

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

---



**LÊ ĐÌNH TRÀ**

**NGHIÊN CỨU CHIẾT TÁCH VÀ ĐẶC TRƯNG CẤU TRÚC  
CỦA ULVAN TỪ RONG LỤC *ULVA PAPENFUSSII***

**LUẬN VĂN THẠC SĨ HÓA HỌC**

**Nha Trang - 2023**

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

---



**LÊ ĐÌNH TRÀ**

**NGHIÊN CỨU CHIẾT TÁCH VÀ ĐẶC TRƯNG CẤU TRÚC  
CỦA ULVAN TỪ RONG LỤC *ULVA PAPENFUSSII***

Chuyên ngành: Hóa phân tích

Mã số: 8440118

**LUẬN VĂN THẠC SĨ HÓA HỌC**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC**

- 1. TS. Phạm Đức Thịnh**
- 2. TS. Bùi Văn Nguyên**

**Nha Trang - 2023**

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu khoa học của riêng tôi dưới sự hướng dẫn của TS. Phạm Đức Thịnh và TS. Bùi Văn Nguyên. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

**Tác giả luận văn**

**Lê Đình Trà**

## LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới hai thầy đã tận tụy hướng dẫn tôi đó là TS. Phạm Đức Thịnh hướng dẫn chính – Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang và TS. Bùi Văn Nguyên - Trường Đại học Khánh Hòa. Hai tiến sĩ là những người Thầy đã truyền đạt những kiến thức và kinh nghiệm, hướng dẫn tôi cách tiếp cận với lĩnh vực khoa học chuyên sâu mà tôi đang theo đuổi, cũng như các vấn đề khác trong cuộc sống trong suốt thời gian thực hiện luận văn.

Tôi xin cảm ơn TS. Trần Nguyễn Hà Vy - Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang đã giúp đỡ tôi trong quá trình thực nghiệm để tôi có thể hoàn thành luận văn của mình.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn Ban Lãnh đạo Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang và Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam đã tạo mọi điều kiện thuận lợi giúp tôi hoàn thành luận văn và mọi thủ tục cần thiết.

Cuối cùng tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới gia đình, bạn bè và những người thân luôn giúp đỡ, động viên tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

**TÁC GIẢ LUẬN VĂN**

**Lê Đình Trà**

## MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT .....	i
DANH MỤC HÌNH .....	ii
DANH MỤC BẢNG .....	iv
MỞ ĐẦU .....	1
CHƯƠNG 1.....	3
TỔNG QUAN .....	3
1.1. Rong biển .....	3
1.1.1. Rong biển trên thế giới và Việt Nam .....	3
1.1.2. Rong <i>Ulva papenfussii</i> .....	6
1.2. Ulvan .....	10
1.2.1. Cấu trúc của ulvan.....	10
1.2.2. Hình thái và khả năng hòa tan của ulvan .....	11
1.2.3. Tính chất vật lý của ulvan .....	12
1.2.4. Gel của ulvan.....	13
1.2.5. Hoạt tính sinh học của ulvan.....	15
1.3. Ứng dụng của ulvan.....	18
1.4. Chiết tách ulvan .....	20
CHƯƠNG 2.....	24
ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	24
2.1. Đối tượng nghiên cứu .....	24
2.2. Quy trình tách Chiết polysaccharide điện tích ulvan.....	24
2.3. Phân tích đặc điểm hóa học của polysaccharide.....	26
2.4. Sắc ký thẩm thấu gel (GPC).....	28
2.5. Phổ IR.....	28

2.6. Phổ NMR.....	28
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	29
3.1. Kết quả thu thập và xử lý mẫu rong <i>Ulva papenfussii</i> .....	29
3.2. Thành phần hóa học của rong <i>Ulva papenfussii</i> .....	30
3.3. Kết quả chiết tách và phân lập ulvan từ rong <i>Ulva papenfussii</i> .....	30
3.4. Kết quả GPC của ulvan từ rong <i>Ulva papenfussii</i> .....	41
3.5. Kết quả đặc điểm cấu trúc của ulvan tách từ rong <i>Ulva papenfussii</i> ..	44
KẾT LUẬN .....	59
KIẾN NGHỊ .....	60
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	61
PHỤ LỤC .....	64

## DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

### Các phương pháp sắc ký

CC	Column Chromatography	Sắc ký cột thường
GC	Gas Chromatography	Sắc ký khí
GPC	Gel permeation chromatography	Sắc ký lọc gel
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng cao áp

### Các phương pháp phổ

$^{13}\text{C}$ -NMR	Carbon-13 NMR Spectroscopy	Phổ CHTHN carbon 13
$^1\text{H}$ -NMR	Proton NMR Spectroscopy	Phổ CHTHN proton
COSY	Correlation Spectroscopy	Phổ tương tác hai chiều $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$
ESI-MS	Electron Spray Ionization Mass Spectrometry	Phổ khối ion hóa phun mù điện tử
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	Phổ tương tác dị hạt nhân qua một liên kết
IR	Infrared Spectroscopy	Phổ hồng ngoại
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Cộng hưởng từ hạt nhân (CHTHN)

### Monosaccharide

Rha	Rhamnose	Đường Rhamnose
Gal	Galactose	Đường galactose
Gluc	Glucose	Đường glucose
GlucA	Glucuronic Acid	Axit glucuronic
Idu	Iduronic acid	Axit Iduronic
Xyl	Xylose	Đường xylose

### Hóa chất

Cetavlon	Hexadecyltrimethylammonium bromide, Cetrimonium bromide	Hexadecyl trimethyl ammonium bromid
DMSO	Dimethylsulfoxide	Dimethylsulfoxid
EtOAc	Ethyl acetate	Ethyl acetat
EtOH	Ethanol	Ethanol
MeOH	Methanol	Methanol
TFA	Trifluoroacetic acid	Axit trifluoroacetic

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1. 1. Số loài rong biển Việt Nam và các nước lân cận .....	5
Hình 1. 2. Bản đồ phân bố rong biển các tỉnh ven biển Việt Nam .....	6
Hình 1. 3. Rong lục <i>U. papenfussii</i> .....	8
Hình 1. 4. Cơ chế tạo hydrogel của ulvan qua $Ca^{2+}$ : hoặc a) của borate ester hoặc một phần của b) carboxylate hoặc một phần của c) sulfate .....	14
Hình 2. 1. (A) Đặc điểm hình thái rong và (B) bột rong <i>U. papenfussii</i> được thu nhận từ vịnh biển Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa.....	24
Hình 2. 2. Sơ đồ quy trình tách chiết polysaccharide điện tích .....	26
Hình 3.1. Rong lục <i>U. papenfussii</i> ở Nha Trang, Khánh Hòa. ....	29
Hình 3. 2. Sơ đồ tách chiết ulvan từ rong lục <i>U. papenfussii</i> .....	32
Hình 3. 3. Các phân đoạn ulvan thông qua kết quả phân tích hàm lượng tổng lượng cacbohydrat bằng phương pháp axit phenol-sulfuric .....	33
Hình 3. 4. Sắc ký đồ của chuẩn Rhamnose.....	34
Hình 3. 5. Đường chuẩn của chuẩn Rhamnose.....	34
Hình 3. 6. Sắc ký đồ của chuẩn Galactose .....	35
Hình 3. 7. Đường chuẩn của chuẩn Galactose .....	35
Hình 3. 8. Sắc ký đồ của chuẩn Glucose.....	36
Hình 3. 9. Đường chuẩn của chuẩn Glucose.....	36
Hình 3. 10. Sắc ký đồ của chuẩn Xylose .....	37
Hình 3. 11. Đường chuẩn của chuẩn Xylose .....	37
Hình 3. 12. Sắc ký đồ của chuẩn Glucuronic acid .....	38
Hình 3. 13. Đường chuẩn của chuẩn Glucuronic acid .....	38
Hình 3. 14. Sắc ký đồ của chuẩn Iduronic acid .....	39
Hình 3. 15. Đường chuẩn của chuẩn Iduronic acid .....	39
Hình 3. 16. Sắc ký đồ GPC của ulvan thô F .....	42
Hình 3. 17. Sắc ký đồ GPC của phân đoạn F1 .....	42
Hình 3. 18. Sắc ký đồ GPC của phân đoạn F2.....	43
Hình 3. 19. Sắc ký đồ GPC của phân đoạn F3.....	43
Hình 3. 20. Phổ IR của ulvan từ rong <i>U.papenfussii</i> .....	44
Hình 3. 21. Phổ IR của ulvan F1 từ rong <i>U.papenfussii</i> .....	46
Hình 3. 22. Phổ IR của ulvan F2 từ rong <i>U.papenfussii</i> .....	48



Hình 3. 23. Phổ IR của ulvan F3 từ rong <i>U.papenfussii</i> .....	49
Hình 3. 24. Phổ $^1\text{H}$ -NMR của ulvan từ rong <i>U.papenfussii</i> .....	51
Hình 3. 25. Phổ $^{13}\text{C}$ NMR của ulvan từ rong <i>U.papenfussii</i> .....	52
Hình 3. 26. Phổ $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC của ulvan từ rong <i>U.papenfussii</i> .....	55
Hình 3. 27. Phổ COSY của của ulvan từ rong <i>U.papenfussii</i> .....	56
Hình 3. 28. Phổ HMBC của ulvan từ rong <i>U.papenfussii</i> .....	58

**DANH MỤC BẢNG**

Bảng 3. 1. Bảng so sánh thành phần hóa học của Rong lục <i>U. Papenfussii</i> với các loài rong lục khác.....	30
Bảng 3. 2. Thành phần hoá học của polysaccharides dạng ulvan.....	40
Bảng 3. 3. Bảng kết quả chạy GPC của các mẫu ulvan .....	41
Bảng 3. 4. Các đỉnh đặc trưng phổ IR của ulvan F.....	45
Bảng 3. 5. Các đỉnh đặc trưng phổ IR của ulvan F1 .....	47
Bảng 3. 6. Các đỉnh đặc trưng phổ IR của ulvan F2.....	49
Bảng 3. 7. Các đỉnh đặc trưng phổ IR của ulvan F3 .....	50
Bảng 3. 8. Bảng so sánh các tín hiệu phổ IR của Ulvan thô và các phân đoạn F1, F2 và F3 .....	51

## MỞ ĐẦU

Nguồn tài nguyên thiên nhiên từ biển phải kể đến loài rong đây là nguồn tài nguyên rất phong phú và đa dạng giữ vai trò quan trọng cho đời sống. Theo thống kê hằng năm ngành công nghiệp khai thác rong từ 7,5 - 8 triệu tấn rong tươi, lợi nhuận kinh tế của nó ước tính lên đến 5,5 - 6 tỷ đô la Mỹ [1]. Nếu như nguồn lợi kinh tế thu từ ngành thực phẩm là 5 tỷ đô la Mỹ thì các sản phẩm từ polysaccharide từ rong biển cũng mang lại nguồn thu khá lớn khoảng 1 tỷ đô la Mỹ.

Một trong những thành phần chính của rong là polysaccharide, đây là hợp chất có nguồn gốc từ thiên nhiên với nhiều công dụng hữu ích. Thành phần polysaccharide của rong đỏ là agar và carrageenan đã được chiết xuất để làm các sản phẩm tạo gel, tạo đông. Rong nâu được xem là nguồn nguyên liệu để tách iodine và kali. Trong thời gian gần đây, rong nâu được khai thác rộng rãi để chiết tách alginate và fucoidan được ứng dụng nhiều trong các ngành thực phẩm, công nghiệp sản xuất tơ, sợi, giấy. Ngoài ra trong rong nâu, polysaccharide fucoidan có nhiều hoạt tính sinh học ngăn ngừa ung thư [2]. Bên cạnh polysaccharide từ hai loài rong nâu và rong đỏ, polysaccharide từ rong lục đang được quan tâm nghiên cứu trong những năm gần đây. Polysaccharide chủ yếu được tìm thấy trong rong lục thuộc chi *Ulva* hoặc *Enteromorpha*, chúng có cấu trúc phức tạp tồn tại trong thành tế bào rong lục, chiếm từ 9-36% khối lượng khô của rong *Ulva sp.* Ulvan đã thu hút sự quan tâm, chú ý trong các ứng dụng về thực phẩm, mỹ phẩm, nông nghiệp và y dược bởi các hoạt tính sinh học đa dạng của chúng, chẳng hạn như hoạt tính chống oxy hóa, kháng virus, chống đông tụ máu, chống tăng lipid máu, hoạt động điều hòa miễn dịch và chống tăng sinh tế bào ung thư [3], [4], [5]. Các loài rong lục thuộc chi *Ulva* chiếm một nửa sinh khối sơ cấp toàn cầu và được coi là nguồn carbon tái tạo bởi tốc độ tăng trưởng nhanh và tỷ lệ năng suất cao trong điều kiện khí hậu đa dạng [6]. Rong lục phù dunhư các loại *Ulva spp.*, phát triển mạnh ở các vùng nước ven biển giàu dinh dưỡng tạo nên hiện tượng " thủy triều xanh" vào mùa hè [7], [8]. Vì vậy, chúng rất phù hợp để canh tác nuôi trồng, đặc biệt là sử dụng trong xử lý sinh học nước thải giàu dinh dưỡng từ thâm canh

nuôi trồng thủy sản trên cạn hoặc cung cấp nguyên liệu để tạo ra các sản phẩm sinh học chất lượng cao với thành phần hóa học đồng nhất. *Ulva sp* được thu hoạch để làm thức ăn nuôi trồng thủy sản khoảng 32,9 nghìn tấn (bao gồm 2,37 nghìn tấn *Ulva*) đã được sản xuất (nuôi và tự nhiên) vào năm 2019 [9].

Ở nước ta, các polysaccharide chiết tách từ rong đỏ như carrageenan và rong nâu như fucoidan, alginate và laminaran đã được nghiên cứu và có kết quả ứng dụng tốt vào cuộc sống. Cho đến nay các nghiên cứu về polysaccharide từ các loài thuộc ngành rong lục nói chung và ulvan từ chi *Ulva* nói riêng vẫn còn rất hạn chế. Trong số các loài rong lục thuộc chi *Ulva* đã được công bố thì chưa có nghiên cứu nào về ulvan từ rong lục *Ulva papenfussii* đây là loài rong lục xuất hiện nhiều ở khu vực ven biển Khánh Hòa nói riêng và khu vực biển Nam Trung Bộ nói chung. Với các lý do nêu trên, chúng tôi chọn đề tài: "*Nghiên cứu chiết tách và đặc trưng cấu trúc của ulvan từ rong lục Ulva papenfussii*", để bước đầu đánh giá về hàm lượng và một số đặc trưng cấu trúc của ulvan từ loài rong này làm cơ sở cho các nghiên cứu sâu hơn về cấu trúc và hoạt tính sinh học của ulvan qua đó góp phần bổ sung thêm các nghiên cứu về polysaccharide từ rong biển và mở rộng khả năng ứng dụng của nguồn rong biển Việt Nam.

#### **Mục đích và nội dung nghiên cứu của đề tài:**

- Mục đích nghiên cứu của đề tài: Thu nhận và xác định đặc trưng cấu trúc của ulvan từ loài rong *Ulva papenfussii*.

Để đạt được mục tiêu đề ra, nội dung nghiên cứu của luận văn gồm:

1. Thu thập và xử lý mẫu rong *Ulva papenfussii*
2. Chiết tách và phân lập ulvan (polysaccharide) từ rong *Ulva papenfussii*
3. Xác định thành phần hóa học của ulvan
4. Xác định đặc trưng cấu trúc của ulvan

## CHƯƠNG 1

### TỔNG QUAN

#### 1.1. Rong biển

##### 1.1.1. Rong biển trên thế giới và Việt Nam

Ngành rong có thể chia thành 3 ngành chính: Rong nâu (Phaeophyceae), rong đỏ (Rhodophyceae) và rong lục (Chlorophyceae). Theo các nghiên cứu mới nhất cho đến nay, các nhà khoa học đã định danh và phân loại được hơn 1.800 loài rong nâu, 1.500 loài rong lục và 6.500 loài rong đỏ [10].

Rong nâu đặc thù của loài này về kích thước có thể dài tương đương 20 m, một số có kích thước nhỏ cũng tầm 2-4 m, nhỏ hơn nữa ước lượng khoảng 30–60 cm [11, 12]. Rong nâu có phần thân cứng hơn một số loài khác vì vậy song biển ít bị tác động ảnh hưởng đối với loài này. Đặc biệt có loài có túi khí và nổi trên bề mặt để quang hợp. Dựa vào thành phần xanthophyll-fucoxanthin cùng với chlorophyll nên loài rong có màu nâu của nó. Rong nâu chiếm một sản lượng tương đối cao trên sinh khối khoảng 1800 loài, chúng thường bám trên đá trầm tích và sâu dưới biển và tập trung phần lớn ở bán cầu Bắc. Rong nâu được phát hiện ở nhiều địa điểm trên thế giới, bao gồm Nhật Bản, Canada, Việt Nam, Hàn Quốc, Alaska, Ireland, Mỹ, Pháp, Ấn Độ,... Ban đầu, rong nâu được sử dụng để chiết tách iodine và kali, nhưng trong thời gian gần đây, chúng được khai thác rộng rãi để trích xuất alginate và fucoidan trên từng các loài rong khác nhau. Rong đỏ có thể được tìm thấy ở một số quốc gia, bao gồm Việt Nam, Nhật Bản, Hàn Quốc, Chile, Indonesia, Philippines, Thái Lan, Brazil, Pháp, Trung Quốc, Hawaii, Ấn Độ, Anh và Mỹ. ...về hình dạng cũng như kích thước nhỏ hơn rong nâu, chiều dài dưới 1m. Được gọi là rong đỏ nhưng không hẳn loài này có màu đỏ mà còn có loài có màu tím màu nâu sẫm, màu trắng hồng nhạt.

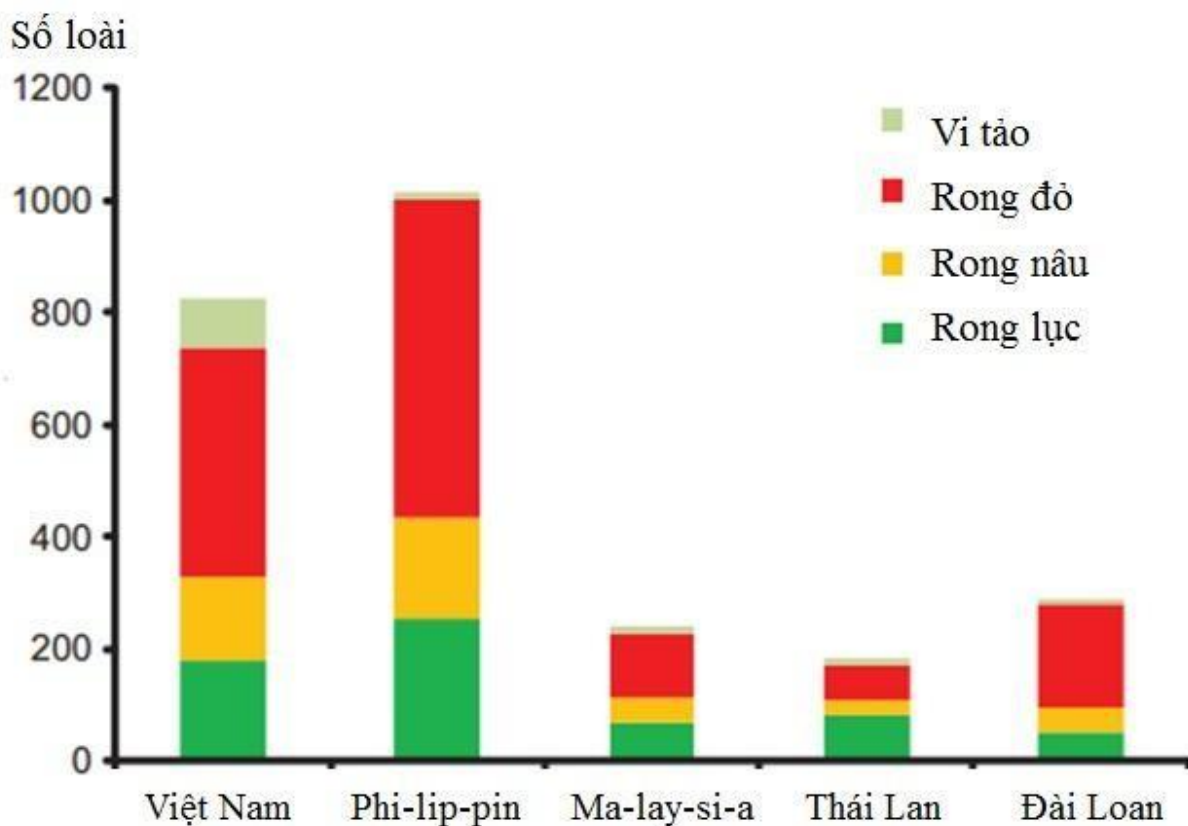
Rong đỏ phân bố ở nhiều nơi trên thế giới các vùng nước có nhiệt độ khác nhau: vùng nước lạnh như Chile, Nova Scotia (Canada) vùng nước mát như vùng duyên hải Maroc và Bồ Đào Nha, vùng nước nhiệt đới như Indonesia và Philippines.

Rong lục có hình dạng và kích thước gần giống như rong đỏ. Rong lục sinh trưởng mạnh ở các vùng nước có độ sâu vừa. Một số còn sinh trưởng ở

vùng nước biển và cả nước ngọt. Rong lục thường sinh trưởng mạnh ở những nơi có nhiệt độ cao như các vùng cận nhiệt đới và không phát triển mạnh ở những nơi có nhiệt độ thấp.

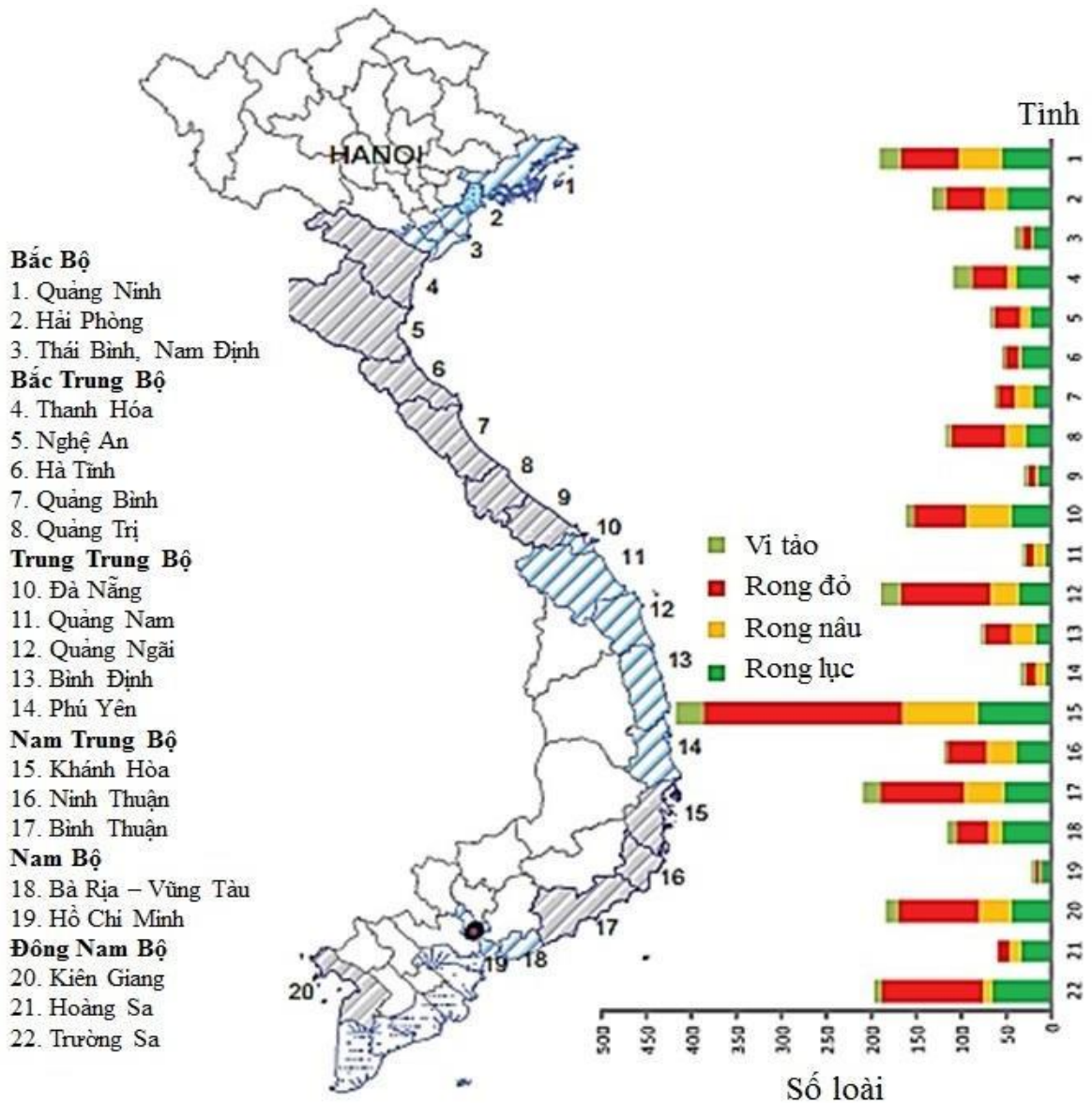
Trên toàn thế giới ngành công nghiệp rong biển hiện đang cung cấp đa dạng các sản phẩm từ rong biển mang lại lợi nhuận hàng năm lên đến hơn 10 tỷ đô la Mỹ [1]. Hiện nay ngành công nghiệp về sản phẩm rong đang phát triển rất mạnh về quy mô khai thác và kinh doanh rong biển được phủ khắp các nước trên thế giới 83% lượng rong biển được con người tiêu thụ trực tiếp, phần còn lại được ứng dụng để sản xuất phân bón cây, thức ăn gia súc gia cầm, cung cấp nguyên vật liệu hữu ích cho ngành công nghệ sinh học, ứng dụng rộng rãi trong y khoa [2].

