

PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM CẤU TRÚC CỦA SULFATE POLYSACCHARIDE TÁCH CHIẾT TỪ LOÀI RONG SARGASSUM SERRATUM

Đến toà soạn 15-05-2024

Cao Thị Thúy Hằng¹, Bùi Văn Nguyên², Trần Thị Thanh Vân¹, Nguyễn Thị Thuận¹,
Trần Nguyễn Hà Vy¹, Võ Mai Như Hiếu¹, Đinh Thành Trung¹, Phạm Đức Thịnh^{1*}

¹Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang, Viện Hàn Lâm KH&CNVN

²Trường Đại học Khánh Hòa

*Email: duchinh@nitra.vast.vn

SUMMARY

ANALYSIS OF THE SULFATED POLYSACCHARIDE STRUCTURAL CHARACTERISTICS EXTRACTED FROM SARGASSUM SERRATUM SEAWEED

Fucoidan was isolated from Vietnamese brown seaweed *Sargassum serratum* and its structural characteristics were analyzed. Through chemical analysis, IR, and NMR spectroscopy, the structural features of *S. serratum* fucoidan were determined. The study identified *S. serratum* fucoidan as belonging to the galactofucan sulfate group. The primary constituents are α -L-fucose, β -D-galactose, xylose, mannose, rhamnose, and glucose, with a molar ratio of 1 : 0.12 : 0.045 : 0.003 : 0.002. The main substituent is sulfate, with a very small amount of acetyl groups. Sulfate groups are located at C4 and C2 positions in the fucosyl and galactosyl residues. The glycosidic bonds in the main chain of fucoidan are predominantly (1 $\rightarrow$ 3) linkages, with branch chain (1 $\rightarrow$ 2) linkages.

Key words: fucoidan structure, galactofucan, *Sargassum serratum*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Fucoidan là các polysaccharit sulfate không đồng nhất có mặt trong rong nâu và một số loài động vật thân mềm biển. Chúng có nhiều hoạt tính sinh học đặc biệt như chống đông tụ, chống viêm nhiễm, điều tiết miễn dịch, ức chế sự phát triển u bướu và ung thư, kháng virus, kể cả vi rút HIV [1].... Các hoạt tính sinh học này phụ thuộc chủ yếu vào khối lượng phân tử, hàm lượng và vị trí nhóm sulphat, cũng như cấu trúc phân tử của fucoidan [2,3]. Đặc điểm hóa học và sinh học của fucoidan bị ảnh hưởng bởi nguồn gốc

nguyên liệu. Các phương pháp tách chiết khác nhau cũng ảnh hưởng đến đặc điểm hóa học và hoạt tính sinh học của fucoidan [4]. Tất cả những yếu tố này đã góp phần tạo nên sự đa dạng và phức tạp về mặt hóa học của fucoidan, đồng thời làm khó khăn cho việc hiểu rõ mối quan hệ cấu trúc - hoạt tính của nhóm chất này.

Nhờ sự phát triển của khoa học kỹ thuật đã được ứng dụng trong việc đánh giá cấu trúc của fucoidan thông qua các phương pháp sắc ký, phương pháp phổ, phương pháp sử dụng enzyme như fucanase và sulfatase mà nhiều cấu trúc tự nhiên của

fucoïdan đã được sáng tỏ. Chính vì vậy mà việc xác định thành phần monomer của fucoïdan, vị trí phân nhánh và mô hình sulfate hóa trở nên dễ dàng và hợp lý hơn trước đây. Từ đó các nhà khoa học đã phát hiện ra hàng trăm bộ khung mạch chính của polymer fucoïdan có thể được phân loại theo tên của thành phần đường đơn có mặt trong khung mạch chính như sau fucan sulfate hóa (F-fucoïdan), galactofucan /fucogalactans (G-fucoïdan hoặc G-fucans) và fucomannoglucuronans (GA hoặc U-fucoïdan) và một số loại khác ít phổ biến hơn [5]. Trong đó, galactofucan sulfate (G-fucoïdan) đã thu hút nhiều sự quan tâm nghiên cứu do sở hữu hoạt tính sinh học đa dạng hơn so với các nhóm fucoïdan khác [5]. Mặc dù vậy, thành phần chính của chúng bao gồm một α -L-fucose được sulfate hóa ở các vị trí khác nhau và một lượng nhỏ galactose, xylose và axit gluconic [6].

