

# Nghiên cứu vi bao kháng thể IgY

Huỳnh Thành Đạt<sup>1\*</sup>, Trần Bích Lam<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Kỹ thuật - Công nghệ, Trường Đại học Văn Hiến, 613 Âu Cơ, phường Phú Trung, quận Tân Phú, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Kỹ thuật Hoá học, Trường Đại học Bách Khoa TP Hồ Chí Minh, 268 Lý Thường Kiệt, phường 14, quận 10, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 28/3/2023; ngày chuyển phản biện 30/3/2023; ngày nhận phản biện 11/4/2023; ngày chấp nhận đăng 13/4/2023

## Tóm tắt:

Kháng thể IgY đã được chứng minh có hiệu quả phòng chống và điều trị một số bệnh truyền nhiễm như cúm A, bệnh tay chân miệng... Vi bao chitosan-alginate được đánh giá là một phương pháp hiệu quả để đưa kháng thể IgY vào cơ thể qua đường ăn uống. Nghiên cứu vi bao kháng thể IgY đã tiến hành khảo sát ảnh hưởng của các chất bao và điều kiện vi bao đến hiệu quả của quá trình vi bao kháng thể IgY kháng Enterovirus 71 (EV71) bao gồm: nồng độ sodium alginate, nồng độ chitosan, pH môi trường vi bao. Kết quả thí nghiệm đã đưa ra các thông số tối ưu nhằm tăng hiệu quả vi bao kháng thể IgY như sau: nồng độ sodium alginate 2,5% (w/v), nồng độ chitosan 0,2%, pH môi trường vi bao 3,5. Trong điều kiện tối ưu, hiệu quả vi bao đạt 63,93%. Chế phẩm vi bao sau sấy có hoạt tính kháng thể IgY kháng EV71 còn lại trong hạt vi bao đạt 35,01%. Độ ổn định của IgY trong môi trường mô phỏng dạ dày (SGF) đã được cải thiện đáng kể, khi được vi bao bằng chitosan-alginate, hoạt tính kháng thể của IgY được giữ lại đến 3 giờ trong SGF có pepsin. Kết quả chụp SEM cho thấy, kích thước hạt vi bao  $\leq 10 \mu\text{m}$ , cấu trúc hạt vi bao xốp, có rất nhiều hạt vi bao trong một hạt chế phẩm vi bao sau sấy tạo thành khối hạt vi bao.

**Từ khóa:** Enterovirus 71, hiệu quả vi bao, hoạt tính kháng thể IgY, kháng thể IgY, vi bao chitosan - alginate.

**Chỉ số phân loại:** 2.6, 2.8, 3.5

## Research on microcapsules for IgY antibodies

Thanh Dat Huynh<sup>1\*</sup>, Bich Lam Tran<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Engineering and Technology, Van Hien University, 613 Au Co Street, Phu Trung Ward, Tan Phu District, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>2</sup>Faculty of Chemical Engineering, Ho Chi Minh City University of Technology, 268 Ly Thuong Kiet Street, Ward 14, District 10, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 28 March 2023; revised 11 April 2023; accepted 13 April 2023

## Abstract:

IgY antibodies have been shown to be effective in the prevention and treatment of some infectious diseases, such as influenza A and hand, foot and mouth disease (HFMD)... Chitosan-alginate microcapsules are considered an effective approach to delivering IgY into the body via the oral route. The research on IgY microcapsules for IgY antibodies investigated the effects of encapsulating agents and encapsulation conditions on the efficiency of the microcapsules process of IgY antibodies against Enterovirus 71 (EV71), including: alginate concentration, chitosan concentration, microcapsules environment pH. The results determined the optimal parameters to enhance the efficiency of microcapsules IgY, which are 2.5% (w/v) sodium alginate, 0.2% chitosan, and microcapsules environment pH 3.5. Under optimum conditions, IgY microcapsules efficiency was 63.93%. After freeze-dried microcapsules, the activity against EV71 in the microcapsules was 35.01%. The IgY stability in simulated gastric fluid (SGF) was significantly improved when encapsulated by chitosan-alginate microcapsules, and the activity of IgY was fully maintained for 3 hours in SGF with the appearance of pepsin. Scanning electron microscopy (SEM), results showed that the microcapsule particle size is  $\leq 10 \mu\text{m}$ , the microcapsule particle structure is porous, and there are many microcapsule particles in the microcapsule product after freeze-drying.

