

NGHIÊN CỨU TÍNH SẠCH VÀ XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH MIỄN DỊCH CỦA FUCOIDAN TỪ RONG SỤN (*Kappaphycus alvarezii*)

Đinh Thị Huyền¹, Lê Thị Mỹ Ngọc², Nguyễn Thị Minh Chi³, Nguyễn Phạm Cẩm Tiên⁴,
Hoàng Thị Ngọc Nhơn⁵

^{1, 2, 3, 4, 5} Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp thực phẩm Tp. HCM
⁵ nhonhtn@hufi.edu.vn

Ngày nhận bài: 7/11/2018, Ngày duyệt đăng: 17/12/2018

Tóm tắt

Rong sụn (*Kappaphycus alvarezii*) là loại rong biển có chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học, trong đó đáng chú ý là fucoidan. Về mặt hóa học, fucoidan là một chuỗi phân tử cao polysaccharides có thành phần chủ yếu là sulfate fucose, có nhiều hoạt tính sinh học quý như kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng mốc, kháng đông máu, chống khối u... và đặc biệt là hoạt tính miễn dịch. Nghiên cứu đã tiến hành thu nhận fucoidan từ rong sụn (khu vực Đầm Môn, tỉnh Khánh Hòa), tinh sạch fucoidan bằng phương pháp sắc ký lọc gel, xác định hàm lượng fucoidan từ các phân đoạn thu được; Thực hiện xác định khối lượng phân tử của fucoidan trong rong sụn bằng phương pháp GPC; thử hoạt tính miễn dịch với MTT. Các phân đoạn được chọn khi qua sắc ký lọc gel có hàm lượng fucoidan 150,14 ($\mu\text{g/ml}$) và độ tinh sạch 36,48%. Khối lượng phân tử trung bình của fucoidan thấp có giá trị 4,2 kDa. Fucoidan được ghi nhận có hoạt tính gây tăng sinh tế bào đơn nhân máu ngoại vi (Peripheral Blood Mononuclear Cell - PBMC), tại nồng độ 250 $\mu\text{g/mL}$ thể hiện tính gây độc và hoạt tính gây độc giảm dần theo nồng độ.

Từ khóa: fucoidan, hoạt tính miễn dịch, rong sụn *Kappaphycus alvarezii*, tinh sạch.

Study of purification and immune activity of fucoidan from *Kappaphycus alvarezii*

Abstract

Kappaphycus alvarezii is a seaweed containing numerous carbohydrate with biological activities, especially fucoidan. Fucoidan is fucose polysaccharides (FCSPs) with diverse biological activities including antioxidant, anticoagulant, antiviral, antitumor, anti-inflammatory... and especially immune activity. In this study, fucoidan purification and immune activity from *Kappaphycus alvarezii* algae (collected at Dam Mon area, Khanh Hoa province) were investigated. Fucoidan was purified from the extract by gel filtration chromatography, the content and the purity in fractions were determined. The molecular mass of fucoidan was determined by GPC and the immune activity of fucoidan was evaluated with MTT. The average molecular weight of low fucoidan was 4.2 kDa. Fucoidan has been shown to be effective in the treatment of several types of cancer that cause peripheral blood mononuclear hyperplasia Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), at a concentration of 250 $\mu\text{g/ml}$ exhibiting toxicity and toxic depressant activity.

Keywords: fucoidan, immune activity, *Kappaphycus alvarezii*, purification.

1. Đặt vấn đề

Rong sụn thuộc ngành tảo đỏ đây là loài rong biển có giá trị kinh tế cao. Trong rong sụn, hàm lượng nước chiếm 77-91% còn lại là phần trầm chất khô. Trong chất khô chứa chủ yếu là

carbohydrate, protein, chất khoáng, lipid, sắc tố, enzym... Hàm lượng carbohydrate dao động từ 50-60% và thường tập trung chủ yếu ở thành tế bào gồm có cellulose và các loại đường có hoạt tính sinh học (Nisho và cộng sự, 1991).