Ở Việt Nam, rong nâu thuộc họ Sargassaceae có trữ lượng lớn nhất với khoảng 68 loài phân bố dọc ven biển và sản lượng ước tính trên 10.000 tấn khô/năm. Rong nâu thuộc họ Sargassaceae được phân loại chủ yếu là các loài thuộc chi *Sargassum*, chi *Turbinaria* và một số ít chi khác. Các nghiên cứu về fucoïdan từ chi rong này cho thấy chúng đều thuộc nhóm galactofucan, có thể kể đến là fucoïdan chiết từ các loài rong *S. mcclurei*, *S. polycystum*, *S. duplicatum*, *S. feldmannii*, và *S. oligocystum* và thể hiện các hoạt tính sinh học đáng quan tâm như gây độc tế bào ung thư, nhạy cảm phóng xạ [4,7–9]. Do đó, rong nâu Việt Nam có thể xem là nguồn nguyên liệu đầy tiềm năng để nghiên cứu, tìm kiếm các hợp chất chống ung thư trong đó có galactofucan.

Trong nghiên cứu này, fucoïdan từ loài rong nâu thuộc chi *Sargassum*, cụ thể là *S. serratum*, đã được phân lập và phân tích một số đặc điểm cấu trúc. Kết quả nghiên

cứu góp phần làm rõ hơn sự đa dạng về cấu trúc của fucoïdan từ các loài rong nâu Việt Nam, cung cấp cơ sở dữ liệu cho các nghiên cứu về hoạt tính sinh học và mối quan hệ giữa cấu trúc và hoạt tính của hợp chất này, từ đó hướng tới ứng dụng hiệu quả hơn trong y học và sinh học.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mẫu rong biển

Rong *Sargassum serratum* được thu thập vào tháng 6 năm 2021 tại bờ biển Nha Trang – Khánh Hòa. Mẫu rong sau khi thu hoạch được rửa sạch bằng nước ngọt, để ráo trong bóng râm và cắt nhỏ ngâm bằng EtOH 96% (tỉ lệ 1:1 w/v) trong ít nhất 7 ngày để loại màu và béo. Sau đó, mẫu rong được lấy ra, phơi khô và lưu giữ -20 °C để tiến hành chiết xuất fucoïdan.

2.2. Chiết xuất và phân tích fucoïdan

Fucoïdan được chiết từ rong đã xử lý ở trên và làm sạch fucoïdan theo quy trình Milan và cộng sự [10]. Fucoïdan được phân tích thành phần hóa học gồm: Tổng hàm lượng carbohydrate xác định bằng phương pháp phenol-sulfuric [11]; Phân tích thành phần monosaccharit bằng phương pháp sắc ký khí thông qua phản ứng axetyl hóa các sản phẩm thủy phân của fucoïdan [12]; Phân tích hàm lượng sulfate theo phương pháp đo độ gelatin/BaCl₂ [13]; Phân tích hàm lượng uronic axit bằng phương pháp carbazole sử dụng D-glucuronic là chất chuẩn [14].

Phổ hồng ngoại (IR) được đo trên máy Impac-410 trong vùng 4000 - 400cm⁻¹. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được đo trên Bruker-500 MHz trong dung môi D₂O và DMSO tại nhiệt độ 60 °C.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân tích thành phần hóa học của fucoïdan

