

NGHIÊN CỨU TINH SẠCH FUCOIDAN THU NHẬN TỪ RONG *Ceratophyllum submersum*

Võ Thị Tuyết Hoa, Nguyễn Trí Khôi, Hoàng Thị Ngọc Nhon*

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: *nhonhtn@cntp.edu.vn*

Ngày nhận bài: 10/7/2019; Ngày chấp nhận đăng: 05/9/2019

TÓM TẮT

Fucoidan là một polysaccharide sulfate dị thể với thành phần cấu tạo phức tạp, hợp chất này có chứa fucose polysaccharide (FCSPs), có mặt trong rong biển, có nhiều hoạt tính sinh học giá trị như: chống ung thư, miễn dịch, chống viêm, kháng virus, chống đông máu, chống oxy hóa... Nghiên cứu này trình bày các yếu tố ảnh hưởng đến độ tinh sạch của fucoidan trích ly từ rong *Ceratophyllum submersum* hay còn được gọi là rong đuôi chó (được thu nhận tại tỉnh Sóc Trăng) bằng phương pháp sắc ký lọc gel Sephadex, sắc ký trao đổi ion DEAE-cellulose và xác định phổ đồ fucoidan bằng phương pháp phổ hồng ngoại IR. Tinh sạch bằng sắc ký trao đổi ion ở thời gian lưu 2 giờ, tốc độ dòng 1 mL/phút và nồng độ muối 0,5M, fucoidan thu được đạt độ tinh khiết (62,05%). Tinh sạch fucoidan bằng phương pháp sắc ký lọc gel ở các điều kiện: Tris-HCl ở pH 7, nồng độ muối NaCl 0,5M thu được fucoidan có độ tinh sạch (28,64%). Như vậy, phương pháp sắc ký trao đổi ion có hiệu quả hơn phương pháp sắc ký lọc gel trong việc tinh sạch fucoidan từ rong *C. submersum*.

Từ khóa: *Ceratophyllum submersum*, DEAE-cellulose, IR, fucoidan, lọc gel Sephadex.

1. MỞ ĐẦU

Fucoidan là một polysaccharide sulfate dị thể với thành phần cấu tạo phức tạp, hợp chất này có chứa fucose polysaccharides (FCSPs), phổ biến trong rong biển [1, 2]. Fucoidan đầu tiên được phân lập và xác định là một polysaccharide có chứa L-fucose, D-xylose và các hợp chất như D-galactose và uronic axit [3, 4]. Fucoidan là một hợp chất đa dạng về công thức cấu tạo nên có nhiều hoạt tính sinh học đáng được quan tâm, được ứng dụng cho thực phẩm chức năng, chống ung thư, miễn dịch, chống viêm, kháng u, kháng bổ thể (anticomplementary), kháng virus, thuốc chống đông máu, chống tạo mạch (antiangiogenic) và chất chống oxy hóa [5, 6]. Rong biển được biết đến là nguồn fucoidan lớn nhất, nhưng nguồn lợi này chưa được khai thác thỏa đáng. Cấu trúc của fucoidan rong biển vô cùng phức tạp và không đồng nhất [7] với những thay đổi về mô hình liên kết, sự phân nhánh, vị trí nhóm sulfate cũng như các gốc đường trong polysaccharide này phụ thuộc vào nguồn gốc của chúng [7].

Ngày nay, phương pháp trích ly fucoidan thường được tiến hành theo các bước tiền xử lý khác nhau, tuy nhiên vẫn dựa trên nguyên tắc sử dụng dung môi cho quá trình trích ly, kết tủa và chạy cột sắc ký để tinh sạch fucoidan có trong dịch trích. Tiền xử lý là cần thiết để loại bỏ chất màu, lipid, mannitol, muối và các hợp chất có khối lượng phân tử nhỏ khác. Hệ MeOH-CHCl₃-H₂O với tỷ lệ 4:2:1 [1] hoặc ethanol 80-85% là hai phương pháp thường được sử dụng để xử lý nguyên liệu trước khi trích ly [8]. Theo các nghiên cứu tách chiết fucoidan bằng dung dịch axit (chẳng hạn như HCl) sẽ tăng hiệu suất trích ly fucoidan. Việc trích ly bằng dung môi là axit [9] hoặc nước nóng với nhiệt độ 60-100 °C [7] và CaCl₂ đôi khi được

sử dụng để kết tủa alginate trong quá trình chiết có thể làm tăng độ tinh khiết của fucoidan nhưng lại có thể làm giảm hiệu suất thu hồi.