Fucoidan là hợp chất có chứa fucose polysaccharides, có mặt trong tảo biển và có nhiều chức năng liên quan đến hoạt động sinh lý (Ale và cộng sự, 2011). Fucoidan là một hợp chất đa dạng về công thức cấu tạo nên có nhiều hoạt tính sinh học đáng được quan tâm, được ứng dụng cho thực phẩm chức năng, chống ung thư, miễn dịch, chống viêm, kháng virus, thuốc chống đông máu và chất chống oxy hóa (Ale và cộng sự, 2011; Fitton, 2011; Lakmal và cộng sự, 2014). Rong biển được biết đến là nguồn fucoidan lớn nhất, nhưng nguồn lợi này chưa được khai thác nhiều (Hahn và cộng sự 2012). Phương pháp trích ly thường sử dụng được tiến hành theo các bước tiền xử lý khác nhau, sử dụng dung môi cho quá trình trích ly, kết tủa, và sắc ký để tinh sạch fucoidan có trong dịch trích. Tiền xử lý là cần thiết để loại bỏ chất diệp lục, mannitol, muối và các hợp chất nhỏ khác. Hệ MeOH-CHCl₃-H₂O với tỷ lệ (4:2:1) (Ale và cộng sự, 2011) hoặc ethanol 80-85% là hai cách thường được sử dụng xử lý nguyên liệu trước khi trích ly (Yang và cộng sự, 2008). Trích ly bằng dung môi là acid (Ale và cộng sự, 2011) hoặc nước nóng với nhiệt độ 60 – 100°C (Luo và cộng sự, 2009) và CaCl₂ đôi khi được sử dụng để kết tủa alginate trong quá trình chiết (Bilan và cộng sự, 2002). Theo các nghiên cứu tách chiết fucoidan bằng dung dịch acid, chẳng hạn như HCl, sẽ nâng cao hiệu suất thu nhận fucoidan (Kawamoto và cộng sự, 2006). Việc bổ sung CaCl₂ để kết tủa alginate có thể làm tăng độ tinh khiết của fucoidan nhưng cũng có thể làm giảm sản lượng.

Tuy nhiên, vấn đề đang được quan tâm nghiên cứu hiện nay là nâng cao độ tinh sạch fucoidan từ chế phẩm dịch trích ly để có thể nghiên cứu các hoạt tính sinh học quý giá của hợp chất này. Fucoidan được biết đến là hợp chất quan trọng trong nghiên cứu hoạt tính chống ung thư nên hoạt tính miễn dịch là tính chất rất được quan tâm. Nghiên cứu quá trình tinh sạch fucoidan từ rong sụn bằng phương pháp sắc ký lọc gel để nâng cao độ tinh sạch của fucoidan, nhà xác định hoạt tính sinh học của fucoidan từ rong sụn làm cơ sở cho các ứng

dụng của chế phẩm fucoidan sau này.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu, địa điểm, thời gian

Rong sụn (*Kappaphycus alvarezii*) tươi được thu nhận ở khu vực Đầm Môn, tỉnh Khánh Hòa. Rong được rửa sạch bằng nước và loại bỏ các tạp chất bằng rây, sấy đối lưu ở 60°C, nghiền thành bột bằng máy xay khô. Nghiên cứu được thực hiện tại Trung tâm Thí nghiệm Thực hành, Trường Đại học Công nghiệp thực phẩm Tp. Hồ Chí Minh, 93 Tân Kỳ Tân Quý, phường Tân Sơn Nhì, quận Tân Phú, thành phố Hồ Chí Minh, trong thời gian từ tháng 10 năm 2017 đến tháng 7 năm 2018.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu tinh sạch fucoidan bằng phương pháp lọc gel

Quy trình trích ly, thu nhận và tinh sạch fucoidan từ dịch trích được tiến hành theo Kim và cộng sự (2007) như sau:

Rong tươi → Xử lý → Trích ly → Kết tủa → Lọc gel → Fucoidan tinh sạch.

Quy trình chi tiết tiến hành thu nhận và tinh sạch fucoidan

Trích ly fucoidan: Cân 200g rong sụn tươi được xử lý với ethanol 85% trong 24 giờ để loại các chất màu, lipid và các tạp chất khác. Rong sau khi xử lý được trích ly với HCl 1M, ở nhiệt độ 80°C trong 3 giờ, tỷ lệ nguyên liệu và dung môi (HCl 1M) là 1:40 (w/v – tỷ lệ khối lượng/ thể tích (g/mL)). Thu dịch, bổ sung Acid trichloroacetic (TCA) tỷ lệ dịch trích/TCA (50:0,2), 2 giờ ở nhiệt độ 4°C sau đó ly tâm 5000 vòng/phút trong 15 phút loại tủa protein, thu dịch trích fucoidan.