Vùng biển Việt Nam với diện tích trên 1 triệu km<sup>2</sup> bao gồm quần đảo, đảo, đảo san hô, rạn san hô, đầm ngập mặn. Với diện tích mặt nước rộng được thiên nhiên ban tặng cho nguồn tài nguyên rất đa dạng và phong phú với bờ biển kéo dài 3.260 km theo hướng Bắc-Nam, miền duyên hải miền trung nước ta trải dài trong khu vực có khí hậu cận nhiệt đới và nhiệt đới. Đây được coi là một thế mạnh về các nguồn tài nguyên vì vậy hệ sinh thái biển nhất là các loài rong ở Việt Nam chiếm sinh khối tương đối lớn: từ các đầm thủy triều rộng lớn, rừng ngập mặn đến các bãi đá, rạn san hô, cung cấp môi trường sống cho các loài sinh vật và đặc biệt là rong sinh trưởng và phát triển rất tốt. Các nghiên cứu mới đây được thống kê bởi Nguyễn Văn Tú và các cộng sự, trong năm 2013, Việt Nam có tổng cộng 827 loài rong: 412 loài rong đỏ (Rhodophyta), 180 loài rong lục (Chlorophyta), 147 loài rong nâu (Phaeophyceae) và 88 loài vi tảo (Cyanobacteria) [13]. Những con số thống kê cho thấy Việt Nam với các nước trong khu vực Đông Nam Á, số loài rong biển ở Việt Nam gần bằng Philippines (1.011 loài) và cao hơn một số nước như: Đài Loan, Thái Lan và Malaysia (Hình 1.1).



Hình 1. 1. Số loài rong biển Việt Nam và các nước lân cận [13]

Theo khảo sát ở Việt Nam có 20 tỉnh ven biển có số lượng rong tập trung nhiều, thì 12 tỉnh có trên 100 loài rong biển (2 tỉnh miền Bắc, 2 tỉnh miền Nam và 8 tỉnh miền Trung). Quần đảo Hoàng Sa có 60 loài và Trường Sa có 197 loài. Riêng tỉnh Khánh Hòa là tỉnh có số loài rong biển nhiều nhất nước với 418 loài, chiếm một nửa số loài rong cả nước. Chính vì vậy đã có rất nhiều nhà khoa học nổi tiếng quan tâm nghiên cứu như Dawson, Abbott, Tsutsui đã nhiều lần ghé thăm để nghiên cứu về rong.



Hình 1. 2. Bản đồ phân bố rong biển các tỉnh ven biển Việt Nam [13]

### 1.1.2. Rong *Ulva papenfussii*

Ulvales là bộ rong phổ biến trên toàn thế giới. *Ulvales* có 2 chi lớn là *Ulva* và *Enteromorpha*. Những năm trước đây tình hình nghiên cứu còn ở mức độ giới hạn và gặp nhiều khó khăn nên Ulvales chưa được nghiên cứu một cách hoàn hảo. Ulvales được các nước Trung Quốc, Nhật Bản, Mỹ, Pháp, Chile sử dụng khá phổ biến thường là những thực phẩm bổ sung về dinh dưỡng. Ở Nhật Bản, sau khi thu hái rong được sấy khô và nghiền thành “aonori”, sau đó chế biến cùng các nguyên liệu khác để cho ra rất nhiều thực phẩm bổ dưỡng [14].



Ngoài ra các ứng dụng trong lĩnh vực thực phẩm, các rong này còn được ủ làm phân và làm nguyên liệu cho quá trình sản xuất methane.

Trong các chi rong lục, phổ biến nhất là chi rong *Ulva*; về hình thái chúng có thể có dạng tế bào đơn giản hoặc phức tạp, các tế bào có cấu tạo dạng phiến hoặc dạng sợi, có thể chia nhánh hoặc không chia nhánh. Trong số đó, một số trường hợp rong chỉ là tế bào trần không có vỏ, trong khi đại đa số có vỏ như pectin hay cellulose. Hiện có hơn 140 loài trong chi *Ulva*, tuy nhiên chỉ khoảng 50 loài đã được định danh. Công dụng của rong thuộc chi *Ulva* chỉ thực sự được quan tâm khi các nhà khoa học phân tích hàm lượng các thành phần có trong rong các thành phần chất có hàm lượng lớn protein, vitamin, khoáng chất và carbohydrate. Thành phần carbohydrate tổng của các loài rong phân tích bao gồm tinh bột, chất xơ không tan (cellulose, hemicellulose) và chất xơ tan trong nước (ulvan). Bảng tổng hợp thành phần hóa học một số loài rong thuộc chi *Ulva* được chỉ ra ở bảng 1.1.

Bảng 1. 1 Thành phần hóa học một số loại rong thuộc chi *Ulva*

Loài rong	Protein (%)	Lipid (%)	Tro (%)	Carbohydrate (%)	Tài liệu tham khảo
<i>Ulva clathrata</i>	20-26	2,2-3,5	28-50	26-41	[14]
<i>Ulva lactuca</i>	8,46	7,87	19,59	54,9	[15]
<i>Uva reticulata</i>	9,8	1,9	13,2	68,9	[16]
<i>Ulva spp.</i>	15-25	0,6 – 0,7	13 - 22	42-46	[17]
<i>Ulva pertusa</i>	25,1	0,1	22,5	52,3	[18]

Rong lục rất đa dạng về loài tuy nhiên các loài rong lục thuộc chi *Ulva*, rong *Ulva papenfussii* là rong phổ biến nhất ở Việt Nam, chiếm 1/3 tổng sản lượng rong lục Việt Nam [19].

Lịch sử rong *Ulva papenfussii* được Linnaeus phát hiện và định danh vào năm 1753 khi ông đi thu hoạch rong này trên vùng biển Đỏ của Ả Rập Saudi. Rong *Ulva papenfussii* ở giai đoạn sinh trưởng trưởng thành có hình dạng lá phiến rộng, mềm, mọc xòe tròn, xếp thùy, mép nhăn gập. Chúng có màu lục thẫm hoặc lục nhạt, cao khoảng 3-10 cm và rộng khoảng 4-10 cm,

trông giống như một cây rau diếp nên còn được gọi với cái tên là rau diếp biển. Lịch sử loài này được đánh giá dựa vào phá hệ của ngân hàng dữ liệu rong toàn cầu algaebase, rong *Ulva papenfussii* thuộc chi *Ulva*, họ Ulvaceae, bộ Uvales, lớp Ulvophyceae và ngành Chlorophyta.



Hình 1. 3. Rong lục *U. papenfussii*.

Rong *Ulva papenfussii* xuất hiện nhiều ở các nước khu vực Ấn Độ Dương và Tây Thái Bình Dương. Rong *Ulva papenfussii*, về hình dáng loài này giống hầu hết các loài rong chi *Ulva*, thường mọc trên các nền đá cứng. Rễ của rong sẽ bắt lấy tảng đá, rặng san hô hoặc thậm chí trên mai rùa, mai cua, vỏ động vật nhuyễn. Khi rong phát triển ở giai đoạn trưởng thành, chúng có thể tách khỏi nền rắn, trở thành các cá thể trôi tự do theo dòng nước, thường vướng vào các lớp đá, san hô và các loài rong biển khác [20].

*Ulva papenfussii* là loài rong nhiệt đới, điều kiện lý tưởng và phát triển nhanh ở những vùng nước cạn và sạch, các điều kiện dinh dưỡng đầy đủ, đặc biệt là các muối amonium và phosphate. Ngoài ra, loài rong này có khả năng phát triển luân phiên trong hệ sinh thái có sự xuất hiện nhiều loài rong khác.

Trong quá trình sinh trưởng rong *Ulva papenfussii* làm thay đổi chất lượng nước và lớp trầm tích nơi mà chúng sinh trưởng do rong có khả năng phân giải các hợp chất hữu cơ. Nơi nào có sản lượng rong phát triển mạnh, nước êm, các chất hữu cơ lắng, tích tụ, làm tăng tốc độ trầm tích hóa khu vực. Trong điều kiện thiếu oxy ở các lớp bùn như vậy, nhiều khí độc được sinh ra như khí sulfur làm cho môi trường đáy biển bị ô nhiễm. Chỉ có một số loài sinh vật có thể

sống được như sò huyết, nghêu Manila, ốc sên bùn, chính vì vậy nên nhiều loài cá và động vật thân mềm khác ở các khu vực vịnh Nanwan (Nam Đài Loan) và đảo Mactan (Cebu, Philippines) đã không thể sinh sống và phải di cư khỏi các rặng san hô, nơi các lớp trầm tích tích trữ nhiều khí độc bởi sự xâm lấn của rong *Ulva papenfussii*. Điều này đã làm cho hệ sinh thái biển mất cân bằng dẫn tới sự thiếu hụt các nhân tố quan trọng của chuỗi thức ăn trong hệ sinh thái khu vực, làm cho sự đa dạng sinh thái không còn sinh động [20]. Với tốc độ phát triển nhanh không kiểm soát được đã ảnh hưởng rất lớn đến hệ lụy như gây ô nhiễm môi trường như một số quốc gia sinh sống gần biển như đảo Boracay (Philippines), Brittany (Pháp) mất dần khách du lịch. Hằng năm chính quyền bỏ ra không ít kinh phí để xử lý các loài rong trôi dạt vào bờ gây ra hiện tượng thủy triều xanh nhất là vào mùa hè làm ô nhiễm môi trường.

Rong *Ulva papenfussii* cung cấp nguyên liệu rất quan trọng có khả năng cung cấp nhiều năng lượng (2.828-3.725 cal/g) và đa dạng với hàm lượng protein nguyên liệu để chế biến thành các món ăn ở nhiều nước như Indonesia, Philippines, Thái Lan. Ở Nhật Bản, bột rong sấy khô được thêm vào súp để tạo hương vị, món pasta, làm đồ uống và bánh dòn vị rong. Ngoài tác dụng làm thức ăn cho người, rong *Ulva papenfussii* dạng bột còn được bổ sung vào thức ăn cho gia súc, cá diạ ở Ấn Độ, anzanian [21]. Rong *Ulva papenfussii* cho thấy khả năng hấp thụ các kim loại nặng, tiềm năng ứng dụng làm thiết bị lọc sinh học để lọc nước biển qua bể nuôi lộ thiên.

Rong không chỉ làm nguyên liệu cho nông nghiệp thực phẩm mà còn làm nguyên liệu cho một số ngành công nghiệp. Khả năng hấp thụ kim loại của rong đã được ứng dụng ở các bể nuôi cá ở Tanzania, thử nghiệm hấp thụ kim loại Ni trong công nghệ sơn phủ, hấp thụ kẽm, đồng ở các nhà máy chế tạo thiết bị xây dựng ở Nhật Bản [22].

Trong quá trình nghiên cứu về thành phần của rong *Ulva papenfussii*, các nhà khoa học đã tìm ra hàm lượng lớn các sulfated polysaccharide có nhiều tính chất hóa lý, hoạt tính sinh học thú vị. Sulfated polysaccharide đặc trưng từ rong, được gọi là ulvan, có các hoạt tính chống ung thư, chống đông tụ, bệnh truyền nhiễm, viêm, rối loạn thần kinh và kỹ thuật mô, nguồn nguyên liệu điều chế thuốc mới, thực phẩm chức năng hỗ trợ sức khỏe cho con người [14] [23].

## 1.2. Ulvan

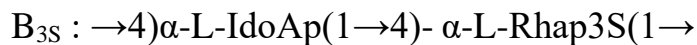
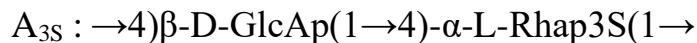
### 1.2.1. Cấu trúc của ulvan

Công trình [24] đã chỉ ra rằng có bốn nhóm polysaccharide đặc trưng được tìm thấy trong sinh khối của các loài rong thuộc chi *Ulva*, gồm: polysaccharide không tan, cellulose; hai loại polysaccharide tan trong kiềm, xyloglucan và glucuronan cùng với polysaccharide tan trong nước, ulvan.

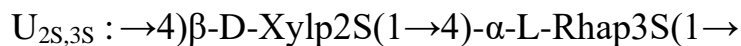
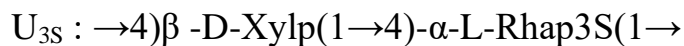
Ulvan là một polysaccharide sulphate hoá có cấu trúc phức tạp tồn tại trong thành tế bào của rong *Ulva*. Chúng chiếm từ 9 đến 36% khối lượng khô của rong và cùng với các sợi cellulose tạo thành hệ mạng lưới trong cấu tạo của thành tế bào rong lục. Ulvan đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì chức năng thẩm thấu và độ bền vững của thành tế bào rong lục. Chúng tương tác với các nhóm polysaccharide khác và protein thông qua các loại liên kết khác nhau, hàm lượng và thành phần của các đơn vị disaccharide trong ulvan có sự thay đổi khác nhau giữa các loài rong *Ulva* [23].

Cấu trúc của ulvan bao gồm các liên kết lặp lại của các disaccharide trong cấu trúc của ulvan [25] [26].

– Cấu trúc ulvanobiuronic được tạo thành bởi các glucuronic acid, iduronic acid liên kết với sulfated rhamnose, ký hiệu là  $A_{3S}$  và  $B_{3S}$ :



– Cấu trúc ulvan cũng có thể là các ulvanobiose với xylose thay thế các biuronic liên kết với rhamnose, ký hiệu là  $U_{3S}$  và  $U_{2S,3S}$ :



p là vòng pyranoside của hợp chất.

Ulvan có thành phần hóa học và hoạt tính sinh học khác nhau tùy thuộc vào loài rong, vị trí địa lý nơi rong sinh trưởng, thời điểm thu hái và quy trình tách chiết. Sản phẩm ulvan sau quá trình chiết chứa các mono-saccharide phụ khác, gồm manose, galactose, arabinose, ... ảnh hưởng đến độ tinh sạch và hoạt tính của sản phẩm [27] [28] [24] [29].

### 1.2.2. Hình thái và khả năng hòa tan của ulvan

Ulvan là một sulfated polysaccharide mang điện tích vì vậy mà khả năng hòa tan và dạng cấu trúc bị ảnh hưởng bởi pH và hằng số điện môi của dung môi hòa tan [23].

Đặc trưng của một polysaccharide điện tích, ở trạng thái mang điện, dạng cấu trúc của chúng sẽ duỗi ra, trải rộng, phân tán trong dung môi, làm cho độ nhớt dung dịch tăng lên. Chính vì vậy, một polysaccharide đặc trưng có các gốc mang điện (gốc sulfate và carboxyl) và các gốc ưa nước (hydroxyl) như ulvan thì khả năng hòa tan trong nước rất tốt, dung dịch thu được đục, độ nhớt giảm, có màng xuất hiện. Hình chụp TEM của ulvan trong nước theo công trình [29] đã nghiên cứu và cho thấy sự xuất hiện các hạt kết tụ hình cầu không phân tán hoàn toàn trong dung môi liên kết với nhau bằng các sợi. Cấu trúc vi mô dạng chuỗi ngọc trai vì vậy rất giống với cấu hình của sợi ADN cuộn chặt các histon thường được hình thành khi hòa tan vật liệu polymer mang điện tích trong dung môi không phù hợp.

Tính chất hòa tan không tốt của ulvan trong nước có sự khác biệt đối với một polysaccharide mang điện. Điều này được giải thích là do sự kết tụ ở ulvan do các gốc điện tích ở trạng thái mang điện khi hòa tan trong dung môi hình thành các liên kết ion nội phân tử. Đặc biệt các liên kết ion, liên kết nội phân tử còn do các liên kết hydro giữa các nguyên tử oxy của nhóm sulfate trên rhamnose với nhóm hydroxyl gắn với C2 trên uronic acid liền kề trước hay với nhóm carboxyl của uronic acid nối tiếp theo sau. Mặt khác là do tính kỵ nước của gốc methyl của đường rhamnose trong cấu trúc ulvan [24].

Trong điều kiện pH dung dịch thấp hơn giá trị pKa của uronic acid (3.28) thì tương tác ion của nhóm carboxyl duy trì siêu cấu trúc dạng chuỗi ngọc trai của ulvan bị bẽ gãy, các hạt kết tụ kích thước nano của ulvan bị phân tán trong dung dịch. Vì vậy, quá trình chiết bằng dung môi có pH gần bằng giá trị pKa của uronic acid cho hiệu quả chiết cao hơn so với chiết trong nước. Nhưng polysaccharide thu được thường sẽ có khối lượng phân tử thấp do xảy ra thủy phân, đặc biệt là liên kết giữa uronic acid và rhamnose [24].

Ở điều kiện pH từ 13 trở lên, hình thái ulvan được mô tả như dạng chuỗi xoắn ốc bị phá vỡ, hình thành hệ dung dịch đồng nhất. Để chuyển ulvan thành các chất dẫn xuất, ulvan cần được tác dụng hóa học lên các nhóm chức. Trong

quá trình biến tính, xu hướng ulvan kết tụ thành hạt trong dung môi sẽ làm giảm số lượng các nhóm chức hoạt động, giảm hiệu suất chuyển đổi của ulvan. Tuy vậy, nhưng số lượng các nhóm chức hoạt động trên bề mặt tự do của các hạt kết tụ tương đối cao cùng với việc có thể lựa chọn dung môi phù hợp cho phép ta phân tán ulvan đồng nhất vào dung môi, ulvan vẫn là chất có tiềm năng biến tính thành các dẫn xuất với hiệu suất cao tùy theo các mục đích ứng dụng khác nhau [23].

### 1.2.3. Tính chất vật lý của ulvan

Ulvan là một hỗn hợp của rất nhiều polysaccharide có khối lượng phân tử khác nhau tùy vào loài rong. Đặc biệt polysaccharide có cấu trúc giống nhau nhưng khối lượng phân tử khác nhau sẽ có các hoạt tính sinh học khác nhau. Chính vì vậy, việc xác định khối lượng phân tử của một số polysaccharide có cấu trúc đặc trưng và có hoạt tính sinh học polysaccharide hoạt là hết sức thiết yếu trong quá trình nghiên cứu các polysaccharide đó. Việc xác định khối lượng phân tử trung bình của polysaccharide ulvan, thông thường sử dụng một phương pháp hiệu quả là sắc ký rây phân tử HPSEC. Cấu tạo của hệ máy HPSEC chính là hệ máy sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC, sử dụng cột rây phân tử với dung môi và đầu dò tương ứng phù hợp với chất phân tích và cột như đầu dò tán xạ ánh sáng RI hay đầu dò UV-VIS.

Từ phổ HPSEC ulvan [27], các đỉnh có hiện tượng doãng rộng, phản ánh tính chất kết tụ của các phân tử ulvan. Ba nhóm macro-ulvan gồm có nhóm khối lượng phân tử trung bình 775kDa (thời gian lưu 8,3 phút), nhóm 150kDa (9,8 phút) và nhóm 1,5kDa (14 phút). Theo như nghiên cứu [30] cũng sử dụng HPSEC để xác định khối lượng phân tử trung bình của ulvan chiết từ các dung môi khác nhau. Kết quả cho thấy, ulvan chiết được thuộc hai nhóm: nhóm có khối lượng phân tử trong khoảng  $300-500 \times 10^3$  g/mol và nhóm  $85-180 \times 10^3$  g/mol. Trong khi ulvan chiết bằng oxalate chủ yếu nằm trong nhóm có khối lượng phân tử lớn thì cho ra kết quả ngược lại, khi chiết bằng HCl thì chủ yếu phân bố ở nhóm khối lượng phân tử thấp. Sử dụng với dung môi chiết là DMSO (Dimethyl sulfoxide), phổ ghi nhận ulvan có khối lượng phân tử thấp nhưng xuất hiện nhiều pic khác nhau còn ulvan chiết bằng dung dịch NaCl thì phân bố đều ở cả hai vùng khối lượng.

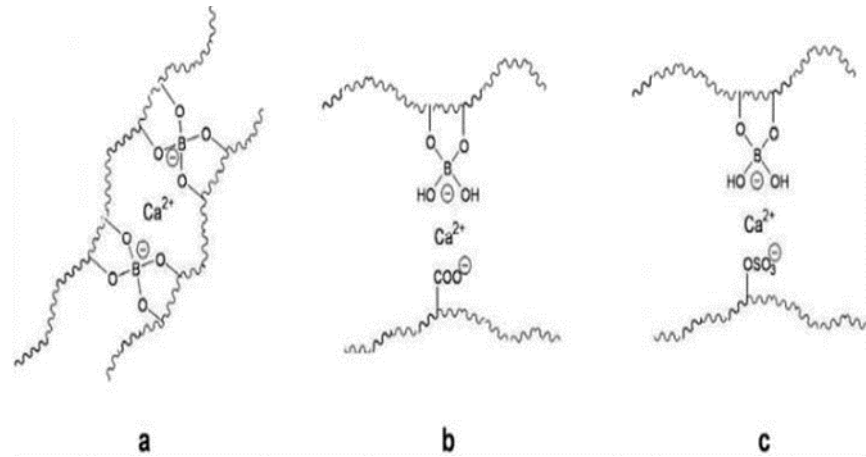
Để đánh giá sự biến đổi của ulvan dưới tác động của nhiệt, các phương pháp TGA và DSC đã được các nhà khoa học ở công trình [31] áp dụng. Quan sát đồ thị đường biểu diễn sự thay đổi khối lượng của ulvan khi tăng nhiệt độ, sự giảm khối lượng đầu tiên xuất hiện ở khoảng 70-80°C khi ulvan thoát hơi nước. Hơi nước chiếm gần 20% khối lượng của mẫu. Quá trình mất khối lượng tiếp theo ở khoảng 220°C liên quan đến giai đoạn phân hủy đầu tiên của polysaccharide. Giai đoạn phân hủy tiếp theo diễn ra ở vùng nhiệt độ 700°C khi toàn bộ chất hữu cơ bị chuyển hóa thành dạng hơi. Khối lượng tro còn lại chiếm khoảng hơn 20% khối lượng ulvan ban đầu.

Độ tinh thể hóa của ulvan cũng đã được nghiên cứu bằng phương pháp tán xạ tia X [31]. Phổ XRD của bột ulvan là phổ điển hình của một polymer bán tinh thể với dấu hiệu tinh thể ở 13,1°; 23,2°; 26,4°; 32,6°; 39,4°. Mức độ tinh thể hóa được tính trên diện tích peak tinh thể so với diện tích tổng là 15%, cho thấy dạng vô định hình vẫn chiếm ưu thế so với dạng tinh thể. Sự sắp xếp của polymer ulvan hình thành nên cấu trúc như trên sẽ thể hiện những đặc tính đặc thù về độ linh động, độ trương nở, độ đục, khả năng hòa tan, sức căng bề mặt của một polymer.

#### **1.2.4. Gel của ulvan**

Ulvan có khả năng tạo gel trong nước tương tự như alginate và khả năng này phụ thuộc vào cơ chế tạo các liên kết borate ester. Để tạo ra hydrogel, điều kiện tối ưu là phải có sự hiện diện của acid boric và ion calcium trong dung dịch với pH = 7,5. Hydrogel được tạo thành có độ đàn hồi (storage modulus) khoảng 250Pa.

Ulvan tạo gel bằng cách tạo thành borate ester với ulvan 1,2-diol và liên kết ngang qua ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Ion calcium có vai trò làm cầu nối cho phức và/hoặc làm cho borate ester trở nên bền hơn, còn nhóm sulfate và carboxylic acid cũng có thể tạo liên kết với ion  $\text{Ca}^{2+}$  góp phần vào quá trình tạo gel của ulvan. Cơ chế này được mô tả chi tiết ở Hình 1.4, trong các nghiên cứu của Lahaye và đồng nghiệp vào năm 2007 [32]. Ulvan tạo thành hydrogel với độ đàn hồi (storage modulus) khoảng 250Pa trong điều kiện tối ưu khi có mặt của acid boric và ion calcium trong dung dịch với pH=7,5.



Hình 1. 4. Cơ chế tạo hydrogel của ulvan qua  $Ca^{2+}$ : hoặc a) của borate ester hoặc một phần của b) carboxylate hoặc một phần của c) sulfate

Trong quá trình hình thành gel các polysaccharide cũng sẽ cho ra các gel không giống bao gồm cả việc hình thành ester với borate. Mark Lahaye và các cộng sự đã lý giải cơ chế hình thành gel từ ulvan chiết từ rong *Ulva papenfussii* [32],[36] như sau: Gel tạo nên dựa vào liên kết của borate với 2 nhóm hydroxyl liên kề tại vị trí cacbon số 2 và 3 của gốc đường rhamnose trong phân tử polysaccharide và phức borate với  $Ca^{2+}$ . Cơ chế trên đòi hỏi tại vị trí cacbon số hai của rhamose, nhóm hydroxyl không bị ester hóa bởi gốc sulfate. Bên cạnh các nhóm hydroxyl, nhóm carboxyl trong gốc acid và nhóm sulfate cũng tham gia vào quá trình tạo gel theo cơ chế khác khi tạo liên kết ion với borate thông qua các cation đa điện tích.

Ulvan có khi tạo gel đôi khi không tạo gel. Trong một nghiên cứu gần đây [33], các nhà nghiên cứu đã sử dụng phổ  $^{11}B$  và  $^{13}C$  NMR để phân tích các mảnh gel ulvan đã được thủy phân. Giá trị pH tối ưu để tạo thành gel ulvan được cho là 7,5. Tuy nhiên, ở giá trị pH này, các đỉnh phức ulvan-boron không được quan sát thấy, cho thấy không có gel ulvan được hình thành. Khi tăng giá trị pH từ 9 trở lên, phức ulvan-boron chỉ được quan sát đối với ulvan có cấu trúc  $A_{3S}$ . Vì vậy, có thể kết luận rằng cấu trúc ulvan  $A_{3S}$  tham gia vào quá trình tạo gel của ulvan bằng cách cố định boric acid, trong khi cấu trúc  $B_{3S}$  với đơn vị cấu trúc lặp lại chứa iduronic acid không có vai trò trong quá trình tạo gel [33].

Công trình nghiên cứu [24] đã tổng hợp những điều kiện thuận lợi tạo ra gel từ ulvan trong những nghiên cứu trước đây: ulvan chiết từ *Ulva reticulata*,



*Ulva rigida*, *Ulva rotundata*, *Ulva armoricana* được bổ sung acid boric, ion  $\text{Ca}^{2+}$  và duy trì ở pH trong khoảng 7,5-8 có thể tạo gel liên kết yếu. Ở điều kiện tối ưu: nồng độ boric acid (15-33mM), nồng độ  $\text{Ca}^{2+}$  (7mM) và pH=7.5, ulvan chiết từ rong *Ulva armoricana* được hòa tan ở nồng độ 1,6 (w/v) hình thành gel với module dự trữ năng lượng khoảng 250 Pa. Các nồng độ ion và giá trị pH khác sẽ gây bất lợi cho sự tạo gel. Quá trình hình thành gel đòi hỏi sự có mặt của cation đa điện như  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  thay vì cation đơn điện tích (thử nghiệm bổ sung NaCl vào dung dịch ulvan chứa acid boric ở giá trị pH=7.5 không hình thành nên gel). Module đàn hồi của gel ulvan chiết từ rong *Ulva armoricana* tăng dần theo thứ tự các cation đa điện Ca, Mn, Zn, Cu. Trong khi đó,  $\text{Mg}^{2+}$  không tạo gel với ulvan. Tuy nhiên, ở [24], các tác giả đã tiến hành các thí nghiệm cho thấy hoàn toàn không cần thêm  $\text{Ca}^{2+}$  để tạo gel với ulvan bởi vì một lượng nhỏ cation này đã có mặt trong ulvan khi chiết là đủ để tạo gel.