Fucoïdan chiết xuất từ rong *S. serratum* được phân tích thành phần hóa học gồm

hàm lượng sulfate, uronic acid và các thành phần monosacarit hiện diện trong fucoidan. Kết quả được dẫn ra ở bảng 1. Kết quả phân tích ở bảng 1 cho thấy rằng thành phần đường của fucoidan chủ yếu là fucoidan với hàm lượng lên đến 33,81 % và lượng nhỏ các gốc đường là galactose, xylose, mannose, ramnose, glucose với tỷ lệ mol là 1 : 0,12 : 0,045 : 0,003 : 0,002. Ngoài thành phần đường fucoidan còn có 02 thành phần mang điện tích là nhóm sulfate và một lượng nhỏ nhóm acetyl (axit uronic) ứng với hàm lượng 38,13 và 2,27%. Hàm lượng sulfate của fucoidan từ loài rong này là tương đối cao. Các nghiên cứu về mối liên hệ giữa cấu trúc và hoạt tính sinh học của fucoidan rong biển trước đây chỉ ra rằng hàm lượng cũng như vị trí liên kết của các gốc sulfate là những yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của fucoidan. Từ đó, có thể dự đoán fucoidan từ rong *S. seratum* có tiềm năng sở hữu nhiều hoạt tính sinh học thú vị cần được nghiên cứu và đánh giá. Sự có mặt của gốc đường fucose và galactose với tỷ lệ mol là 1:0,12 chứng tỏ rằng fucoidan chiết từ rong *Sargassum seratum* là dạng galactofucan sulfate. Kết quả này tương tự các công bố trước đây về cấu trúc của một số fucoidan chiết từ một số loài rong thuộc chi *Sargassum* sinh trưởng tại Việt Nam như *S. mcclurei* [7], *S. polycystum* [15], *S. duplicatum*, *S. feldmannii* [8], và *S. oligocystum* [16]. Tuy nhiên có khác biệt ở các loài rong nâu là tỉ lệ fucose: galactose.

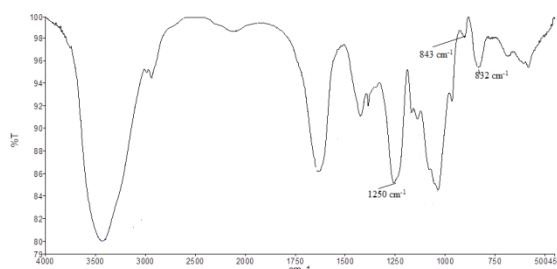
Fucoidan chiết từ rong *S. seratum* trong nghiên cứu này có tỉ lệ fucose :galactose là 1 : 0,12 trong khi đó tỉ lệ này đối với các loài rong *S. mcclurei*, *T. ornata* lần lượt là 1 : 0,7, 1 : 0,5 và 1 : 0,3, chứng tỏ hàm lượng galactose trong fucoidan chiết từ loài *S. seratum* thấp hơn rất nhiều so với các loài rong nâu khác ở vùng biển Việt Nam.

Bảng 1. Thành phần hóa học chính của fucoidan chiết từ rong *S. serratum*

Thành phần % (w/w)	Fucoidan
Sulfate	38,13 ± 4,06
Uronic acid	2,27 ± 0,16
Fucose	33,81 ± 1,39
Galactose	4,46 ± 0,42
Xylose	1,4 ± 0,16
Mannose	0,24 ± 0,02
Rhamnose	0,10 ± 0,01
Glucose	0,10 ± 0,01

3.2. Kết quả phân tích phổ IR

Trên phổ hồng ngoại (IR) của các mẫu fucoidan thấy xuất hiện các tín hiệu tương ứng với số sóng 1250 cm^{-1} , 843 và 832 cm^{-1} thuộc về dao động của liên kết S=O, C₄-O-S và C₂-O-S (hình 1).



Hình 1. Phổ IR của fucoidan chiết từ rong *S. seratum*

Kết quả này xác nhận sự có mặt nhóm sulfat trong fucoidan và vị trí của nhóm sulfat là C₄ và C₂ trong gốc pyranosyl. Tuy nhiên kết quả này chưa cho biết thông tin về nhóm sulfat này là của galactopyranose hay fucopyranose.