Kết tủa fucoidan: Kết tủa fucoidan với ethanol 99% qua hai giai đoạn. Thêm cồn 99% vào bình chứa dịch trích với tỷ lệ 30:69 (w/w – tỷ lệ khối lượng/khối lượng (g/g)) để nồng độ cồn trong dung dịch là 30%, giữ ở nhiệt độ lạnh trong 4 giờ rồi ly tâm loại tủa thu dịch. Tiếp tục thêm cồn 99% vào dịch (29:40 w/w) để nồng độ cồn là 70%, giữ ở 4°C trong 12 giờ để kết tủa fucoidan, ly tâm 5000 vòng/phút trong 15 phút, thu tủa fucoidan (Marudhupandi và cộng sự, 2014).

Tinh sạch fucoidan từ dịch trích: Hòa tan tủa fucoidan với đệm, ly tâm lấy dịch rồi cho

vào cột sắc ký lọc gel. Các thông số cố định: Thể tích mẫu: 5mL, khối lượng tủa: 1g, 15g gel sephadex G-100, pH (đệm)=7, tốc độ dòng: 5mL/10phút, khảo sát ở nhiệt độ phòng. Các chỉ tiêu theo dõi: Hàm lượng và độ tinh khiết fucoidan sau sắc ký lọc gel. Các loại đệm được khảo sát (tris-HCl, phosphate, acetate) và nồng độ NaCl rửa giải được khảo sát (0,5M; 1M; 1,5M; 2M). Tất cả các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần.

2.2.2. Xác định hoạt tính miễn dịch của fucoidan

Máu được pha trong dung dịch muối cân bằng, đặt lên lớp Ficoll, ly tâm thu nhận lớp PBMC và rửa bằng dung dịch muối cân bằng, ly tâm để thu và hòa tế bào vào 1 mL dung dịch ly giải hồng cầu và ủ từ 3-5 phút. Ly tâm thu tế bào và hòa tế bào vào trong 1mL môi trường RPMI 1640 có bổ sung 10% FBS. Xác định mật độ tế bào và tỷ lệ tế bào sống, chết bằng phương pháp Trypan blue (Altman và cộng sự, 1993). Tế bào sau khi được phủ lên đĩa với mật độ 10^5 tế bào/giếng sẽ được cảm ứng với thuốc. Ủ trong 48 giờ ở 37°C , 5% CO_2 . Sau đó bổ sung 20 μL MTT (nồng độ cuối 0,5 $\mu\text{g/mL}$), ủ đĩa 4 giờ trong tối, ly tâm thu tinh thể formazan và hòa lại bằng 100 μL isopropanol. Ghi nhận giá trị OD bằng máy ELISA Reader ở bước sóng 570nm và 590nm. Tất cả các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần.

2.3. Các phương pháp phân tích

2.3.1. Xác định khối lượng phân tử của fucoidan từ rong sụn bằng phương pháp GPC

Trọng lượng phân tử trung bình (M_w) của fucoidan trong rong sụn đã được phân tích trong thiết bị Shimadzu LC-20A với RID-10A - bộ dò khúc xạ bằng cột Tosoh (TSKgel Super H2000 7,8 mm x 30 cm) khối lượng mẫu một lần tiêm là 10 μL sử dụng nước là dung môi rửa giải ở 65°C với tốc độ dòng chảy 1 ml/phút.

2.3.2. Phương pháp xác định hàm lượng fucoidan

Thêm 1 mL dung dịch fucoidan ở mỗi nồng độ vào ống nghiệm, làm lạnh ở 4°C (2-3 phút). Thêm 4,5 mL H_2SO_4 (85%), đun sôi trong 10 phút, sau đó để nguội, thêm 0,3 mL acid cysteine hydrochloric 0,1% vào ống nghiệm, ủ trong bóng tối trong 2 giờ, sau đó đo độ hấp thụ

trên quang phổ kế ở 396 nm và 430 nm. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần. Xác định hàm lượng fucoidan có trong mẫu bằng phương pháp đo quang phổ UV-VIS ở 390nm và 430nm, theo đường chuẩn $y = 0,0074x + 0,0059$ (Dische và cộng sự, 1948).

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

2.3.3. Phương pháp xác định thử hoạt tính miễn dịch (phương pháp MTT)

Hoạt tính miễn dịch của fucoidan được xác định bằng cách sử dụng phương pháp MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide để khảo sát sự tăng sinh PBMC với mật độ tế bào dùng phủ giếng là 10^5 tế bào/giếng, nồng độ dung môi nước $\leq 1\%$. Nồng độ mẫu fucoidan trong thí nghiệm là 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$.