Các liên kết trong gel gồm các liên kết yếu, chẳng hạn như liên kết kém bền giữa nhóm ester borate và các cation, dễ dàng bị bẻ gãy khi xử lý nhiệt. Vì vậy, gel có tính biến đổi theo nhiệt, nó sẽ trở thành dung dịch nhớt khi nhiệt độ tăng lên cao và sẽ hình thành lại gel khi nhiệt độ giảm xuống. Tuy nhiên, cơ tính của gel này kém khi tiếp xúc với các chất dịch trong cơ thể, do quá trình trao đổi cation  $\text{Ca}^{2+}$  (đóng vai trò duy trì mạng lưới liên kết giữa các anionic polysaccharide) với các cation  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  có mặt trong các dịch trong cơ thể. Do đó, ứng dụng của gel này trong kỹ thuật mô tương đối hạn chế bởi tính bất ổn cơ học và khó kiểm soát được khả năng hòa tan của ulvan ở các điều kiện sinh lý khác nhau của cơ thể [23].

### **1.2.5. Hoạt tính sinh học của ulvan**

Ulvan đã được khẳng định là vật liệu sinh học có khả năng tự tái tạo, không độc hại, tương thích sinh học tốt khi thể hiện nhiều hoạt tính sinh học khả quan trên nhiều loại chủ thể khác nhau. Ngoài ra, ulvan còn có khả năng tự phân hủy sinh học, dễ dàng đào thải khỏi cơ thể. Hầu hết các chức năng tăng cường sức khỏe của ulvan đến từ sự có mặt của các gốc sulfate trong cấu trúc của chúng [23].

- *Hoạt tính chống oxy hóa*

Rất nhiều công bố cho thấy sulfate polysaccharide chiết xuất từ thiên nhiên thể hiện hoạt tính chống oxy hóa quan trọng trong các thí nghiệm *in vitro*. Nó là một chất chống oxy hóa tự nhiên tuyệt vời và có khả năng lớn để ngăn ngừa các bệnh gây ra bởi các gốc tự do. Ulvan chiết từ rong *Ulva papenfussii* cho thấy khả năng quét các gốc điện tích tự do (nguyên nhân gây ra sự lão hóa và nguồn gốc của nhiều loại bệnh như ung thư, vô sinh) [34]. Các nghiên cứu về hoạt tính này của Qi năm 2005 [29] đã chuẩn bị các phân đoạn ulvan có khối lượng phân tử khác nhau bằng phương pháp thủy phân  $H_2O_2$  rồi xác định hoạt tính chống oxy hóa của các phân đoạn này. Nghiên cứu cho thấy ulvan có khối lượng phân tử thấp có hoạt tính chống oxy hóa cao. Kết quả cho thấy ulvan có khối lượng phân tử thấp có khả năng bắt các tế bào và cung cấp proton hiệu quả hơn so với ulvan có khối lượng phân tử cao. Cũng giống như các nhóm sulfated polysaccharide đã được nghiên cứu trước đây như fucoidan chiết từ rong nâu, hoạt tính chống oxy hóa của ulvan phụ thuộc vào hàm lượng và sự phân bố của gốc sulfate trên mạch polysaccharide. Tối ưu về hoạt tính của ulvan, Qi và cộng sự tiến hành tăng hàm lượng sulfate trên polysaccharide nhờ quá trình xử lý với sulphur trioxide/N,N-dimethylformamide, tăng cường hoạt tính chống oxy hóa của sản phẩm [34]. Kết quả nghiên cứu thời gian sau đó của nhóm tác giả này đã cải tiến và đạt được thành công trong thúc đẩy hiệu quả hoạt tính chống oxy hóa bằng cách xử lý ulvan với các nhóm acetyl và benzoyl.

- *Hoạt tính chống đông tụ máu*

Thành phần Heparin là một loại glycoaminoglycan có nguồn gốc từ động vật, trong cấu trúc có các nhóm carboxylic và sulfate. Chất này đã được chứng minh và ứng dụng trên thị trường hơn 50 năm nay làm chất chống đông tụ máu, ngăn ngừa tắc nghẽn tĩnh mạch huyết khối [35]. Tuy nhiên, heparin gây ra những hiệu ứng phụ, tốn nhiều công đoạn phức tạp để tinh sạch và ngày càng xuất hiện các mối quan ngại về miễn dịch và truyền bệnh khi sử dụng. Vì vậy, tìm kiếm một nguồn chất chống đông tụ máu mới thay thế cho heparin là một vấn đề cấp thiết. Với cấu trúc tương tự như heparin, ulvan cũng thể hiện hoạt tính chống đông tụ máu. Khối lượng phân tử của polysaccharide ảnh hưởng quan trọng đến hoạt tính chống đông tụ máu, cụ thể thì mạch càng dài càng ức

ché sự hoạt động của các thrombin (thrombin là enzyme trong plasma máu, xúc tác quá trình đông máu bằng cách chuyển hóa fibrinogen thành fibrin). Hàm lượng và vị trí nhóm sulfate trên polysaccharide cũng tác động đến hoạt tính này.

– *Hoạt tính tăng cường hệ miễn dịch*

Theo nghiên cứu, đại thực bào đóng vai trò quan trọng trong việc loại bỏ các thành phần hoại tử và bụi trong phổi. Các tế bào chết phải được loại bỏ để ngăn chặn hiện tượng viêm nhiễm. Ban đầu, các tế bào viêm chủ yếu là các tế bào hạt trung tính, nhưng khi chúng lão hóa, chúng sẽ trở thành tế bào viêm. Đại thực bào và các tế bào thực bào từ tủy xương sản xuất các glycosaminoglycan tiêu biểu như hyaluronic acid và sulfated chondroitin. Các glycosaminoglycan này chứa các thành phần glucuronic acid và sulfate, giúp loại bỏ các tế bào viêm, các tế bào già cỗi và tổn thương để làm sạch tổ chức. Nhờ có cấu trúc tương tự như hyaluronic acid và sulfated chondroitin, các sulfated polysaccharide chiết từ rong đỏ như carrageenan hay chiết từ rong lục như ulvan cũng thể hiện hoạt tính tăng cường hệ miễn dịch. Ulvan từ rong *Ulva rigida* được chứng minh góp phần tăng cường chức năng miễn dịch của cơ thể nhờ thúc đẩy hoạt tính thực bào tại các vùng viêm nhiễm [36].

– *Hoạt tính giảm lipid máu*

Góp phần không nhỏ về vai trò của ulvan trong đời sống vì nó thuộc dạng chất xơ tiêu hóa hòa tan được trong nước nhưng không bị phân hủy bởi các enzyme sinh ra trong cơ thể, polysaccharide này giúp ngăn ngừa các bệnh đường ruột nhờ khả năng giữ nước. Như một số chất xơ tiêu hóa khác, ulvan có tác dụng giảm hàm lượng cholesterol trong máu. Với đặc tính là điện tích trên ulvan tạo phức với các acid trong mật, làm cho quá trình bài tiết của mật hoạt động theo, chính vì thế giảm hàm lượng cholesterol trong máu. Khả năng làm giảm cholesterol trong máu này đã được Yu và nhóm nghiên cứu của mình thử nghiệm trên chuột [37]. Kết quả thể hiện ulvan chiết từ *Ulva pertusa* làm giảm đáng kể nồng độ cholesterol khối lượng phân tử thấp (nguyên nhân chính gây ra bệnh xơ vữa động mạch) và kích thích bài tiết mật ở chuột. Cũng giống như các loài rong khác hoạt tính này của ulvan phụ thuộc nhiều vào khối lượng

phân tử của polysaccharide do độ nhớt của ulvan càng cao thì càng làm giảm khả năng liên kết với các acid mật.

### 1.3. Ứng dụng của ulvan

Những năm qua, đã có nhiều bằng chứng khoa học về các ích lợi đối với sức khỏe của các polysaccharide có nguồn gốc từ biển. Trong số đó, ulvan là một polymer mới với nhiều hoạt tính sinh học vô cùng có ích và có tiềm năng ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực như dinh dưỡng, mỹ phẩm, thực phẩm chức năng, y tế, hóa chất nông nghiệp và nuôi trồng thủy sản [24].

Ulvan, một loại polysaccharide mới có nhiều hoạt tính sinh học hữu ích, đã được chứng minh qua nhiều nghiên cứu, là nguồn cung cấp các gốc đường hiếm và có thể được sử dụng làm nguyên liệu chính cho một số ngành sản xuất hóa chất. Ulvan chứa chủ yếu các monomer rhamnose và biuronic acid, trong đó rhamnose là một loại monomer hiếm và khó tìm trong thiên nhiên. Rhamnose chiết từ ulvan có thể được sử dụng để tổng hợp mùi vị và được thêm vào các sản phẩm mỹ phẩm chăm sóc da để tăng cường tổng hợp collagen, tăng độ đàn hồi cho da và làm trắng da.

Ulvan làm nguyên liệu cho các ứng dụng y khoa vì chứa L-rhamnose, thành phần chủ yếu của kháng nguyên bề mặt của nhiều loại vi khuẩn. Chúng cũng có thể cung cấp iduronic acid, một dạng đường có hoạt tính chống huyết khối tương tự như heparin, một loại glycosaminoglycan tìm thấy ở động vật có vú. Tuy nhiên, việc nghiên cứu hợp chất iduronic acid này vẫn đang gặp nhiều khó khăn do độ hiếm gặp của nó, nếu như ulvan được khai thác hiệu quả hơn thì rào cản hạn chế trên có thể sẽ được gỡ bỏ.

Các nhà nghiên cứu đang quan tâm đến ulvan oligomer và polymer ngoài monomer, vì chúng có tiềm năng trong các hoạt tính sinh học và ứng dụng khác. Nghiên cứu cho thấy ulvan oligomer và polymer có tác dụng ngăn chặn sự phát triển của tế bào ung thư, tăng cường hệ miễn dịch, kháng một số chủng virus cúm và ngăn chặn đông máu.

Nhóm nghiên cứu và đồng nghiệp [39] đã sử dụng rhamnose và oligomer từ các polysaccharide bị loại bỏ sulfate có cấu trúc tương tự ulvan được chiết từ *Monostroma* để điều trị các bệnh đường ruột. Sự ứng dụng đã được thử nghiệm trên chuột và đã cho thấy khả năng tăng sản xuất glycoprotein cao phân

tử mucin để bảo vệ niêm mạc ruột. Ngoài ra, việc thử nghiệm ulvan trên chuột bạch tạng cũng cho thấy tiềm năng ngăn ngừa bệnh giải độc gan.

Ulvan liên quan đến hệ tiêu hóa trên cơ thể người thông qua các nghiên cứu. Ulvan cung cấp chất xơ giúp tiêu hóa tốt và không bị phân hủy bởi các enzyme trong cơ thể con người. Là một chất xơ tiêu hóa, ulvan giữ nước tốt và đóng vai trò trong việc tạo khối, cũng như ngăn ngừa các rối loạn chức năng vận chuyển đường ruột [22]. Ulvan cũng có tác dụng làm giảm nồng độ mỡ trong máu, đồng thời ngăn ngừa các bệnh về tim như tai biến sơ vữa mạch máu não gây đột quỵ trên cơ thể người và giảm lượng cholesterol trong máu. Thêm vào đó, các nghiên cứu đang quan tâm đến tác dụng của ulvan trong chuyển hóa lipid trên cơ thể người.

Ulvan cũng được sử dụng làm thực phẩm bổ sung chức năng trong chăn nuôi gia súc, gia cầm và nuôi trồng thủy hải sản. Các oligosaccharide có trong ulvan giúp tăng hàm lượng protein trong sản phẩm và kích thích hệ miễn dịch động vật, từ đó giúp động vật kháng nhiều loại bệnh. Nghiên cứu cho thấy ulvan chiết từ rong *Ulva rigida* cũng có khả năng kích thích tăng miễn dịch ở cá. Thêm vào đó, trong thời gian gần đây đã có những phát minh sử dụng ulvan dạng nano kết hợp với đất sét để tạo ra sản phẩm khử độc thức ăn cho chăn nuôi [21].

Trong nông nghiệp, về ứng dụng của ulvan được sử dụng rất phổ biến. Ngoài tác dụng làm phân bón cây, ulvan còn làm thuốc tiêu diệt một số loại nấm gây bệnh trên cây. Một số họ đậu *Medicago truncatula* đã phát triển tốt khi sử dụng dịch chiết ulvan chống lại được các loài nấm gây bệnh *Colletrichum trifolii*. Ulvan giúp kích thích tăng trưởng và cố định đạm ở rễ cây và thân cây.

Ulvan đã được nghiên cứu trong lĩnh vực hóa học, được sử dụng như một chất chỉ thị sinh học để xác định mức độ ô nhiễm kim loại nặng ở các vùng biển. Gần đây, một số nghiên cứu đã tập trung vào khả năng trao đổi ion đặc biệt của polysaccharide, giúp tăng hiệu quả xử lý nước thải công nghiệp chứa kim loại nặng, đồng thời tăng hàm lượng khoáng chất cần thiết trong đất trồng và thức ăn chăn nuôi [40].

Ulvan có khả năng tạo gel giúp duy trì hàm lượng cation, pH và nhiệt độ, tăng độ bền cơ học và khả năng bám dính với phân tử chất mang. Các ứng dụng của gel ulvan như làm chất dẫn thuốc, băng vết thương nha thuốc cần được nghiên cứu kỹ hơn để đảm bảo độ ổn định và chính xác, đặc biệt là trong ngành dược phẩm [25].

#### 1.4. Chiết tách ulvan

Rong sau khi được thu hái về thường được rửa lại bằng nước biển để loại bỏ đất, cát, bụi bám trên rong rồi tiếp tục rửa nhanh sơ qua bằng nước máy sau đó đem phơi khô ở trong mát hoặc sấy khô ở 50°C. Theo các nghiên cứu ở [41], tác giả đã cho thấy mức ảnh hưởng của các biện pháp lưu trữ rong *Ulva rotundata* lên thành phần hóa học của rong nguyên liệu, thành phần đường và khối lượng phân tử trung bình của polysaccharide sạch được lưu trữ bằng các cách: sấy ở 50°C và 70°C; ngâm trong dung dịch muối NaCl 25% ở nhiệt độ 4°C trong 33 tuần và nhiệt độ phòng trong 26 tuần; trữ lạnh ở nhiệt độ -30°C và -80°C; ngâm trong dung dịch acetic acid, citric acid và muối NaCl ở 4°C trong 2, 7 và 22 tuần.

Trước khi tiến hành chiết rong, quá trình ngâm rong trong dung dịch ethanol giúp loại bỏ lipid và các chất màu có thể ảnh hưởng đến quá trình chiết. Theo công trình [29], bột rong được ngâm chiết trong dung dịch ethanol 70 độ trong một giờ, sau đó được ly tâm để thu mẫu rong và loại bỏ dung dịch ethanol. Cũng tương tự ở công trình khác [31], Anabela Alves cùng các cộng sự đã sử dụng dung môi là acetone và dichlorometane thay cho ethanol để chiết hồi lưu rong trong thiết bị soxhlet.

Nước thường được các nhà khoa học chọn làm dung môi chiết dù nước không thực sự hòa tan tốt ulvan, nhưng nước vẫn lựa chọn hàng đầu với những lý do sau: chiết bằng nước giúp bảo toàn cấu trúc ulvan, tiết kiệm kinh phí dung môi khi chiết với lượng lớn nguyên liệu, giảm các bước xử lý dung môi sau khi chiết. Từ các kết quả nghiên cứu trước đây [31] [27] [33] [29], có thể thấy polysaccharide được chiết trong nước ở nhiệt độ từ 60°C đến nhiệt độ sôi trong khoảng thời gian từ 1 đến 3 tiếng. Để giảm thời gian chiết xuống còn 30 phút nhưng vẫn duy trì hiệu suất chiết, rong *Ulva rigida* được chiết trong nồi hấp ở 130°C.

Ngoài việc chiết bằng nước ulvan còn được chiết trong môi trường acid HCl (pH = 1-2) [28] [33] [29]. Dung môi acid làm thủy phân thành tế bào rong cấu tạo từ cellulose, hemicellulose; giúp lôi kéo ulvan từ rong đi vào dung môi khi chuyển hóa polysaccharide ulvan thành dạng acid và tách khỏi các nhóm cation đa điện tích; cắt đứt liên kết các polysaccharide với protein. Anabela và các cộng sự đã khảo sát hiệu suất và thành phần polysaccharide chiết từ rong *Ulva spp.* Trong môi trường acid khi thay đổi các điều kiện chiết như giá trị pH, thời gian chiết, nhiệt độ chiết [31]. Kết quả cho thấy, hiệu suất chiết polysaccharide trong môi trường acid thu được cao hơn trong môi trường nước nhưng khối lượng phân tử trung bình của sản phẩm bị giảm đi, điều này được giải thích là do sự thủy phân các polysaccharide chiết được. Rong sau khi làm sạch được lưu trữ bằng các cách sấy ở 50°C và 70°C; ngâm trong dung dịch muối NaCl 25% ở nhiệt độ 4°C trong 33 tuần và nhiệt độ phòng trong 26 tuần; trữ lạnh ở nhiệt độ -30°C và -80°C; ngâm trong dung dịch acetic acid, citric acid và muối NaCl ở 4°C trong 2, 7 và 22 tuần.

Để loại bỏ lipid và các hợp chất màu trước khi chiết, thường sử dụng dung môi ethanol. Theo công trình [29], ethanol 70°C được sử dụng để ngâm chiết rong trong một giờ, sau đó sử dụng phương pháp ly tâm để thu nhận mẫu rong và loại bỏ ethanol. Ở một công trình khác [31], Anabela Alves cùng các cộng sự đã sử dụng dung môi là acetone và dichlorometane thay cho ethanol để chiết hồi lưu rong trong thiết bị soxhlet.

Mặc dù nước không thực sự hòa tan tốt ulvan, nước vẫn được nhiều nhà khoa học lựa chọn làm dung môi để chiết polysaccharide từ các loài rong *Ulva* với những lý do sau: chiết bằng nước giúp bảo toàn cấu trúc ulvan, tiết kiệm chi phí dung môi khi chiết với lượng lớn nguyên liệu, giảm các bước xử lý dung môi sau khi chiết. Từ các bài báo [31] [27] [25] [29], có thể thấy polysaccharide được chiết trong nước ở nhiệt độ từ 60°C đến nhiệt độ sôi trong khoảng thời gian từ 1 đến 3 tiếng. Để giảm thời gian chiết xuống còn 30 phút nhưng vẫn duy trì hiệu suất chiết, rong *Ulva rigida* được chiết trong nồi hấp ở 130°C.

Để tăng hiệu suất chiết polysaccharide, nhiều công trình mô tả quá trình chiết sử dụng dung môi khác thay cho nước. Chiết rong *Ulva* trong môi trường acid HCl (pH = 1-2) [28] [25] [29]. Bằng cách dung môi acid làm thủy

phân thành tế bào rong cấu tạo từ cellulose, hemicellulose; giúp lôi kéo ulvan từ rong vào dung môi khi chuyển hóa polysaccharide ulvan thành dạng acid và tách khỏi các nhóm cation đa điện tích; cắt đứt liên kết các polysaccharide với protein. Anabela và các cộng sự đã khảo sát hiệu suất và thành phần polysaccharide chiết từ rong *Ulva spp.* Trong môi trường acid khi thay đổi các điều kiện chiết như giá trị pH, thời gian chiết, nhiệt độ chiết [31]. Hiệu suất chiết polysaccharide trong môi trường acid thu được cao hơn trong môi trường nước nhưng trong quá trình bị ảnh hưởng bởi các yếu tố khác làm khối lượng phân tử trung bình thu được bị giảm, nguyên nhân do sự thủy phân các polysaccharide.

Trong môi trường acid ở nhiệt độ cao từ 70 đến 100°C. Một cách khác để chiết polysaccharide từ rong là sử dụng các enzyme như cellulase để thủy phân cellulose, proteinase để thủy phân protein, amylase để thủy phân tinh bột [27]. Trong phương pháp này, dung môi chiết được bổ sung enzyme để điều chỉnh sự thủy phân ulvan với giá trị pH ổn định hơn, nhưng sau khi chiết, enzyme sẽ cần được xử lý bất hoạt.

Do polysaccharide âm điện có khả năng liên kết chặt chẽ với các cation đa điện tích trong rong, đặc biệt là  $Ca^{2+}$ . Vì vậy, một số nhóm các nhà khoa học đã bổ sung các chất tạo phức với  $Ca^{2+}$  như muối oxalate, EDTA vào dung môi chiết để giải phóng các polysaccharide khỏi liên kết với  $Ca^{2+}$ , để tăng hiệu suất chiết [28] [26] [29].

Để tách ulvan từ hỗn hợp polysaccharide chiết được, B.Ray và cộng sự là những nhà nghiên cứu cho ra công bố sớm nhất kết quả trong công trình [26]. Các tác giả đã sử dụng nhựa trao đổi ion DEAE-sepharose CL-6B để tách các phân đoạn polysaccharide điện tích. Sau quá trình rửa giải ở các nồng độ muối NaCl khác nhau, các phân đoạn được xác định thành phần đường, uronic acid, sulfate. Kết quả đã xác định được 4 nhóm polysaccharide có trong rong lục *Ulva rigida*, trong đó có ulvan. Tuy nhiên, quá trình tách sử dụng nhựa trao đổi ion DEAE cực kỳ tốn kém, lượng polysaccharide tách chỉ thích hợp ứng dụng trong quy mô phòng thí nghiệm nhằm phân tích cấu trúc sản phẩm.

Bên cạnh các yếu tố loài rong *Ulva*, vị trí phân bố, thời gian thu mẫu thì quá trình chiết ảnh hưởng cực kỳ lớn đến thành phần và cấu trúc sản phẩm. Chính vì vậy, khảo sát các điều kiện của quá trình chiết cũng như tìm ra phương



pháp tách ulvan phù hợp đối với từng loại rong phân bố ở một địa điểm cụ thể, là nhiệm vụ bắt buộc nhằm thu được sản phẩm ulvan tinh sạch, cho hiệu suất cao, mang lại những giá trị cần thiết nhất.

Như vậy, cho đến nay các nghiên cứu về polysaccharide từ các loài thuộc ngành rong lục nói chung và ulvan từ chi *Ulva* nói riêng vẫn còn rất hạn chế. Trong số các loài rong lục thuộc chi *Ulva* đã được công bố thì chưa có nghiên cứu nào về ulvan từ rong lục *Ulva papenfussii* đây là loài rong lục xuất hiện nhiều ở khu vực ven biển Khánh Hòa nói riêng và khu vực biển Nam Trung Bộ nói chung. Với các lý do nêu trên, đề tài: "Nghiên cứu chiết tách và đặc trưng cấu trúc của ulvan từ rong lục *Ulva papenfussii*", để bước đầu đánh giá về hàm lượng và một số đặc trưng cấu trúc của ulvan từ loài rong này làm cơ sở cho các nghiên cứu sâu hơn về cấu trúc và hoạt tính sinh học của ulvan qua đó góp phần bổ sung thêm các nghiên cứu về polysaccharide từ rong biển và mở rộng khả năng ứng dụng của nguồn rong biển Việt Nam.

## CHƯƠNG 2

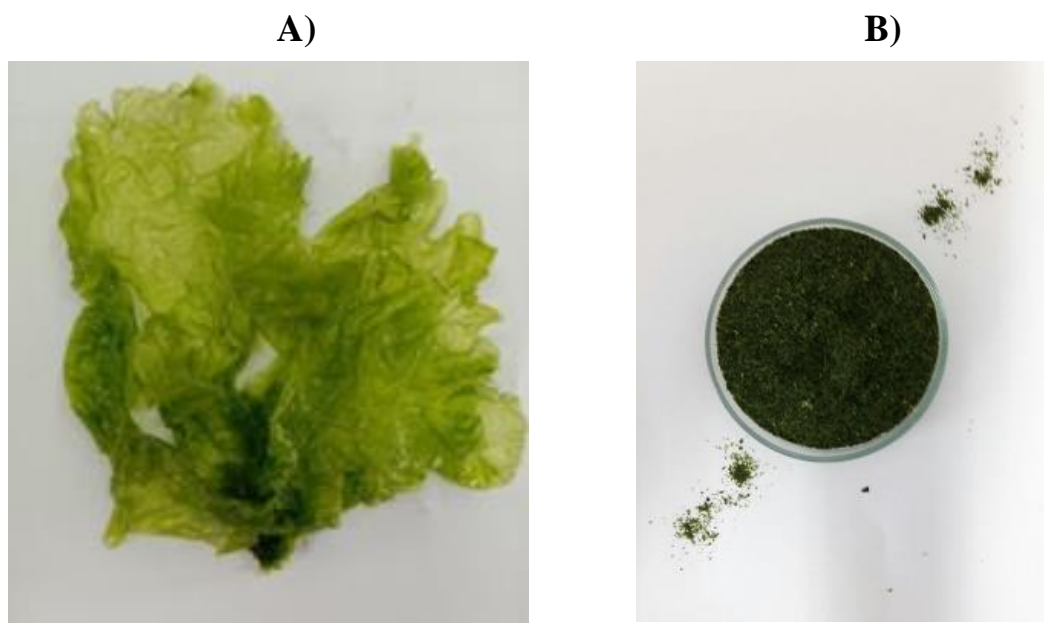
### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là ulvan tách chiết từ rong lục *U. papenfussii* thu thập ở vịnh Nha Trang, Khánh Hòa.

Thời gian vào tháng 5 năm 2022 địa điểm tại vùng biển Hòn Chồng Nha Trang – Khánh Hòa, có tọa độ địa lý là  $12^{\circ}15'53.7''N$  vĩ độ và  $109^{\circ}12'16.8''E$  kinh độ.

Mẫu rong được định danh bởi TS. Võ Thành Trung (Viện nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang). Sau khi thu thập, mẫu rong được rửa sạch bằng nước máy để loại bỏ rác, cát và mùn, sau đó được phơi khô trong bóng râm và nghiền thành bột mịn.



Hình 2. 1. (A) Đặc điểm hình thái rong và (B) bột rong *U. papenfussii* được thu nhận từ vịnh biển Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa.