**Keywords:** chitosan-alginate microcapsules, Enterovirus 71, IgY activity, IgY antibodies, microcapsules efficiency.

**Classification numbers:** 2.6, 2.8, 3.5

\*Tác giả liên hệ: Email: datht@vhu.edu.vn

## 1. Đặt vấn đề

Kháng thể IgY đã được chứng minh có hiệu quả phòng chống và điều trị một số bệnh truyền nhiễm như cúm A, bệnh tay chân miệng... Kháng thể IgY đã được ứng dụng trong lĩnh vực chăn nuôi thú y và phòng chữa bệnh cho người [1]. Năm 2002, Carlander sử dụng kháng thể IgY như công cụ phòng chống các bệnh nhiễm trùng ở bệnh nhân xơ gan. Kháng thể IgY có các đặc tính hóa sinh học rất phù hợp với việc điều trị miễn dịch thông qua đường miệng, tuy nhiên kháng thể IgY rất nhạy cảm với môi trường dịch vị dạ dày và hoạt tính kháng thể nhanh chóng mất đi trong SGF. Vì vậy, vi bao chitosan - alginate được đánh giá là một phương pháp hiệu quả để đưa kháng thể IgY vào cơ thể qua đường ăn uống [1, 2]. Ở nước ngoài, những năm gần đây, các tính chất của alginate và chitosan đã được ứng dụng trong sản xuất vi bao, mang các chất nhân khác nhau như peptides, protein và các loại thuốc để theo đường uống, chuyển đến dạ dày và đường ruột [1, 3, 4].

Tại Việt Nam, trước tình hình dịch cúm A và bệnh tay chân miệng đang diễn tiến hết sức phức tạp và hiện chưa có chưa có thuốc đặc trị hay vaccin phòng ngừa. Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh đã nghiên cứu và đạt được thành công trong việc hoàn thiện quy trình sản xuất kháng thể IgY kháng Enterovirus 71 (EV 71).

Nghiên cứu của chúng tôi: Vi bao kháng thể IgY kháng Enterovirus 71, được thực hiện nhằm tạo chế phẩm vi bao chứa kháng thể IgY sản xuất trong nước, để bổ sung qua đường ăn uống, phòng chống bệnh, giảm nguy cơ bùng phát của các bệnh truyền nhiễm, góp phần bảo vệ sức khỏe cho cộng đồng. Nội dung nghiên cứu gồm: Khảo sát ảnh hưởng của các chất bao và điều kiện vi bao đến hiệu quả của quá trình vi bao kháng thể IgY kháng EV71 trong khuôn gel chitosan-alginate; Khảo sát độ bền của chế phẩm vi bao với điều kiện mô phỏng môi trường trong dạ dày (simulated gastric fluid - SGF).

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu

Kháng thể IgY kháng Enterovirus 71 (EV 71) được cung cấp bởi Phòng Thí nghiệm Sinh học phân tử - Khoa Vi sinh Miễn Dịch, Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh.

Chất bao sử dụng bao gồm: Chitosan có độ deacetyl hóa 97,2%, do Công ty TNHH Hùng Tiến (Cần Thơ) sản xuất. Sodium alginate do Công ty HiMedia cung cấp.

Hóa chất sử dụng bao gồm:  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ,  $CaCl_2$ , Citrate buffer, Comassie protein assay reagent, enzyme Pepsin, Goat Anti-Chicken IgY, kháng nguyên EV71,

NaCl,  $NaHCO_3$ , NaOH, OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride), PBST (Phosphate Buffered Saline with 0,05% Tween 20), Tris - HCl ( $C_4H_{11}NO_3$ ),  $KH_2PO_4$ ,  $H_2SO_4$ .

### 2.2. Quy trình vi bao kháng thể IgY kháng EV71

Dung dịch kháng thể IgY được phối trộn với dung dịch sodium alginate ở các nồng độ khác nhau. Môi trường vi bao được chuẩn bị bằng cách hòa trộn dung dịch  $CaCl_2$  1,5% (w/v) với dung dịch Chitosan ở các nồng độ khác nhau. Hỗn hợp dung dịch sodium alginate/IgY được bơm nhỏ giọt bằng bơm tiêm có đường kính kim tiêm 0,6 mm, vào môi trường vi bao, lắc đều hỗn hợp và để hạt vi bao ổn định cấu trúc trong 1 giờ ở nhiệt độ 4-6°C, tỷ lệ thể tích dung dịch sodium alginate/IgY và môi trường vi bao là 1:20 [5, 6].

Hạt vi bao sau khi ổn định cấu trúc, tiến hành lọc qua vải lọc để thu hạt. Sau đó dùng nước cất để rửa hạt. Hạt vi bao sau lọc sẽ được tiến hành sấy thăng hoa bằng thiết bị FDU-2100 (Eyela, Nhật Bản) ở áp suất 3,6 Pa, nhiệt độ đông lạnh được điều chỉnh ở -30°C, thời gian sấy 16-17 giờ, để thu chế phẩm vi bao. Nghiên cứu này khảo sát ảnh hưởng của các chất bao gồm: nồng độ sodium alginate (1,5, 2, 3,5, 3%w/v), nồng độ chitosan (0,15, 0,2, 0,25, 0,3%w/v) và pH môi trường vi bao (3, 3,5, 4, 5, 6) đến hiệu quả của quá trình vi bao kháng thể IgY kháng EV71 trong khuôn gel chitosan - alginate. Đồng thời, khảo sát độ bền của chế phẩm vi bao ở điều kiện mô phỏng môi trường trong dạ dày (simulated gastric fluid - SGF) và đánh giá hoạt tính của chế phẩm sau khi sấy thăng hoa thông qua hàm lượng kháng thể IgY, hoạt tính kháng thể IgY còn lại trong hạt vi bao.