Trong nghiên cứu này trình bày các phương pháp xác định độ tinh sạch của fucoidan từ rong *Ceratophyllum submersum*.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu rong *C. submersum* được thu hái ở huyện Diên Châu, tỉnh Sóc Trăng sau đó được vận chuyển trong ngày đến phòng thí nghiệm. Tại đây rong được rửa bằng nước máy, loại bỏ các tạp chất bám trên rong... và bảo quản ở -5 °C. Trước khi thực hiện thí nghiệm, thực hiện sấy đối lưu ở 60 °C, nghiền thành bột bằng máy xay khô để sử dụng cho toàn bộ thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thực hiện trích ly fucoidan từ rong C. submersum

Trích ly fucoidan: Cân 10 g rong *C. submersum*, tiến hành vi sóng ở cường độ 700W trong thời gian 2,5 phút, tiếp tục xử lý với enzyme cellulase trong 3 giờ. Ly tâm thu bã, ngâm bã với hệ dung môi methanol-chloroform-nước có tỷ lệ 4:2:1 trong 15 giờ để loại các chất màu, lipid và các tạp chất khác. Tiến hành rửa bã và trích ly với HCl 0,85M, ở nhiệt độ 70°C trong 2 giờ, tỷ lệ nguyên liệu và dung môi (HCl 0,85M) là 1:20 (w/v). Thực hiện thu dịch, bổ sung TCA (axit trichloroacetic) tỷ lệ dịch trích/TCA (50:0,2), 1 giờ ở nhiệt độ 4°C sau đó ly tâm 5500 vòng/phút trong 10 phút loại tủa protein, thu dịch trích fucoidan.

Kết tủa fucoidan: Kết tủa fucoidan với ethanol 99% qua hai giai đoạn. Thêm cồn 99% vào bình chứa dịch trích với tỷ lệ 30:69 (w/w) để nồng độ cồn trong dung dịch là 30%, giữ ở nhiệt độ lạnh trong 2 giờ rồi ly tâm loại tủa thu dịch. Tiếp tục thêm cồn 99% vào dịch 29:40 (w/w) để nồng độ cồn là 70%, giữ ở 4 °C trong 2 giờ để kết tủa fucoidan, ly tâm 5500 vòng/phút trong 10 phút, thu tủa fucoidan.

2.2.2 Khảo sát tinh sạch fucoidan bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion.

Tiến hành tinh sạch fucoidan từ dịch trích: Hòa tan 1 g tủa fucoidan với 10 mL đệm Tris-HCl (pH 2), sau đó dịch hòa tan được cho vào cột sắc ký trao đổi ion DEAE-cellulose và rửa giải bằng dung dịch NaCl với các nồng độ 0,25M; 0,5M; 0,75M; 1M.

2.2.3. Khảo sát tinh sạch fucoidan bằng phương pháp sắc ký lọc gel

Tiến hành tinh sạch fucoidan từ dịch trích: Hòa tan 1 g tủa fucoidan với đệm Tris-HCl, ly tâm lấy dịch rồi cho vào cột sắc ký lọc gel với thể tích mẫu: 10 mL, khối lượng tủa: 1g, 2,5 g gel sephadex G-75, tốc độ dòng: 5 mL/10phút, khảo sát ở nhiệt độ phòng. Xác định độ tinh khiết fucoidan sau sắc ký lọc gel. Khảo sát pH của đệm (pH 6; 7; 8; 9) và nồng độ NaCl rửa giải được khảo sát (0,25M; 0,5M; 0,75M; 1M).

2.2.4. Xác định cấu trúc của fucoidan bằng phổ hồng ngoại

Phổ hồng ngoại FT-IR của fucoidan được ghi trên máy Tensor 37 Bruker - Đức với bộ tách tia KBr (đo tại Trung tâm phân tích trọng điểm - Trường Đại học Bách khoa TP.HCM)

trong vùng số sóng 4000-400 cm^{-1} . Dựa vào phổ IR trong vùng từ 800-1732 cm^{-1} , có thể xác định được các nhóm sulfate đặc trưng của fucoidan trong các phân tử đường nằm ở vị trí axial hay equatorial.

