong 48 giờ và đông khô thu được carboxymethyl polysaccharide (viết tắt là C-CP). Tiến hành xác định mức độ thay thế carboxymethyl (DS) bằng phương pháp chuẩn độ ngược [12].

2.3. Phương pháp phân tích

2.3.1. Xác định mức độ thay thế DS

Nguyên tắc: Mức độ thay thế DS là số lượng trung bình nhóm carboxymethyl liên kết với một đơn vị anhydroglucose [13]. Đánh giá mức độ thay thế DS thông qua việc xác định hàm lượng carboxymethyl, biểu thị số gốc liên kết trên một đơn vị monosaccharide. Chuẩn độ ngược là phương pháp được chọn để đánh giá mức độ thay thế DS.

Cách thực hiện: Cho 0,5 g C-PC vào bình Erlen sạch, thêm 100 mL nước cất và 25 mL dung dịch NaOH 0,5 M, sau đó gia nhiệt hỗn hợp đến 98 °C. Sau khi đun nóng, dung dịch được chuẩn độ bằng HCl 0,3 M với phenolphthalein làm chất chỉ thị. Mỗi mẫu được chuẩn độ lặp lại ba lần để đảm bảo độ chính xác [12]. Quy trình tương tự cũng được thực hiện đối với dung dịch NaOH 0,5 M không chứa C-PC để làm mẫu đối chứng. Hàm lượng nhóm carboxymethyl và mức độ thay thế (DS) được xác định dựa trên các công thức tính toán sau:

$$\%CP = \frac{(V_0 - V_N) \times 0,058 \times 100 \times N}{M}$$

$$DS = \frac{162 \times \%CP}{5800 - (57 \times \%CP)}$$

Trong đó, V_0 là thể tích HCl dùng để trung hòa dung dịch NaOH không chứa mẫu, V_N là thể tích HCl chuẩn độ với dung dịch chứa C-PC, N là nồng độ đương lượng của HCl, M là số g C-PC sử dụng (g).

2.3.2. So sánh hoạt tính kháng oxy hóa của polysaccharide sau biến tính

Phương pháp DPPH

Khả năng ức chế gốc tự do DPPH của PS được thực hiện bằng cách sử dụng 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, ở dạng gốc DPPH thể hiện bước sóng cực đại là 517 nm, độ hấp thụ này biến mất khi khử với chất phản gốc [14]. Công thức tính phần trăm ức chế DPPH như sau:

$$\text{Tỷ lệ bất gốc tự do DPPH (\%)} = \frac{1 - (A_{\text{mẫu}} - A_{\text{mẫu đối chứng}})}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

Trong đó A là khả năng hấp thụ phổ, A_{blank} là khả năng hấp thụ phổ của nước

Điều chế dung dịch DPPH 0,1 mM bằng cách hòa tan methanol. Cho 2 mL dịch polysaccharide pha loãng (50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g/mL}$) thêm nước cất và 2 mL DPPH vừa chuẩn bị. Lắc kỹ dung dịch vừa thu được và đặt vào không gian tối tại nhiệt độ thường trong 1 giờ. Sau đó, đem đi đo độ hấp thụ tại bước sóng 517 nm [15].

Phương pháp ABTS

Phép thử ABTS cho biết khả năng trung hòa cation ABTS^{+} (2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonic acid)) tại bước sóng 734 nm, độ hấp thụ này giảm khi có mặt của chất chống oxy hóa [16].

ABTS^{+} được chuẩn bị bằng cách hòa tan dung dịch ABTS tinh khiết và $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, ở trong điều kiện phòng thí nghiệm từ 12 đến 16 giờ trong bóng tối, thuốc thử ABTS^{+} được hòa tan với đệm acetate đến độ hấp thụ là $0,70 \pm 0,10$ tại bước sóng 734 nm [17]. 5 mL dịch polysaccharide pha loãng (50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g/mL}$) thêm dung dịch methanol, 1 mL ABTS đã chuẩn bị và 100 μL đệm acetate. Lắc kỹ hỗn hợp trên và đặt trong tối, sau đó đem đi đo ở bước sóng 734 nm. Công thức xác định phần trăm bất gốc tự do ABTS như sau:

$$\text{Tỷ lệ bất gốc tự do ABTS (\%)} = \frac{1 - (A_{\text{mẫu}} - A_{\text{mẫu đối chứng}})}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

Trong đó A là khả năng hấp thụ phổ, A_{blank} là khả năng hấp thụ phổ của nước

Phương pháp RP

Khả năng khử RP của polysaccharide được xác định theo phương pháp của Oyaizu (1986) dựa trên nguyên tắc cho electron của mẫu để khử ion Fe^{3+} trong potassium ferricyanide [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] thành Fe^{2+} , sau đó Fe^{2+} kết hợp với FeCl_3 hình thành phức màu xanh (Prussian blue), có độ hấp thụ cực đại tại bước sóng 700 nm [18].

Chuẩn bị dung dịch polysaccharide với 5 nồng độ (50, 100, 150, 200, 250 ppm) bằng cách hòa tan với DMSO, sau đó, 100 μL mẫu được trộn với 100 μL đệm phosphate (pH 6,6) và 100 μL $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 1%, hỗn hợp được ủ ở 50 °C trong 20 phút. Sau khi ủ, thêm 100 μL acid trichloroacetic (TCA) và đem hỗn hợp ly tâm 3000 rpm trong 10 phút, sau đó hút 100 μL phần dịch nổi trộn với 100 μL nước cất và 100 μL dung dịch FeCl_3 0,1% (w/v), độ hấp thụ được đo tại bước sóng 700 nm, theo đó giá trị hấp thụ cao hơn biểu thị khả năng khử mạnh hơn [19, 20].

Phương pháp NO

Sodium nitroprusside tạo thành nitric oxide (NO) trong dung dịch nước sinh lý, NO tác dụng với oxy tạo thành NO^{2-} [21]. Hàm lượng nitrite được xác định bằng thuốc thử Griess thông qua phản ứng diazot hóa với sulfanilamide và ghép cặp với naphthylethylenediamine tạo thành hợp chất azo màu và đo độ hấp thụ [22].

Pha loãng polysaccharide ở các nồng độ (50, 100, 150, 200, 250 ppm) bằng cách hòa tan methanol. 2 mL sodium nitroprusside 5 mM được pha với đệm phosphate (pH 7,4), 0,5 mL mẫu đã pha loãng được thêm vào sau đó. Hỗn hợp trên được ủ tại nhiệt độ phòng trong 150 phút. Sau đó, thêm 0,5 mL thuốc thử Griess (sulfanilamide 1% trong acid phosphoric 5% với naphthylethylenediamine dichloride 0,1% hòa tan với nước) vào 0,5 mL hỗn hợp đã ủ [23, 24]. Mẫu đối chứng được chuẩn bị tương tự nhưng thay mẫu bằng dung môi. Đường chuẩn nitrite được thiết lập bằng dung dịch chuẩn potassium nitrite [21]. Khả năng bắt gốc NO của mẫu được đánh giá thông qua sự suy giảm lượng nitrite tạo thành so với đối chứng.

$$\text{Tỷ lệ bất gốc tự do NO (\%)} = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

Trong đó: A_{blank} là độ hấp thụ phổ của đối chứng, A_{sample} là độ hấp thụ phổ của mẫu.