### 2.3. Xác định hiệu quả vi bao (Encapsulation efficiency - EE%)

Cân 10 mg chế phẩm vi bao sau khi sấy cho vào 5 ml hỗn hợp phá hạt gồm:  $NaHCO_3$  0,2 M,  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$  0,06 M, pH 8,0. Khuấy mẫu liên tục trong 15-20 phút hoặc cho đến khi hạt vi bao được phá hủy hoàn toàn. Sau đó tiến hành ly tâm (8000 RCF, 4°C, 15 phút). Lấy phần dịch nước để đo mẫu. Mẫu được đo bằng phương pháp Bradford [6, 7].

$$EE (\%) = \frac{\text{Tổng lượng IgY trong hạt vi bao}}{\text{Lượng IgY ban đầu}} \times 100$$

### 2.4. Xác định độ bền của chế phẩm vi bao với điều kiện mô phỏng môi trường dạ dày (Simulated gastric fluid - SGF)

Môi trường mô phỏng dạ dày bao gồm: 3,2 mg/ml enzyme Pepsin hòa tan trong NaCl 0,03 M, ở pH 1,2.

Cân 25 mg chế phẩm vi bao sau khi đã sấy thăng hoa cho vào 5 ml SGF, ủ ở 37°C, lắc liên tục (100 vòng/phút). Thí nghiệm được thực hiện trong tube ly tâm 15 ml.

Song song, thực hiện thí nghiệm cho dung dịch kháng thể IgY chưa vi bao như sau: Cho 0,15 ml dung dịch kháng thể IgY vào 5 ml SGF, ủ ở 37°C, lắc liên tục (100 vòng/ phút trong tube ly tâm 15 ml).

Tiến hành lấy 200 µl mẫu tại các thời điểm: 0, 0,5, 1, 2, 3, 4 giờ. Tại từng thời điểm sau khi lấy mẫu sẽ bổ sung lại vào mẫu dung dịch SGF bằng đúng lượng thể tích lấy mẫu ra.

Lượng mẫu tại từng thời điểm sau khi lấy sẽ được trung hòa bằng 200 µl dung dịch đệm Tris - HCl 2M (pH 8,0). Thử lại pH mẫu, đảm bảo pH được duy trì 7-8. Hoạt tính kháng thể IgY được đo bằng phương pháp ELISA. Độ bền của chế phẩm vi bao được tính dựa trên phần trăm hoạt tính kháng thể IgY giải phóng theo công thức [2, 6].

$$\% \text{ Hoạt tính IgY giải phóng} = \frac{\text{Hoạt tính IgY ban đầu} - \text{Hoạt tính IgY tại từng thời điểm}}{\text{Hoạt tính IgY ban đầu}} \times 100$$

## 2.5. Xác định hoạt tính kháng thể bằng phương pháp ELISA

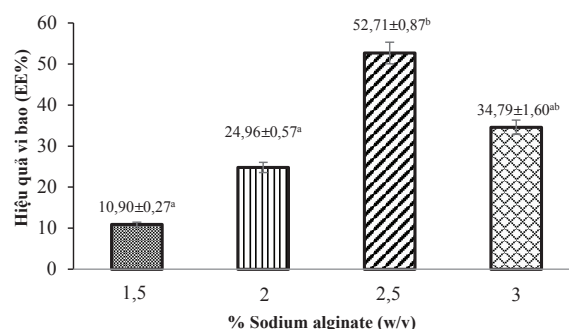
Hoạt tính kháng thể IgY trong mẫu được xác định bằng phương pháp ELISA gián tiếp. Phù giống với kháng nguyên Enterovirus 71 (100 µl/giếng) nồng độ 10 µg/ml và ủ đĩa qua đêm ở 4°C. Rửa đĩa 3 lần với PBST và khóa màng với 200µl dung dịch PBST + 10% skimmilk, ủ ở 37°C trong 2 giờ. Sau khi rửa đĩa 3 lần với PBST ủ đĩa với kháng thể IgY mẫu (độ pha loãng từ 1:100 đến 1:10000) 100 µl/giếng, ủ ở 37°C trong 2 giờ. Tiếp tục rửa đĩa 3 lần với PBST và bổ sung 100 µl/giếng kháng thể IgY thứ cấp - cộng hợp HRP (Horseradish peroxidase) (độ pha loãng 1/4000), ủ ở 37°C, 1 giờ. Rửa đĩa 4 lần với PBST và bổ sung OPD 100 µl/giếng, ủ ở 37°C trong 20-30 phút. Để ngừng phản ứng, bổ sung H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,25M 100 µl/giếng [6]. Tiến hành đọc kết quả ở bước sóng 490 nm bằng máy đọc ELISA (Thermo Scientific, Mỹ).