#### 2.2. Quy trình tách chiết polysaccharide điện tích ulvan

Tham khảo các công trình [31] [27] [24] [41], tác giả đã lựa chọn và điều chỉnh phương pháp chiết phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. Quy trình chiết được tiến hành như sau:

Sau khi thu thập, mẫu rong được rửa bằng nước biển để loại đất, cát, san hô. Sau đó, rong được rửa nhanh qua nước máy, đem ngâm trong ethanol  $80^{\circ}$

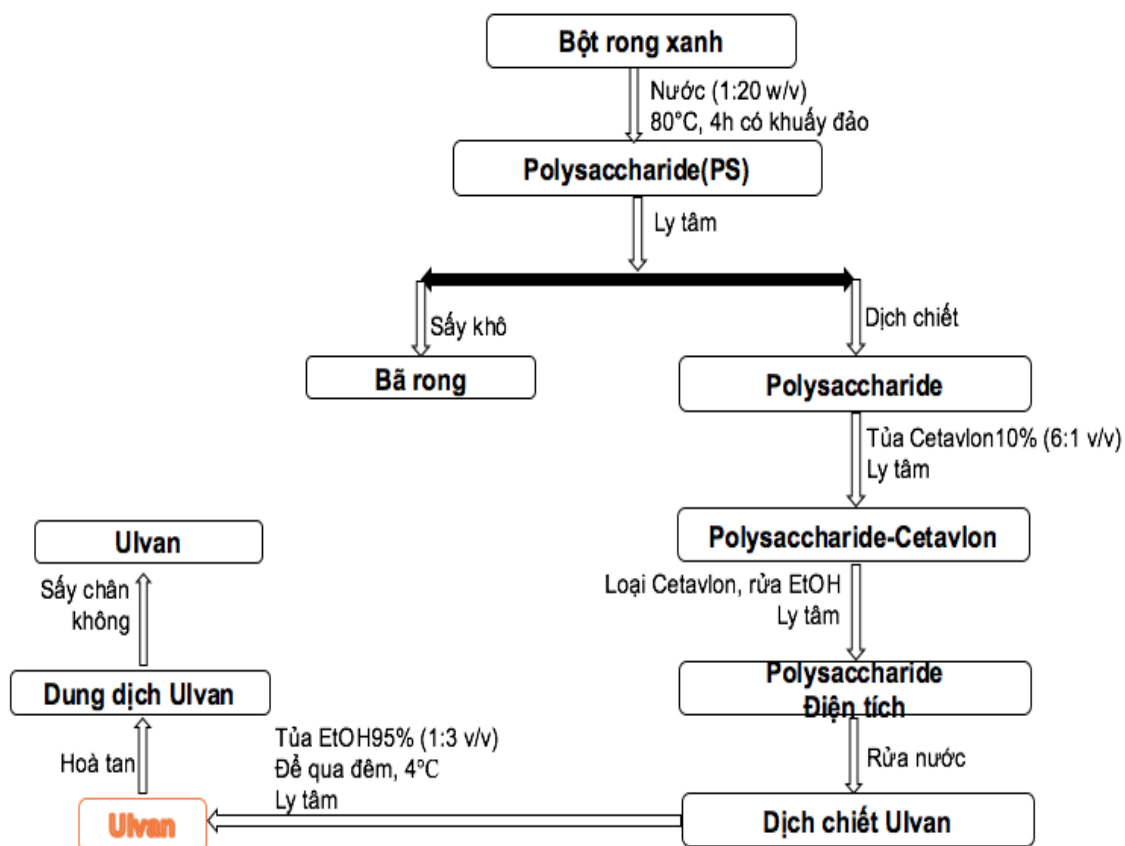
trong 1 tuần để loại các chất màu và các chất có khối lượng phân tử thấp. Rong được sấy khô tại nhiệt độ 50 °C, sau đó được xay, nghiền thành bột và bảo quản trong hộp kín ở nhiệt độ phòng.

Để chiết 10 g bột rong, chúng tôi sử dụng dung dịch nước có pH 6.0, tỷ lệ dung môi:nguyên liệu là 20:1 (ml/g), thời gian chiết là 4 giờ và nhiệt độ chiết là 80°C. Các yếu tố chiết khác như pH dung dịch, tỷ lệ dung môi:nguyên liệu, thời gian chiết và nhiệt độ chiết được kiểm tra và lựa chọn tối ưu trong các thí nghiệm tiếp theo.

Lấy giấy lọc whatman để lọc dịch chiết lần đầu. Sau đó, tiến hành chiết lại bã rong ở điều kiện tương tự và lọc dịch chiết thu được. Tiếp theo, ly tâm dịch chiết 2 lần với tốc độ quay 10.000 vòng/phút để lấy dịch trong. Sau khi cô quay đủ thể tích 100 ml, bổ sung thêm 400 ml ethanol để tạo kết tủa polysaccharide.

Để tách các sản phẩm, polysaccharide tiếp tục được xử lý bằng phương pháp tách điện tích với nhựa cetavlon (hexadecyltrimethylammonium bromide). Sản phẩm polysaccharide được rửa bằng cách rửa 3 lần bằng ethanol 80° và 3 lần bằng ethanol tuyệt đối, sau đó hòa tan trong nước khử ion. Sau đó, sản phẩm được đông khô và cân để tính hiệu suất. Sản phẩm sau đó phân tích thành phần hóa học của các sản phẩm tách được

Quy trình chiết được tóm tắt ở sơ đồ chiết dưới đây:



Hình 2. 2. Sơ đồ quy trình tách chiết polysaccharide điện tích

### 2.3. Phân tích đặc điểm hóa học của polysaccharide

– Tách hàm lượng polysaccharide trung tính và polysaccharide điện tích theo phương pháp sử dụng nhựa cetavlon [42].

Hòa tan 0.5 g polysaccharide vào 50 ml nước khử ion. Thêm vào dung dịch polysaccharide dung dịch cetavlon 1 % cho đến khi dung dịch chuyển từ đục sang trong, tủa bông tạo thành bởi polysaccharide điện tích và cetavlon nổi lên trên dung dịch. Ly tâm dung dịch ở tốc độ 5000 vòng/phút trên thiết bị máy ly tâm lạnh HERMLE, Z 326K, của Đức thu dịch trong polysaccharide trung tính. Định mức 100 ml dung dịch polysaccharide trung tính.

– Phân tích hàm lượng cacbohydrate bằng phương pháp so màu [32].

Xây dựng đường chuẩn với chất chuẩn là glucose trong khoảng nồng độ 10 -200  $\mu\text{g/ml}$ . Cho 0.5 ml chất chuẩn vào ống nghiệm có nắp vặn, bổ sung 1 ml phenol 5 %, 5ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Đun cách thủy 15 phút. Đo UV-VIS ở bước sóng 484 nm. Dung dịch polysaccharide trung tính được hiện màu và xác định hàm

lượng polysaccharide căn cứ vào các bước như trên và đường chuẩn đã xây dựng.

- *Xác định thành phần monosaccharide* [49]: Mẫu được thủy phân trong dung dịch  $\text{H}_2\text{SO}_4$  72% ở  $30^\circ\text{C}$  trong 1 giờ trong bể nhiệt. Sau đó pha loãng dịch thủy phân đến 4%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  và tiếp tục thủy phân mẫu ở  $120^\circ\text{C}$  trong 40 phút trong nồi hấp khử trùng. Dịch thủy phân được lọc qua màng  $0,22\ \mu\text{m}$  và sử dụng để xác định thành phần monosaccharide. Thành phần monosaccharide được phân tích bằng hệ thống sắc ký trao đổi anion hiệu năng cao, Hệ thống Dionex ICS-3000 HPAEC-PAD với phát hiện ampe kế xung (PAD), sử dụng các dung môi rửa giải A - nước khử ion, B - 200 mM NaOH. Số liệu được xử lý bằng chương trình Chromeleon 7.0 (Thermo Scientific).

- *Phân tích hàm lượng sulfate bằng phương pháp đo độ đục* [28].

Cách xây dựng đường chuẩn  $\text{K}_2\text{SO}_4$  như sau: Trong một ống nghiệm, thêm 20  $\mu\text{l}$  chuẩn  $\text{K}_2\text{SO}_4$  có nồng độ khoảng 0,25-1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Sau đó, thêm 3,8 ml dung dịch TCA 3%, 1 ml dung dịch gelatin 0,5%, và 1 ml dung dịch  $\text{BaCl}_2$  0,5%. Để dung dịch yên trong 15 phút trước khi đo độ hấp thụ ở bước sóng 360 nm sử dụng UV-VIS.

Polysaccharide ulvan được thủy phân bằng 2 ml dung dịch HCl 1N trong ống nghiệm có nút vắn, ở nhiệt độ  $100^\circ\text{C}$  trong 6 giờ, sau đó lấy 20  $\mu\text{l}$  ulvan đã thủy phân ở nồng độ khoảng 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  và trộn với 3,8 TCA 3%, 1 ml dung dịch gelatin 0,5%, và 1 ml dung dịch  $\text{BaCl}_2$  0,5% trong ống nghiệm. Sau đó, để yên trong 15 phút và đo UV-VIS ở bước sóng 360 nm. Hàm lượng sulfate của ulvan được tính toán dựa trên đường chuẩn sulfate đã được xây dựng.

- *Phân tích hàm lượng uronic acid bằng phương pháp carbazole* [44]

Xây dựng đường chuẩn glucuronic acid như sau: Cho 1 ml chuẩn glucuronic acid có nồng độ trong khoảng 5-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  vào ống nghiệm. Làm lạnh ống nghiệm. Thêm vào 6 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  đậm đặc, đun 20 phút, làm nguội. Thêm vào 0,2 ml dung dịch carbazole 1 %, lắc đều. Đo UV-VIS ở bước sóng 527 nm.

Để xác định hàm lượng uronic acid, cho 1 ml chuẩn ulvan có nồng độ trong khoảng 5-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  vào ống nghiệm. Thêm vào 6 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  đậm đặc,

đun 20 phút, làm nguội. Thêm vào 0,2 ml dung dịch carbazole 1 %, lắc đều. Đo UV-VIS ở bước sóng 527 nm.

- *Phương pháp xác định hàm lượng protein [48].*

Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp của Lowry, sử dụng Albumin huyết thanh bò (BSA – Bovine serum albumin) làm dung dịch chuẩn. Thí nghiệm được tiến hành như sau: 0,5 mL dung dịch cần phân tích được cho vào ống nghiệm, thêm vào 2,5 mL dung dịch C (hỗn hợp dung dịch A ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + NaOH) và dung dịch B ( $\text{CuSO}_4$  +  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ) theo tỉ lệ 50:1). Phản ứng được để yên 20 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó thêm tiếp vào hỗn hợp phản ứng 0,25 mL thuốc thử Folin 0,5M, để yên ở nhiệt độ phòng trong 60 phút và tiến hành đo quang ở bước sóng  $\lambda = 750$  nm.

#### **2.4. Sắc ký thẩm thấu gel (GPC)**

Khối lượng phân tử của sản phẩm được xác định bằng kỹ thuật sắc ký thẩm thấu gel (GPC - Gel permeation chromatography) trên hệ thống Shimadzu LC-20AD, đầu dò RID, cột GPC/SEC Suprema Ultrahigh 10mm (8 x 300).

#### **2.5. Phổ IR**

Phổ hồng ngoại được đo trên máy FT-IR Affinity-1S SHIMADZU có bước sóng từ 400 đến 4000 nm tại Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang.

#### **2.6. Phổ NMR**

Mẫu nghiên cứu được hòa tan trong dung môi  $\text{D}_2\text{O}$  và được đo phổ NMR ở nhiệt độ  $70^\circ\text{C}$  với chế độ đo khử tín hiệu của nước, trên máy Bruker AVANCE 500MHz tại Viện Hóa học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, DSS (acid 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic) được dùng làm chất chuẩn nội.

### CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả thu thập và xử lý mẫu rong *Ulva papenfussii*

Rong *Ulva papenfussii* được thu thập ở Nha Trang và được định danh bởi TS. Võ Thành Trung (Viện nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang). Rong *Ulva papenfussii* thuộc chi *Ulva*, họ Ulvaceae, bộ Uvales, lớp Ulvophyceae và ngành Chlorophyta. Rong *Ulva papenfussii* thu thập ở giai đoạn sinh trưởng trưởng thành có hình dạng là phiến rộng, mềm, mọc xòe tròn, xếp thùy, mép nhăn gập. Chúng có màu lục thẫm hoặc lục nhạt, cao khoảng 4-10 cm và rộng khoảng 5-10 cm, trông giống như một cây rau diếp nên còn được gọi với cái tên là rau diếp biển. Mẫu rong sau khi thu thập, được rửa bằng nước biển để loại đất, cát, san hô. Sau đó, rong được rửa nhanh qua nước máy, đem ngâm trong ethanol 80° trong 1 tuần để loại các chất màu và các chất có khối lượng phân tử thấp. Rong được sấy khô tại nhiệt độ 50 °C, sau đó được xay, nghiền thành bột và bảo quản trong hộp kín ở nhiệt độ phòng.

Kết quả thu được bột rong khô phục vụ nghiên cứu các bước tiếp theo là tách chiết và phân lập ulvan.



Hình 3.1. Rong lục *U. papenfussii* ở Nha Trang, Khánh Hòa.

### 3.2. Thành phần hóa học của rong *Ulva papenfussii*

Rong lục rất đa dạng về loài tuy nhiên các loài rong lục thuộc chi *Ulva*, rong *Ulva papenfussii* là rong phổ biến nhất ở Việt Nam, chiếm 1/3 tổng sản lượng rong lục Việt Nam [19]. Thành phần hóa học của rong *Ulva papenfussii* theo trọng lượng rong khô bao gồm chủ yếu là Carbohydrate (37,1%), Protein (2,3%), Lipid (0,63%) và tro (15,2%). Kết quả được chỉ ra ở bảng 3.1.

Hàm lượng Protein thấp hơn nhiều so với các loài rong *Ulva* khác, thành phần Carbohydrate nằm trong khoảng 26%-70% rất giống với các loài rong đã được công bố.

Thành phần Sulfated polysaccharides (ulvan) của rong *Ulva papenfussii* khoảng 15% - 19% trọng lượng rong khô, tỉ lệ này phù hợp với các nghiên cứu trước đây về thành phần ulvan của rong lục.

Bảng 3. 1. Bảng so sánh thành phần hóa học của rong lục *U. Papenfussii* với các loài rong lục khác.

Loài rong	Protein (%)	Lipid (%)	Carbohydrate (%)	Tro (%)	Tài liệu tham khảo
<i>Ulvan papenfussii</i>	<b>2,3</b>	<b>0,63</b>	<b>37,1</b>	<b>15,2</b>	
<i>Ulva spp.</i>	15-25	0,6 – 0,7	42-46	13 - 22	[17]
<i>Ulva clathrata</i>	20-26	2,2-3,5	26-41	28-30	[14]
<i>Ulva lactuca</i>	8,46	7,87	54,9	19,59	[15]
<i>Uva reticulata</i>	9,8	1,9	68,9	13,2	[16]
<i>Ulva pertusa</i>	25,1	0,1	52,3	22,5	[18]

### 3.3. Kết quả chiết tách và phân lập ulvan từ rong *Ulva papenfussii*

Chiết 10 g bột rong trong dung dịch chiết ở điều kiện cơ sở là nước có pH 6,0 tỷ lệ dung môi:nguyên liệu là 20:1 (ml/g), thời gian chiết là 4 giờ, nhiệt độ chiết là 80°C. Ở các thí nghiệm sau đó, tiến hành quan sát chọn lọc của từng yếu tố là pH dung dịch chiết, tỷ lệ dung môi:nguyên liệu, thời gian chiết và nhiệt độ chiết lên quá trình chiết.

Lọc dịch chiết lần 1 bằng giấy lọc whatman. Bã rong được chiết tiếp lần 2 ở điều kiện tương tự rồi lọc thu dịch chiết. Dịch chiết 2 lần được ly tâm với



tốc độ quay 10.000 vòng/phút để thu dịch trong. Cô quay dịch trong đến thể tích 100 ml, sau đó cho vào 400 ml ethanol để tủa polysaccharide.

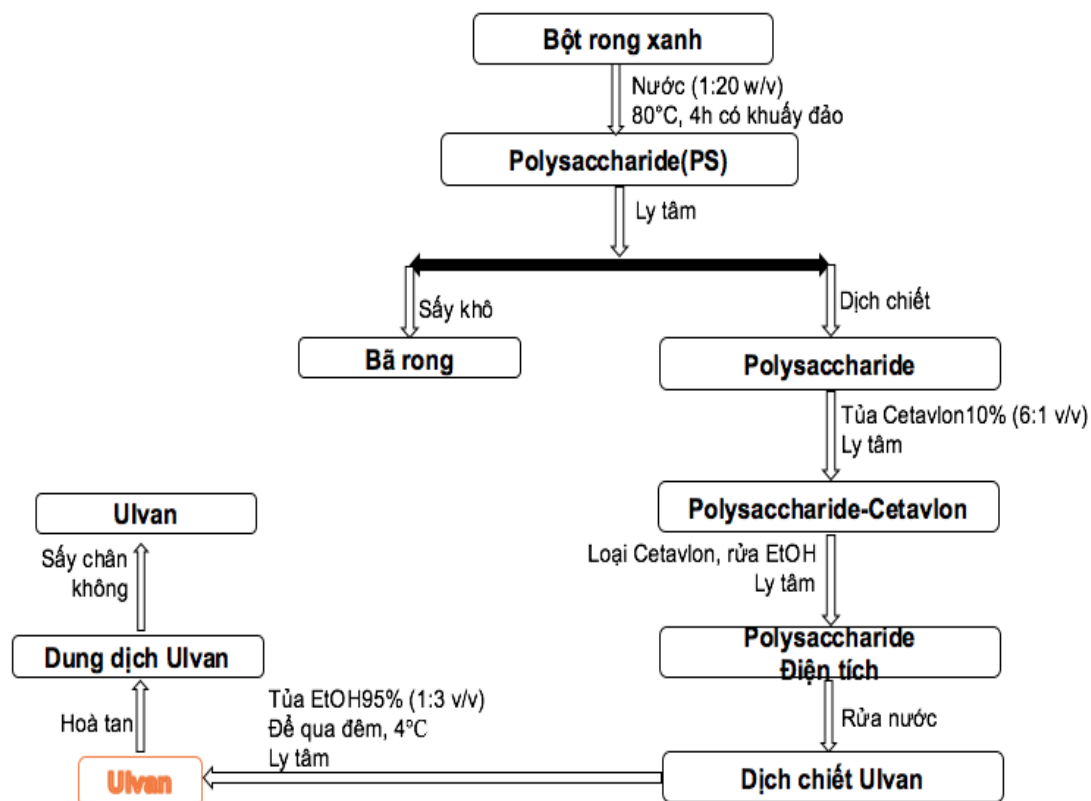
Tủa polysaccharide được rửa 3 lần bằng ethanol 80<sup>0</sup>, 3 lần bằng ethanol tuyệt đối rồi hòa tan vào nước khử ion. Đem đông khô thu sản phẩm polysaccharide. Cân hiệu suất sản phẩm thu được. Polysaccharide tiếp tục được tách polysaccharide điện tích bằng nhựa cetavlon (hexadecyltrimethylammonium bromide) và phân tích thành phần hóa học các sản phẩm tách được.

Trong quá trình chiết, khi tăng nhiệt độ thì hiệu suất chiết tăng. Điều này được giải thích là do khi tăng nhiệt độ, các liên kết giữa các polysaccharide với nhau và với các thành phần khác trong rong như protein bị bẻ gãy, tạo điều kiện cho chúng khuếch tán vào dung môi được dễ dàng hơn.

Mặc dù hiệu suất chiết đạt giá trị cao nhất tại tỷ lệ dung môi: nguyên liệu cao nhưng tỷ lệ dung môi: nguyên liệu càng cao thì dung dịch polysaccharide càng loãng gây khó khăn trong việc thu hồi và tinh chế sản phẩm polysaccharide điện tích mong muốn.

pH dung dịch chiết ảnh hưởng lên hiệu suất chiết và hàm lượng polysaccharide điện tích trong sản phẩm rất rõ rệt. Tại môi trường acid và môi trường kiềm, mặc dù hiệu suất chiết polysaccharide tăng mạnh nhưng hàm lượng polysaccharide trung tính cao. Kết quả này có thể do các dạng khác của polysaccharide không tan trong nước như cellulose hay hemicellulose, polysaccharide tan được trong môi trường kiềm như xyloseglucan, khi chiết tại môi trường acid và môi trường kiềm mạnh xảy ra quá trình thủy phân, không thể tách khỏi dung dịch sản phẩm polysaccharide điện tích bởi quá trình lọc và ly tâm. Vì vậy, để hạn chế hàm lượng sản phẩm phụ không mong muốn, giới hạn giá trị pH của dung dịch chiết trong khoảng từ 4 đến 8.

Quy trình chiết được tóm tắt ở sơ đồ chiết dưới đây:



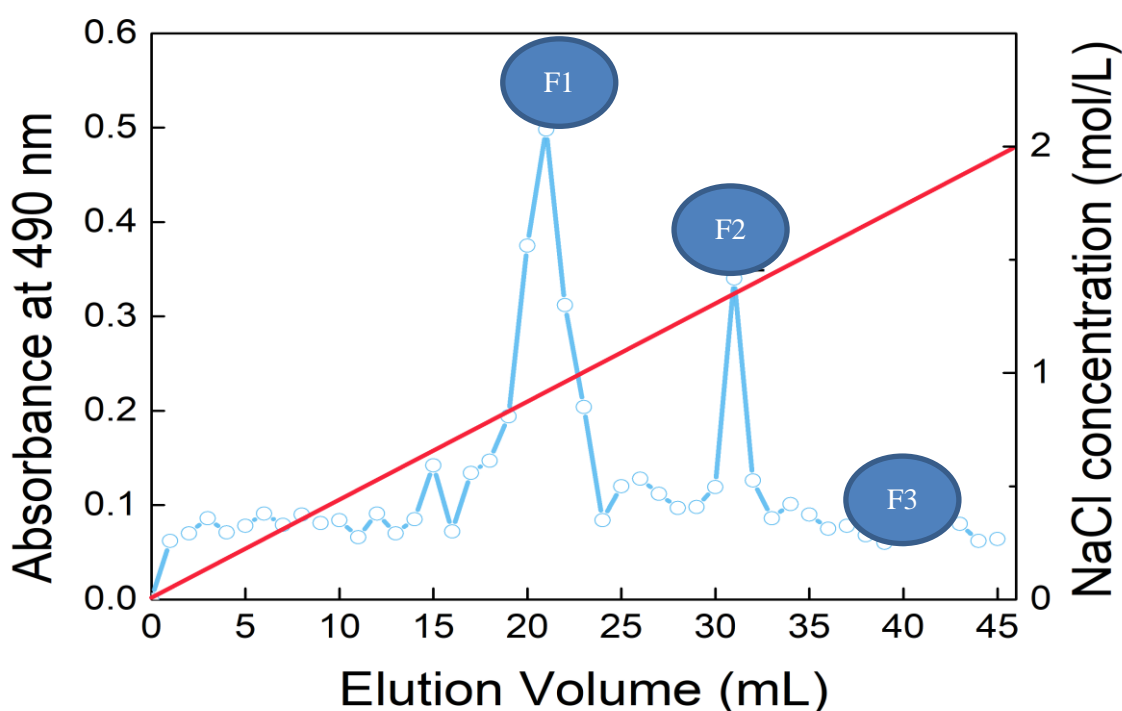
Hình 3. 2. Sơ đồ tách chiết ulvan từ rong lục *U. papenfussii*

Ngâm chiết 10 g bột rong trong 400 ml nước ở nhiệt độ 80 °C trong 4h. Lọc lấy dịch chiết. Bã rong được chiết tiếp lần 2 ở điều kiện như trên. Gộp dịch chiết trong 2 lần, ly tâm lấy dịch trong, sau đó tủa trong cetavlon cho đến khi tủa hoàn toàn. Lắng gạn thu tủa sau đó hòa tan tủa chuyển về dạng muối natri, thêm tiếp cồn tuyệt đối vào để kết tủa ulvan (Vethanol:Vdịch = 4:1). Gạn lọc rồi ly tâm lấy tủa, rửa tủa nhiều lần bằng cồn 70°, hòa tan lại kết tủa trong nước cất và đem đông khô ở -40°C đến khối lượng không đổi thu được ulvan tổng. Hàm lượng ulvan thu được là 12% so với khối lượng rong khô đem chiết [22]. Kết quả quan sát chọc lọc cho thấy các yếu tố nhiệt độ, thời gian chiết, tỷ lệ dung môi: nguyên liệu đều ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu suất chiết polysaccharide từ rong biển. Tuy nhiên, chỉ có yếu tố pH làm dung dịch chiết ở môi trường acid và kiềm làm tăng đáng kể hàm lượng polysaccharide trung tính không mong muốn, có khả năng thủy phân cũng như biến đổi polysaccharide điện tích. Do đó, nhằm thu được sản phẩm polysaccharide điện tích đạt hiệu suất, độ tinh sạch cao và tương đối đồng nhất, điều kiện chiết tối ưu được chọn như sau:

pH = 6, thời gian là 4 h, nhiệt độ là 80 °C, tỷ lệ dung môi:dung môi:nguyên liệu là 20:1 (ml/g).

### Quá trình tinh sạch polysaccharide dạng ulvan

Dịch chiết chứa các polysaccharide điện tích được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion. Các phân đoạn riêng biệt được gom lại thông qua kết quả phân tích hàm lượng tổng lượng cacbohydrat bằng phương pháp axit phenol-sulfuric. Theo kết quả thu nhận được tổng cộng có 3 phân đoạn được thu nhận và được ký hiệu theo thứ tự thu nhận từ trước đến sau là: phân đoạn thứ nhất F1; phân đoạn thứ hai F2 và phân đoạn ra sau cùng là phân đoạn thứ ba F3.