2.3. Phương pháp phân tích

Phương pháp xác định hàm lượng fucoidan bằng quang phổ

Thêm 1 mL dung dịch fucoidan ở mỗi nồng độ vào các ống nghiệm. Các ống nghiệm được làm lạnh ở nhiệt độ 4 °C (trong 2-3 phút), thêm 4,5 mL axit sulfuric (85%). Các ống nghiệm được đậy nắp kín để tránh bốc hơi và các ống được đặt trong bồn nước sôi, trong thời gian 10 phút. Các ống được làm nguội dưới vòi nước, sau đó thêm 0,3 mL axit cysteine hydrochloric 0,1% vào ống nghiệm. Các ống nghiệm được đặt trong bóng tối trong 2 giờ, đo độ hấp thụ trên quang phổ kế ở bước sóng 390 nm và 430 nm. Mẫu trắng được chuẩn bị bằng phương pháp tương tự. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần. Xác định hàm lượng fucoidan có trong mẫu bằng phương pháp đo quang phổ UV-VIS ở bước sóng 390 nm và 430 nm, theo đường chuẩn [10].

$$\text{Độ tinh khiết} = (\text{khối lượng fucoidan})/(\text{khối lượng chất khô})$$

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, kết quả được xử lý với phần mềm Microsoft Excel 2013, sự khác biệt và chọn các thông số phù hợp dựa trên kết quả phân tích của phần mềm IBM SPSS Statistics 20. Kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm sai số.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát tinh sạch fucoidan bằng phương pháp sắc ký ion

3.1.1. Ảnh hưởng của thời gian lưu

Thời gian lưu mẫu dịch trích với DEAE-cellulose tạo tương tác ion của fucoidan trong mẫu với DEAE-cellulose. Ảnh hưởng của thời gian lưu được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian lưu trong sắc ký trao đổi ion DEAE-cellulose

STT	Thời gian lưu mẫu (giờ)	Hàm lượng fucoidan (μg)	Độ tinh khiết (%)
1	0	125,28 ^a \pm 0,06	2,32 ^a \pm 0,03
2	2	1895,68 ^d \pm 0,51	32,28 ^d \pm 0,46
3	4	1067,64 ^c \pm 0,60	17,22 ^c \pm 0,68
4	6	630,85 ^b \pm 0,43	11,47 ^b \pm 0,42

Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì sự khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê theo phân tích ANOVA ($\alpha=0,05$)

Thời gian lưu mẫu trong cột sắc ký ion DEAE-cellulose ảnh hưởng đến hàm lượng và độ tinh khiết của fucoidan tại các phân đoạn thu hồi. Fucoidan thô được hòa tan trong dịch tạo thành mẫu lỏng, sau đó ly tâm để thu được dịch trong, loại bỏ sơ bộ các tạp chất không tan [11] rồi được nạp vào cột sắc ký DEAE-cellulose để tiến hành rửa giải với các nồng độ muối khác nhau [12, 13]. Việc hòa tan vào dịch tạo điều kiện cho gốc sulfate của fucoidan

(tích điện âm) dễ dàng bám lên bề mặt của bộ đệm DEAE, tuy nhiên cần có thời gian nhất định để quá trình này xảy ra. Theo Bảng 1, tại thời gian lưu 0 giờ cho hiệu suất tinh sạch thấp ($2,32 \pm 0,03\%$), điều này có thể giải thích do chưa đủ thời gian để fucoidan trong mẫu có thể bám lên bề mặt của bộ DEAE-cellulose nên ngay tại nồng độ muối đầu tiên đã rửa giải hoàn toàn mẫu cùng một hàm lượng lớn tạp chất ra khỏi cột sắc ký, dẫn đến hiệu suất tinh sạch thấp. Tuy nhiên, việc lưu mẫu lâu – khoảng vài giờ hoặc qua đêm không cho kết quả tốt [14], thực tế cho thấy, tại thời gian lưu 4 và 6 giờ, hiệu suất tinh sạch có tăng lên (so với 0 giờ) nhưng vẫn còn rất thấp ($11,47-17,22\%$). Lý giải cho việc này là do thời gian lưu mẫu vượt ngưỡng giới hạn, các gốc sulfate trong hợp chất galactofucan sulfate (GFS) lắng sâu và bám chặt vào DEAE-cellulose làm thay đổi độ pH của bộ đệm [15]. Cụ thể hơn, DEAE được xem là một bộ trao đổi ion yếu, các bộ trao đổi ion yếu có nhược điểm là các proton của bộ đệm rất dễ bị mất đi trong quá trình trao đổi ion trên cột sắc ký, dẫn đến việc pH của bộ đệm bị thay đổi [15]. Điều kiện nhiệt độ môi trường cũng tác động một phần lên cột sắc ký nếu ngâm mẫu quá lâu do ảnh hưởng trực tiếp lên quá trình điện ly nước trong dịch mẫu, tạo ra các ion H^+ và OH^- tồn tại trong cột, từ đó khiến việc rửa giải trở nên khó khăn hơn. Do đó, cần xác định rõ thời gian lưu mẫu hợp lý để thu được dịch tinh sạch có hiệu suất cao nhất. Ngoài thời gian lưu mẫu trong cột sắc ký, các yếu tố tác động trực tiếp lên độ tinh sạch của dịch trích còn có nồng độ muối rửa giải và tốc độ dòng chảy ra khỏi cột.