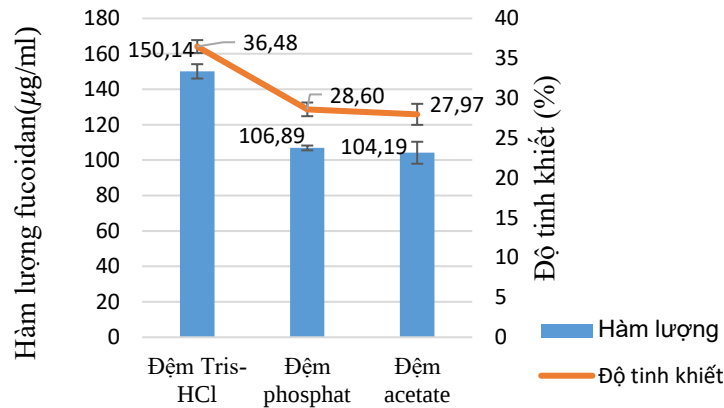
2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được tiến hành lặp lại ba lần, kết quả được trình bày ở dạng giá trị trung bình $\pm$ giá trị sai số. Kết quả được tính toán bằng phần mềm Microft Office Excel 2010 và phần mềm thống kê JMP. Kết quả phân tích ANOVA với độ tin cậy 95%, so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức qua phép thử LSD.

3. Kết quả và thảo luận

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

Sau khi thực hiện quá trình trích ly thu nhận fucoidan thu được dịch trích có hàm lượng fucoidan là 44,25 $\mu\text{g/mL}$. Sau khi kết tủa fucoidan tiến hành quá trình sắc ký lọc gel bằng 3 loại đệm phổ biến là: Tris-HCl, phosphate, acetate. Cân 1g mẫu tủa hòa trong 5mL đệm trước khi đưa vào cột sắc ký lọc gel. Mẫu được nạp vào cột sắc ký lọc gel đã được lắp sẵn, dùng đệm rửa mẫu trên cột sắc ký với thể tích gấp 5 lần thể tích cột, điều chỉnh tốc độ dòng 5mL/10phút, mẫu được hứng theo từng phân đoạn mỗi phân đoạn 10mL, hứng 10 phân đoạn mỗi loại đệm. Các phân đoạn thu được đem đo quang để xác định độ tinh khiết và hàm lượng fucoidan. Ảnh hưởng của loại đệm và nồng độ muối NaCl rửa giải trong sắc ký lọc gel được thể hiện trong Hình 1.



Hình 1. Ảnh hưởng của các loại đệm trong sắc ký lọc gel

Từ kết quả Hình 1 cho thấy, 3 loại đệm sử dụng trong sắc ký lọc gel ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến hàm lượng fucoidan ở các phân đoạn thu hồi được. Về độ tinh khiết, với đệm Tris-HCl pH 7 cao nhất (36,48%) so với 2 loại đệm còn lại và có sự khác nhau có ý nghĩa ($p < 0,05$). Về hàm

lượng, 3 loại đệm cũng có sự khác nhau có ý nghĩa ($p > 0,05$) hàm lượng thu nhận được ở đệm Tris-HCl cao nhất (150,14 µg/mL). Tiếp theo, tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl rửa giải, hàm lượng fucoidan qua các nồng độ NaCl được thể hiện qua Bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl rửa giải trong sắc ký lọc gel

STT	Nồng độ muối NaCl (M)	Hàm lượng (µg/mL)	Độ tinh khiết (%)
1	0,5	(3,96±0,78) ^a	(5,73±0,54) ^a
2	1	(183,74±2,38) ^c	(36,64±0,88) ^c
3	1,5	(22,66±2,73) ^b	(17,92±1,05) ^b
4	2	(2,97±0,50) ^a	(5,37±0,75) ^a