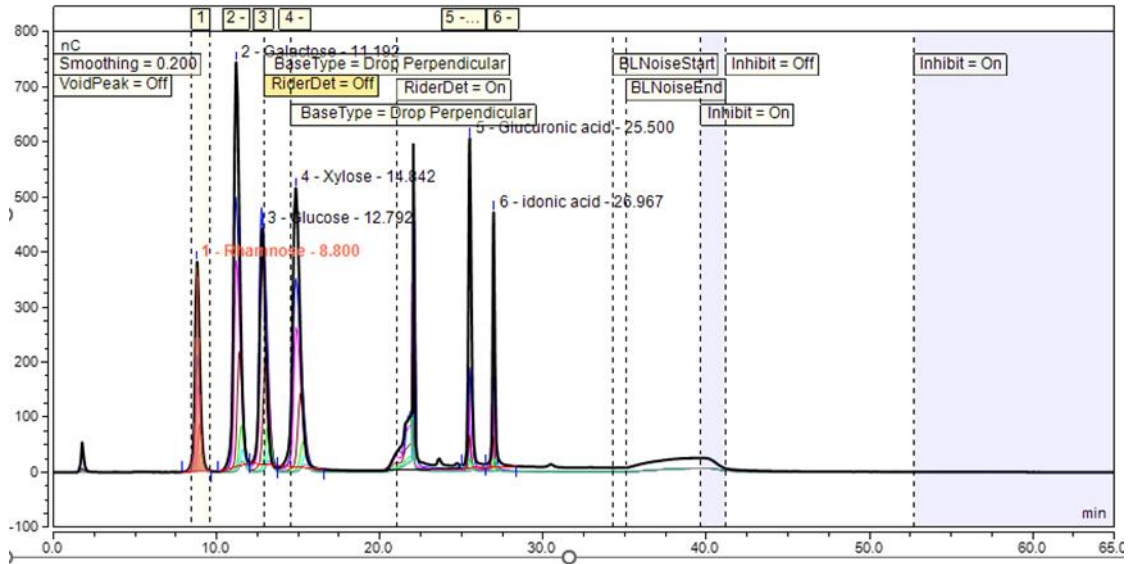
Hình 3. 3. Các phân đoạn ulvan thông qua kết quả phân tích hàm lượng tổng lượng cacbohydrat bằng phương pháp axit phenol-sulfuric

### 3.3. Xác định thành phần hoá học của polysaccharide dạng ulvan

Sulfated polysaccharide từ rong lục *U.papenfussii* có thành phần rất phức tạp, kết quả về thành phần hóa học của ulvan đều có các monosaccharide hay gặp như rhamnose và xylose, đường glucose và galactose chiếm hàm lượng thấp, và 02 nhóm điện tích là sulfate và uronic acid.

Sắc ký đồ và đường chuẩn của các đường sử dụng trong phân tích thành phần hóa học của ulvan được miêu tả cụ thể như sau từ hình 3.4 đến hình 3.15.

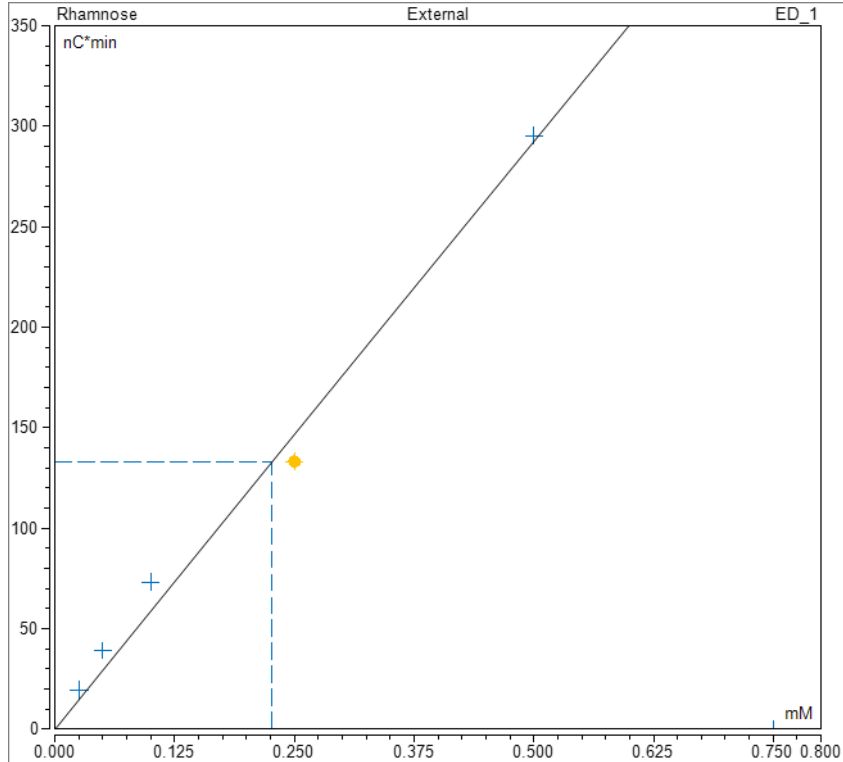
### 1. Sắc ký đồ của chuẩn Rhamnose



Hình 3. 4. Sắc ký đồ của chuẩn Rhamnose

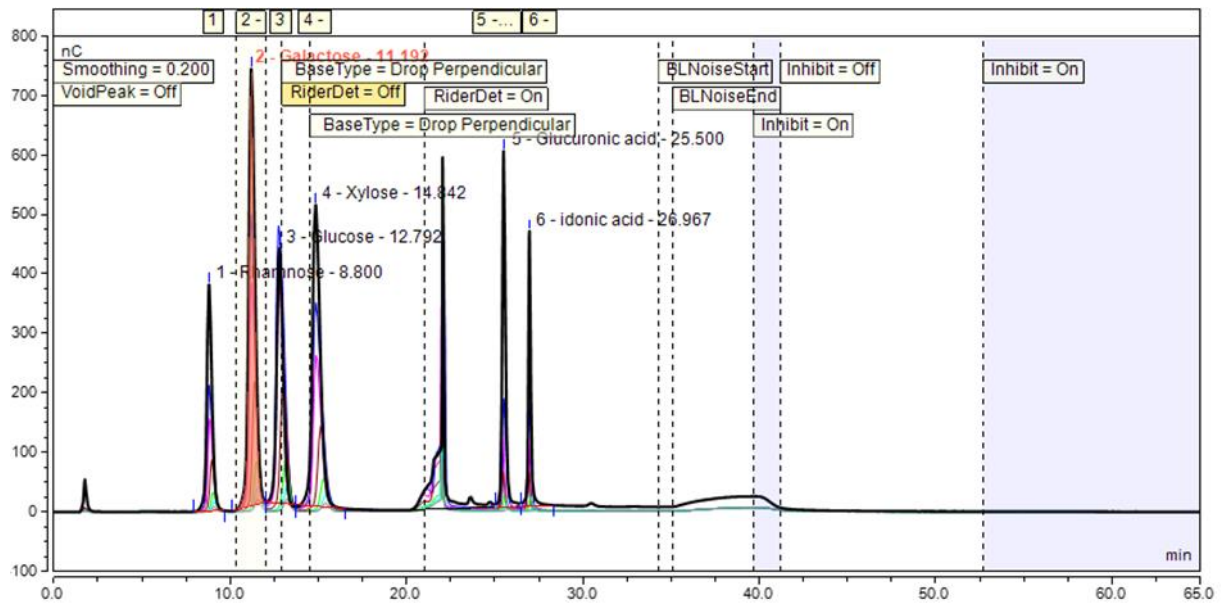
### 2. Đường chuẩn của chuẩn Rhamnose

$$y = 601.5x - 2.0602; R^2 = 0.9991$$



Hình 3. 5. Đường chuẩn của chuẩn Rhamnose

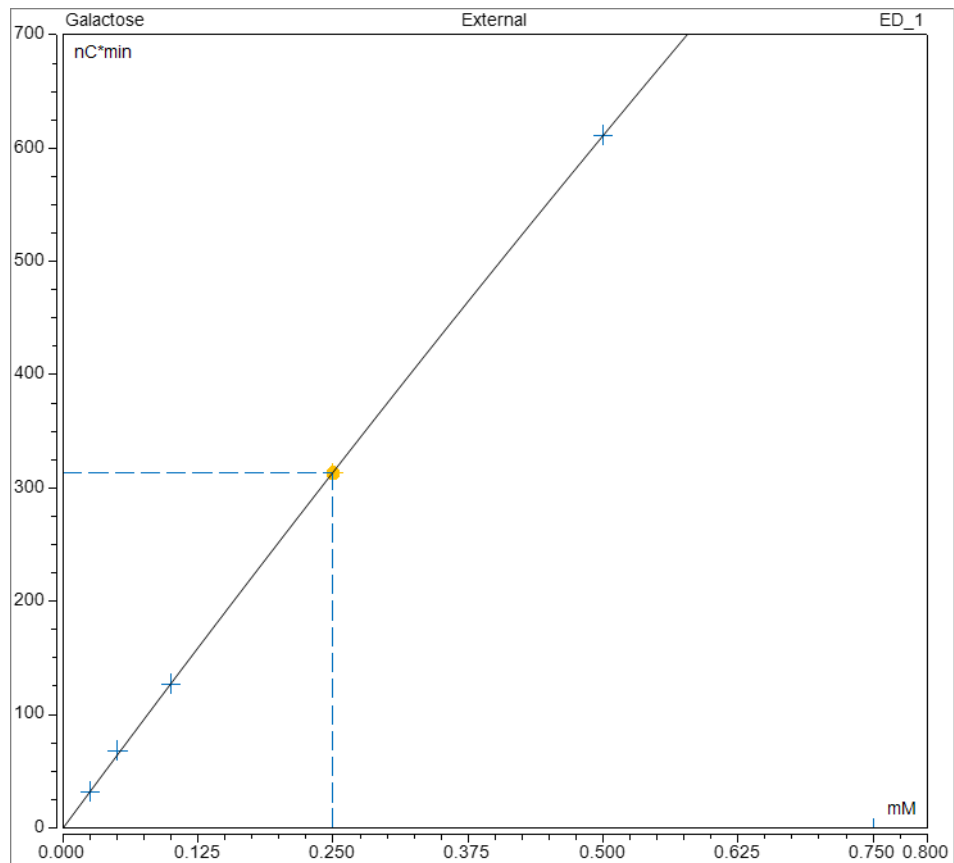
### 3. Sắc ký đồ của chuẩn Galactose



Hình 3. 6. Sắc ký đồ của chuẩn Galactose

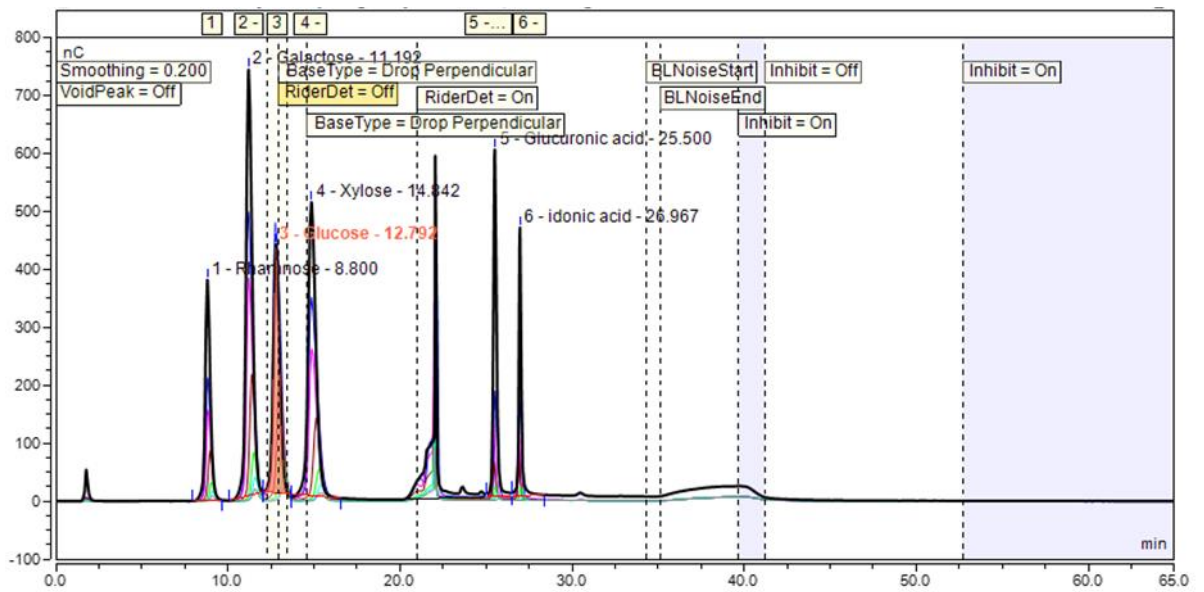
### 4. Đường chuẩn của chuẩn Galactose

$$y = 1182.2x + 12.427; R^2 = 0.9994$$



Hình 3. 7. Đường chuẩn của chuẩn Galactose

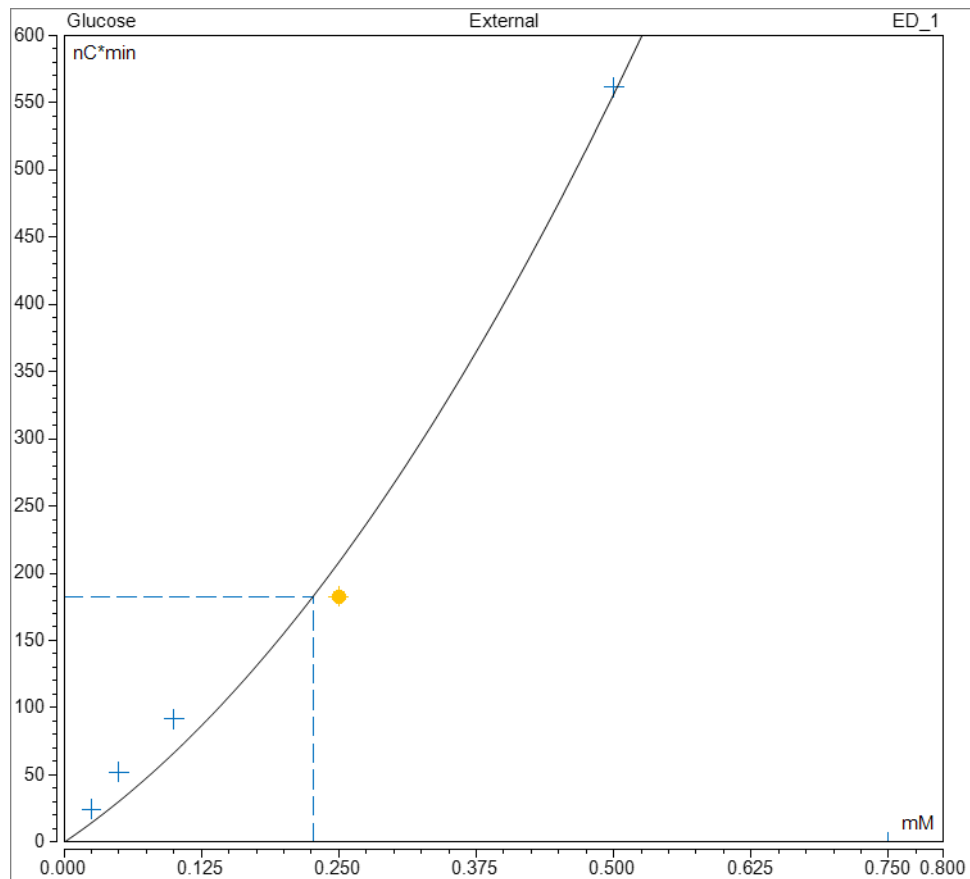
## 5. Sắc ký đồ của chuẩn Glucose



Hình 3. 8. Sắc ký đồ của chuẩn Glucose

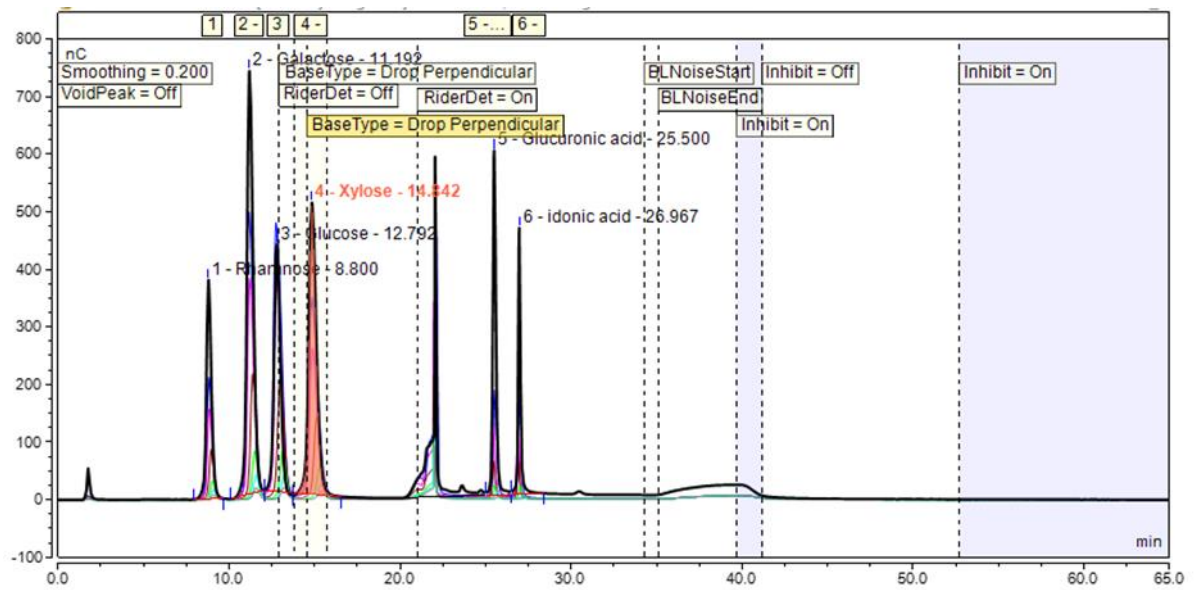
## 6. Đường chuẩn của chuẩn Glucose

$$y = 1133.9x - 4.1804; R^2 = 0.9991$$



Hình 3. 9. Đường chuẩn của chuẩn Glucose

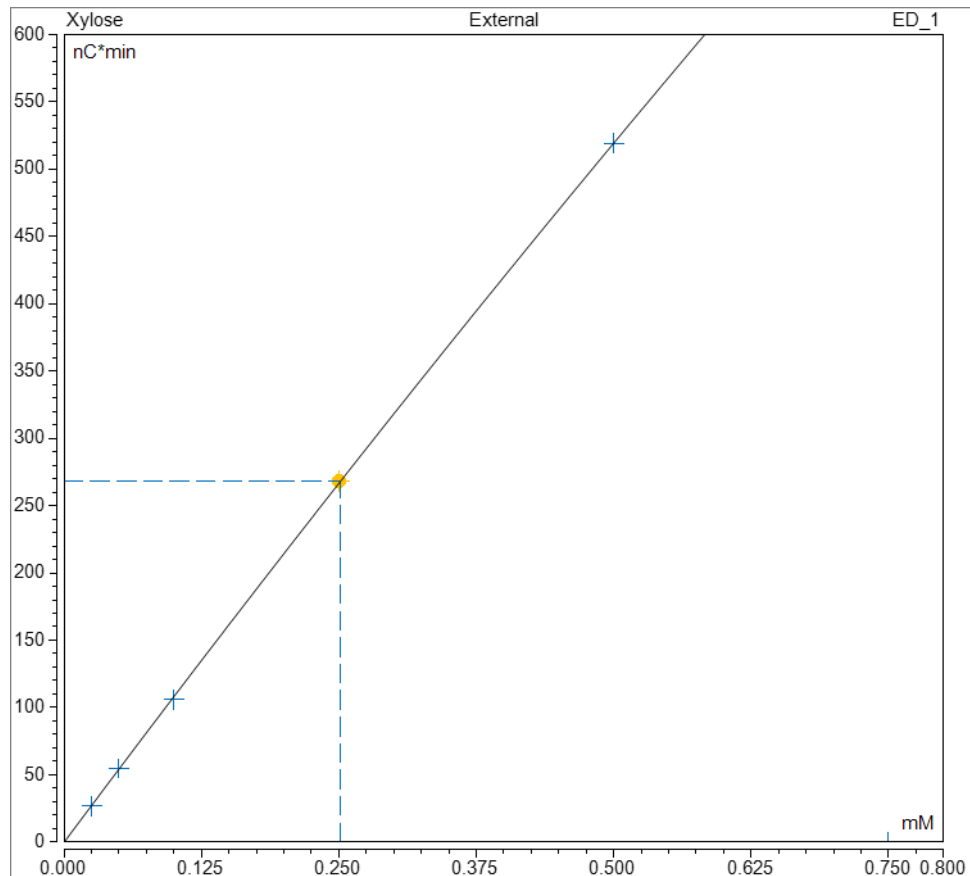
## 7. Sắc ký đồ của chuẩn Xylose



Hình 3. 10. Sắc ký đồ của chuẩn Xylose

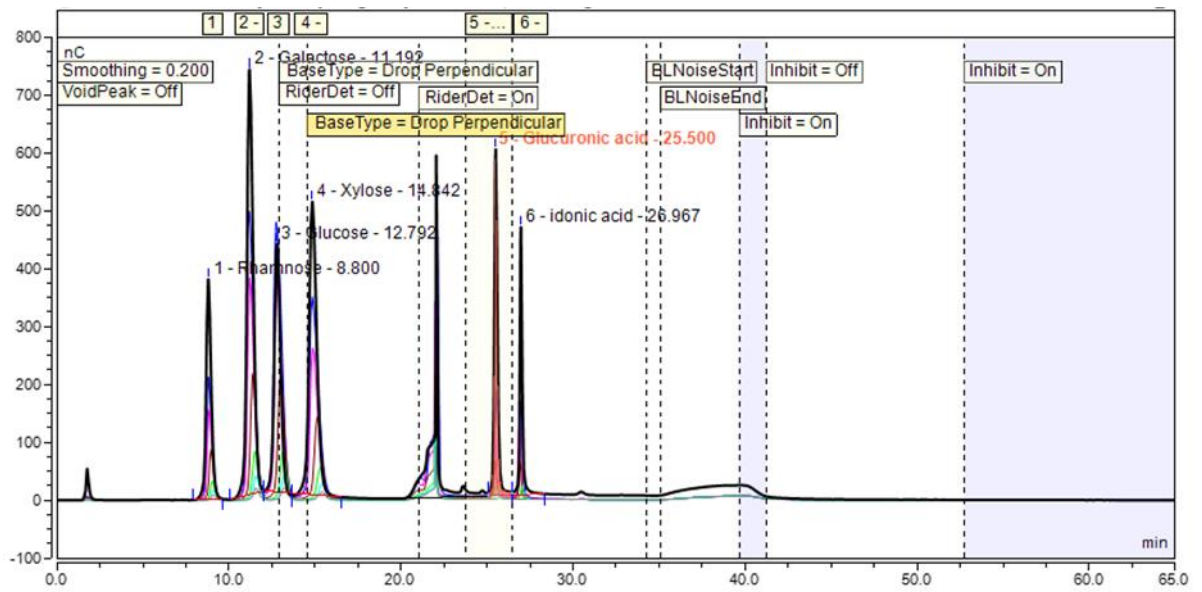
## 8. Đường chuẩn của chuẩn Xylose

$$y = 1029.8x + 7.4919; R^2 = 0.9997$$



Hình 3. 11. Đường chuẩn của chuẩn Xylose

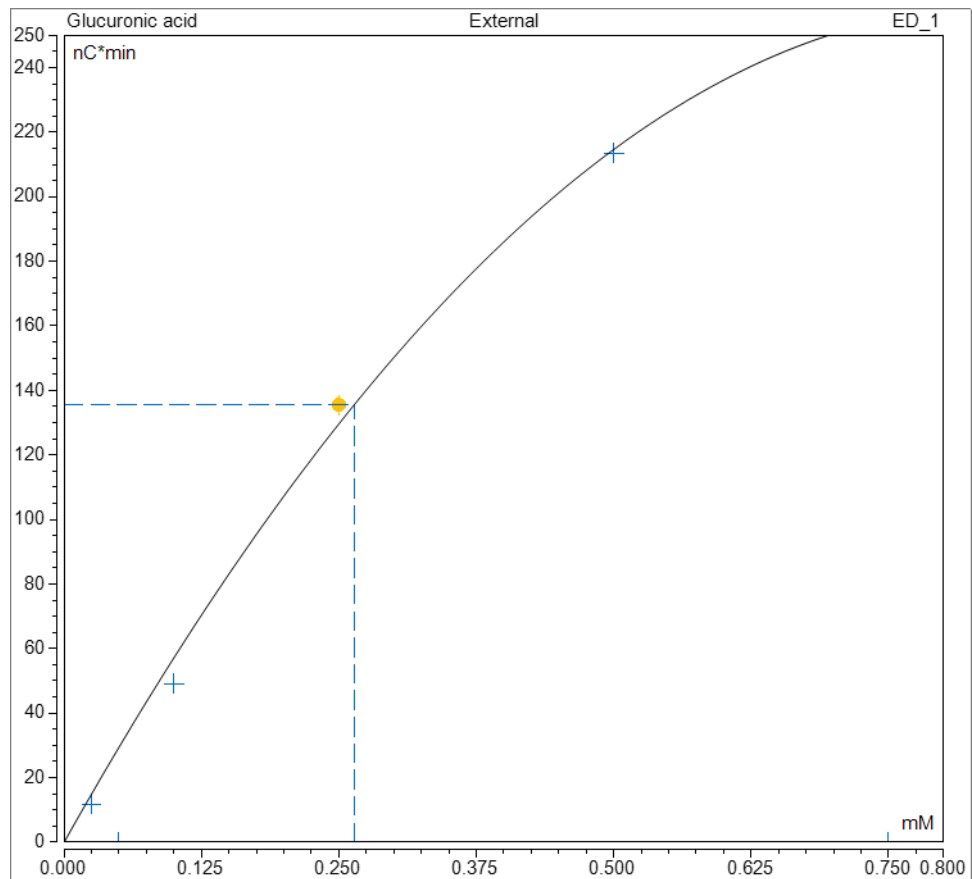
### 9. Sắc ký đồ của chuẩn Glucuronic acid