2.3.3. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của polysaccharide sau biến tính

Nguyên tắc:

Phương pháp này dựa trên sự khuếch tán của các hợp chất kháng khuẩn trong môi trường thạch và khả năng kìm hãm sự tăng trưởng của vi khuẩn thử nghiệm. Khi các chất kháng khuẩn lan tỏa trong môi trường agar, chúng sẽ tác động lên vi khuẩn được cấy trên bề mặt thạch. Hoạt tính kháng khuẩn của mẫu thể hiện thông qua đường kính vòng vô khuẩn tại vùng ức chế sự phát triển của khuẩn hình thành quanh vị trí đặt mẫu.

Các bước tiến hành:

Khả năng ức chế khuẩn được thực hiện dựa trên phương pháp khuếch tán trên đĩa theo Bauer và cộng sự (1966) với sự cải tiến. Môi trường thạch Mueller Hinton (MHA) được hấp tiệt trùng ở 121 °C trong 15 phút, sau đó làm nguội đến khoảng 50 °C và rót vào đĩa petri vô trùng. Chúng vi sinh vật được cấy rìa trên bề mặt thạch và ủ ở 37 °C trong 24 giờ để chuẩn bị cho thí nghiệm.

Sau đó, 100 μL huyền phù có chứa vi khuẩn có mật độ khoảng $10^6 - 10^8$ CFU/mL được trải đều trên bề mặt đĩa MHA bằng que trải vô trùng và để khô trong 15 - 30 phút. Giấy lọc vô trùng đường kính 6 mm được tẩm 20 μL mẫu sau tinh sạch hoặc dung dịch đối chứng ở các nồng độ khác nhau, sau đó đặt lên bề mặt đĩa thạch. Các đĩa được ủ ở 37 °C trong 24 giờ và đường kính vòng ức chế vi sinh vật được đo để đánh giá hoạt tính kháng khuẩn. Nước cất được sử dụng làm đối chứng âm, trong khi chloramphenicol (200 $\mu\text{g/mL}$) có vai trò là đối chứng dương. Mỗi thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần.

$$\text{Công thức tính toán: } I(\%) = \frac{d_c - d_{tb}}{d_c} \times 100$$

Trong đó:

I: Phần trăm ức chế (%); d_c : Đường kính tăng trưởng trung bình của mẫu đối chứng.

d_{tb} : Đường kính tăng trưởng trung bình của mẫu có bổ sung chất ức chế.

2.3.4. So sánh cấu trúc trước và sau hiệu chỉnh polysaccharide

Phương pháp phân tích quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier-FT-IR

Nguyên tắc:

Sự hấp thụ phân tử của bức xạ điện từ trong vùng hồng ngoại của quang phổ thúc đẩy sự chuyển đổi giữa mức năng lượng quay và dao động của electron trong nguyên tử ở trạng thái cơ bản (thấp nhất). Điều này trái ngược với sự hấp thụ bức xạ tia cực tím và tia khả kiến mạnh hơn về mặt năng lượng, gây ra sự chuyển đổi giữa mức năng lượng dao động và quay của các mức điện tử khác nhau. Quang phổ hồng ngoại chủ yếu quan tâm đến các dao động phân tử, vì sự chuyển tiếp giữa các trạng thái quay riêng lẻ chỉ có thể được đo bằng quang phổ hồng ngoại của các phân tử nhỏ trong pha khí [25].

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được thực hiện lặp lại ít nhất 3 lần. Các số liệu ban đầu được xử lý thông qua phần mềm Microsoft Office 2019 và thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức được xác định bằng phân tích phương sai một yếu tố (ANOVA) với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ bằng phần mềm Minitab.

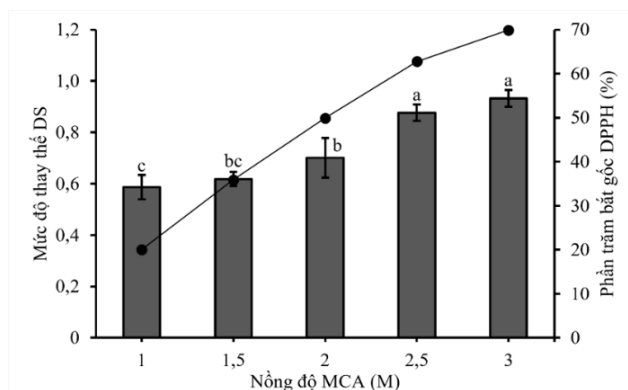
3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Các yếu tố tác động đến điều kiện biến tính polysaccharide

3.1.1. Mối quan hệ giữa nồng độ acid chloroacetic với mức độ carboxymethyl hóa polysaccharide (DS)

Hình 1 cho thấy ảnh hưởng của nồng độ MCA đến mức độ carboxymethyl hóa polysaccharide từ rong *C. submersum*. Khi tăng nồng độ MCA từ 1 M lên 2,5 M, mức độ thay thế DS tăng rõ rệt từ 0,587

$\pm 0,047$ lên $0,876 \pm 0,032$ ($p < 0,05$), phản ánh sự gia tăng xác suất va chạm giữa tác nhân MCA và các nhóm hydroxyl trên mạch polysaccharide. Trong môi trường kiềm, NaOH chuyển hóa nhóm -OH của polysaccharide thành dạng alkoxide ($-O^-Na^+$), đóng vai trò là tác nhân ái nhân mạnh. Khi nồng độ MCA tăng, mật độ phân tử MCA trong hệ phản ứng cao hơn, làm tăng khả năng phản ứng thể nucleophilic tại carbon mang nguyên tử clo, từ đó thúc đẩy sự hình thành liên kết ether carboxymethyl trên mạch polysaccharide [26]. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nồng độ lên 3 M, giá trị DS chỉ tăng nhẹ và không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 2,5 M, cho thấy xu hướng bão hòa của phản ứng. Shi và cộng sự (2017) ghi nhận DS dao động từ 0,618 đến 0,870 khi biến tính trên rong *Enteromorpha prolifera* [11], kết quả trong nghiên cứu này cho thấy khả năng carboxymethyl hóa cao hơn. Ngoài ra, Yang và cộng sự (2011) khi carboxymethyl hóa polysaccharide từ *Auricularia auricula* thu được DS đạt 0,857, thấp hơn so với giá trị tối ưu trong nghiên cứu này [15]. Hoạt tính kháng oxy hóa tăng đồng thời với sự gia tăng nồng độ MCA và mức độ thay thế DS. Khi nồng độ MCA tăng từ 1 M lên 2,5 M, hoạt tính bắt gốc DPPH tăng mạnh từ 20,04% lên 62,77%, sau đó tăng chậm khi tiếp tục nâng nồng độ MCA. Kết quả này cho thấy DS ảnh hưởng đáng kể đến khả năng kháng oxy hóa của polysaccharide. Việc gia tăng mức độ carboxymethyl hóa làm tăng tính phân cực và độ hòa tan của polysaccharide trong môi trường nước, từ đó làm giãn nở cấu trúc mạch polymer và tạo điều kiện thuận lợi cho sự tương tác với gốc tự do, góp phần cải thiện khả năng bắt gốc DPPH, phù hợp với nhận định của Machova và cộng sự (2014) [27]. Sự tăng hoạt tính chậm lại khi tăng nồng độ MCA lên 3 M. Hiện tượng này có thể được giải thích bởi sự xuất hiện của các phản ứng phụ khi nồng độ MCA quá cao. Khi lượng MCA dư thừa, một phần tác chất có xu hướng phản ứng với NaOH tạo thành sodium glycolate thay vì gắn vào mạch polysaccharide, làm giảm hiệu quả của quá trình carboxymethyl hóa [26]. Sự hình thành sản phẩm phụ này không chỉ làm giảm lượng MCA tham gia phản ứng chính mà còn có thể cản trở sự tiếp cận của tác nhân carboxymethyl vào các vị trí hydroxyl trên chuỗi polysaccharide, từ đó làm tốc độ gia tăng DS và hoạt tính kháng oxy hóa trở nên chậm lại ở nồng độ 3 M.