3.3. Kết quả phân tích methyl hóa.

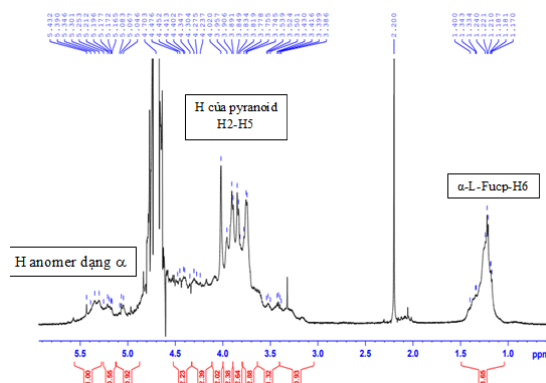
Sau khi đơn giản hóa cấu trúc fucoidan bằng phương pháp desulfate, chúng tôi thực hiện phân tích methyl hóa nhằm xác định vị trí liên kết của các gốc đường trong cấu trúc fucoidan. Kết quả dẫn ra trên bảng 2.

Bảng 2. Thành phần đường trong phân tích methyl hóa fucoidan chiết từ loài rong *S. seratum*

Thành phần đường	Gốc (Dự đoán)	Hàm lượng (%)
2,4 di-O-methyl - α -L-Fucose	$\rightarrow$ 3) Fucose-(1 $\rightarrow$	57,6
4-mono-O-methyl - α -L-Fucose	$\rightarrow$ 2,3) Fucose-(1 $\rightarrow$	14,6
3,4 di-O-methyl - α -L-Fucose	$\rightarrow$ 2) Fucose-(1 $\rightarrow$	6,7
2,3 di-O-methyl - α -L-Fucose	$\rightarrow$ 4) Fucose-(1 $\rightarrow$	0,8
2-mono-O-methyl - α -L-Fucose	$\rightarrow$ 3,4) Fucose-(1 $\rightarrow$	0,3
2,4 di-O-methyl -galactose	$\rightarrow$ 3) galactose-(1 $\rightarrow$	8,8
2,3 di-O-methyl -galactose	$\rightarrow$ 4) galactose-(1 $\rightarrow$	1,5
4-mono-O-methyl galactose	$\rightarrow$ 2,3) galactose-(1 $\rightarrow$	1,0

Trên phổ hồng ngoại (IR) đã xác định được nhóm sulfate ở vị trí C₄ và C₂ trong gốc pyranosyl. Vì vậy các liên kết glycosit tồn tại trong mạch chính của Fucoidan được dự đoán là có thể là liên kết (1 $\rightarrow$ 3) hoặc có thể là liên kết xen kẽ (1 $\rightarrow$ 3) với liên kết (1 $\rightarrow$ 2) hoặc (1 $\rightarrow$ 4). Kết quả phân tích bảng 2 cũng cho số liệu xác nhận sự dự đoán trên. Đó là các gốc đường có liên kết (1 $\rightarrow$ 3) chiếm chủ yếu còn lại là lượng nhỏ các kiểu liên kết (1 $\rightarrow$ 2) và (1 $\rightarrow$ 4). Ngoài ra còn có gốc đường có đồng thời 02 liên kết được giải thích bởi sự có mặt của mạch nhánh. Như vậy có thể cho rằng liên kết glycosit chính trong polymer fucoidan là liên kết (1 $\rightarrow$ 3) và xen kẽ một số nhỏ liên kết (1 $\rightarrow$ 4) và có mạch nhánh (1 $\rightarrow$ 2).