3.1.2. Ảnh hưởng nồng độ NaCl rửa giải

Sự trao đổi ion là sự gắn kết có tính chất thuận nghịch giữa các phân tử có mang điện tích. Trong sắc ký cột trao đổi ion, pha tĩnh (DEAE-cellulose) có gắn thêm nhóm chức mang điện tích. Fucoidan có điện tích ngược dấu với nhóm chức mang điện tích nên được giữ lại trên DEAE-cellulose. Việc giải ly fucoidan được thực hiện bằng cách gia tăng lực ion của dung dịch rửa giải bằng cách cho NaCl. Khi có thêm NaCl trong dung dịch đệm rửa giải, ion của dung dịch đệm sẽ cạnh tranh với hỗn hợp fucoidan, để giành lấy những nhóm chức của DEAE-cellulose, đẩy fucoidan ra khỏi DEAE-cellulose theo dòng chảy ra khỏi cột. Do đó, nồng độ NaCl có ảnh hưởng lớn đến độ tinh sạch của fucoidan tinh sạch. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl rửa giải trong sắc ký ion

STT	Nồng độ muối NaCl (M)	Hàm lượng fucoidan (μg)	Độ tinh khiết (%)
1	0	$172,73^a \pm 0,11$	$3,14^a \pm 0,16$
2	0,25	$1037,48^d \pm 0,54$	$28,13^d \pm 0,62$
3	0,5	$3056,75^c \pm 0,92$	$54,87^e \pm 0,89$
4	0,75	$831,04^c \pm 0,43$	$15,68^c \pm 0,43$
5	1	$541,72^b \pm 0,62$	$9,34^b \pm 0,69$

Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì sự khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê theo phân tích ANOVA ($\alpha=0,05$)

Kết quả Bảng 2 cho thấy, khi rửa giải bằng nồng độ muối 0,5M cho độ tinh khiết cao nhất $54,87 \pm 0,89\%$ và độ tinh khiết bắt đầu giảm dần từ nồng độ muối 0,5M; 0,75M; 1M. Quá trình rửa giải bắt đầu tại nồng độ muối 0,25M. Tại nồng độ muối này tiến hành rửa giải nhiều lần để loại đi các tạp chất và các chất bị rửa giải. Khi tiến hành rửa giải ở nồng độ 0,5M, do tạp chất đã được rửa giải ở nồng độ 0,25M, nên nồng độ 0,5M có độ tinh khiết cao hơn. Ở các nồng độ muối sau độ tinh khiết giảm dần vì hàm lượng fucoidan qua các phân đoạn ngày càng giảm, nhưng nồng độ muối càng tăng, dịch trong phân đoạn thu được lúc này chủ yếu là muối.

3.1.3. Ảnh hưởng của tốc độ dòng

Tốc độ dòng chảy là đại lượng có thể được xác định bằng tốc độ dòng thể tích, nghĩa là thể tích trên một đơn vị thời gian (mL/phút) [15], có ảnh hưởng trực tiếp đối với hiệu suất rửa giải của các cột sắc ký mớ (DEAE, Sephadex...) [17]. Ảnh hưởng của tốc độ dòng được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tốc độ dòng trong sắc ký ion

STT	Tốc độ dòng (mL/phút)	Hàm lượng fucoidan (μg)	Độ tinh khiết (%)
1	0,5	5564,16 ^c \pm 0,71	60,48 ^c \pm 0,75
2	1	5646,55 ^d \pm 0,69	62,05 ^d \pm 0,71
3	1,5	2825,39 ^b \pm 0,60	42,17 ^b \pm 0,55
4	2	1790,35 ^a \pm 0,72	29,35 ^a \pm 0,78

Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì sự khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê theo phân tích ANOVA ($\alpha=0,05$)