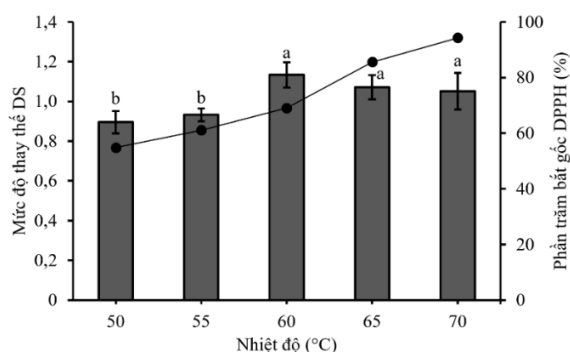
Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ acid chloroacetic (MCA) đến mức độ thay thế DS và khả năng bắt gốc DPPH của polysaccharide sau biến tính carboxymethyl

Chú thích: Mức độ thay thế: Cột, trục tung bên trái; Phần trăm bắt gốc tự do: Đường biểu diễn, trục tung bên phải. Các chữ cái phía trên các cột thể hiện sự khác nhau giữa các mức với độ tin cậy trên 95%

3.1.2. Ảnh hưởng nhiệt độ phản ứng tới mức độ carboxymethyl hóa polysaccharide (DS)

Hình 2 cho thấy ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến mức độ thay thế DS của polysaccharide khi được biến tính bằng carboxymethyl hóa từ rong *C. submersum*. Khi nhiệt độ tăng từ 50 đến 60 °C, mức độ thay thế DS tăng rõ rệt từ $0,895 \pm 0,056$ lên $1,134 \pm 0,063$ ($p < 0,05$) và đạt giá trị cao nhất tại 60 °C. Sự gia tăng này phản ánh vai trò của nhiệt độ trong việc thúc đẩy phản ứng, bao gồm tăng khả năng khuếch tán của MCA và làm giãn cấu trúc polymer, từ đó tạo điều kiện cho tác nhân phản ứng tiếp cận các nhóm -OH bị che chắn trong cấu trúc polysaccharide. Tuy nhiên, khi tiếp tục nâng nhiệt độ lên 65 và 70 °C, giá trị DS có xu hướng giảm nhẹ. Kết quả này cho thấy nhiệt độ đóng vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy phản ứng carboxymethyl hóa. Ở khoảng nhiệt độ trung bình (50 – 60 °C), tốc độ khuếch tán và mức năng lượng hoạt hóa được cải thiện, tạo điều kiện thuận lợi cho tác nhân MCA tiếp cận và gắn vào các nhóm hydroxyl trên mạch polysaccharide. Ngược lại, tại nhiệt độ cao hơn 60 °C, quá trình depolymer hóa có thể xảy ra do sự phá vỡ một phần liên kết glycosidic, làm biến đổi cấu trúc mạch polymer và hạn chế số vị trí -OH khả dụng cho phản ứng, dẫn đến sự suy giảm mức độ DS. So với nghiên cứu sulfate hóa polysaccharide từ *Sphallerocarpus gracilis* của Xu và cộng sự (2016) với

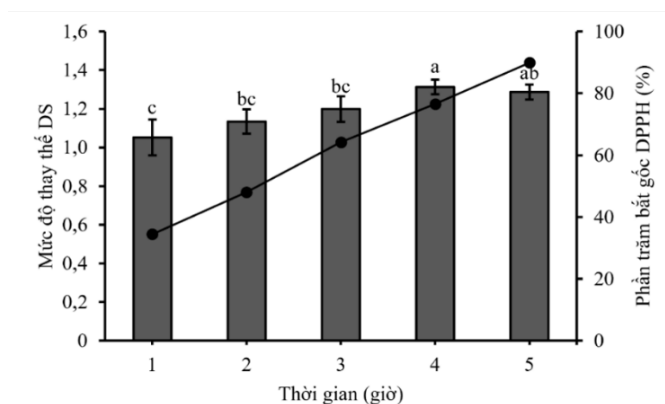
giá trị DS dao động từ 0,42 đến 1,01, phương pháp carboxymethyl hóa trong nghiên cứu này cho thấy khả năng gắn nhóm thể hiệu quả hơn [28]. Tương tự, Varshney và cộng sự khi nghiên cứu carboxymethyl hóa α -cellulose từ *Lantana camara* ở khoảng 35 – 65 °C ghi nhận DS trong khoảng 0,79 – 0,98, thấp hơn so với kết quả đạt được trên rong *C. submersum* trong nghiên cứu hiện tại [29]. Hoạt tính kháng oxy hóa của polysaccharide cũng chịu ảnh hưởng tương tự của nhiệt độ phản ứng. Khi tăng nhiệt độ từ 50 đến 60 °C, hoạt tính bắt gốc DPPH tăng từ 54,82% lên 74,73%, phù hợp với xu hướng gia tăng DS. Tuy nhiên, ở nhiệt độ trên 60 °C, sự suy giảm cấu trúc polymer do depolymer hóa khiến số nhóm hydroxyl hoạt động giảm, đồng thời làm thay đổi cấu trúc không gian của chuỗi polysaccharide, từ đó làm hoạt tính kháng oxy hóa tăng chậm hoặc có xu hướng giảm, tương tự nhận định của Machova và cộng sự (2014) [27]. Như vậy, nhiệt độ phản ứng 60 °C được xác định là điều kiện tối ưu cho quá trình carboxymethyl hóa polysaccharide từ rong *C. submersum*, do đảm bảo sự cân bằng giữa khả năng khuếch tán của tác nhân phản ứng và sự ổn định cấu trúc mạch polymer, từ đó đạt mức độ DS và hoạt tính kháng oxy hóa cao nhất.