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

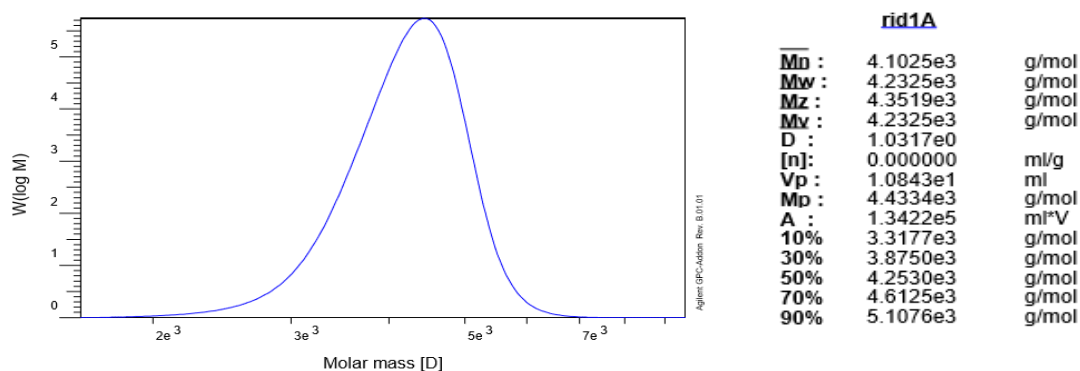
Hàm lượng fucoidan khi rửa giải bằng muối có nồng độ 1M cho hàm lượng cao nhất 183,74µg/mL đạt độ tinh khiết 36,64%. Phương pháp sắc ký lọc gel tinh sạch dựa vào trọng lượng phân tử, nồng độ muối rửa giải có ảnh hưởng đáng kể đến quá trình tinh sạch trong sắc ký lọc gel. Tuy nhiên, từ kết quả này có thể thấy sắc ký lọc gel là phương pháp làm tăng độ tinh sạch của fucoidan trong các phân đoạn thu được. Như vậy, phương pháp sắc ký lọc gel có hiệu quả trong việc tinh sạch fucoidan từ dịch trích ly từ rong sụn.

Phân tử lượng của các fucoidan có khoảng dao động lớn (1kDa-1,500kDa) nên chọn gel sử dụng tinh sạch fucoidan bằng phương pháp sắc

ký lọc gel là G100 (4,000-150,000). Phương pháp này đã được nhiều tác giả sử dụng hiệu quả để nghiên cứu tinh sạch fucoidan như: Mak (2012) đã tinh sạch fucoidan từ rong *Undaria pinnatifida*, Cong và cộng sự (2015) tinh sạch fucoidan từ rong *Sargassum fusiforme*, Synytsya và cộng sự (2010) đã tinh sạch fucoidan từ *Undaria pinnatifida*.

3.2. Xác định khối lượng phân tử fucoidan từ rong sụn bằng phương pháp GPC

Sau khi thực hiện việc trích ly bằng HCl, tinh sạch bằng phương pháp lọc gel. Tiến hành xác định khối lượng phân tử của fucoidan từ rong sụn bằng phương pháp GPC, kết quả được thể hiện ở Hình 2.



Hình 2. Kết quả phổ đồ xác định khối lượng phân tử của fucoidan trong rong sụn bằng phương pháp GPC