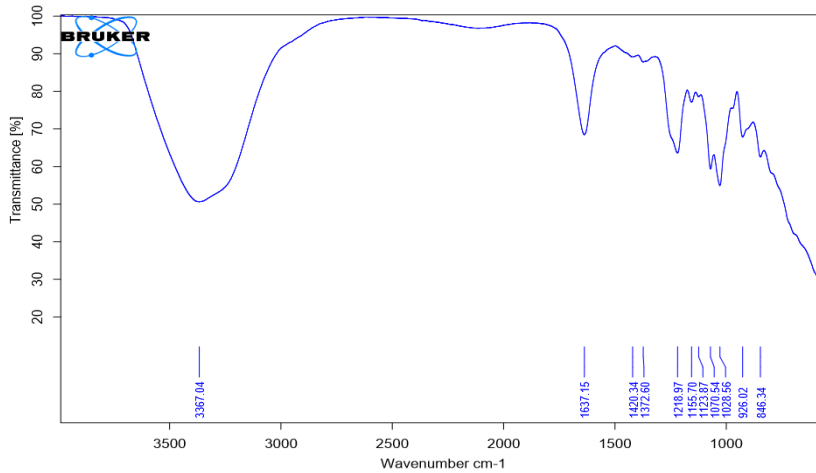
Cụ thể, tại tốc độ dòng 0,5 mL/phút và 1 mL/phút, hiệu suất tinh sạch khá cao (trên 60%), đây là khoảng thời gian được khuyến khích cho việc rửa giải các hợp chất polysaccharide sulfate (PS) bằng dãy nồng độ muối NaCl [18, 19] vì phản ứng trao đổi có thể diễn ra, thay thế của ion Cl⁻ và gốc sulfate trong fucoidan nhằm rửa giải được hàm lượng PS cao ở các phân đoạn tinh sạch thu được. Tuy nhiên, việc điều chỉnh tốc độ dòng xuống nhỏ hơn không đem lại hiệu quả cao do mẫu có thể bị ảnh hưởng bởi các yếu tố khác trong quá trình chờ được rửa giải [16]. Độ tinh sạch giảm mạnh được thể hiện qua việc tăng tốc độ dòng bởi các phản ứng hóa học chưa đủ thời gian để xảy ra, động lực liên kết giữa ion của dung dịch rửa giải với mẫu fucoidan bị giảm dẫn đến hiệu suất không cao ở các phân đoạn tinh sạch [17, 19]. Tốc độ dòng chảy cao có thể được sử dụng để cân bằng pH của dịch ra khỏi đầu cột, quá trình rửa mẫu ra khỏi cột hay tái cân bằng bộ đệm [15].

3.1.4. Xác định phổ IR của fucoidan

Sulfate là một trong những yếu tố quan trọng nhất quyết định hoạt tính sinh học của fucoidan, các hoạt tính quan trọng như kháng đông tụ máu và kháng ung thư của fucoidan phụ thuộc vào mật độ và vị trí của nhóm sulfate trên các gốc đường [20].

Fucoidan chiết xuất sau khi tinh sạch được phân tích bằng phương pháp IR (đây là phương pháp phân tích nhanh và thuận tiện để nghiên cứu cấu trúc phân tử thông qua việc sắp xếp các vạch phổ dao động tương ứng với nhóm nguyên tử nhất định trong phân tử). Dựa vào phổ IR (Hình 1), có thể xác định được các peak đặc trưng của nhóm sulfate trong các phân tử đường của fucoidan nằm ở vị trí axial hay equatorial trong 800-1732 cm⁻¹.

Kết quả phân tích phổ hồng ngoại của các phân đoạn fucoidan (Hình 1) có dải hấp thụ là đặc trưng liên kết glycosidic của C-O-C và C-O-H (1028-1637cm⁻¹) [21, 22], bên cạnh đó đều thu được những dải hấp thụ chính ở 1210-1250 cm⁻¹ (vùng dao động đặc trưng của liên kết S=O) và các dao động hấp thụ trong vùng số sóng từ 840-848 cm⁻¹ (vùng dao động của liên kết C-O-S) khẳng định sự có mặt của nhóm sulfate trên các gốc đường pyranose.