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến mức độ thay thế DS và khả năng bắt gốc DPPH của polysaccharide sau biến tính carboxymethyl

Chú thích: Mức độ thay thế: Cột, trục tung bên trái; Phần trăm bắt gốc tự do: Đường biểu diễn, trục tung bên phải.
Các chữ cái phía trên các cột thể hiện sự khác nhau giữa các mức với độ tin cậy trên 95%

3.1.3. Ảnh hưởng thời gian tới mức độ carboxymethyl hóa polysaccharide (DS)



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến mức độ thay thế DS và khả năng bắt gốc DPPH của polysaccharide sau biến tính carboxymethyl

Chú thích: Mức độ thay thế: Cột, trục tung bên trái; Phần trăm bắt gốc tự do: Đường biểu diễn, trục tung bên phải.
Các chữ cái phía trên các cột thể hiện sự khác nhau giữa các mức với độ tin cậy trên 95%

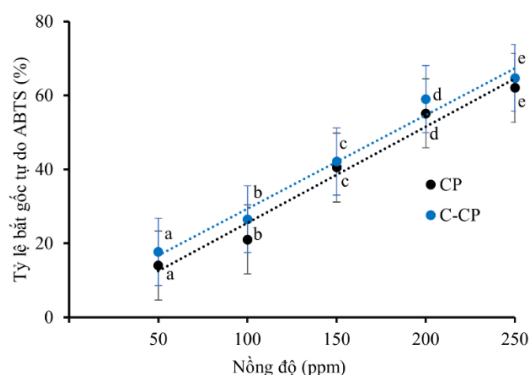
Hình 3 thể hiện ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến mức độ thay thế DS và hoạt tính kháng oxy hóa của polysaccharide carboxymethyl hóa. Khi kéo dài thời gian phản ứng từ 1 đến 4 giờ, mức độ DS tăng đáng kể từ $1,052 \pm 0,092$ lên $1,313 \pm 0,038$, cho thấy phản ứng cần đủ thời gian để các nhóm alkoxide trên mạch polysaccharide tiếp xúc và phản ứng hoàn toàn với MCA. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng thời gian phản ứng đến 5 giờ, giá trị DS có xu hướng giảm nhẹ, chứng tỏ phản ứng đã tiến gần trạng thái bão hòa và không còn thuận lợi cho sự gắn thêm nhóm thế. Xu hướng này có thể được giải thích bởi việc các vị trí hydroxyl hoạt động trên mạch polysaccharide dần bị chiếm hết theo thời gian,

trong khi sự kéo dài quá mức thời gian phản ứng dưới điều kiện nhiệt có thể gây ra hiện tượng depolymer hóa một phần, phá vỡ liên kết glycosidic và làm suy giảm cấu trúc mạch, từ đó làm giảm số nhóm -OH khả dụng cho phản ứng carboxymethyl hóa [27]. Đối với hoạt tính kháng oxy hóa, giá trị bắt gốc DPPH tăng liên tục từ 34,47% lên 80,10% khi thời gian phản ứng kéo dài từ 1 đến 5 giờ. Sự gia tăng này có liên quan đến sự cải thiện mức độ biến tính và sự thay đổi cấu trúc không gian của polysaccharide, giúp tăng khả năng tiếp xúc và trung hòa gốc tự do. Tuy nhiên, do DS không tiếp tục tăng sau 4 giờ, sự cải thiện hoạt tính ở 5 giờ được xem là không tương xứng với nguy cơ suy giảm cấu trúc polymer. Do đó, thời gian phản ứng 4 giờ được xác định là điều kiện tối ưu cho quá trình carboxymethyl hóa polysaccharide từ rong *C. submersum*, khi đạt được mức độ thay thế DS cao nhất đồng thời đảm bảo sự ổn định cấu trúc và hiệu quả sinh học. Kết quả này cho giá trị DS cao hơn so với nghiên cứu của Yu và cộng sự (2022) trên polysaccharide từ *Panax japonicus*, trong đó giá trị DS tối đa chỉ đạt 0,97 [30].

Như vậy, mức độ thay thế DS của polysaccharide sau khi biến tính bằng phương pháp carboxymethyl hóa chịu ảnh hưởng đáng kể bởi các yếu tố phản ứng bao gồm nồng độ MCA, nhiệt độ và thời gian phản ứng. Sự điều chỉnh hợp lý các thông số này đã giúp tối ưu hóa quá trình gắn nhóm carboxymethyl vào mạch polysaccharide, từ đó đạt được giá trị DS cao hơn so với các phương pháp biến tính khác như sulfate hóa. Khi DS tăng, mật độ các nhóm carboxymethyl mang điện tích âm ($-\text{CH}_2\text{COO}^-$) trên mạch polysaccharide tăng lên, góp phần cải thiện khả năng cho hydrogen để trung hòa gốc tự do DPPH [27]. Bên cạnh đó, DS tăng làm tăng tính phân cực và độ hòa tan của polysaccharide trong môi trường phản ứng, đồng thời làm cấu trúc mạch polymer giãn và linh động hơn, tạo điều kiện thuận lợi cho sự tiếp xúc và tương tác giữa các nhóm chức với gốc tự do [31]. Tuy nhiên, khi DS đạt đến giá trị cao, hiệu quả bắt gốc tự do có xu hướng tăng chậm lại do hiện tượng bão hòa phản ứng và sự suy giảm cấu trúc polymer. Do đó, carboxymethyl hóa được xác định là phương pháp biến tính hiệu quả, góp phần nâng cao giá trị ứng dụng tiềm năng của polysaccharide từ rong *C. submersum* trong lĩnh vực thực phẩm chức năng và dược liệu.

3.2. Đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa của polysaccharide trước và sau biến tính