## 3. Kết quả và bàn luận

### 3.1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ sodium alginate đến hiệu quả vi bao

Thí nghiệm khảo sát nồng độ sodium alginate được thực hiện theo quy trình vi bao kháng thể IgY. Trong đó, chất bao và môi trường vi bao được cố định: nồng độ chitosan: 0,2% (w/v), nồng độ CaCl<sub>2</sub>: 1,5% (w/v), pH 4. Sodium alginate khảo sát ở các nồng độ: 1,5, 2, 2,5 và 3% (w/v). Sau đó, mẫu hạt vi bao được xử lý theo phương pháp xác định hiệu quả vi bao.

Ảnh hưởng của nồng độ sodium alginate đến hiệu quả vi bao được thể hiện ở hình 1.

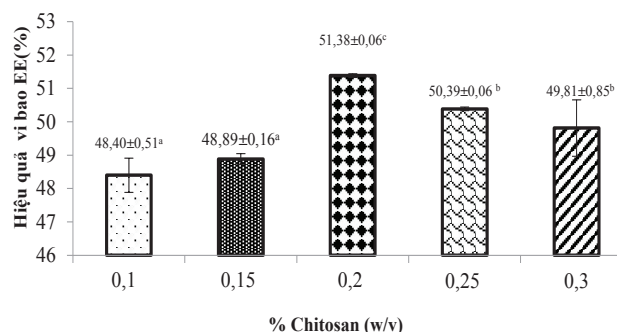


Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ sodium alginate đến hiệu quả vi bao. Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± SD (n=3). Các chữ cái khác nhau ở cột thể hiện sự khác biệt có nghĩa về mặt thống kê (p<0,05).

Hiệu quả vi bao được đánh giá thông qua tỷ lệ kháng thể IgY được giữ lại trong hạt. Theo đó, khi tăng nồng độ sodium alginate, hiệu quả vi bao có xu hướng tăng dần từ nồng độ sodium alginate 1,5 đến 2,5% (w/v). Hiệu quả vi bao đạt cao nhất 52,7% tại nồng độ sodium alginate 2,5% (w/v) nhưng giảm khi tiếp tục tăng nồng độ sodium alginate lên 3% (w/v). Theo K. Punyokun và cs (2015) [3], khi tăng nồng độ sodium alginate trên 2% (w/v) gây khó khăn cho việc tạo hạt do độ nhớt sodium alginate cao sẽ làm tắc nghẽn đầu phun tạo hạt. Thực nghiệm cho thấy, tại các nồng độ sodium alginate thấp hơn 2% (w/v), cấu trúc hạt không ổn định, có xu hướng tạo thành các mảnh vi bao nhỏ và không giữ được cấu trúc hạt khi tạo hạt. Ngược lại, khi tăng nồng độ alginate lớn hơn 2,5% (w/v), hạt vi bao có xu hướng kết dính lại và tạo thành các khối hạt lớn hơn.

### 3.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chitosan đến hiệu quả vi bao

Thí nghiệm khảo sát nồng độ chitosan được thực hiện theo quy trình vi bao kháng thể IgY. Trong đó, chất bao và môi trường vi bao được cố định: nồng độ sodium alginate: 2,5% (w/v), nồng độ CaCl<sub>2</sub>: 1,5% (w/v), pH môi trường vi bao: 3,5. Khảo sát chitosan ở các nồng độ: 0,1, 0,15, 0,2, 0,25 và 0,3% (w/v). Mẫu hạt vi bao được xử lý theo phương pháp xác định hiệu quả vi bao.

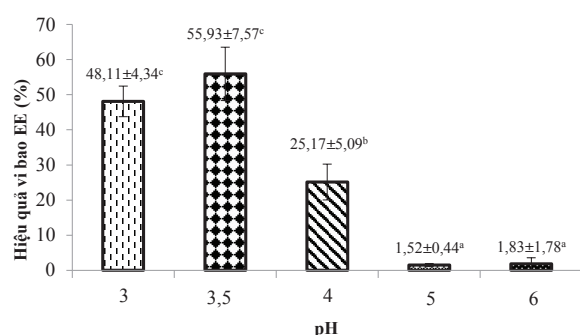


Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan đến hiệu quả vi bao. Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± SD (n=3). Các chữ cái khác nhau ở cột thể hiện sự khác biệt có nghĩa về mặt thống kê (p<0,05).