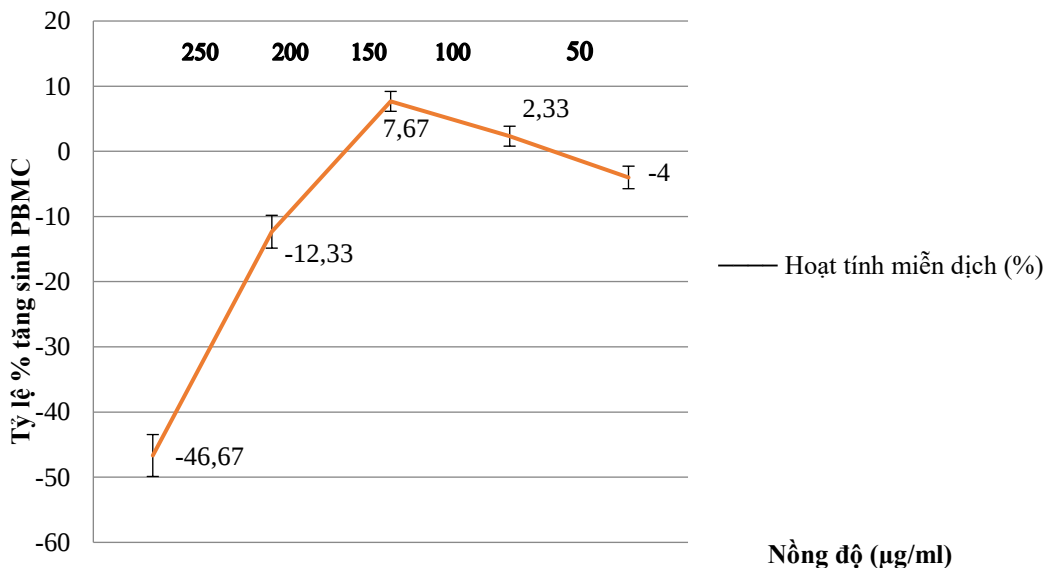
Kết quả xác định khối lượng phân tử của fucoidan trong rong sụn bằng phương pháp GPC cho thấy khối lượng phân tử trung bình của fucoidan thấp có giá trị 4,2 kDa. Như các công bố khối lượng phân tử trung bình của fucoidan dao động trong khoảng 1 kDa – 1500 kDa (Li và cộng sự, 2008). Tuy nhiên, như kết quả ở trên cho thấy rằng khối lượng phân tử trung bình của fucoidan trong nghiên cứu này chỉ nằm trong vùng khối lượng phân tử trung bình thấp, có thể do nhiều yếu tố tác động đến quá trình trích ly như ảnh hưởng của nhiệt độ và loại dung môi trích ly, sẽ làm phân cắt mạch polysaccharide thành nhiều đoạn có khối lượng phân tử nhỏ và fucoidan các có khối lượng phân tử khác nhau có thể thu được từ cùng một loài (Altman và cộng sự, 1993). Nghiên cứu này, dung môi HCl với nồng độ khá cao được sử dụng nên sẽ ảnh hưởng đến kích thước của phân tử fucoidan thu nhận được. Nhiều nhà khoa học đã chứng minh rằng trọng lượng phân tử fucoidan thấp được ứng dụng trong nhiều hoạt tính sinh học của fucoidan rất cao, bên cạnh đó trọng lượng phân tử thấp được dùng làm chất chống oxy hóa có hiệu quả tốt (McNeil, 2013). Kim và cộng sự (2007) đã công bố rằng khối lượng phân tử thấp (1389 ~ 3749 Da) của fucoidan có giá trị cho quá trình sản xuất của fuco-oligosaccharides có hoạt tính chống đông cao (Duarte và cộng sự, 2001). García-Ríos (2012) cũng cho rằng khối

lượng phân tử trung bình của fucoidan thấp là một lợi thế cho quá trình điều trị tác dụng trên hệ miễn dịch và chống viêm. Nishino và cộng sự (1991) đã công bố rằng hàm lượng sulfate là yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của fucoidan. Fucoidan có trọng lượng phân tử thấp (<2000 Da) với thành phần chính là fucose và một lượng lớn sulfate có hoạt tính kháng u mạnh hơn fucoidan dị thể trọng lượng phân tử cao và hàm lượng sulfate thấp. Luyt và cộng sự (2003), Li và cộng sự (2008) đã phân tách fucoidan từ khối lượng phân tử trung bình cao xuống khối lượng phân tử trung bình thấp (5 - 9 kDa) để thử hoạt tính chống đông máu trên chuột. Kết quả cho thấy rất thành công và là tiềm năng cho việc điều trị thúc đẩy quá trình tuần hoàn máu (Li và cộng sự, 2008; Kim và cộng sự, 2007). Trong nghiên cứu xác định hoạt tính fucoidan của rong *Laminaria japonica*, về khả năng kháng khuẩn ở hai loài vi khuẩn Gram âm là *E. coli* và *S. aureus*, Liu và cộng sự (2017) đã khảo sát khả năng ức chế sự phát triển trên 2 loài vi khuẩn này với các khối lượng phân tử trung bình khác nhau: <6 kDa, 6 - 20 kDa, 20 - 50 kDa, 50 - 80 kDa, > 80 kDa. Kết quả của fucoidan có khối lượng phân tử trung bình < 6 kDa có khả năng ức chế sự phát triển của 2 loài vi khuẩn *E. coli* và *S. aureus* cao nhất so với các khối lượng phân tử trung bình còn lại (Rodríguez-Jasso và cộng sự, 2013).