Hình 3. 12. Sắc ký đồ của chuẩn Glucuronic acid

### 10. Đường chuẩn của chuẩn Glucuronic acid

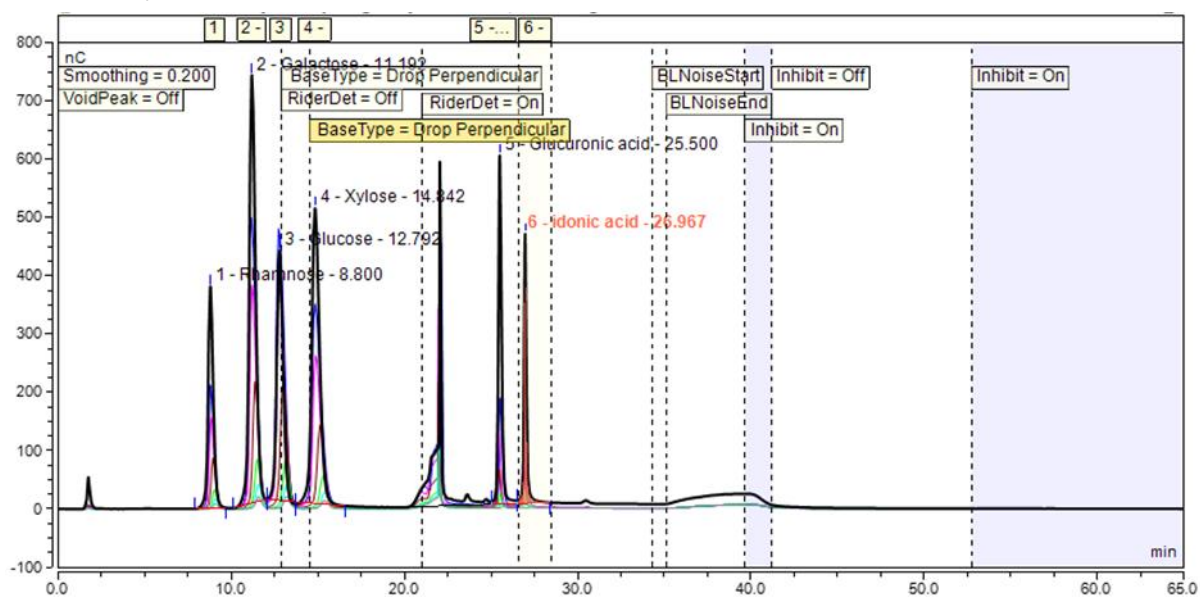
$$y = 499.26x - 0.5623; R^2 = 0.9998$$



Hình 3. 13. Đường chuẩn của chuẩn Glucuronic acid



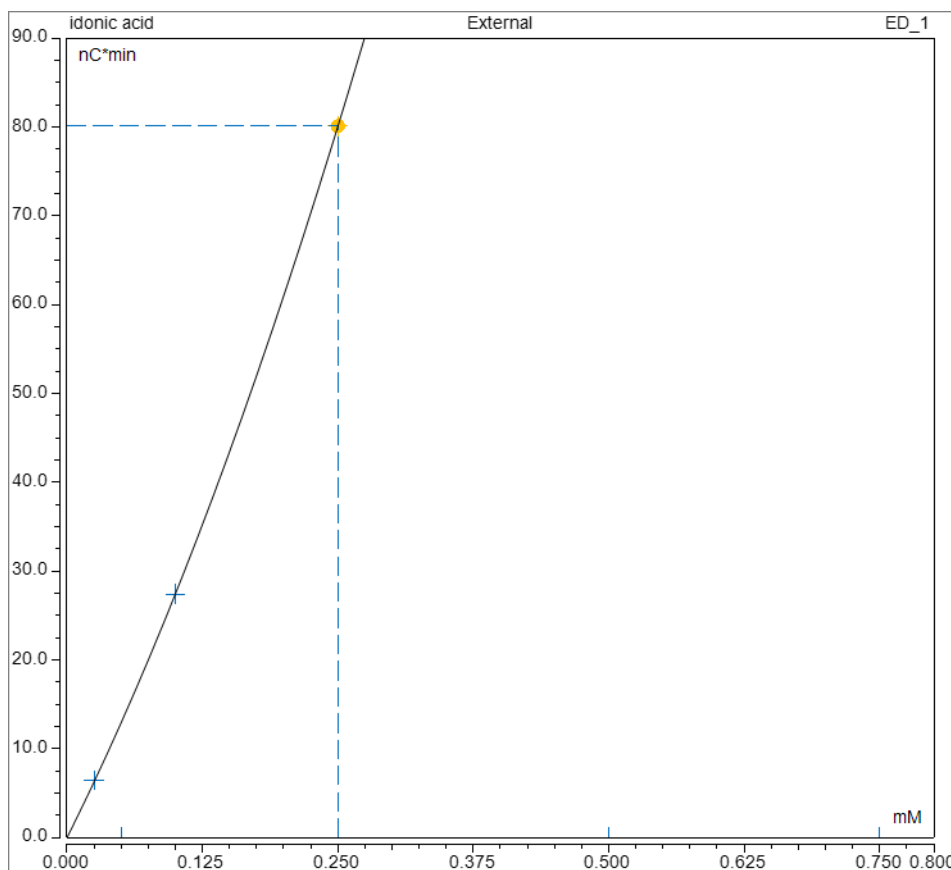
## 11. Sắc ký đồ của chuẩn Iduronic acid



Hình 3. 14. Sắc ký đồ của chuẩn Iduronic acid

## 12. Đường chuẩn của chuẩn Iduronic acid

$$y = 325.71x - 1.7143; R^2 = 0.9996$$



Hình 3. 15. Đường chuẩn của chuẩn Iduronic acid

Phân tích đặc điểm hóa học của các mẫu polysaccharide thu được nhằm xác minh sản phẩm thu được có phải là polysaccharide ulvan như mong muốn. Kết quả phân tích hóa học trên bảng 3.2 cho thấy mẫu polysaccharide điện tích trong phân tử có các loại đường chủ yếu là rhamnose và xylose, đường glucose và galactose chiếm hàm lượng thấp, và 02 nhóm điện tích là sulfate và acid uronic. Dựa trên kết quả phân tích này có thể cho rằng polysaccharide điện tích là sulfated polysaccharide có dạng ulvan. Do có sự tương đồng về thành phần hóa học như các polysaccharide chiết từ chi *Ulva* khác đã công bố trước đây [14-18], ulvan chiết từ rong lục *U.papenfussi* có thành phần chủ yếu là rhamnose, uronic acid (bao gồm iduronic acid, glucuronic acid) và sulfate. Kết quả cụ thể được chỉ ra ở Bảng 3.2.

Bảng 3. 2. Thành phần hoá học của polysaccharides dạng ulvan

		F	F1	F2	F3
Monosaccharides (%)	Rhamnose	24,02±0,64	42,16±1,94	31,08±4,55	9,02±0,7
	Galactose	0,89±0,36	0,97±0,08	1,98±1,21	0,81±0,02
	Glucose	16±4,96	0,58±0,02	2,32±1,76	0,77±0,05
	Xylose	3,48±0,8	3,89±0,19	5,3±2,49	2,64±0,29
Uronic acid (%)	Glucuronic acid	12,62±1,67	15,54±1,02	20,29±1,94	12,31±0,73
	Iduronic acid	9,43±3,05	16,39±0,45	22,92±0,77	9,95±0,77
Sulfate (%*)		20,71±1,97	16,25±2,43	28,46±3,63	20,15±2,47

% tính theo hàm lượng monosaccharide trong sulfated polysaccharide.

%\* tính theo trọng lượng mẫu trong sulfated polysaccharide.

#### Kết luận:

Nghiên cứu thành công quy trình tách chiết, tinh sạch polysaccharide điện tích từ rong lục *Ulva papenfussi*

Xác định được thành phần hóa học của polysaccharide điện tích bao gồm chủ yếu là đường rhamnose, uronic acid và sulfate. Khẳng định được polysaccharide điện tích là sulfated polysaccharide dạng ulvan.

### 3.4. Kết quả GPC của ulvan từ rong *Ulva papenfussii*

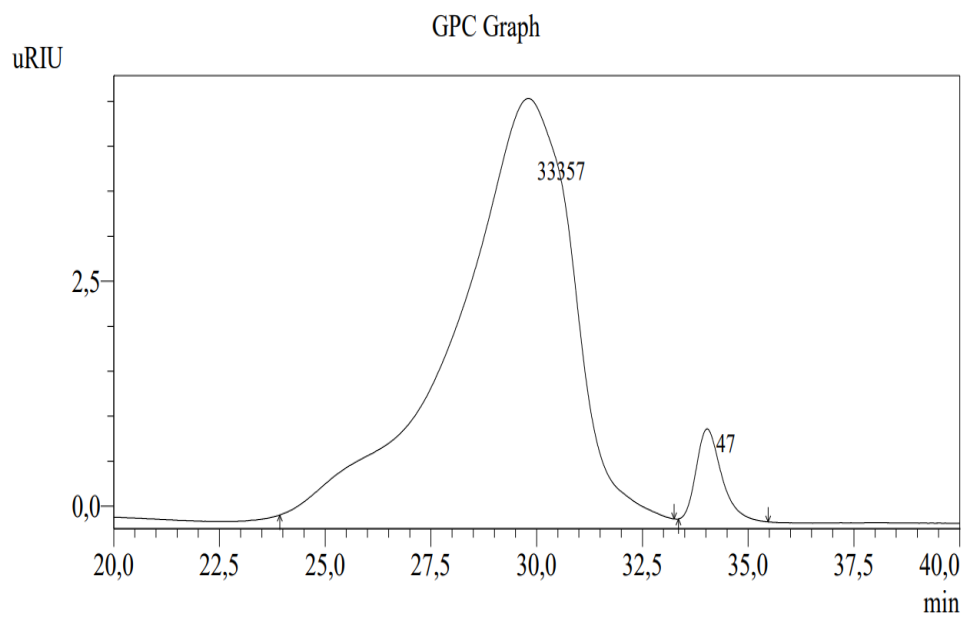
Khối lượng phân tử trung bình khối  $M_w$ , khối lượng phân tử trung bình số  $M_n$  và độ phân tán khối lượng phân tử  $M_w/M_n$  được xác định bằng phương pháp sắc ký thẩm thấu gel GPC, kết quả được trình bày ở Bảng 3.3. Cũng giống như các sulfate polysaccharide tự nhiên khác, ulvan là polymer có độ phân tán cao với giá trị  $M_w/M_n$  từ 6,5 đến 217 và  $M_w$  cũng rất cao từ  $164,452 \times 10^3$  g/mol đến  $5536,050 \times 10^3$  g/mol, tùy theo điều kiện chiết tách. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đã công bố là khối lượng phân tử của ulvan từ  $1,8 \times 10^5$  g/mol đến  $2,0 \times 10^6$  g/mol, phụ thuộc vào điều kiện chiết tách, vị trí địa lý và thời gian thu hái rong. Riêng phân đoạn F2 có phân bố trọng lượng phân tử lớn và có  $M_w$  tới khoảng  $5,5 \times 10^6$  g/mol.

Bảng 3. 3. Bảng kết quả chạy GPC của các mẫu ulvan

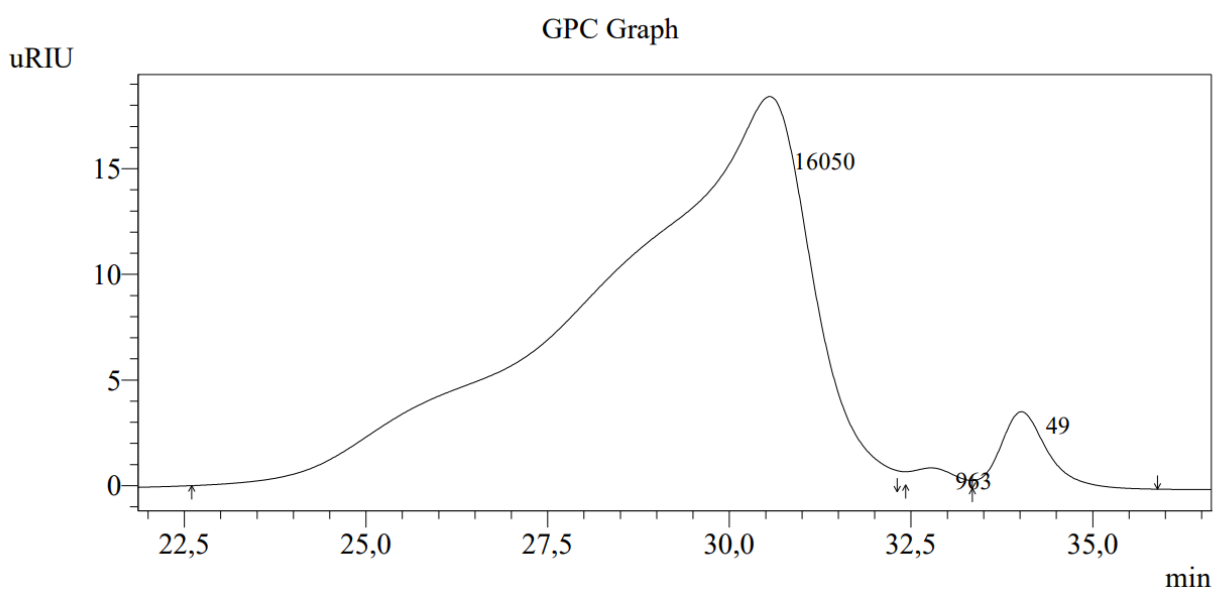
Mẫu	$M_w \times 10^3$ (Dalton)	$M_n \times 10^3$ (Dalton)	$M_w/M_n$	%	Thời gian bắt đầu (Min)	Thời gian đạt đỉnh peak (Min)	Thời gian kết thúc (Min)
F	164,452	25,240	6,51561	94,6	23,925	29,801	33,250
F1	619,285	43,092	14,37107	91,1772	23,000	29,529	32,100
F2	5536,050	25,511	217,00402	95,0345	22,6	30,555	32,308
F3	488,620	32,391	15,08500	96,1962	23,058	30,051	32,533

Về thời gian bắt đầu, thời gian đạt đỉnh peak và thời gian kết thúc của mẫu ulvan thô và các phân đoạn F1, F2, F3 rất gần nhau và tỉ lệ % thể hiện sự xuất hiện chủ yếu các phân tử trong khoảng trọng lượng phân tử nêu trên trong mẫu đo.

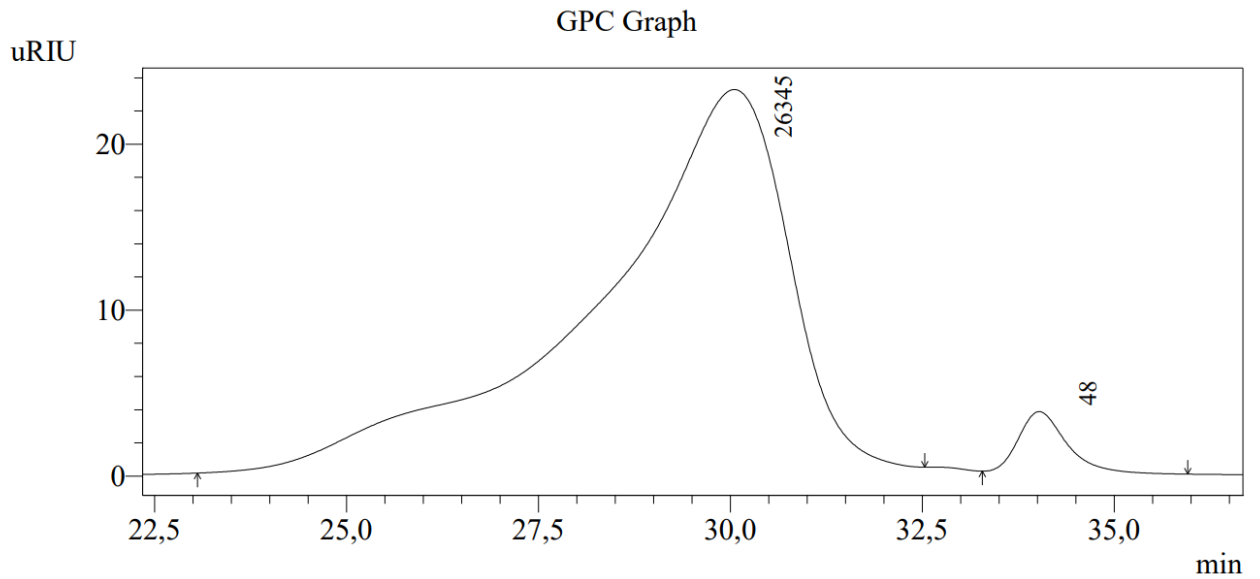
**Sắc ký đồ GPC của mẫu Ulvan thô F và của các phân đoạn F1, F2, F3**



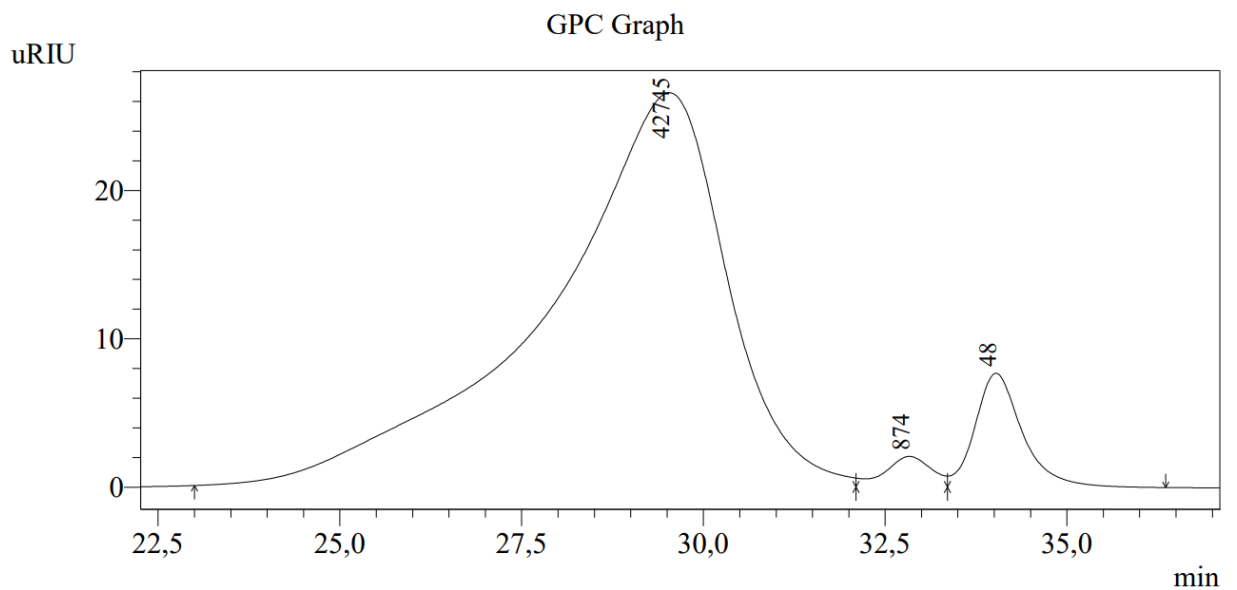
Hình 3. 16. Sắc ký đồ GPC của Ulvan thô F



Hình 3. 17. Sắc ký đồ GPC của phân đoạn F1



Hình 3. 18. Sắc ký đồ GPC của phân đoạn F2



Hình 3. 19. Sắc ký đồ GPC của phân đoạn F3

Theo các tài liệu tham khảo thì khối lượng ulvan tách chiết từ các loài rong lục khác nhau có nhiều sự thay đổi rất lớn. Điều này phụ thuộc vào từng loại rong, mùa vụ, phương pháp tách chiết và kỹ thuật đo.

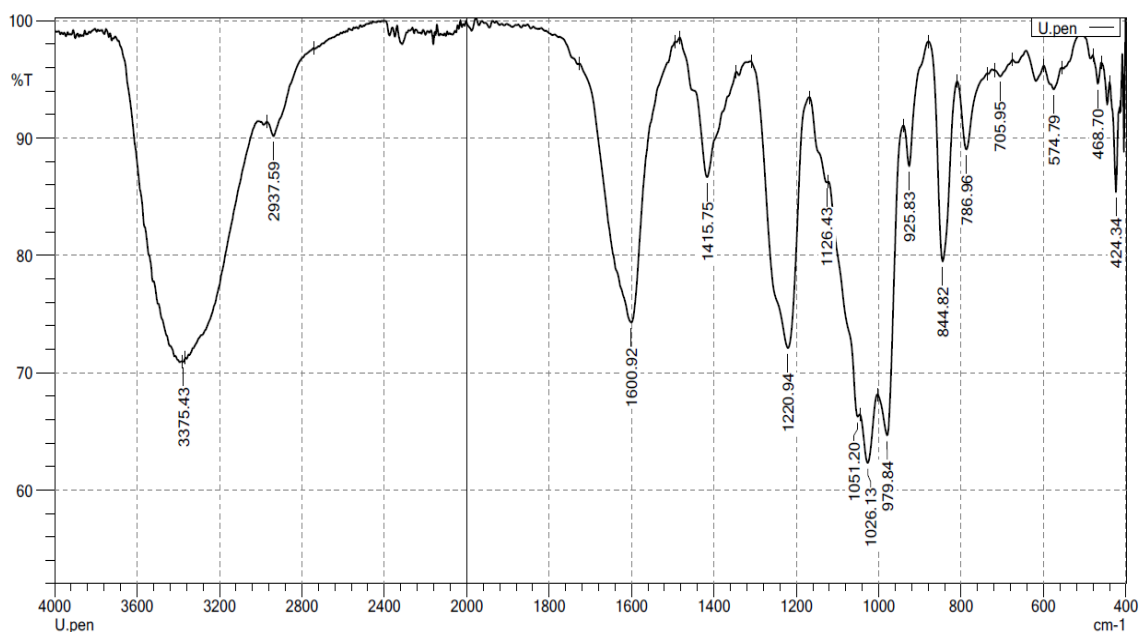
### 3.5. Kết quả đặc điểm cấu trúc của ulvan tách từ rong *Ulva papenfussii*

Để làm rõ cấu trúc hóa học của sản phẩm sulfated polysaccharide, phổ IR,  $^{13}\text{C}$  NMR,  $^1\text{H}$  NMR, COSY, HMBC, HSQC đã được giải phổ chi tiết và được trình bày ở các phần tiếp theo.

#### 3.5.1. Kết quả phổ IR

Phương pháp phổ hồng ngoại (IR) là phương pháp đơn giản 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. Trong phân tích cấu trúc của polysaccharide sulfate, phổ IR cho biết các thông tin về sự có mặt và vị trí nhóm sulfate, các liên kết glycoside từ đó cho biết một phần thông tin về đặc trưng cấu trúc của chúng [8, 41].

#### a. Phổ IR của mẫu Ulvan thô



Hình 3. 20. Phổ IR của ulvan từ rong *U.papenfussii*

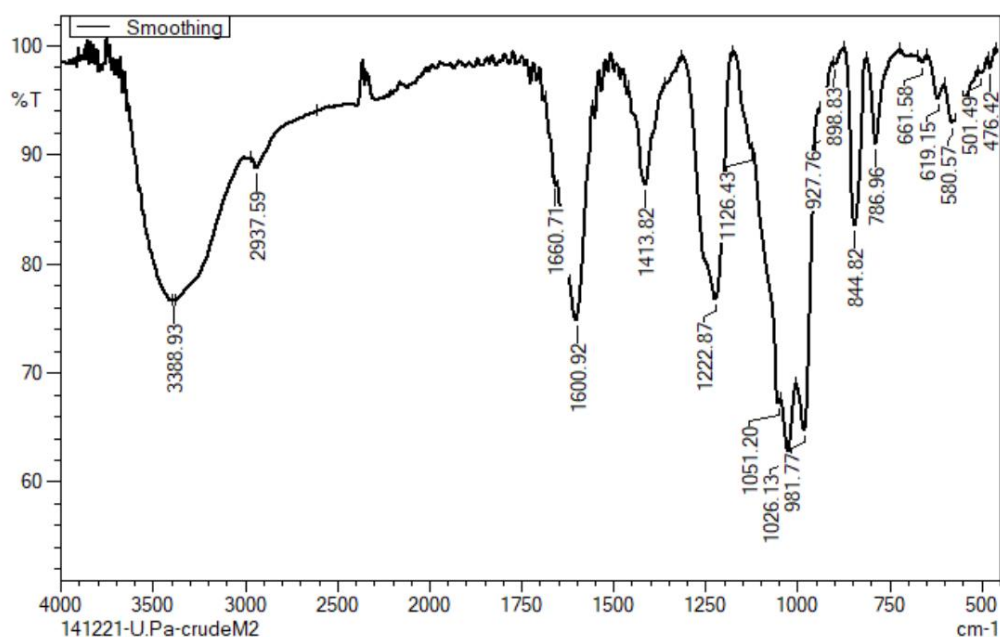
Từ phổ IR của ulvan tổng F ở Hình 3.20 và Bảng 3.4 chiết từ rong lục *U.papenfussii*, có thể quan sát thấy các peak đặc trưng cho polysaccharide như vùng dao động  $3375,43\text{ cm}^{-1}$  đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm O-H, peak tại vị trí  $1026,13\text{ cm}^{-1}$  là dao động hóa trị hemiacetal của carbon anomer

các gốc đường khi đóng vòng hay là dao động hóa trị đối xứng của C-O-C (liên kết glycosidic), peak 1220,94  $\text{cm}^{-1}$  dao động hóa trị đối xứng của S=O. Đặc biệt, trên phổ IR, xuất hiện các đỉnh thể hiện sự có mặt của nhóm sulfate và carboxylic trong cấu trúc sản phẩm, điều này khớp với kết quả phân tích thành phần sulfate và uronic acid ở phần trên, cụ thể có dải hấp thụ ở vùng 844,82  $\text{cm}^{-1}$  được gán cho dao động của liên kết C-O-S của nhóm sulfate ở vị trí axial. Ngoài ra còn có dải hấp thụ tại vùng 786,96  $\text{cm}^{-1}$  được cho là dao động đặc trưng cho liên kết C-O-S của nhóm sulfate ở vị trí equatorial, dải hấp thụ trong vùng khoảng 1600,92  $\text{cm}^{-1}$  đặc trưng cho dao động đối xứng của nhóm  $\text{COO}^-$  của acid uronic. Hơn nữa ở 2937,59  $\text{cm}^{-1}$  là dao động hóa trị của liên kết C-H và peak 1415,75  $\text{cm}^{-1}$  là của dao động hóa trị đối xứng của  $\text{COO}^-$ .