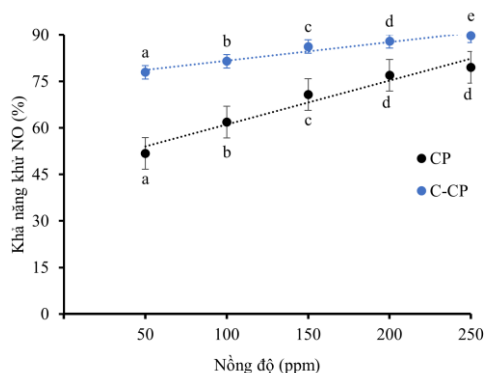
Hình 4 thể hiện hoạt tính ức chế ABTS của polysaccharide trước và sau khi biến tính carboxymethyl. Kết quả cho thấy ở cả hai mẫu, phần trăm ức chế tăng dần theo nồng độ từ 50 đến 250 ppm. Trước khi biến tính, phần trăm ức chế tăng từ $13,98 \pm 0,003\%$ lên $62,05 \pm 0,001\%$ ($p < 0,05$). Sau biến tính, khả năng bắt gốc ABTS được cải thiện nhẹ nhưng vẫn có ý nghĩa thống kê, với giá trị cao nhất đạt $64,70 \pm 0,005\%$. IC_{50} được xác định bằng phương pháp hồi quy tuyến tính trong khoảng nồng độ khảo sát dựa trên phương trình đường chuẩn của độ hấp thụ. Với mẫu chưa biến tính, phương trình $y = 0,2604x - 0,5315$ ($R^2 = 0,974$), từ đó suy ra IC_{50} là 189,97 $\mu\text{g/mL}$. Đối với mẫu sau biến tính, phương trình $y = 0,253x + 4,0439$ ($R^2 = 0,979$) cho IC_{50} là 181,65 $\mu\text{g/mL}$. Việc IC_{50} giảm cho thấy polysaccharide sau biến tính có hiệu quả kháng oxy hóa cao hơn do cần nồng độ thấp hơn để đạt 50% khả năng ức chế. Hiện tượng này có thể liên quan đến sự gia tăng nhóm carboxymethyl và độ phân cực của phân tử sau biến tính.



Hình 4. Khả năng kháng oxy hóa ABTS của polysaccharide chưa biến tính (CP, đường màu đen) và polysaccharide biến tính (C-CP, đường màu xanh).

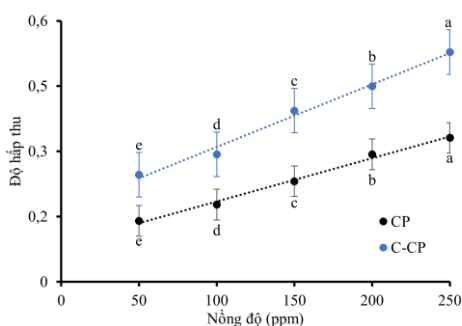
Các chữ cái phía trên các đường thể hiện sự khác nhau giữa các mức với độ tin cậy trên 95%

Khả năng khử NO được trình bày trong Hình 5. Polysaccharide sau biến tính thể hiện hoạt tính tốt hơn mẫu ban đầu tại tất cả các nồng độ khảo sát. Ở 250 ppm, phần trăm khử của mẫu sau biến tính đạt $85,21 \pm 0,001\%$ so với $67,46 \pm 0,007\%$ của mẫu chưa biến tính ($p < 0,05$). IC_{50} được xác định bằng hồi quy tuyến tính từ phương trình đường chuẩn. Với mẫu chưa biến tính, phương trình $y = 0,1411x + 47,016$ ($R^2 = 0,956$) cho IC_{50} là $124,51 \mu\text{g/mL}$; trong khi mẫu sau biến tính có phương trình $y = 0,06x + 75,656$ ($R^2 = 0,959$) với IC_{50} là $63,79 \mu\text{g/mL}$. Giá trị IC_{50} giảm mạnh chứng tỏ khả năng khử NO được cải thiện rõ rệt sau biến tính. Hiện tượng này có thể được lý giải do sự gia tăng các nhóm carboxyl ($-\text{COO}^-$), làm tăng khả năng cho hydrogen và bắt giữ các gốc tự do nitrogen oxide.



Hình 5. Khả năng khử NO của polysaccharide chưa biến tính (CP, đường màu đen) và polysaccharide biến tính (C-CP, đường màu xanh). Các chữ cái phía trên các đường thể hiện sự khác nhau giữa các mức với độ tin cậy trên 95%

Đối với phương pháp RP (Hình 6), polysaccharide thể hiện khả năng khử tăng theo nồng độ và chịu ảnh hưởng rõ rệt của quá trình biến tính. Trước khi biến tính, độ hấp thụ tăng từ $0,140 \pm 0,007$ lên $0,331 \pm 0,004$ khi nồng độ tăng từ 50 đến 250 ppm. Sau biến tính, giá trị này tăng đáng kể, dao động từ $0,246 \pm 0,007$ đến $0,528 \pm 0,005$, cho thấy khả năng cho electron của polysaccharide được cải thiện rõ rệt. Kết quả này cho thấy nhóm carboxymethyl không chỉ góp phần tăng cường khả năng cho electron mà còn làm thay đổi cấu trúc không gian của polysaccharide, từ đó nâng cao hiệu quả kháng oxy hóa theo cơ chế khử.



Hình 6. Khả năng khử RP của polysaccharide chưa biến tính (CP, đường màu đen) và polysaccharide biến tính (C-CP, đường màu xanh). Các chữ cái phía trên các đường thể hiện sự khác nhau giữa các mức với độ tin cậy trên 95%

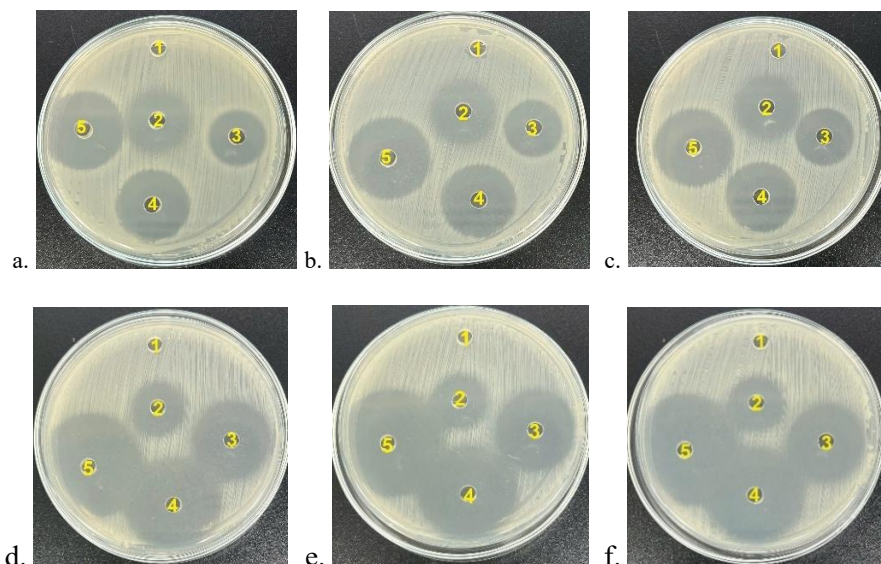
Nhìn chung, quá trình carboxymethyl hóa đã làm tăng hoạt tính kháng oxy hóa của polysaccharide khi đánh giá bằng ba phương pháp ABTS, NO và RP, trong đó sự cải thiện thể hiện rõ rệt nhất ở phép thử NO và RP. Kết quả này cho thấy mức độ thay thế DS có liên quan tới việc nâng cao hoạt tính sinh học của polysaccharide sau biến tính.

3.3. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của polysaccharide sau biến tính

Hai chủng vi sinh được dùng để đánh giá khả năng ức chế khuẩn của polysaccharide sau biến tính gồm: *S. typhimurium*, *S. aureus*.