3.3. Xác định hoạt tính miễn dịch của fucoidan từ rong sụn

Trong lĩnh vực điều trị ung thư bằng hợp chất tự nhiên, bên cạnh hoạt tính gây độc tế bào thì tính kháng oxy hóa hay khả năng kích thích miễn dịch ở cơ thể chủ được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm (Bafna và Mishra, 2010). Khả năng kích thích miễn dịch của hợp chất tự nhiên được thể hiện qua sự hoạt hóa tăng sinh các tế bào miễn dịch và kích thích tiết các phân tử miễn dịch (cytokine) (Wilasrusmee và cộng sự, 2002). Nhiều công trình nghiên cứu về khả năng kích thích miễn dịch đã sử dụng tế bào đơn nhân

máu ngoại vi người (PBMC) làm mô hình nghiên cứu vì có chứa hầu hết các tế bào miễn dịch của cơ thể (Yue và cộng sự, 2010, Chow và cộng sự, 2001). Các phương pháp miễn dịch đã được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực phân tích được phẩm quan trọng như chẩn đoán bệnh, theo dõi thuốc điều trị, dược động học và nghiên cứu tương đương sinh học trong ngành phát hiện thuốc và dược phẩm (Darwish và cộng sự, 2006). Để kiểm chứng hoạt tính sinh học của fucoidan thu nhận được từ rong sụn, nghiên cứu tiến hành thử hoạt tính miễn dịch của chế phẩm, kết quả thu được thể hiện ở Hình 3.



Hình 3. Hoạt tính miễn dịch của fucoidan

Hàm lượng fucoidan sau cô quay đạt được 1181,338 µg/mL, tiến hành pha loãng nồng độ 250, 200, 150, 100, 50 µg/mL để xác định được nồng độ có khả năng kích thích tăng sinh tế bào đơn máu ngoại vi. Kết quả ở Hình 3 cho thấy tại nồng độ 250 µg/mL thể hiện tính gây độc và hoạt tính gây độc giảm dần cùng với nồng độ mẫu fucoidan tinh sạch. Tác động gây độc không thể hiện ở những nồng độ mẫu dưới 150 µg/mL. Ở nồng độ 150 µg/mL của mẫu fucoidan tinh sạch có tác động kích thích PBMC tăng sinh cao nhất với hoạt tính là 7,67%. Như vậy, fucoidan được ghi nhận sử dụng trong điều trị

một số dạng ung thư có hoạt tính gây tăng sinh tế bào đơn nhân máu ngoại vi.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, phương pháp sắc ký lọc gel có hiệu quả tương đối tốt trong việc tinh sạch fucoidan từ rong sụn. Loại đệm thích hợp trong nghiên cứu là Tris-HCl và nồng độ muối rửa giải là 1M. Khối lượng phân tử trung bình của fucoidan có giá trị 4,2 kDa. Ngoài ra, dịch fucoidan sau khi tinh sạch thể hiện hoạt tính miễn dịch giảm dần theo nồng độ, cao nhất ở 150 µg/mL. Như vậy có thể thấy, rong sụn là một nguồn nguyên liệu tiềm năng,

giúp mở ra một hướng đi mới trong việc ứng dụng vào thực phẩm chức năng.