3.4. Kết quả phân tích Phổ ¹H NMR



Hình 2. Phổ ¹H NMR của rong *S.seratum*

Trên phổ ¹H NMR của mẫu fucoidan nghiên cứu, chúng tôi thấy có các tín hiệu sau: các tín hiệu ở 1,17 - 1,4 ppm là vùng H₆ của fucose với cường độ mạnh, vùng 3,5 - 4,5 ppm là vùng của các gốc đường pyranosyl và vùng 5,0 - 5,5 ppm là vùng của H anomer dạng α (hình 2). Điều này cho thấy trong Fucoidan chiết từ rong *Sargassum seratum* có mặt chủ yếu là α -L-fucose. Theo các dữ liệu phổ thực nghiệm và lí thuyết thì tín hiệu H₁ của liên kết (1 $\rightarrow$ 3)-fucopyranosyl-4-sulfate là vùng tín hiệu 5,28 - 5,35ppm, tín hiệu H₁ của liên kết (1 $\rightarrow$ 3)-fucopyranosyl không liên kết sulfate là vùng tín hiệu 5,1-5,2 ppm [17], [18], [19]. Dựa trên cơ sở trên, chúng tôi gán phổ như sau : tất cả các tín hiệu thuộc vùng α -anomer (từ 5,0-5,3ppm) đều thuộc về gốc α -(1 $\rightarrow$ 3)-fucopyranosyl. Tín hiệu 5,4ppm và 5,3ppm là của H₁ thuộc liên kết (1 $\rightarrow$ 3)-fucopyranosyl-4-sulfate. Sự dịch chuyển về trường thấp (0,1ppm) của tín hiệu 5,4 ppm là do gốc (1 $\rightarrow$ 3)-fucopyranosyl-4-sulfate còn tồn tại liên kết glycosit (1 $\rightarrow$ 2) kiểu mạch nhánh hoặc ảnh hưởng của nhóm thế sulfate tại vị trí C₂ trong vòng pyranosyl. Tín hiệu 5,2 ppm và 5,1ppm là của H₁ thuộc liên kết (1 $\rightarrow$ 3)-fucopyranosyl không sulfate và sự dịch chuyển tín hiệu về phía trường thấp của tín hiệu 5,2 ppm cũng được giải thích như trên. Vì hàm lượng galactose chỉ chiếm 4,46 % nên các tín hiệu cộng hưởng proton rất nhỏ nên khó phát hiện

trên phổ NMR, tuy nhiên trên hình 2 vẫn xuất hiện 3,386 ppm đặc trưng cho H-6 của gốc β -D-galactose.

4. KẾT LUẬN

Bằng phương pháp phân tích thành phần hóa học, phổ IR và NMR đã xác định cấu trúc của fucoidan chiết từ rong *S. serratum* có những đặc điểm cấu trúc sau: Thành phần chính của Fucoidan là α -L-fucose, β -D-galactose, xylose, mannose, ramnose, glucose với tỷ lệ mol là 1 : 0,12 : 0,045 : 0,003 : 0,002. Chủ yếu là nhóm thế là sulfate và một lượng rất nhỏ nhóm acetyl. Vị trí của nhóm sulfate là C₄ và C₂ trong vòng fucopyranose và galactopyranose. Liên kết glycosit trong mạch chính của Fucoidan là chủ yếu là liên kết (1 $\rightarrow$ 3), có liên kết mạch nhánh (1 $\rightarrow$ 2).

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện bởi sự hỗ trợ kinh phí của đề tài nghiên cứu khoa học thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam mã số QTRU02.07/23-24.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Thanh Thi Thu Thuy, Bui Minh Ly, Tran Thi Thanh Van, Nguyen Quang Nang, Tu, H.C.; Zheng, Y.; Seguin-Devaux, C.; Mi, B.; Ai, U., (2015). Anti-HIV activity of fucoidans from three brown seaweed species. *Carbohydrate polymers*, **115**, 122-128.

[2]. Mou, J., Li, Q., Qi, X., Yang, J., (2018). Structural Comparison, Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Fucosylated Chondroitin Sulfate of Three Edible Sea Cucumbers. *Carbohydrate Polymers*, **185**, 41-47.

[3]. Zayed, A., Ulber, R., (2019). Fucoidan Production: Approval Key Challenges and Opportunities. *Carbohydrate Polymers*, **211**, 289-297.

[4]. Usoltseva, R. V., Anastyyuk, S.D., Surits, V. V., Shevchenko, N.M., Thinh, P.D., Zadorozhny, P.A., Ermakova, S.P., (2019). Comparison of Structure and in Vitro Anticancer Activity of Native and Modified

Fucoidans from *Sargassum Feldmannii* and *S. Duplicatum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, **124**, 220-228.