*Bảng 3. 4. Các đỉnh đặc trưng phổ IR của ulvan F*

<b>Vị trí đỉnh</b>	<b>Đặc điểm dao động</b>
786,96	Liên kết C-O-S equatorial của nhóm sulfate ether
844,82	Liên kết C-O-S axial của nhóm sulfate ether
1026,13	Dao động hóa trị đối xứng của C-O-C (liên kết glycosidic)
1220,94	Dao động hóa trị đối xứng của S=O
1415,75	Dao động hóa trị đối xứng của $\text{COO}^-$
1600,92	Dao động hóa trị bất đối xứng của $\text{COO}^-$
2937,59	Dao động hóa trị của C-H
3375,43	Dao động hóa trị của O-H

## b. Phổ IR của mẫu Ulvan phân đoạn F1



Hình 3. 21. Phổ IR của ulvan F1 từ rong *U.papenfussii*

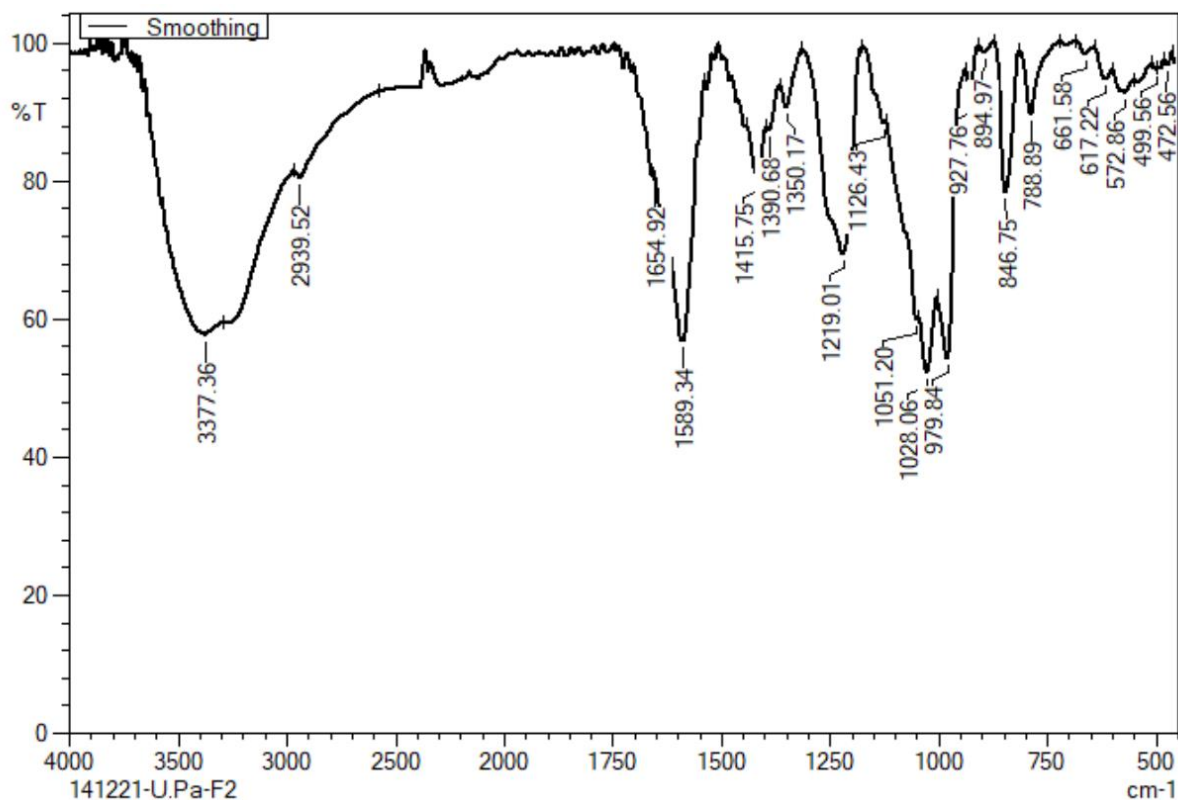
Từ phổ IR của Ulvan của phân đoạn Ulvan F1 chỉ ra ở Hình 3.21 chiết từ rong lục *U.papenfussii*, có thể quan sát thấy các peak đặc trưng cho polysaccharide như vùng dao động  $3388,93\text{ cm}^{-1}$  đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm O-H, peak tại vị trí  $1026,13\text{ cm}^{-1}$  là dao động hóa trị hemiacetal của carbon anomer các gốc đường khi đóng vòng hay là dao động hóa trị đối xứng của C-O-C (liên kết glycosidic), peak  $1220,87\text{ cm}^{-1}$  dao động hóa trị đối xứng của S=O. Đặc biệt, trên phổ IR, xuất hiện các đỉnh thể hiện sự có mặt của nhóm sulfate và carboxylic trong cấu trúc sản phẩm, điều này khớp với kết quả phân tích thành phần sulfate và acid uronic ở phần trên, cụ thể có dải hấp thụ ở vùng  $844,82\text{ cm}^{-1}$  được gán cho dao động của liên kết C-O-S của nhóm sulfate ở vị trí axial. Ngoài ra còn có dải hấp thụ tại vùng  $786,96\text{ cm}^{-1}$  được cho là dao động đặc trưng cho liên kết C-O-S của nhóm sulfate ở vị trí equatorial, dải hấp thụ trong vùng khoảng  $1600,92\text{ cm}^{-1}$  đặc trưng cho dao động đối xứng của nhóm  $\text{COO}^-$  của acid uronic. Hơn nữa ở  $2937,59\text{ cm}^{-1}$  là dao động hóa trị của liên kết C-H và peak  $1413,82\text{ cm}^{-1}$  là của dao động hóa trị đối xứng của  $\text{COO}^-$ , số liệu chi cụ thể ở Bảng 3.5.



Bảng 3. 5. Các đỉnh đặc trưng phổ IR của ulvan F1

Vị trí đỉnh	Đặc điểm dao động
786,96	Liên kết C-O-S equatorial của nhóm sulfate ether
844,82	Liên kết C-O-S axial của nhóm sulfate ether
1026,13	Dao động hóa trị đối xứng của C-O-C (liên kết glycosidic)
1220,87	Dao động hóa trị đối xứng của S=O
1413,82	Dao động hóa trị đối xứng của COO <sup>-</sup>
1600,92	Dao động hóa trị bất đối xứng của COO <sup>-</sup>
2937,59	Dao động hóa trị của C-H
3388,93	Dao động hóa trị của O-H

**c. Phổ IR của mẫu Ulvan phân đoạn F2**



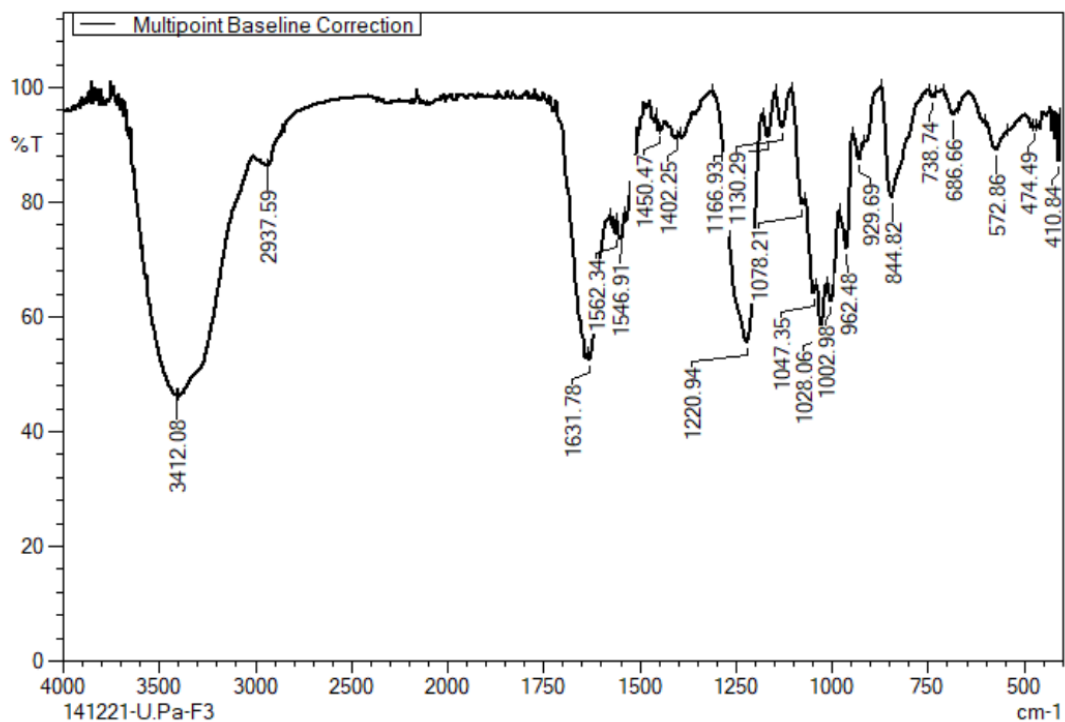
Hình 3. 22. Phổ IR của ulvan F2 từ rong *U.papenfussii*

Từ phổ IR của Ulvan của phân đoạn Ulvan F2 chỉ ra ở Hình 3.22 chiết từ rong lục *U.papenfussii*, có thể quan sát thấy các peak đặc trưng cho polysaccharide như vùng dao động  $3377,36\text{ cm}^{-1}$  đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm O-H, peak tại vị trí  $1028,06\text{ cm}^{-1}$  là dao động hóa trị hemiacetal của carbon anomer các gốc đường khi đóng vòng hay là dao động hóa trị đối xứng của C-O-C (liên kết glycosidic), peak  $1219,01\text{ cm}^{-1}$  dao động hóa trị đối xứng của S=O. Đặc biệt, trên phổ IR, xuất hiện các đỉnh thể hiện sự có mặt của nhóm sulfate và carboxylic trong cấu trúc sản phẩm, điều này khớp với kết quả phân tích thành phần sulfate và acid uronic ở phần trên, cụ thể có dải hấp thụ ở vùng  $846,75\text{ cm}^{-1}$  được gán cho dao động của liên kết C-O-S của nhóm sulfate ở vị trí axial. Ngoài ra còn có dải hấp thụ tại vùng  $788,89\text{ cm}^{-1}$  được cho là dao động đặc trưng cho liên kết C-O-S của nhóm sulfate ở vị trí equatorial, dải hấp thụ trong vùng khoảng  $1589,34\text{ cm}^{-1}$  đặc trưng cho dao động đối xứng của nhóm  $\text{COO}^-$  của acid uronic. Hơn nữa ở  $2939,52\text{ cm}^{-1}$  là dao động hóa trị của liên kết C-H và peak  $1415,75\text{ cm}^{-1}$  là của dao động hóa trị đối xứng của  $\text{COO}^-$ , số liệu chi cụ thể ở Bảng 3.6.

Bảng 3. 6. Các đỉnh đặc trưng phổ IR của ulvan F2

Vị trí đỉnh	Đặc điểm dao động
788,89	Liên kết C-O-S equatorial của nhóm sulfate ether
846,75	Liên kết C-O-S axial của nhóm sulfate ether
1028,06	Dao động hóa trị đối xứng của C-O-C (liên kết glycosidic)
1219,01	Dao động hóa trị đối xứng của S=O
1415,75	Dao động hóa trị đối xứng của COO <sup>-</sup>
1589,34	Dao động hóa trị bất đối xứng của COO <sup>-</sup>
2939,52	Dao động hóa trị của C-H
3377,36	Dao động hóa trị của O-H

#### d. Phổ IR của mẫu Ulvan phân đoạn F3

Hình 3. 23. Phổ IR của ulvan F3 từ rong *U.papenfussii*

Từ phổ IR của Ulvan của phân đoạn Ulvan F3 chỉ ra ở Hình 3.23 chiết từ rong lục *U.papenfussii*, có thể quan sát thấy các peak đặc trưng cho polysaccharide như vùng dao động  $3412,08\text{ cm}^{-1}$  đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm O-H, peak tại vị trí  $1028,06\text{ cm}^{-1}$  là dao động hóa trị hemiacetal của carbon anomer các gốc đường khi đóng vòng hay là dao động hóa trị đối xứng của C-O-C (liên kết glycosidic), peak  $1220,94\text{ cm}^{-1}$  dao động hóa trị đối xứng của S=O. Đặc biệt, trên phổ IR, xuất hiện các đỉnh thể hiện sự có mặt của nhóm sulfate và carboxylic trong cấu trúc sản phẩm, điều này khớp với kết quả phân tích thành phần sulfate và acid uronic ở phần trên, cụ thể có dải hấp thụ ở vùng  $844,82\text{ cm}^{-1}$  được gán cho dao động của liên kết C-O-S của nhóm sulfate ở vị trí axial. Ngoài ra còn có dải hấp thụ tại vùng  $738,74\text{ cm}^{-1}$  được cho là dao động đặc trưng cho liên kết C-O-S của nhóm sulfate ở vị trí equatorial, dải hấp thụ trong vùng khoảng  $1631,78\text{ cm}^{-1}$  đặc trưng cho dao động đối xứng của nhóm  $\text{COO}^-$  của acid uronic. Hơn nữa ở  $2937,59\text{ cm}^{-1}$  là dao động hóa trị của liên kết C-H và peak  $1402,25\text{ cm}^{-1}$  là của dao động hóa trị đối xứng của  $\text{COO}^-$ , số liệu chi cụ thể ở Bảng 3.7.

Bảng 3. 7. Các đỉnh đặc trưng phổ IR của ulvan F3

Vị trí đỉnh	Đặc điểm dao động
738,74	Liên kết C-O-S equatorial của nhóm sulfate ether
844,82	Liên kết C-O-S axial của nhóm sulfate ether
1028,06	Dao động hóa trị đối xứng của C-O-C (liên kết glycosidic)
1220,94	Dao động hóa trị đối xứng của S=O
1402,25	Dao động hóa trị đối xứng của $\text{COO}^-$
1631,78	Dao động hóa trị bất đối xứng của $\text{COO}^-$
2937,59	Dao động hóa trị của C-H
3412.08	Dao động hóa trị của O-H

**e. Bảng so sánh các tín hiệu phổ IR của ulvan thô và các phân đoạn F1, F2 và F3**

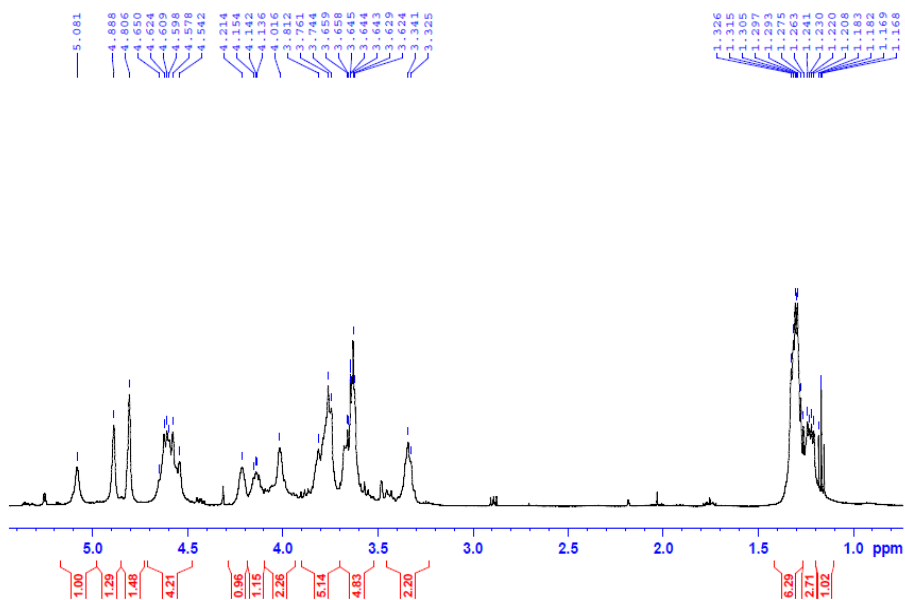
Qua bảng so sánh ta thấy đặc điểm cấu trúc của mẫu ulvan thô và của các phân đoạn F1, F2 và F3 có cấu trúc tương đồng và giống nhau. Tất cả số liệu cho chúng ta thấy chúng có đặc điểm cấu trúc tương tự nhau.

Bảng 3. 8. Bảng so sánh các tín hiệu phổ IR của ulvan thô và các phân đoạn F1, F2 và F3

Vị trí đỉnh				Đặc điểm dao động
F	F1	F2	F3	
786,96	786,96	788,89	738,74	Liên kết C-O-S equatorial của nhóm sulfate ether
844,82	844,82	846,75	844,82	Liên kết C-O-S axial của nhóm sulfate ether
1026,13	1026,13	1028,06	1028,06	Dao động hóa trị đối xứng của C-O-C (liên kết glycosidic)
1220,94	1220,87	1219,01	1220,94	Dao động hóa trị đối xứng của S=O
1415,75	1413,82	1415,75	1402,25	Dao động hóa trị đối xứng của COO <sup>-</sup>
1600,92	1600,92	1589,34	1631,78	Dao động hóa trị bất đối xứng của COO <sup>-</sup>
2937,59	2937,59	2939,52	2937,59	Dao động hóa trị của C-H
3375,43	3388,93	3377,36	3412,08	Dao động hóa trị của O-H

### 3.5.2. Kết quả phổ NMR

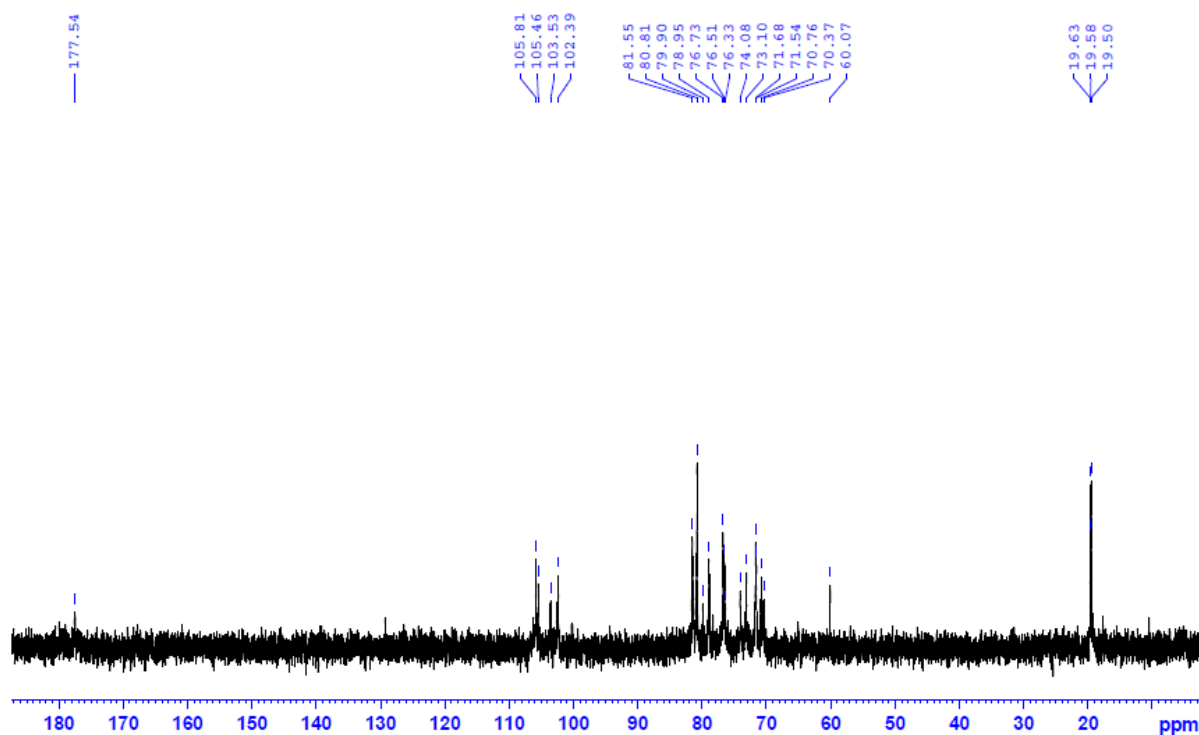
Phương pháp phổ NMR là phương pháp mạnh trong việc nghiên cứu các hợp chất hữu cơ nói chung và các hợp chất polysaccharide nói riêng. Kết hợp các kết quả phân tích từ các phương pháp khác như sắc ký lỏng, phổ hồng ngoại IR, phương pháp phổ NMR có thể xác định được cấu trúc của polysaccharide, trong đó có ulvan [31, 36].



Hình 3. 24. Phổ <sup>1</sup>H-NMR của ulvan từ rong *U. papenfussii*

Trên phổ  $^1\text{H-NMR}$ , xuất hiện đỉnh có độ chuyển dịch hóa học trong vùng 1,2-1,3 ppm. Đây là vùng tín hiệu đặc trưng cho proton của nhóm methyl, khớp với dự đoán carbon vị trí số 6 của đường rhamnose.

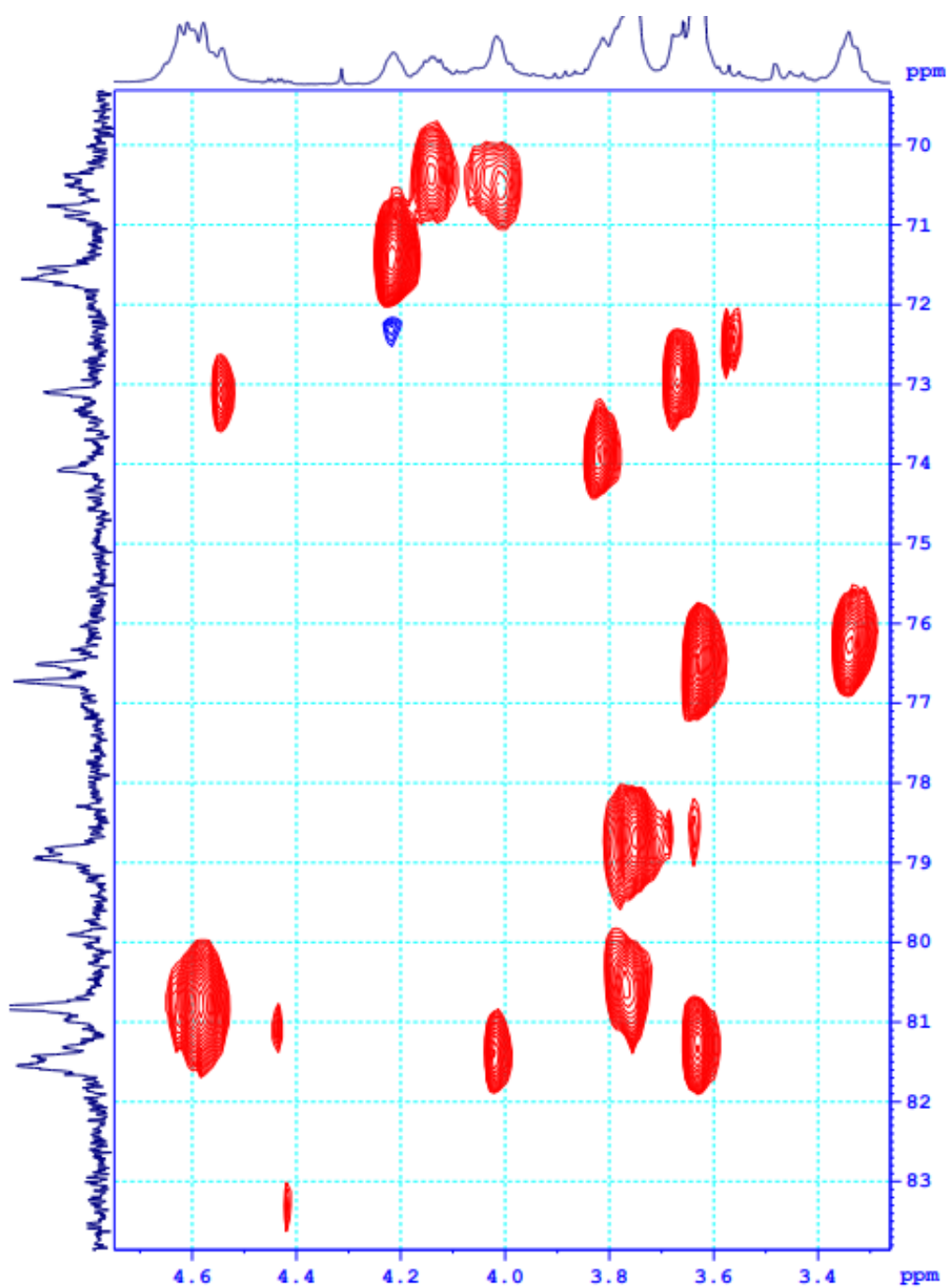
Trên phổ  $^{13}\text{C NMR}$  (Hình 4) xuất hiện 4 nhóm tín hiệu. Theo công bố [36], tín hiệu  $\delta = 17.53$  ppm ở vùng trường cao (vùng số 4) là tín hiệu đặc trưng của C6 methyl của rhamnopyranose. Tín hiệu  $\delta = 177,6$  ppm ở vùng trường thấp (vùng số 1) tương ứng C6 carboxyl của uronic acid. Vùng số 2 có độ chuyển dịch hóa học từ 100 đến 103 ppm đặc trưng cho các carbon anomer. Vùng xuất hiện nhiều tín hiệu từ  $\delta 69$  đến  $\delta 80$  ppm là vùng carbon saccharide. Trên phổ  $^{13}\text{C NMR}$ , xuất hiện các tín hiệu ở khoảng giá trị  $\delta = 60$  ppm, tương ứng với C5 nhóm  $\text{CH}_2$  của xylose; tuy nhiên đây không phải là vùng cho tín hiệu mạnh. Vùng xuất hiện các tín hiệu trong khoảng giá trị  $\delta = 65$  ppm, tương ứng với C6 nhóm  $\text{CH}_2$  của glucose không tìm thấy trên phổ  $^{13}\text{C NMR}$ . Kết quả phổ  $^{13}\text{C NMR}$  khớp với kết quả xác định thành phần monosaccharide bằng sắc ký lỏng cao áp khi xylose và glucose chỉ xuất hiện ở dạng vết trên sản phẩm.