Kết quả kháng khuẩn của polysaccharide biến tính được trình bày ở Hình 7.

Hoạt tính kháng khuẩn của polysaccharide biến tính được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch đối với hai chủng vi khuẩn đại diện là *S. aureus* (Gram dương) và *S. typhimurium* (Gram âm). Đường kính vòng vô khuẩn tăng dần của mẫu sau carboxymethyl cho thấy khả năng ức chế vi sinh tại các nồng độ tăng dần. Tại nồng độ 400 $\mu\text{g/mL}$, polysaccharide tạo vòng ức chế đối với *S. aureus* là $21,30 \pm 0,45$ mm, cao hơn so với *S. typhimurium* ($16,01 \pm 1,58$ mm). Khi tăng nồng độ lên 600 và 800 $\mu\text{g/mL}$, đường kính vòng ức chế của *S. aureus* tăng lần lượt lên $27,19 \pm 0,89$ mm và $33,00 \pm 0,79$ mm, trong khi đối với *S. typhimurium* đạt $20,37 \pm 0,44$ mm và $24,20 \pm 0,11$ mm. Điều này cho thấy *S. aureus* nhạy cảm hơn với polysaccharide biến tính so với vi khuẩn Gram âm. Sự khác biệt này có thể do cấu trúc thành tế bào Gram âm tạo nên từ lớp màng ngoài giàu lipopolysaccharide làm cản trở sự xâm nhập của hợp chất kháng khuẩn, trong khi vi khuẩn Gram dương có thành tế bào đơn giản hơn nên dễ bị tác động hơn. So sánh với nghiên cứu của Li và cộng sự (2018), khi biến tính carboxymethyl polysaccharide từ bã hạt mẫu đơn (PSDPs), đường kính vòng kháng khuẩn đối với *S. typhimurium* chỉ đạt khoảng 12 – 14 mm và tương đương với *S. aureus* [32]. Cho thấy polysaccharide từ rong *C. submersum* trong nghiên cứu này có hiệu quả kháng khuẩn cao hơn. Bên cạnh đó, Chen và cộng sự (2024) khi sulfate hóa polysaccharide từ cám gạo ghi nhận đường kính vòng vô khuẩn đối với *S. aureus* và *Salmonella* lần lượt là 19,26 mm và 17,27 mm [33]. So với kết quả này, phương pháp carboxymethyl hóa trong nghiên cứu hiện tại cho thấy hiệu quả kháng khuẩn vượt trội hơn, chứng minh ưu thế của nhóm carboxymethyl trong việc tăng cường hoạt tính sinh học của polysaccharide.



Hình 7. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của polysaccharide sau biến tính

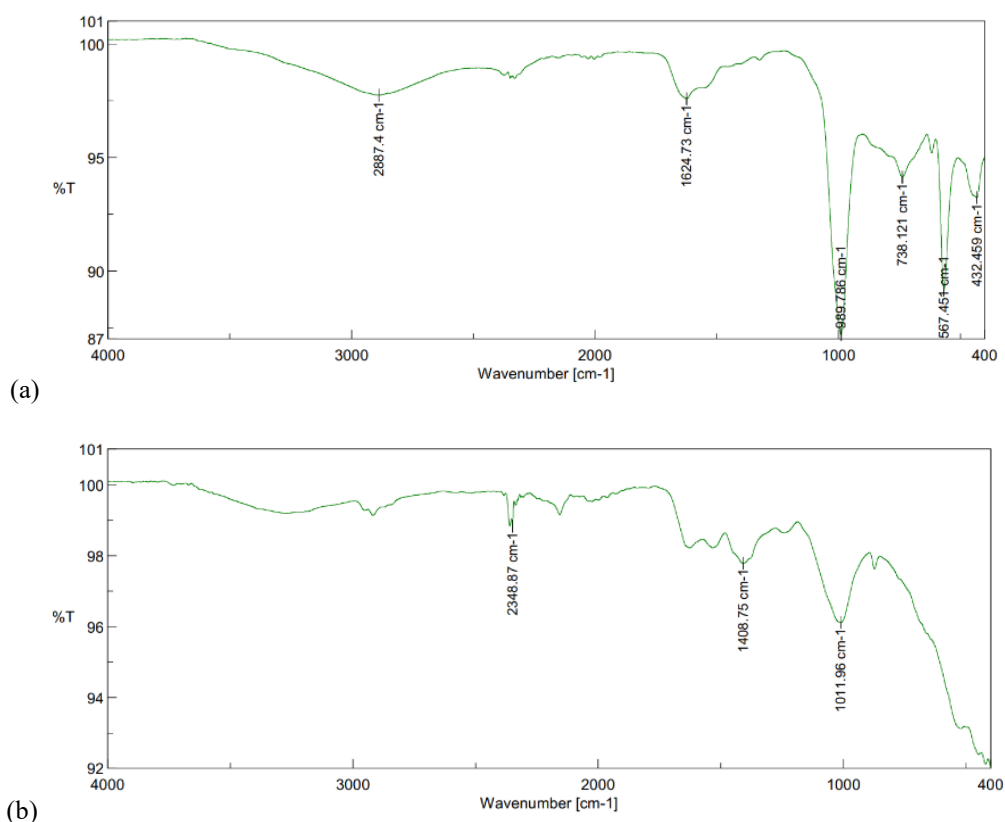
Chú thích: a, b, c. Kết quả kháng *Salmonella typhimurium*; d, e, f. Kết quả kháng *Staphylococcus aureus*;

(1): Đối chứng âm; (2): Đối chứng dương; (3) nồng độ 400 $\mu\text{g/mL}$; (4) nồng độ 600 $\mu\text{g/mL}$; (5) nồng độ 800 $\mu\text{g/mL}$

Sự gia tăng khả năng kháng khuẩn sau quá trình carboxymethyl hoá polysaccharide không chỉ đơn thuần do tương tác tĩnh điện hấp dẫn giữa nhóm chức mới và màng tế bào vi khuẩn. Quá trình carboxymethyl hoá làm thay đổi đáng kể tính chất hóa lý của polysaccharide, bao gồm độ hoà tan, tính phân cực và cấu trúc không gian, từ đó tăng khả năng hấp phụ lên bề mặt tế bào và gây rối loạn chức năng màng vi khuẩn. Điều này dẫn đến sự thay đổi tính thấm màng, làm mất cân bằng nội môi và ức chế phát triển vi khuẩn, như được tổng kết trong các nghiên cứu tổng quan về cải thiện hoạt tính kháng khuẩn của polysaccharide thông qua biến đổi hoá học. Ngoài ra, bản chất tương tác giữa nhóm carboxylat và các thành phần khác của tế bào (như protein màng, ion đa hoá trị) cũng góp phần vào cơ chế này, cho thấy hoạt tính kháng khuẩn ở các dẫn xuất carboxymethyl không giống hoàn toàn với cơ chế của các polymer mang điện dương như chitosan [34].