Tài liệu tham khảo

- Ale, M. T., Mikkelsen, J. D. and Meyer, A. S. (2011). Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Marine drugs*, 9 (10), pp. 2106-2130.
- Altman, S. A., Randers, L. and Rao, G. (1993). Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnology progress*, 9 (6), pp. 671-674.
- Bafna, A. and Mishra, S. (2009). Antioxidant and immunomodulatory activity of the alkaloidal fraction of *Cissampelos pareira* Linn. *Scientia Pharmaceutica*, 78 (1), pp. 21-32.
- Bilan, M. I., Grachev, A. A., Ustuzhanina, N. E., Shashkov, A. S., Nifantiev, N. E. and Usov, A. I. (2002). Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C. Ag. *Carbohydrate research*, 337 (8), pp. 719-730.
- Chow, L. W. C., Loo, T. Y. and Sham, J. S. T. (2001). Effects of a herbal compound containing bupleurum on human lymphocytes. *Hong Kong Medical Journal*, 7 (4), pp. 608.
- Cong, Q., Chen, H., Liao, W., Xiao, F., Wang, P., Qin, Y., Dong, Q. and Ding, K. (2015). Structural characterization and effect on anti-angiogenic activity of a fucoidan from *Sargassum fusiforme*. *Carbohydrate Polymers*, 136, pp. 899-907.
- Darwish, I. A. (2006). Immunoassay methods and their applications in pharmaceutical analysis: basic methodology and recent advances. *International journal of biomedical science: IJBS*, 2 (3), p. 217.
- Dische, Z. and Shettles, L. B. (1948). A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. *Journal of Biological Chemistry*, 175 (2), pp. 595-603.
- Duarte, M. E., Cardoso, M. A., Nosedá, M. D. and Cerezo, A. S. (2001). Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydrate Research*, 333 (4), pp. 281-293.
- Fitton, J. H. (2011). Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. *Marine drugs*, 9 (10), pp. 1731-1760.
- García-Ríos V., Ríos-Leal E., Robledo D. and Freile-Pelegrin Y. 2012. Polysaccharides composition from tropical brown seaweeds, *Phycological research*, 60 (4), pp. 305-315.
- Hahn, T., Lang, S., Ulber, R. and Muffler, K. (2012). Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. *Process biochemistry*, 47 (12), pp. 1691-1698.
- Kawamoto, H., Miki, Y., Kimura, T., Tanaka, K., Nakagawa, T., Kawamukai, M. and Matsuda, H. (2006). Effects of fucoidan from Mozuku on human stomach cell lines. *Food science and technology research*, 12 (3), pp. 218-222.
- Kim, W. J., Kim, S. M., Kim, H. G., Oh, H. R., Lee, K. B., Lee, Y. K. and Park, Y. I. (2007). Purification and anticoagulant activity of a fucoidan from Korean *Undaria pinnatifida* sporophyll. *Algae*, 22 (3), pp. 247-252.
- Lakmal, H. C., Lee, J. H. and Jeon, Y. J. (2014). Enzyme-assisted extraction of a marine algal polysaccharide, fucoidan and bioactivities. *Polysaccharides: Bioactivity and biotechnology*, pp. 1-11.
- Li, B., Lu, F., Wei, X. and Zhao, R. (2008). Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules*, 13 (8), pp.1671-1695.
- Liu, M., Liu, Y., Cao, M.J., Chen, Q., Sun, L. and Chen, H. (2017). Antibacterial activity and mechanisms of depolymerized fucoidans isolated from *Laminaria japonica*. *Carbohydrate polymers*, 172, pp. 294-305.
- Luo, D., Zhang, Q., Wang, H., Cui, Y., Sun, Z., Yang, J. and Wang, X. (2009). Fucoidan protects against dopaminergic neuron death in vivo and in vitro. *European Journal of Pharmacology*, 617 (1-3), pp. 33-40.
- Luyt, C.E. Anne, M.P., Benoit H.T.N., Sylvia C.J., Jean, G. and Jean, B.M. (2003). Low-molecular-weight fucoidan promotes therapeutic revascularization in a rat model of critical hindlimb ischemia. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 305 (1), pp. 24-30.
- Mak, W.W.F (2012), Extraction, Characterization and Antioxidant Activity of Fucoidan from New Zealand *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, Master thesis, Auckland, New Zealand.
- Marudhupandi, T., Kumar, T. A., Senthil, S. L. and Devi, K. N. (2014). In vitro antioxidant

- properties of fucoidan fractions from *Sargassum tenerrimum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 17 (3), p. 402.
- McNeil, S. E. (2013). *Handbook of immunological properties of engineered nanomaterials* (Vol. 1). World Scientific.
- Nishino T., Nagumo, T., Kiyohara, H. and Yamada H. (1991), Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*, *Carbohydrate research*, 211 (1), pp. 77-90.
- Rodríguez-Jasso, R. M., Mussatto, S. I., Pastrana, L., Aguilar, C. N. and Teixeira, J. A. (2013). Extraction of sulfated polysaccharides by autohydrolysis of brown seaweed. In *Journal of Applied phycology*, 5 (1), pp. 31-39.
- Synytsya, A., Kim, W. J., Kim, S. M., Pohl, R., Synytsya, A., Kvasnička, F., ... and Park, Y. I. (2010). Structure and antitumour activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*. *Carbohydrate Polymers*, 81 (1), pp. 41-48.
- Wilasrusmee, C., Kittur, S., Siddiqui, J., Bruch, D., Wilasrusmee, S. and Kittur, D. S. (2002). In vitro immunomodulatory effects of ten commonly used herbs on murine lymphocytes. *The Journal of Alternative & Complementary Medicine*, 8 (4), pp. 467-475.
- Yang, C., Chung, D., Shin, I. S., Lee, H., Kim, J., Lee, Y. and You, S. (2008). Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *International journal of biological macromolecules*, 43 (5), pp. 433-437.
- Yue, G. G., Chan, B. C., Hon, P. M., Kennelly, E. J., Yeung, S. K., Cassileth, B. R., ... and Lau, C. B. (2010). Immunostimulatory activities of polysaccharide extract isolated from *Curcuma longa*. *International journal of biological macromolecules*, 47 (3), pp. 342-347.