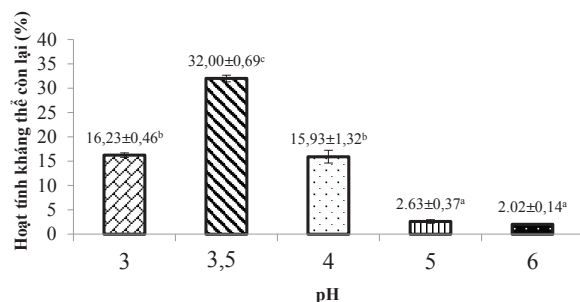
Hiệu quả vi bao (hình 2) đạt cao nhất tại nồng độ chitosan 0,2% (w/v) với khả năng giữ kháng thể IgY trong hạt đạt 51,4%. So sánh với một số nghiên cứu trước, theo X.Y. Li và cs (2009) [7] qua đánh giá khả năng tải IgY của hạt vi bao cho thấy, chitosan ở nồng độ từ 0,05 đến 0,1% (w/v) tăng tỷ lệ tải IgY từ 8 đến 13,3%. Nồng độ chitosan từ 0,2 đến 0,8% (w/v) làm tăng thêm khả năng tải IgY ở mức 19,7%. Tỷ lệ tải IgY tối đa (19,7%) đạt được ở 0,2% (w/v). Tiếp tục tăng nồng độ chitosan, tải IgY không tăng. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ chitosan đến hiệu quả vi bao EE% trong quá trình bao gói cùng alginate cũng đã được các tác giả khác thực hiện để cải thiện hiệu quả vi bao EE% của dextran, ampicillin, albumin huyết thanh bò, và hemoglobin. Các kết quả này đều cho thấy, tỷ lệ tải IgY và EE% tăng khi tăng nồng độ chitosan là do sự hình thành màng vi bao có liên kết chặt chẽ làm ổn định, tăng liên kết trong mạng lưới gel ion và hạn chế tổn hao protein, khuếch tán trong suốt quá trình tạo hạt [7].

### 3.3. Khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường vi bao đến khả năng vi bao

Thí nghiệm khảo sát pH môi trường vi bao được thực hiện theo quy trình vi bao kháng thể IgY. Trong đó, chất bao và môi trường vi bao được cố định: nồng độ chitosan: 0,2% (w/v), nồng độ sodium alginate: 2,5% (w/v), nồng độ  $\text{CaCl}_2$ : 1,5% (w/v). pH môi trường vi bao khảo sát ở các giá



Hình 3. Ảnh hưởng của pH đến hiệu quả vi bao. Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± SD (n=3). Các chữ cái khác nhau ở cột thể hiện sự khác biệt có nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0,05$ ).



Hình 4. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính kháng thể IgY còn lại. Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± SD (n=3). Các chữ cái khác nhau ở cột thể hiện sự khác biệt có nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0,05$ ).

trị: 3, 3,5, 4, 5, 6. Mẫu hạt vi bao được xử lý theo phương pháp xác định hiệu quả vi bao. Hiệu quả vi bao kháng thể IgY được đánh giá bằng phương pháp Bradford và hoạt tính kháng thể còn lại trong hạt vi bao được xác định bằng phương pháp ELISA.

Khả năng vi bao kháng thể IgY được đánh giá thông qua hiệu quả vi bao kháng thể IgY và hoạt tính kháng thể IgY còn lại trong hạt vi bao. Kết quả thí nghiệm như hình 3 và hình 4 cho thấy, khả năng vi bao kháng thể IgY đạt cao nhất tại pH 3,5, khi càng tăng giá trị pH hiệu quả vi bao có xu hướng giảm dần cả về nồng độ IgY và hoạt tính kháng thể. Tùy thuộc vào độ pH của môi trường vi bao mà dung dịch sodium alginate/IgY tạo hạt, mức độ ion hóa trên bề mặt của alginate thay đổi và tăng theo pH môi trường vi bao. Trong khoảng pH này (từ 3 đến 5), mức độ ion hóa chitosan không thay đổi đáng kể [8]. Tại pH 5,0, cả hai chất đa điện ly đạt mức độ ion hóa khoảng 70-80%, và do đó các polysaccharide này có thể duy trì cấu trúc bền vững hình thành mạng lưới liên kết dày đặc. Tại các pH >5,0, khả năng ion hóa của chitosan bị ức chế và chitosan có thể tạo thành một số kiểu vòng chuỗi [9]. Sự hình thành vòng chuỗi như vậy làm cho màng chitosan - alginate kém dày đặc và làm tăng khả năng IgY phóng thích ra ngoài môi trường. Tương tự, ở các giá trị pH vi bao thấp hơn 3,0, chitosan ion hóa hoàn toàn, trong khi alginate ở bề mặt hạt vi bao mang điện tích âm nhỏ vì khả năng ion hóa thấp và không thể liên kết chặt chẽ với chitosan do vậy màng vi bao được hình thành kém dày đặc.

Theo kết quả thực nghiệm này thì hiệu quả vi bao và khả năng vi bao kháng thể IgY đạt cao nhất tại pH 3,5, cho thấy ở pH này, trong quá trình tạo hạt vi bao, khi cho hỗn hợp IgY/sodium alginate vào môi trường vi bao chứa chitosan và  $\text{CaCl}_2$ , các chất bao đã tạo lớp màng chitosan - alginate bảo vệ khá tốt kháng thể IgY nhờ vậy giảm thiểu ảnh hưởng của pH môi trường vi bao đến tính chất và hoạt tính của IgY.