3.4. So sánh cấu trúc polysaccharide trước và sau biến tính bằng phương pháp phổ FT-IR

Hình 8 cho thấy sự khác biệt trong phổ FT-IR giữa polysaccharide (CP) và polysaccharide sau khi carboxymethyl hóa (C-CP). Dải hấp thụ rộng tại vùng $3200 - 3600\text{ cm}^{-1}$ ở cả hai mẫu đặc trưng cho dao động kéo giãn của nhóm hydroxyl $-OH$ của polysaccharide [35]. Sau biến tính, cường độ dải này thay đổi nhẹ, phản ánh sự biến đổi trong liên kết hydro khi nhóm $-CH_2COO^-$ được gắn vào mạch polysaccharide. Sự khác biệt quan trọng nhất là sự xuất hiện của đỉnh mới tại peak 1408 cm^{-1} trong mẫu C-CP, tương ứng với dao động COO^- , là đặc trưng của nhóm carboxymethyl [36]. Đây là bằng chứng rõ ràng cho thấy phản ứng carboxymethyl hóa đã xảy ra. Trong khi đó, peak đặc trưng của liên kết C-O-C và C-O của khung carbohydrate tại 1011 cm^{-1} vẫn được bảo tồn ở cả hai mẫu, chứng tỏ cấu trúc khung polysaccharide không bị phá hủy trong quá trình biến tính. Như vậy, sự xuất hiện của dải hấp thụ tại 1408 cm^{-1} cùng với việc các đặc điểm cấu trúc carbohydrate vẫn được giữ nguyên cho thấy quá trình carboxymethyl hóa polysaccharide đã diễn ra thành công.



Hình 8. Phổ FT-IR của polysaccharide chưa biến tính (a) và polysaccharide đã biến tính (b)

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đưa ra được mối quan hệ giữa nồng độ acid chloroacetic, nhiệt độ và thời gian phản ứng và mức độ carboxymethyl hóa polysaccharide từ rong *C. submersum*. Điều kiện biến tính tối ưu được xác định tại nồng độ MCA 2,5 M, nhiệt độ 60°C và thời gian phản ứng 4 giờ, cho mức độ thay thế (DS) cao nhất, đồng thời cải thiện rõ rệt hoạt tính kháng oxy hóa của polysaccharide. Kết quả phân tích FT-IR cho thấy sự thành công trong việc gắn gốc carboxymethyl vào mạch carbon, góp phần làm thay đổi cấu trúc hóa học của vật liệu và cải thiện hoạt tính kháng oxy hóa. Sự gia tăng DS có mối liên hệ chặt chẽ với sự cải thiện hoạt tính sinh học, thể hiện qua hoạt tính bắt gốc ABTS, NO, khả năng khử RP và hoạt tính kháng khuẩn đối với *S. typhimurium* và *S. aureus*. Điều này cho thấy carboxymethyl hóa là một phương pháp hiệu quả nhằm nâng cao giá trị sinh học của polysaccharide từ rong nước ngọt. Nghiên cứu này không chỉ cung cấp cơ sở khoa học cho việc tối ưu hóa quá trình carboxymethyl hóa polysaccharide từ *C. submersum* mà còn góp phần làm rõ mối liên hệ giữa mức độ biến tính và hoạt

tính sinh học của polysaccharide rong. Trong các nghiên cứu tiếp theo, cần tập trung phân tích sâu hơn đặc điểm cấu trúc và hình thái của polysaccharide biến tính bằng các kỹ thuật hiện đại như NMR, phân tích khối lượng phân tử và đánh giá hoạt tính sinh học ở mức độ tế bào hoặc in vivo, nhằm làm rõ cơ chế tác động và mang đến tiềm năng khai thác trong lĩnh vực y sinh và dược phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H. Cheng and G. Huang, "The antioxidant activities of carboxymethylated garlic polysaccharide and its derivatives," *Int J Biol Macromol*, vol. 140, pp. 1054-1063, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.204>
- [2] G. G. d'Ayala *et al.*, "Marine derived polysaccharides for biomedical applications: chemical modification approaches," *Molecules*, vol. 13, no. 9, pp. 2069-106, 2008, <https://doi.org/10.3390/molecules13092069>
- [3] Y. Wu *et al.*, "Application of polysaccharide-rich solution derived from waste macroalgae *Enteromorpha prolifera* in cherry tomato preservation and utilizing post-extraction residue for crude bio-oil production," *Food Chem*, vol. 409, pp. 135301, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135301>
- [4] X. Chen *et al.*, "Immunomodulatory activity and mechanism of Chinese yam polysaccharide after sulfated modification," *Industrial Crops and Products*, vol. 197, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116549>
- [5] L. Liang *et al.*, "Sulfated modification and anticoagulant activity of pumpkin (*Cucurbita pepo*, *Lady Godiva*) polysaccharide," *Int J Biol Macromol*, vol. 106, pp. 447-455, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.035>
- [6] T. Zhao *et al.*, "Structural modification and biological activity of polysaccharides," *Molecules*, vol. 28, no. 14, 2023, <https://doi.org/10.3390/molecules28145416>
- [7] Z. W. Li *et al.*, "Chemical modification, characterization, and activity changes of land plant polysaccharides: A review," *Polymers (Basel)*, vol. 14, no. 19, 2022, <https://doi.org/10.3390/polym14194161>
- [8] Y. Liu *et al.*, "Characterization of carboxymethylated polysaccharides from *Catathelasma ventricosum* and their antioxidant and antibacterial activities," *Journal of Functional Foods*, vol. 38, pp. 355-362, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.050>
- [9] H. Musarurwa and N. T. Tavengwa, "Application of carboxymethyl polysaccharides as bio-sorbents for the sequestration of heavy metals in aquatic environments," *Carbohydr Polym*, vol. 237, pp. 116142, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116142>
- [10] J. Jebamalar and V. Judia Harriet Sumathy, "Comparison of polysaccharide characterization of *Chaetomorpha antennina* and *Ceratophyllum submersum*," *International Journal of Recent Scientific Research*, vol. 10, 2019, <https://doi.org/10.24327/ijrsr.2019.1007.3700>
- [11] M. J. Shi *et al.*, "Carboxymethylated degraded polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*: Preparation and in vitro antioxidant activity," *Food Chem*, vol. 215, pp. 76-83, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.151>
- [12] Ž. Stojanović *et al.*, "A comparison of some methods for the determination of the degree of substitution of carboxymethyl starch," *Starch - Stärke*, vol. 57, no. 2, pp. 79-83, 2005, <https://doi.org/10.1002/star.200400342>
- [13] J. Liu *et al.*, "Determination of degree of substitution of carboxymethyl starch by Fourier transform mid-infrared spectroscopy coupled with partial least squares," *Food Chemistry*, vol. 132, no. 4, pp. 2224-2230, 2012, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.072>
- [14] V. Bondet *et al.*, "Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 30, no. 6, pp. 609-615, 1997, <https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0240>