Hình 1. Kết quả xác định phổ đồ fucoidan bằng phương pháp IR

Ngoài ra, trên phổ hồng ngoại của mẫu fucoidan xuất hiện tín hiệu hấp thụ rộng ở 1218 cm^{-1} thuộc về dao động hóa trị S=O của nhóm sulfate, bên cạnh đó đỉnh hấp thụ mạnh tại 846 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị của liên kết C-O-S ở vị trí axial cho biết nhóm sulfate chủ yếu liên kết ở vị trí C4 của vòng α -L-fucopyranose. Tuy nhiên, dữ liệu phổ hồng ngoại chỉ cho biết thông tin nhóm sulfate ở vị trí axial (C4) hay equatorial (C2 hoặc C3) của vòng pyranose nói chung mà không phân biệt được nó thuộc vòng fucose hay galactose [23-25]. Các dao động hấp thụ ở vùng số sóng $820\text{-}828\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho liên kết C-O-S ở vị trí equatorial C2 hoặc/và C3, vùng $840\text{-}848\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho liên kết C-O-S ở vị trí axial C4, vùng $1240\text{-}1272\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho dao động hóa trị của S=O, vùng $1610\text{-}1625\text{ cm}^{-1}$ và 1410 cm^{-1} đặc trưng cho dao động đối xứng và không đối xứng của nhóm cacboxylat [23, 26-29].

Qua kết quả phân tích phổ IR một lần nữa khẳng định sự có mặt của nhóm sulfate trong phân tử fucoidan, cho biết một phần thông tin về vị trí nhóm sulfate chiếm ưu thế tại vị trí C4 hay vị trí C2/C3 trên gốc đường α -L-fucopyranose. Để xác định chính xác vị trí của các nhóm sulfate chúng ta cần thêm những thông tin từ phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR và phổ khối (MS).

3.2. Khảo sát tinh sạch fucoidan bằng phương pháp sắc ký lọc gel

3.2.1. Ảnh hưởng giá trị pH của đệm Tris-HCl

Ảnh hưởng của giá trị pH của đệm Tris-HCl đến sắc ký lọc gel Sephadex được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng giá trị pH của đệm Tris-HCl trong sắc ký lọc gel

STT	Giá trị pH	Hàm lượng fucoidan (μg)	Độ tinh khiết (%)
1	6	$168,75^a \pm 0,05$	$3,75^a \pm 0,05$
2	7	$1176,82^d \pm 0,15$	$20,29^d \pm 0,10$
3	8	$951,62^c \pm 0,07$	$15,86^c \pm 0,11$
4	9	$275,08^b \pm 0,09$	$5,98^b \pm 0,08$

Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì sự khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê theo phân tích ANOVA ($\alpha=0,05$)

Đối với phương pháp tinh sạch bằng sắc ký lọc gel, độ trương nở của các hạt gel có ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình và kết quả tinh sạch. Sự trương nở này chịu ảnh hưởng bởi cường độ ion và độ pH của dung dịch. Tuy nhiên, các bộ đệm trao đổi Sephadex A-25; C-25 hay G-75 có cấu trúc hạt khá cứng nên sự thay đổi kích thước lớp đệm hầu như ít chịu tác động bởi độ pH [19]. Nhưng kết quả tinh sạch của các thí nghiệm cho thấy có một sự khác biệt đáng kể giữa các giá trị pH. Điều này được lý giải do độ pH và lượng ion của bộ đệm cần đạt mức cân bằng (pH 7) để thuận lợi cho sự liên kết của các phân tử mẫu nằm trong dịch hòa tan được nạp vào cột sắc ký [15], ngoài lực đẩy của các nhóm tích điện sẽ ảnh hưởng đến kích thước của bộ đệm, gây ra sai số cho quá trình tinh sạch bởi pH nằm ngoài mức trung tính. Do đó, pH 7 được xem là mức tối thích cho hoạt động rửa giải fucoidan ra khỏi cột sắc ký lọc gel Sephadex G-75 [30, 31].

3.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl rửa giải

Tương tự như phương pháp sắc ký trao đổi ion, nồng độ NaCl khi rửa giải có ảnh hưởng đến hàm lượng và độ tinh sạch của fucoidan từ rong *C. submersum*. Ảnh hưởng này được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl rửa giải trong sắc ký lọc gel

STT	Nồng độ muối NaCl (M)	Hàm lượng fucoidan (μg)	Độ tinh sạch (%)
1	0,25	200,22 ^a \pm 0,03	4,26 ^a \pm 0,04
2	0,50	1518,98 ^c \pm 0,06	28,66 ^c \pm 0,06
3	0,75	1126,98 ^b \pm 0,06	20,87 ^b \pm 0,02
4	1,00	236,64 ^a \pm 0,05	4,93 ^a \pm 0,08

Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì sự khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê theo phân tích ANOVA ($\alpha=0,05$)

Từ kết quả thực nghiệm cho thấy, khi tiến hành rửa giải fucoidan bằng muối có nồng độ 0,5M được độ tinh khiết cao nhất 28,64%. Bản chất của sắc ký lọc gel là tinh sạch dựa vào trọng lượng phân tử, nồng độ muối rửa giải ảnh hưởng không đáng kể đến quá trình tinh sạch trong sắc ký lọc gel. Điều đó cho thấy rằng sắc ký lọc gel là phương pháp làm tăng độ tinh sạch của fucoidan trong các phân đoạn thu được. Tuy nhiên, cần nghiên cứu thực hiện kết hợp với phương pháp tinh sạch bằng sắc ký trao đổi ion để đạt được hiệu quả tinh sạch tốt hơn.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này cho thấy, các điều kiện khảo sát như: thời gian lưu, nồng độ muối, tốc độ dòng, độ pH của đệm ảnh hưởng nhiều đến kết quả tinh sạch fucoidan. Cùng một khối lượng tủa fucoidan thô ban đầu, sau khi thực hiện tinh sạch fucoidan từ rong *C. submersum* bằng phương pháp sắc ký ion và sắc ký lọc gel nhận thấy: phương pháp sắc ký trao đổi ion cho hiệu quả tốt hơn so với phương pháp sắc ký lọc gel. Ngoài ra thông qua phổ IR cho ta biết sự có mặt của nhóm sulfate trong mẫu fucoidan nghiên cứu và thông tin về vị trí của chúng trong các gốc đường pyranose thông qua dao động của liên kết C-O-S. Tuy nhiên, cần có những nghiên cứu kết hợp với các phương pháp khác để cho hiệu quả cao hơn.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này do Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. Hồ Chí Minh bảo trợ và cấp kinh phí theo Hợp đồng số 67/HĐ-DCT.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ale M.T., Mikkelsen J.D., Meyer A.S. - Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds, *Marine Drugs* **9** (10) (2011) 2106-2130.
2. Fitton J.H. - Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers, *Marine Drugs* **9** (10) (2011) 1731-1760.
3. Percival E. and McDowell R.H. - Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides, London and New York (1967) 219.
4. Ahmad T.B.S. - Methods for quantification and extraction of fucoidan, and quantification of the release of total carbohydrate and fucoidan from the brown algae *Laminaria hyperborea*, Norwegian University of Science and Technology, 2015.
5. Li B., Lu F., Wei X., and Zhao R. - Fucoidan: structure and bioactivity, *Molecules* **13** (8) (2008) 1671-1695.
6. Chandía N.P. and Matsuhira B. - Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties, *International Journal of Biological Macromolecules* **42** (3) (2008) 235-240.
7. Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., and Usov A.I. - Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C. Ag, *Carbohydrate research* **337** (8) (2002) 719-730.
8. Yang, C., Chung D., Shin I., Lee H., Kim J, Lee Y., You S. - Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity, *International Journal of Biological Macromolecules* **43** (5) (2008) 433-437.
9. Luo D., Zhang Q., Wang H., Cui Y., Sun Z., Yang J., Zheng Y., Jia J., Yu F., Wang X. - Fucoidan protects against dopaminergic neuron death in vivo and in vitro, *European Journal of Pharmacology* **617** (1-3) (2009) 33-40.
10. Dische and Shettles L.B. - A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination, *Journal of Biological Chemistry* **175** (2) (1948) 595-603.
11. Spirin P.A. and Garber B.M. - Protocols and tips in protein purification or How to purify protein in one day, The University of Sheffield, England 2008 134.
12. Isnansetyo A., Lutfia N.L.F., Nursid M., Trijoko, Susidarti A.R. - Cytotoxicity of fucoidan from three tropical brown algae against breast and colon cancer cell lines, *Pharmacogn Journal* **9** (1) (2017) 14-20.
13. Kim W., Kim S., Kim H. - Purification and Anticoagulant Activity of a Fucoidan from Korean *Undaria pinnatifida* Sporophyll, *Algae* **22** (3) (2007) 247-252.
14. Millah S. - Tips and Tricks for the Lab: Column Troubleshooting and Alternatives, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012
(https://www.chemistryviews.org/details/education/2345141/Tips_and_Tricks_for_the_Lab_Column_Troubleshooting_and_Alternatives.html)
15. GE Healthcare Bio-Sciences AB, Ion Exchange Chromatography Principles and Methods, 18, GE Healthcare Life Sciences, UK 2016 170.
16. Wilson K. & Walker J. - Basic guide to protein chromatography/ Purification, University of San Diego 2004.