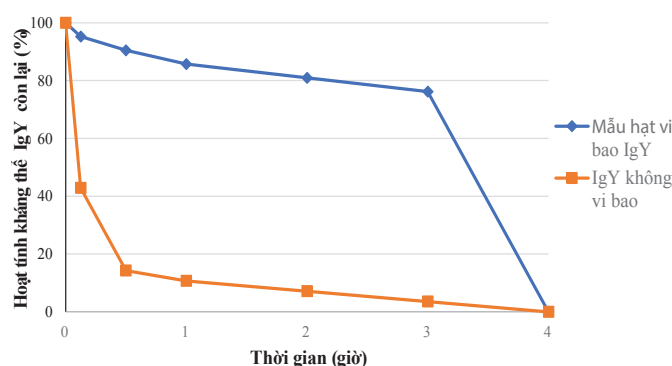
### 3.4. Khảo sát độ bền chế phẩm vi bao trong điều kiện mô phỏng môi trường dạ dày

Thí nghiệm khảo sát độ bền của chế phẩm vi bao trong điều kiện mô phỏng môi trường dạ dày được thực hiện theo điều kiện mô phỏng dạ dày có sử dụng enzyme pepsin như phương pháp xác định độ bền của chế phẩm vi bao với điều kiện mô phỏng môi trường dạ dày.

**Bảng 1. Hoạt tính kháng thể IgY còn lại trong SGF.**

| Thời gian (giờ) | Hoạt tính IgY còn lại (%) |                  |
|-----------------|---------------------------|------------------|
|                 | Mẫu hạt vi bao IgY        | IgY không vi bao |
| 0               | 100                       | 100              |
| 0,125           | 95,24±0,56                | 42,86±0,81       |
| 0,5             | 90,48±0,71                | 14,29±1,06       |
| 1               | 85,71±0,31                | 10,71±0,74       |
| 2               | 80,95±0,92                | 7,14±1,41        |
| 3               | 76,19±0,87                | 3,57±0,68        |
| 4               | 0                         | 0                |

Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± SD (n=3).



**Hình 5. Độ bền của chế phẩm vi bao trong điều kiện mô phỏng môi trường dạ dày.** Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± SD (n=3).

Điều kiện mô phỏng môi trường dạ dày (SGF) được sử dụng để đánh giá độ ổn định của chế phẩm vi bao kháng thể IgY *in vitro*. Theo kết quả như hình 5 và bảng 1, IgY không vi bao đã bị thủy phân dưới tác dụng của enzyme pepsin. Sau 1 giờ, trong SGF, chỉ còn 10,71% hoạt tính kháng thể IgY. Trong khi đó, độ ổn định của IgY trong SGF đã được cải thiện đáng kể khi được vi bao bằng màng chitosan - alginate. Hoạt tính kháng thể của IgY được vi bao, sau 3 giờ trong SGF vẫn còn 76,19%. Một số nghiên cứu trước đây cũng cho thấy điều tương tự. Theo M. Shimizu và cs (1988) [10] kháng thể IgY không được vi bao rất nhạy cảm với môi trường dịch vị dạ dày, và hoạt tính kháng thể nhanh chóng mất đi trong SGF, còn IgY trong chế phẩm vi bao giữ được hoạt tính sau 2 giờ ở SGF [10]. Chính màng interphase chitosan - alginate hoạt động như một hàng rào ngăn cản các ion hydrogen ( $H^+$ ). Hơn nữa, hạt vi bao bằng chitosan - alginate còn cho thấy vai trò quan trọng trong việc bảo vệ kháng thể IgY khỏi quá trình thủy phân bởi pepsin trong dịch dạ dày. Theo X.Y. Li và cs (2007) [6], trong khoảng pH môi trường vi bao khảo sát từ pH 3 đến 6, kháng thể IgY khi được vi bao giữ được 61,36-74,61% hoạt tính sau 2 giờ trong môi trường mô phỏng dịch dạ dày (SGF).

### 3.5. Đánh giá hoạt tính của chế phẩm sau khi sấy thăng hoa

Chế phẩm vi bao sau khi sấy thăng hoa được tiến hành đánh giá thông qua hàm lượng kháng thể IgY và hoạt tính kháng thể IgY còn lại. Mẫu hạt vi bao được xử lý theo phương pháp xác định hiệu quả vi bao, đo mẫu bằng hai phương pháp: phương pháp Bradford và phương pháp ELISA. Hàm lượng kháng thể IgY còn lại trong hạt vi bao được trình bày ở bảng 2.

**Bảng 2. Hàm lượng kháng thể IgY còn lại trong hạt vi bao.**

| Mẫu | Nồng độ protein (mg/ml) | Thể tích mẫu (ml) | Nồng độ protein mẫu stock (mg/ml) | Hiệu quả vi bao (%) |
|-----|-------------------------|-------------------|-----------------------------------|---------------------|
| 1   | 1,70                    | 5                 | 12,95                             | 65,52               |
| 2   | 1,66                    | 5                 |                                   | 64,09               |
| 3   | 1,61                    | 5                 |                                   | 62,17               |

Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình (n=3).