- [15] L. Yang *et al.*, "Carboxymethylation of polysaccharides from *Auricularia auricula* and their antioxidant activities *in vitro*," *Int J Biol Macromol*, vol. 49, no. 5, pp. 1124-30, 2011, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.09.011>
- [16] I. G. Munteanu and C. Apetrei, "Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 7, 2021, <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- [17] V. Mareček *et al.*, "ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt," *Journal of Cereal Science*, vol. 73, pp. 40-45, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.11.004>
- [18] I. Gulcin, "Antioxidant activity of food constituents: an overview," *Arch Toxicol*, vol. 86, no. 3, pp. 345-91, 2012, <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>
- [19] O. Tusevski *et al.*, "Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants," *Open Life Sciences*, vol. 9, no. 9, pp. 888-900, 2014, <https://doi.org/10.2478/s11535-014-0322-1>
- [20] M. Oyaizu, "Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine," *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, vol. 44, no. 6, pp. 307-315, 1986, <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
- [21] Deepshikha Gupta, "Methods for determination of antioxidant capacity: A review," *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 6, no. 2, 2015, [https://doi.org/10.13040/ijpsr.0975-8232.6\(2\).546-66](https://doi.org/10.13040/ijpsr.0975-8232.6(2).546-66)
- [22] Sreejayan and M. N. Rao, "Nitric oxide scavenging by curcuminoids," *J Pharm Pharmacol*, vol. 49, no. 1, pp. 105-7, 1997, <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1997.tb06761.x>
- [23] M. N. Alam *et al.*, "Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity," *Saudi Pharm J*, vol. 21, no. 2, pp. 143-52, 2013, <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- [24] S. K. Sharma and A. P. Singh, "*In vitro* antioxidant and free radical scavenging activity of *Nardostachys jatamansi* DC," *J Acupunct Meridian Stud*, vol. 5, no. 3, pp. 112-8, 2012, <https://doi.org/10.1016/j.jams.2012.03.002>
- [25] A. A. Ismail *et al.*, "Fourier transform infrared spectroscopy: principles and applications," in *Techniques and instrumentation in analytical chemistry*, vol. 18: Elsevier, 1997, pp. 93-139.
- [26] P. Rachtanapun *et al.*, "Effect of monochloroacetic acid on properties of carboxymethyl bacterial cellulose powder and film from Nata de Coco," *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 4, 2021, <https://doi.org/10.3390/polym13040488>
- [27] E. Machova *et al.*, "Effect of carboxymethylation on antioxidant properties and radical degradation of mannans and glucans," *Carbohydr Polym*, vol. 112, pp. 603-7, 2014, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.050>
- [28] Y. Xu *et al.*, "Sulfated modification of the polysaccharide from *Sphallerocarpus gracilis* and its antioxidant activities," *Int J Biol Macromol*, vol. 87, pp. 180-90, 2016, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.037>
- [29] V. Varshney and S. Naithani, "Chemical functionalization of cellulose derived from nonconventional sources," in *Cellulose Fibers: Bio-and nano-polymer composites: Green chemistry and technology*: Springer, 2011, pp. 43-60.
- [30] Q.-Y. Yu *et al.*, "Extraction, preparation and an assessment of the activity of carboxymethyl polysaccharide from *Panax japonicus*," *Food Science and Technology*, vol. 42, 2022, <https://doi.org/10.1590/fst.82221>
- [31] L. Yang *et al.*, "Carboxymethylation of polysaccharides from *Auricularia auricula* and their antioxidant activities *in vitro*," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 49, no. 5, pp. 1124-1130, 2011.
- [32] X. L. Li *et al.*, "Effects of different chemical modifications on the antibacterial activities of polysaccharides sequentially extracted from peony seed dreg," *Int J Biol Macromol*, vol. 116, pp. 664-675, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.082>

- [33] B.-J. Chen *et al.*, "Sulfation, characterization, antibacterial activity, and action mechanism of rice bran polysaccharides," *Food Bioscience*, vol. 59, 2024, <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.103953>
- [34] Z. Wang *et al.*, "Improvement of antibacterial activity of polysaccharides via chemical modification: A review," *Int J Biol Macromol*, vol. 269, no. Pt 2, pp. 132163, 2024, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132163>
- [35] X. Zhang *et al.*, "Structure characterization and antioxidant activity of carboxymethylated polysaccharide from *Pholiota nameko*," *J Food Biochem*, vol. 46, no. 7, pp. e14121, 2022, <https://doi.org/10.1111/jfbc.14121>
- [36] Y. Y. Cao *et al.*, "Effects of sulfated, phosphorylated and carboxymethylated modifications on the antioxidant activities *in-vitro* of polysaccharides sequentially extracted from *Amana edulis*," *Int J Biol Macromol*, vol. 146, pp. 887-896, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.211>

ABSTRACT

CARBOXYMETHYL MODIFICATION ON POLYSACCHARIDE FROM *Ceratophyllum submersum* ALGAE

Trinh Thi Bich Huyen, Tran Khanh Linh, Nguyen Hoan Phuong Thuy,

Nguyen Thi Thu Huyen, Hoang Thi Ngoc Nhon*

Ho Chi Minh City University of Industry and Trade

*Email: nhonhtn@huit.edu.vn

Polysaccharides are natural macromolecules widely found in plants that exhibit diverse biological activities and have attracted considerable attention due to their potential applications in medicine and pharmaceutical development. *Ceratophyllum submersum* is a freshwater alga rich in polysaccharides; however, studies on structural modification aimed at enhancing the biological activities of polysaccharides from this species remain limited. This study aimed to determine the optimal conditions for polysaccharide modification using the carboxymethylation method and to evaluate the effects of this process on biological activities. The investigated factors included monochloroacetic acid (MCA) concentration, reaction temperature, and reaction time. The results showed that the optimal conditions were achieved at an MCA concentration of 2.5 M, a reaction temperature of 60 °C, and a reaction time of 4 h, corresponding to degrees of substitution (DS) of 0.876 ± 0.032 , 1.134 ± 0.063 , and 1.313 ± 0.038 , respectively. FT-IR analysis indicated the appearance of the CH_2COO^- group, suggesting the substitution of hydroxyl groups ($-\text{OH}$) in the carbon chain. Biological activities were evaluated through antioxidant assays, including 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), nitric oxide (NO) scavenging, ferric reducing power (RP), and antibacterial activity. The modified polysaccharides exhibited stronger radical-scavenging activity, with IC_{50} values of 181.65 $\mu\text{g/mL}$ for ABTS and 63.79 $\mu\text{g/mL}$ for NO. The reducing power assay showed increased absorbance, indicating greater ferric-reducing capacity after modification compared with the native polysaccharide. In addition, the modified polysaccharides demonstrated inhibitory activity against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*. The obtained results demonstrate that carboxymethylation effectively enhances the biological activities of polysaccharides through structural modification, suggesting promising applications of *C. submersum*-derived polysaccharides in medicine, pharmaceutical development, and functional foods.

Keywords: Carboxymethyl, *Ceratophyllum submersum*, modification, polysaccharide.