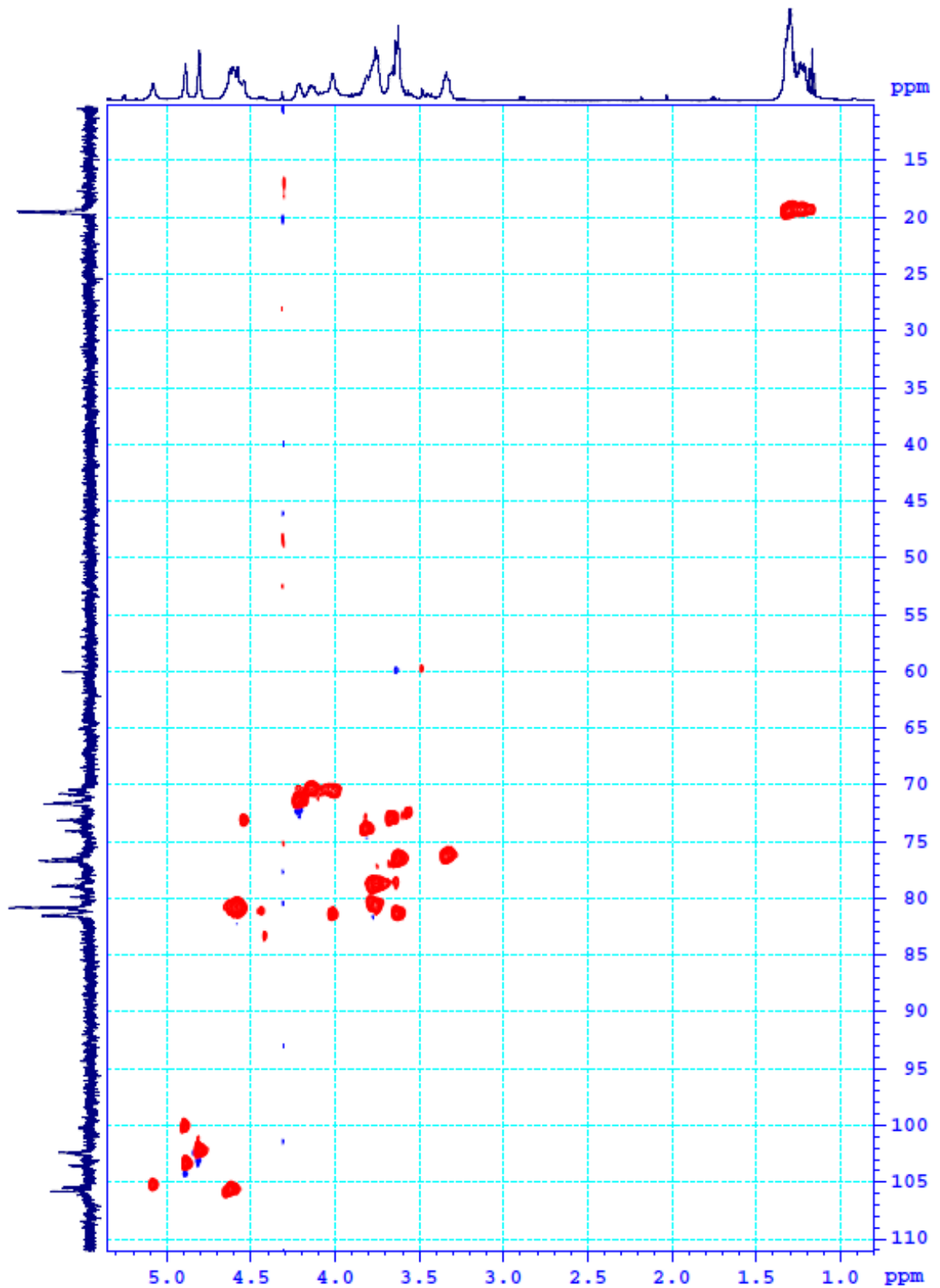
Hình 3. 25. Phổ  $^{13}\text{C NMR}$  của ulvan từ rong *U. papenfussii*

Qua so sánh tín hiệu từ phổ  $^{13}\text{C}$  NMR monosaccharide  $\alpha\text{-L-rhamnose}$  ( $\delta\text{C3} = 72,71$  ppm và  $\delta\text{C4} = 74,84$  ppm), sự dịch chuyển về trường thấp của các tín hiệu C3-A ( $\delta 79,9$ ), C3-B ( $\delta 80,81$ ), C4-A ( $\delta 80,8$ ) và C4-B ( $\delta 78,95$ ) cho thấy khả năng  $\alpha\text{-L-rhamnose}$  trong cấu trúc có liên kết glycoside (tín hiệu dịch chuyển về trường thấp từ 4 đến 10 ppm) và/hoặc có nhóm sulfate (tín hiệu dịch chuyển về trường thấp từ 6 đến 10 ppm) tại vị trí C3 và C4. Bên cạnh đó, sự dịch chuyển về trường thấp của các tín hiệu C4-D ( $\delta 81,55$ ), C4-E ( $\delta 81,55$ ) so với tín hiệu từ phổ  $^{13}\text{C}$  NMR monosaccharide  $\beta\text{-D-glucuronic acid}$  ( $\delta\text{C4} = 74,2$  ppm)  $\alpha\text{-L-iduronic acid}$  ( $\delta\text{C4} = 73,8$  ppm) cho thấy khả năng có liên kết glycoside tại vị trí C4 của  $\beta\text{-D-glucuronic acid}$  và  $\alpha\text{-L-iduronic acid}$ .

Sau khi có kết quả độ chuyển dịch hóa học của các proton trên phổ  $^1\text{H}$ -NMR, sử dụng các tín hiệu liên kết chéo trên phổ HSQC (Hình 5), các tín hiệu carbon liên kết trực tiếp với proton được giải ra. Để xác định vị trí carbon và proton trên sulfated polysaccharide từ các phổ cộng hưởng từ hạt nhân, ta xét phổ cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều HSQC trước tiên (Hình 3.26). Phổ HSQC cho chúng ta biết thông tin về mối tương quan giữa carbon và proton có liên kết trực tiếp với nhau. Từ phổ đồ, có thể thấy 4 tín hiệu giao nhau trong vùng carbon anomer ( $\delta 100\text{-}103$  ppm), tách biệt so với các tín hiệu của vùng carbon vòng saccharide.

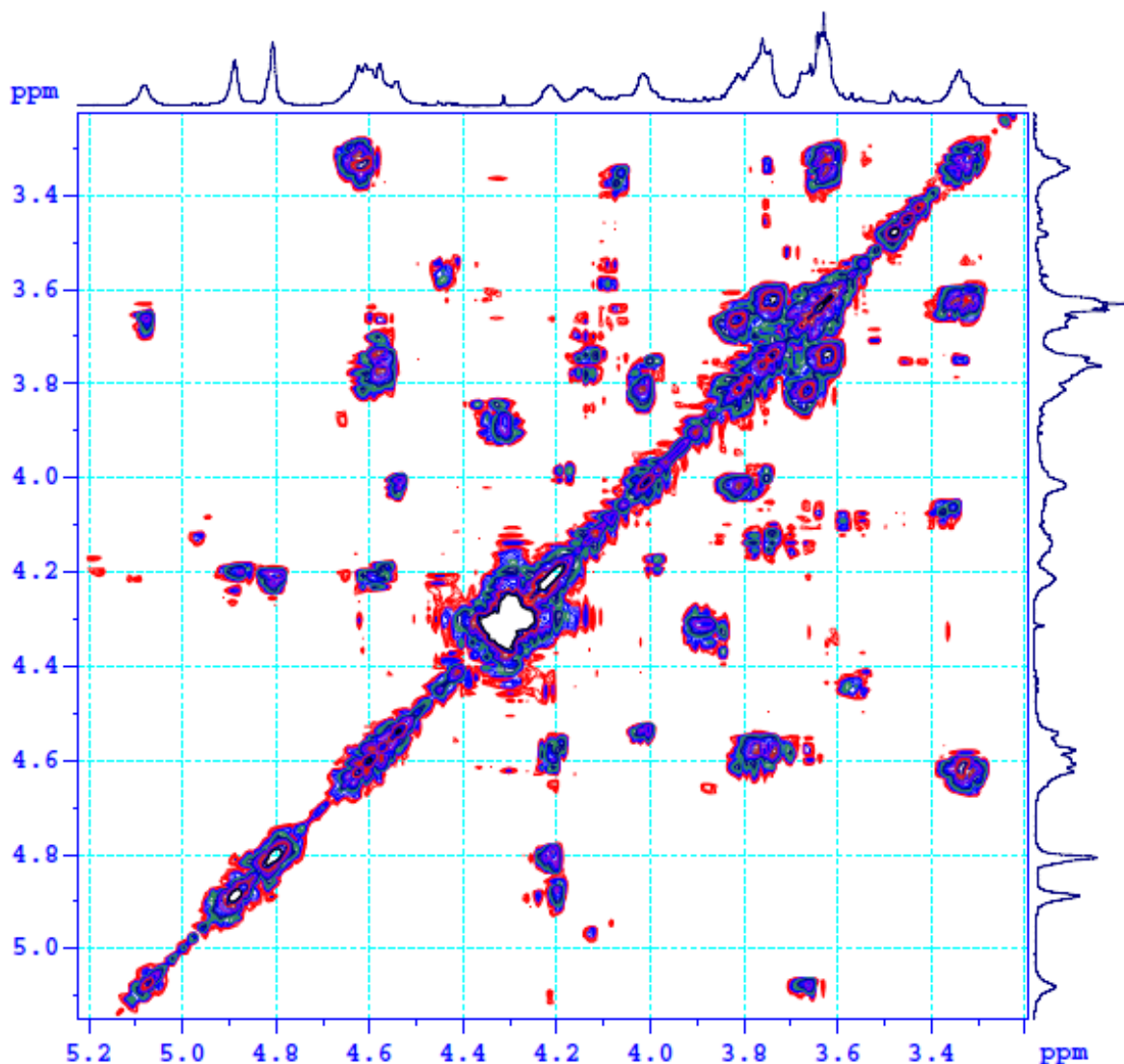






Hình 3. 26. Phổ  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC của ulvan từ rong *U. papenfussii*

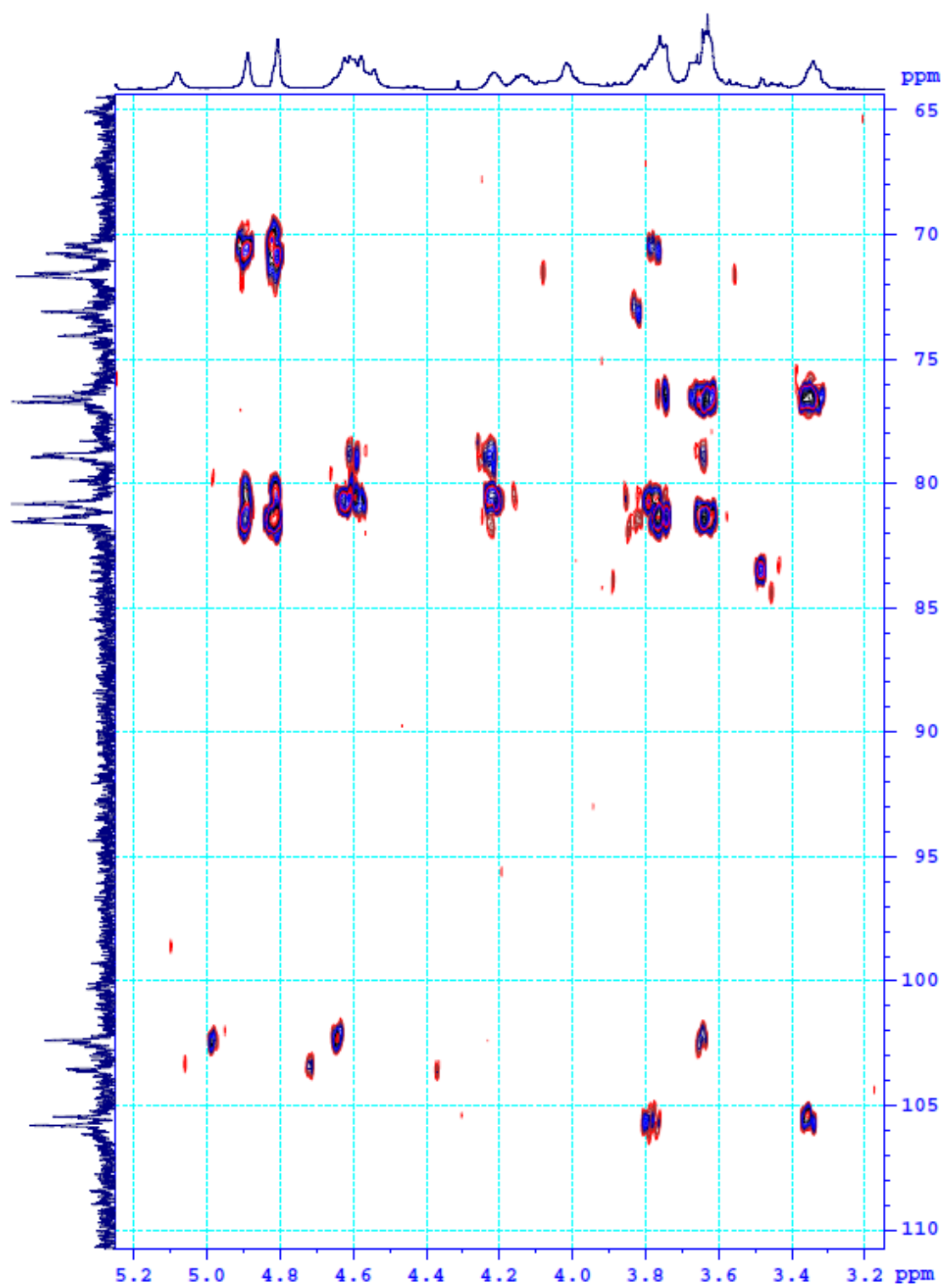
Sau khi xác định được các tín hiệu proton tại vị trí carbon anomer có được từ phổ HSQC, ta tiến hành xác định tương tác của các proton giữa các carbon liền kề bằng phổ COSY.



Hình 3. 27. Phổ COSY của của ulvan từ rong *U.papenfussii*

Bốn nhóm saccharide đã được xác định các tín hiệu proton. Đối chiếu các kết quả thu được với các công trình đã được công bố về phổ  $^1\text{H}$  NMR ulvan [3] [22] [35], bốn nhóm saccharide trùng tín hiệu với 4 nhóm đường  $\beta$ -D-glucuronic acid,  $\alpha$ -L-iduronic acid,  $\alpha$ -L-rhamnose liên kết với glucuronic và  $\alpha$ -L-rhamnose liên kết với  $\alpha$ -L-iduronic acid trong cấu trúc ulvan thuộc dạng  $A_{3S}$  và  $B_{3S}$ .

Để xác định vị trí liên kết glycoside, tiến hành phân tích các tín hiệu của phổ HMBC để tìm mối liên hệ giữa carbon và proton qua hai mối liên kết. Từ 2 tín hiệu peak chéo H4-/C1-(4,65/102,39), H1-/C4 - (4,88/79,49), cho thấy 2 saccharide tạo liên kết (1→4) phù hợp với cấu trúc A3S có liên kết (1→4) giữa  $\beta$ -D-glucuronic acid và  $\alpha$ -L-rhamnose. Từ 2 tín hiệu peak chéo H1-/C4- (4,89/79,31) và H4-/C1- (4,88/103,53), cho thấy saccharide B và E tạo liên kết (1→4) phù hợp với cấu trúc B3S có liên kết (1→4) giữa  $\alpha$ -L-iduronic acid và  $\alpha$ -L-rhamnose. Tại vị trí C3 của  $\alpha$ -L-rhamnose, không phát hiện liên kết chéo với các gốc đường khác. Như vậy, tín hiệu biểu thị C3 của  $\alpha$ -L-rhamnose bị dịch chuyển về trường thấp chỉ còn nguyên nhân là do sự có mặt của gốc thế sulfate.



Hình 3. 28. Phổ HMBC của ulvan từ rong *U.papenfussii*

## KẾT LUẬN

Sau khi đã nghiên cứu chiết tách và đặc trưng cấu trúc của ulvan từ rong lục *Ulva papenfussii*, chúng tôi rút ra các kết luận như sau:

1. Nghiên cứu thành công quy trình tách chiết, tinh sạch polysaccharide điện tích từ rong lục *Ulva papenfussii*. Với tổng số ba phân đoạn là F1, F2 và F3
2. Xác định được thành phần hóa học của polysaccharide điện tích bao gồm chủ yếu là đường rhamnose (24%), uronic acid (12,6%) và sulfate (20,7%). Khẳng định được polysaccharide điện tích là sulfated polysaccharide dạng ulvan.
3. Bằng phương pháp phân tích phổ IR và phổ NMR, xác định được cấu trúc của sulfated polysaccharide là ulvan dạng A<sub>3S</sub> và B<sub>3S</sub> có mảnh cấu trúc chính như sau:

A<sub>3S</sub>:  $\rightarrow 4) \beta\text{-D-Glucuronic acid}(1 \rightarrow 4) \alpha\text{-L-Rhamnose-3-sulfate}(1 \rightarrow$

B<sub>3S</sub>:  $\rightarrow 4) \alpha\text{-L-Iduronic acid}(1 \rightarrow 4) \alpha\text{-L-Rhamnose-3-sulfate}(1 \rightarrow$

## KIẾN NGHỊ

Trên cơ sở các kết quả thu được từ luận văn, chúng tôi có một số kiến nghị như sau:

1. Tiếp tục khảo sát, đánh giá một số hoạt tính sinh học của ulvan từ rong *Ulva papenfussii*, đồng thời nghiên cứu mối quan hệ giữa cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học để hiểu rõ hơn về sự ảnh hưởng của cấu trúc polysaccharide tự nhiên và các dẫn xuất được chuyển hóa đến hoạt tính sinh học của ulvan làm cơ sở khoa học cho việc khai thác và sử dụng hiệu quả nguồn rong lục *Ulva papenfussii* cũng như tạo ra các dạng sản phẩm ulvan cho các mục đích sử dụng khác nhau phục vụ sức khỏe cộng đồng.

2. Tiếp tục nghiên cứu cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học của sulfated polysaccharide (ulvan) từ các loài rong lục khác của Việt Nam nhằm tìm kiếm các hợp chất mới có hoạt tính sinh học cao từ đó làm cơ sở cho việc khai thác và sử dụng hiệu quả nguồn tài nguyên rong biển Việt Nam.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Leiro J.M., Castro R., Arranz J.A., Lamas J. (2007), “Immunomodulating activities of acidic sulphatated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh”, *International Immunopharmacology*, 7(7), pp. 879–888.
2. Bitter T., Muir H.M. (1962), “A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction”, *Analytical Biochemistry*, 4, pp.330–334.
3. Holdt, S.L.; Kraan, S, 2011, Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation, *J. Appl. Phycol.* 23, pp. 543–597.
4. Alves, A.; Sousa, R.A.; Reis, R.L. . 2013. A practical perspective on ulvan extracted from green algae. *J. Appl. Phycol*, 25, 407–424.
5. Kidgell, J.T.; Magnusson, M.; de Nys, R.; Glasson, C.R. 2019. Ulvan: A systematic review of extraction, composition and function. *Algal Res.* 39, 101422.
6. Wargacki AJ, Leonard E, Win MN, Regitsky DD, Santos CNS, Kim PB, Cooper SR, Raisner RM, Herman A, Sivitz AB, Lakshmanaswamy A, Kashiwama Y, Baker D, Yoshikuni Y. 2012. An Engineered Microbial Platform for Direct Biofuel Production from Brown Macroalgae. *Science* (80-) 335:308–313.
7. Smetacek V, Zingone A. 2013. Green and golden seaweed tides on the rise. *Nature*, 504:84–88.
8. Lingchong Wang, Xiangyu Wang, Hao Wu and Rui Liu. 2014. Overview on Biological Activities and Molecular Characteristics of Sulfated Polysaccharides from Marine Green Algae in Recent Years. *Mar. Drugs.*, 12, 4984-5020.
9. Cai, J. 2021. Global status of seaweed production, trade and utilization. In *Seaweed Innovation Forum Belize, Session 1: Seaweed and Climate Change; Compete Caribbean: Christ Church, Barbados.*
10. Leiro J.M., Castro R., Arranz J.A., Lamas J. (2007), “Immunomodulating activities of acidic sulphatated polysaccharides obtained from the seaweed

- Ulva rigida* C. Agardh”, *International Immunopharmacology*, 7(7), pp. 879–888.
11. Berna Kılınç, Semra Cirik, Gamze Turan, Hatice Tekogul and Edis Koru (2013). *Food Industry*, Chapter 31: Seaweeds for Food and Industrial Applications. Edited by Innocenzo Muzzalupo, published: January 16, 2013 under CC BY 3.0 license.
  12. Dennis J. McHugh (2003). *A guide to the seaweed industry. Food and agriculture organization of the united nations*, Rome.
  13. Shonima G.M., Jiji T., Pratheesh P.T., Kurup G.M. (2012), “Ex Vivo anticoagulant activity of the polysaccharide isolated from *Ulva fasciata*”, *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 1(3), pp. 194–197.
  14. Chu Đình Kính (2001), *Các phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân*, Viện Hóa học, Trung tâm khoa học tự nhiên và Công nghệ quốc gia.
  15. Tu V.N., Hau L.N., Lin S.M., Frederique S., Olivier D.C. (2013), “Checklist of the marine macroalgae of Vietnam”, *Botanica Marina*, 56(3), pp. 207–227.
  16. Fedorov S.N., Ermakova S.P., Zvygintseva T.N., Stonik V.A. (2013), “Anticancer and cancer preventive properties of marine polysaccharides: some results and projects”, *Marine Drugs*, 11, pp. 4876–4901.
  17. Hong D.D., Hien H.M. (2007), “Seaweeds from Vietnam used for functional food, medicine and biofertilizer”, *Journal of Applied Phycology*, 19, pp. 817–826.
  18. Robic A., Sassi J.F., Lahaye M. (2008), “Impact of stabilization treatments of the green seaweed *Ulva rotundata* (Chlorophyta) on the extraction yield, the physico-chemical and rheological properties of ulvan”, *Carbohydrate Polymers*, 74, pp. 344–352.
  19. Favero N., Cattalini F., Bertaggia D., Albergoni V. (1996), “Metal accumulation in a biological indicator (*Ulva rigida*) from the lagoon of Venice (Italy)”, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 31, pp. 9–18.



20. Celine Rebours, Eliane M.S., José A.Z., Leila H., Julio A.V., Paul K., Gonzalo S., Raul U., Maria H.A., Ingrid B.L., Grete H., Rolf R., Daniel R. (2014), “Seaweeds: an opportunity for wealth and sustainable livelihood for coastal communities”, *Journal of Applied Phycology*, 26(5), pp. 1939–1951.
21. Indergaard M., Minsaas J. (1991), “Animal and human nutrition”, *Seaweed Resources in Europe: Uses and Potential*, John Wiley & Sons, Chichester, 21–64.
22. Maria I.Bilan, Alexey A.Grachev, Nadezhda E.Ustuzhanina Alexander S.Shashkov, Nikolay E.Nifantiev, Anatolii I. Usov (2004), “A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus* L”, *Carbohydrate Research*, 339, pp. 511–517.
23. Carina C., Anabela A., Paula R.P., Rui A.S., Eduardo A.B.S., Rui L.R., Alirio E.R. (2012), “Characterization of ulvan extracts to assess the effect of different steps in the extraction procedure”, *Carbohydrate Polymers*, 88, pp. 537–546.
24. Kim S.K., Pangestuti R., Rahmadi P. (2011), “Sea lettuces: culinary uses and nutritional value”, *Advances in Food and Nutrition Research*, 64, pp.57-70.
25. Kaeffer B., Benard C., Lahaye M., Blottiere H. M., Cherbut C. (1999), “Biological Properties of Ulvan, a New Source of Green Seaweed Sulfated Polysaccharides, on Cultured Normal and Cancerous Colonic Epithelial Cells”, *Planta Medica*, 65, pp. 527–531.
26. Pereira M.S., Melo F.R., Mourao P.A.S. (2002), “Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans”, *Glycobiology*, 12(10), pp. 573–580.
27. Barcelo A., Claustre J., Moro F., Chayvialle J.A., Cuber J.C., Plaisancie P. G. (2000), “Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon”, *gut*, 46, pp. 218–224.
28. Dodgson K.S. (1961), “Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters”, *Biochemical Journal*, 78, pp.312–319.

29. Qi H., Zhang Q., Zhao T., Chen R., Zhang H., Niu X., Li Z. (2005), “Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 37, pp. 195–199.
30. Monk A., Scudiero D., Skehan P., Shoemaker R. (1991), “Feasibility of a high- flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines”, *Journal of National Cancer Institute*, 83(11), pp. 757–766.
31. Alberto P.R., Thomas P.M., Denis R.M., Elizabeth L.C.S. (2011), “Chemical composition of cultivated seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh”, *Food Chemistry*, 129, pp. 491–498.
32. Lahaye, M.; Robic, A. 2007. Structure and Functional Properties of Ulvan, a Polysaccharide from Green Seaweeds. *Biomacromolecules*, 8(6), 1765-1774.
33. Kaeffer B., Benard C., Lahaye M., Blottiere H. M., Cherbut C. (1999), “Biological Properties of Ulvan, a New Source of Green Seaweed Sulfated Polysaccharides, on Cultured Normal and Cancerous Colonic Epithelial Cells”, *Planta Medica*, 65, pp. 527–531.
34. Oyaizu, M., (1988), “Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography”, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 46, pp. 571–575.
35. Osama M.A., Rasha R.A.(2014), “Anti-proliferative and apoptotic efficacies of ulvan polysaccharides against different types of Carcinoma cells *in vitro*”, *Journal of Cancer Science Therapy*, 6, pp. 202–208.
36. Lahaye M., Axelos M. A. V. (1993), “Gelling properties of water-soluble polysaccharides from proliferating marine green seaweeds (*Ulva* spp)”,
37. Yaiche H., Garna H., Besbes S., Paquot M., Blecker C., Attia H. (2011), “Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia”, *Food Chemistry*, 128, pp. 895–901.
38. Subhash R.Y., Uday N.H., Bhupal B.C. (2014), “Therapeutic potential and health benefits of *Sargassum* species”, *Pharmacognosy Review*, 8(15), pp. 1–7.

39. Albertus J.S. (2004), “Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review”, *Journal of applied phycology*, 16, pp. 245–265.
40. Enrique H. G., Jose A.Z.G., Isai P.R. (2011), “Isolation and chemical characterization of algal polysaccharides from the green seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh”, *Journal of Applied Phycology*, 23, pp. 537–542.
41. Ray B., Lahaye M. (2005), “Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta), chemical structure of ulvan”, *Carbohydrate Research*, 274, pp. 313–318.
42. Yen G.C., Chen H. (1995), “Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, pp. 27–37.
43. Chiellini F., Morelli A. (2014), “Ulvan: A Versatile Platform of Biomaterials from Renewable Resources”, *Book Biomaterials - Physics and Chemistry*, Italy.
44. Anabela A., Sofia G.C., Joao F.M., Rui A.S., Rui L. R. (2010), “Extraction and physico-chemical characterization of a versatile biodegradable polysaccharide obtained from green algae”, *Carbohydrate Research*, 345, pp. 2194–2200.
45. Zagintseva T.N., Shevchenko N.M., Popivnich, I.B. (1999), “A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds”, *Carbohydrate Research*, 322, pp. 32–39.
46. Zayia Josep (2004), “Principles of Mass spectroscopy of Glycosaminoglycan”, *Journal of Biomacromolecular Mass Spectrometry*, 1 (1), pp. 3-36.
47. Zeysa Domon, Costello C.E. (1988), “A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates”, *Glycoconjugate Journal*, 5, pp. 397-409.
48. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.I., Randall R.J., (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), pp. 265 – 275.
49. Manns D., Deutschle A.L., Saake B., Meyer A.S (2014), Methodology for quantitative determination of the carbohydrate composition of brown seaweeds (Laminariaceae), *RSC Advances*, (4), pp 25736–25746.