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, hàm lượng kháng thể còn lại trong chế phẩm vi bao sau sấy thăng hoa đạt hiệu quả trung bình là 63,93%. Trong nghiên cứu của X.Y.Li và cs (2007) [6] hiệu quả vi bao đạt 73,93% tại pH 3,5.

Hoạt tính kháng thể IgY còn lại trong hạt vi bao được trình bày ở bảng 3.

**Bảng 3. Hoạt tính kháng thể IgY còn lại trong hạt vi bao.**

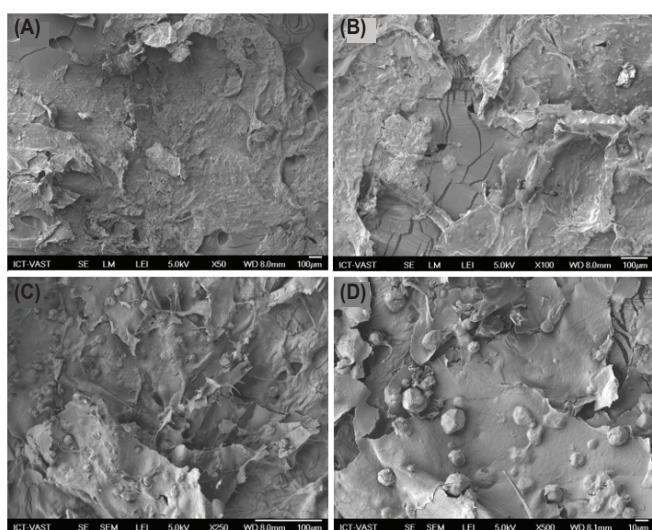
| Mẫu | Hàm lượng IgY trong mẫu vi bao (mg/ml) | Hàm lượng IgY mẫu stock (mg/ml) | Hoạt tính kháng thể còn lại (%) |
|-----|----------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 1   | 1,24                                   |                                 | 43,61                           |
| 2   | 0,75                                   | 2,84                            | 26,40                           |
| 3   | 0,99                                   |                                 | 35,02                           |

Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình (n=3).

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, hoạt tính kháng thể IgY còn lại trong chế phẩm vi bao trung bình là 35,01%. Như vậy, trong 63,93% hàm lượng IgY được vi bao trong hạt thì có khoảng một nửa lượng kháng thể IgY còn hoạt tính trong hạt vi bao.

### 3.6. Cấu trúc hạt vi bao

Cấu trúc hình thái hạt vi bao kháng thể IgY được phóng đại trên ảnh kính hiển vi điện tử quét (Scanning electron microscopy - SEM) FSEM 7401F tại Phòng Thí nghiệm Hóa sinh, Viện Công nghệ Hóa học, số 1 Mạc Đĩnh Chi, TP Hồ Chí Minh.



Hình 6. Hình ảnh chụp SEM chế phẩm vi bao sau sấy thăng hoa. (A) Độ phóng đại X50; (B) Độ phóng đại X100; (C) Độ phóng đại X250; (D) Độ phóng đại X500.

Qua kết quả chụp SEM như hình 6 cho thấy, kích thước hạt vi bao  $\leq 10 \mu\text{m}$ . Có rất nhiều hạt vi bao trong một hạt chế phẩm vi bao sau sấy tạo thành khối hạt vi bao. Nhìn chung, cấu trúc hạt vi bao xốp, bề mặt khối hạt có các vết nứt gãy có thể do trong quá trình sấy thăng hoa, trải qua giai đoạn lạnh đông sâu ở nhiệt độ  $-30^\circ\text{C}$  làm hình thành các tinh thể đá gây ảnh hưởng đến cấu trúc màng bao sau khi sấy thăng hoa.

Theo nghiên cứu của K. Punyokun và cs (2015) [3], đường kính trung bình của các hạt vi bao chitosan - alginate được đo bằng kính hiển vi soi ngược là từ  $1.000-1.500 \mu\text{m}$ . Tuy nhiên, kích thước hạt vi bao giảm xuống còn  $100-200 \mu\text{m}$  khi được nạp khí  $0,3 \text{ m}^3/\text{giờ}$  trong suốt quá trình tạo hạt vi bao.

W. Chen và cs (2013) [11] đã nghiên cứu vi bao kháng thể IgY bằng vật liệu vi bao sodium alginate và dầu đậu nành. Kết quả chụp SEM hạt vi bao alginate cho thấy, kích thước hạt vi bao khoảng  $10 \mu\text{m}$ . Các vết nứt gãy xuất hiện trên bề mặt do trong quá trình chuẩn bị mẫu khi đông lạnh hạt vi bao alginate trong nitơ lỏng và sau đó sấy khô dưới điều kiện áp suất chân không. Dựa trên các kết quả chụp SEM, các hạt vi bao có cấu trúc mạng lưới xốp, kích thước lỗ từ  $5$  đến  $100 \text{ nm}$ , với kích thước lỗ rỗng chiếm ưu thế từ  $30$  đến  $50 \text{ nm}$ .