- [5]. Zayed, A., Avila-Peltroche, J., El-Aasr, M., & Ulber, R., (2022). Sulfated galactofucans: An outstanding class of fucoidans with promising bioactivities. *Marine Drugs*, **20**(7), 412.
- [6]. Kusaykin, M., Bakunina, I., Sova, V., Ermakova, S., Kuznetsova, T., Besednova, N., ... & Zvyagintseva, T., (2008). Structure, biological activity, and enzymatic transformation of fucoidans from the brown seaweeds. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, **3**(7), 904-915.
- [7]. Pham Duc Thinh, Menshova, R. V., Ermakova, S. P., Anastyyuk, S. D., Ly, B. M., & Zvyagintseva, T. N., (2013). Structural characteristics and anticancer activity of fucoidan from the brown alga *Sargassum mcclurei*. *Marine Drugs*, **11**(5), 1456-1476.
- [8]. Usoltseva, R. V., Anastyyuk, S. D., Shevchenko, N. M., Surits, V. V., Silchenko, A. S., Isakov, V. V., ... & Ermakova, S. P., (2017). Polysaccharides from brown algae *Sargassum duplicatum*: The structure and anticancer activity in vitro. *Carbohydrate polymers*, **175**, 547-556.
- [9]. Usoltseva, R. V., Malyarenko, O. S., Anastyyuk, S. D., Shevchenko, N. M., Silchenko, A. S., Zvyagintseva, T. N., ... & Ermakova, S. P., (2021). The structure of fucoidan from *Sargassum oligocystum* and radiosensitizing activity of galactofucans from some algae of genus *Sargassum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, **183**, 1427-1435.
- [10]. Bilan, M. I., Grachev, A. A., Shashkov, A. S., Nifantiev, N. E., & Usov, A. I., (2006). Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus* L. *Carbohydrate research*, **341**(2), 238-245.
- [11]. DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F., (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, **28**(3), 350-356.
- [12]. Nguyen Thi Thuan, Mikkelsen, M. D.,

- Tran Nguyen Ha Vy, Vo Thi Dieu Trang, Rhein-Knudsen, N., Holck, J., ... & Meyer, A. S., (2020). Enzyme-assisted fucoidan extraction from brown macroalgae *Fucus distichus subsp. evanescens* and *Saccharina latissima*. *Marine drugs*, **18**(6), 296. 13.
- [13]. Torres, P. B., Nagai, A., Jara, C. E. P., Santos, J. P., Chow, F., & Santos, D. Y. A. C. D., (2021). Determination of sulfate in algal polysaccharide samples: a step-by-step protocol using microplate reader. *Ocean and Coastal Research*, **69**, e21021.
- [14]. Bitter, T., & Muir, H. M., (1962). A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical biochemistry*, **4**(4), 330-334.
- [15]. Bilan, M. I., Grachev, A. A., Shashkov, A. S., Thuy, T. T. T., Van, T. T. T., Ly, B. M., ... & Usov, A. I., (2013). Preliminary investigation of a highly sulfated galactofucan fraction isolated from the brown alga *Sargassum polycystum*. *Carbohydrate research*, **377**, 48-57.
- [16]. Usoltseva, R. V., Malyarenko, O. S., Anastyuk, S. D., Shevchenko, N. M., Silchenko, A. S., Zvyagintseva, T. N., ... & Ermakova, S. P., (2021). The structure of fucoidan from *Sargassum oligocystum* and radiosensitizing activity of galactofucans from some algae of genus *Sargassum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, **183**, 1427-1435.
- [17]. Bilan, M. I., Grachev, A. A., Ustuzhanina, N. E., Shashkov, A. S., Nifantiev, N. E., & Usov, A. I., (2002). Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C. Ag. *Carbohydrate research*, **337**(8), 719-730. 18.
- [18]. Duarte, M. E., Cardoso, M. A., Nosedá, M. D., & Cerezo, A. S., (2001). Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydrate Research*, **333**(4), 281-293.
- [19]. Chevolot, L., Mulloy, B., Ratiskol, J., Foucault, A., & Collic-Jouault, S., (2001). A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydrate Research*, **330**(4), 529-535.