17. Vaikundamoorthy R., Krishnamoorthy V., Vilwanathan R., Rajendran R. - Structural characterization and anticancer activity (MCF7 and MDA-MB-231) of polysaccharides fractionated from brown seaweed *Sargassum wightii*, International Journal of Biological Macromolecules **111** (2011) 1229-1237.
18. Hedhammar M., Eriksson Karlström A., Hober S. - Chromatographic methods for protein purification, Royal Institute of Technology, AlbaNova University Center Sweden 1991.
19. Pharmaci Biotech, Sephadex ion exchange media, Ion exchange chromatography, Sweden 1996.
20. Phạm Đức Thịnh - Nghiên cứu phân tích thành phần, cấu trúc hóa học của fucoidan có hoạt tính sinh học từ một số loài rong nâu ở vịnh Nha Trang, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam 2015.
21. Yu P. and Sun H. - Purification of a fucoidan from kelp polysaccharide and its inhibitory kinetics for tyrosinase, Carbohydrate polymers **99** (2014) 278-283.
22. Shanthi N., Eluvakkal T., and Arunkumar K. - Characterization of galactose rich fucoidan with anticoagulation potential isolated from *Turbinaria decurrens* Bory de Saint-Vincent occurring along the coast of Gulf of Mannar (Pamban), India, J. Pharmacogn. Phytochem **3** (2014) 132-137.
23. Bilan M. I., Grachev A. A., Ustuzhanina N. E., Shashkov A. S., Nifantiev N. E., and Usov A. I. - A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus* L, Carbohydrate research **339** (3) (2004) 511-517.
24. Yuan Y. and Macquarrie D. - Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity, Carbohydrate polymers **129** (2015) 101-107.
25. Rodriguez-Jasso R. M., Mussatto S. I., Pastrana L., Aguilar C. N., and Teixeira J. A. - Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed, Carbohydrate Polymers **86** (3) (2011) 1137-1144.
26. Nguyễn Duy Nhứt - Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của polysaccharide từ một số loài rong nâu ở tỉnh Khánh Hòa. Luận án tiến sỹ Hóa học, Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội 2008.
27. Trần Thị Thanh Vân - Nghiên cứu cấu trúc polysaccharide dạng agar chiết từ một số loài rong biển Việt Nam. Luận án tiến sỹ Hóa học, Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội 2007.
28. Duarate, Cardoso M., Nosedá M. - Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. Carbohydr. Res **333** (2001) 281-293.
29. Vishchuk O.S., Ermakova S.P., Zvyagintseva T.N. - Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity, Carbohydrate Research **346** (2011) 2769-2776.
30. Soeda S., Sakaguchi S., Shimeno H., Nagamatsu A. - Fibrinolytic and anticoagulant activities of highly sulfated fucoidan, Biochem Pharmacol **43** (8) (1992) 1853-1858.
31. Peranginangin R., Saepudin E., Bulletin S. - Purification and characterization of fucoidan from brown seaweed *Sargassum binderi* Sonder, Journal of Biological Chemistry **12** (3) (2016) 113-120.

ABSTRACT

STUDY ON FUCOIDAN PURIFICATION FROM *Ceratophyllum submersum* AGLA

Vo Thi Tuyet Hoa, Nguyen Tri Khoi, Hoang Thi Ngoc Nhon*

Ho Chi Minh City University of Food Industry

*Email: *nhonhtn@cntp.edu.vn*

Fucoidan is an heterozygous polysaccharide sulfate with complex composition, this compound contains fucose polysaccharide (FCSPs), presented in seaweed, has many interesting biological activities such as anti-cancer, immune, anti inflammation, antiviral, anticoagulant, antioxidant... This study conducted the fucoidan purification from *Ceratophyllum submersum* (collected in Dien Chau area, Soc Trang province) by Gel chromatography filtration and DEAE-cellulose ion exchange chromatography method. The result of ion exchange chromatography method at retention time of 2 hours, flow rate of 1 mL/minute and salt concentration of 0.5M, the purity of resulting fucoidan achieved (62.05%) was 2.16 times higher than gel filtration chromatography (28.64%).

Keywords: *Ceratophyllum submersum*, fucoidan, DEAE-cellulose, gel chromatography Sephadex.