#### 4. Kết luận và kiến nghị

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành khảo sát ảnh hưởng của các chất bao và điều kiện vi bao đến hiệu quả của quá trình vi bao kháng thể IgY kháng EV71 trong mạng gel chitosan - alginate. Kết quả nghiên cứu đã chọn được điều kiện vi bao kháng thể IgY kháng EV71, đạt hiệu quả cao nhất ở nồng độ sodium alginate  $2,5\%$  (w/v), pH môi trường vi bao  $3,5$ , nồng độ chitosan  $0,2\%$ . Khi đó hàm lượng kháng thể IgY kháng EV71 được giữ lại trong chế phẩm vi bao đạt  $63,93\%$  và hoạt tính kháng thể IgY kháng

EV71 còn lại trong chế phẩm vi bao:  $35,01\%$ . Kết quả khảo sát độ bền của chế phẩm vi bao ở điều kiện mô phỏng môi trường trong dạ dày (SGF) cho thấy, độ ổn định của IgY trong SGF đã được cải thiện đáng kể khi được vi bao bằng chitosan - alginate, hoạt tính kháng thể của IgY vẫn còn tới  $76,19\%$  sau  $3$  giờ trong SGF. Cần có những nghiên cứu tiếp tục để tối ưu hóa quá trình vi bao kháng thể IgY kháng EV71 nhằm tăng hàm lượng kháng thể IgY và hoạt tính kháng thể IgY còn lại trong hạt vi bao.

#### LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi gửi lời cảm ơn chân thành đến PGS.TS Cao Thị Bảo Vân, ThS Phạm Thanh Hồng ở Phòng Thí nghiệm Sinh học phân tử - Khoa Vi sinh Miễn dịch, Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh đã cung cấp kháng thể và hỗ trợ phương tiện giúp chúng tôi thực hiện đề tài này.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] X.Y. Zhang, R.S.V. Pires, P.M. Morgan, et al. (2021), *IgY-Technology: Production and Application of Egg Yolk Antibodies*, Switzerland: Springer Cham, pp.162-165, DOI: 10.1007/978-3-030-72688-1.
- [2] P.L. Lam, R. Gambari (2014), "Advanced progress of microencapsulation technologies: *In vivo* and *in vitro* models for studying oral and transdermal drug deliveries", *Journal of Controlled Release*, **178**, pp.25-45, DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.12.028.
- [3] K. Punyokun, R. Hongprayoon, P. Srisapoome, et al. (2015), "Influence of chitosan - alginate microcapsules containing anti-vibrio harveyi IgY in the gastrointestinal tract simulation", *Modern Applied Science*, **9**, pp.110-117, DOI: 10.5539/mas.v9n12p110.
- [4] A. Karim, A. Rehman, J. Feng, et al. (2022), "Alginate-based nanocarriers for the delivery and controlled-release of bioactive compounds", *Advances in Colloid and Interface Science*, **307**, DOI: 10.1016/j.cis.2022.102744.
- [5] R. Ghaffarian, EP. Herrero, H. Oh, et al. (2016), "Chitosan-alginate microcapsules provide gastric protection and intestinal release of ICAM-1-targeting nanocarriers, enabling GI targeting *in vivo*", *Advanced Functional Materials*, **26**, pp.3382-3392, DOI:10.1002/adfm.201600084.
- [6] X.Y. Li, L.J. Jin, T.A.M. Allister, et al. (2007), "Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, pp.2911-2917, DOI: 10.1021/jf062900q.
- [7] X.Y. Li, L.J. Jin, Y.N. Lu, et al. (2009), "Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY): Effects of chitosan concentration", *Humana Press*, **159**, pp.778-787, DOI: 10.1007/s12010-009-8628-6.
- [8] M.L. Huguet, E. Dellacherie (1996), "Calcium alginate beads coated with chitosan: Effect of the structure of encapsulated materials on their release", *Process Biochemistry*, **31**, pp.745-751, DOI: 10.1016/S0032-9592(96)00032-5.
- [9] K.Y. Lee, W.H. Park, W.S. Ha (1998), "Polyelectrolyte complexes of sodium alginate with chitosan or its derivatives for microcapsules", *Journal of Applied Polymer Science*, **63**, pp.425-432, DOI: 10.1002/(SICI)1097-4628(19970124)63:4%3C425::AID-APP3%3E3.0.CO;2-T.
- [10] M. Shimizu, R.C. Fitzsimmons, S. Nakai (1988), "Anti-*E.coli* Immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient", *Journal of Food Science*, **53**, pp.1360-1368, DOI: 10.1111/j.1365-2621.1988.tb09277.x.
- [11] W. Chen, J.H. Kim, D. Zhang, et al. (2013), "Microfluidic one - step synthesis of alginate microspheres immobilized with antibodies", *Journal of The Royal Society Interface*, **10**, pp.1-8, DOI: 10.1098/rsif.2013.0566.