



Original Article

# Structural Characteristics and Cytotoxic Activity of Polysaccharide Extracted from Green Seaweed *Caulerpa torta*

Quach Thi Minh Thu, Dang Vu Luong, Do Thi Thanh Xuan, Thanh Thi Thu Thuy\*

*Institute of Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology,  
18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*

Received 29 October 2021

Revised 07 April 2022; Accepted 19 April 2022

**Abstract:** In this work, hot water extraction was applied to isolate a polysaccharide from green seaweed *Caulerpa torta*, the extraction yield was 3.4% of dried seaweed weight. The structural characteristics and cytotoxic effects on three human cancer cell lines of the polysaccharide were investigated. The results showed that the polysaccharide consisted of galactose, glucose, xylose and mannose in a molar ratio of 1.00: 0.74: 0.21: 0.0.21, with a molecular weight of 107 kDa. In addition, it contained sulfate groups, which is approximately 15.34%w. The polysaccharide showed a significant cytotoxic activity against thyroid cancer - 8505C (IC<sub>50</sub> 55.55±1.84 µg/ml), colon cancer - HT-29 (IC<sub>50</sub> 57.26±2.06 µg/ml) and cervical cancer - Hela (IC<sub>50</sub> 54.79 ±3.22 µg/ml).

**Keywords:** Polysaccharide, green seaweed, *Caulerpa torta*, structural characteristics, cytotoxic activity.

\* Corresponding author.

E-mail address: [thuyttt@ich.vast.vn](mailto:thuyttt@ich.vast.vn)

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5369>

# Đặc trưng cấu trúc và hoạt tính gây độc tế bào của polysaccharide chiết tách từ rong lục *Caulerpa torta*

Quách Thị Minh Thu, Đặng Vũ Lương,  
Đỗ Thị Thanh Xuân, Thành Thị Thu Thủy\*

Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,  
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 29 tháng 10 năm 2021

Chỉnh sửa ngày 19 tháng 4 năm 2022; Chấp nhận đăng ngày 19 tháng 4 năm 2022

**Tóm tắt:** Trong bài báo này, chúng tôi đã chiết tách được polysaccharide từ rong lục *Caulerpa torta* với hiệu suất chiết tách là 3,4% trọng lượng rong khô. Đặc điểm cấu trúc và hoạt tính gây độc tế bào của polysaccharide này cũng đã được nghiên cứu. Kết quả chỉ ra rằng polysaccharide từ rong lục *Caulerpa* nghiên cứu có khối lượng phân tử là 107 kDa, phân tử polysaccharide được tạo thành từ các thành phần đường galactose, glucose, xylose và mannose với tỉ lệ 1.00: 0.74: 0.21: 0.21 tương ứng, và nhóm sulfate chiếm 15.34%. Kết quả thử hoạt tính sinh học cho thấy, mẫu polysaccharide nghiên cứu đã thể hiện khả năng gây độc tế bào trên cả 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm là ung thư tuyến giáp - 8505C (IC<sub>50</sub> 55.55±1.84 µg/ml), ung thư đại trực tràng - HT-29 (IC<sub>50</sub> 57.26±2.06 µg/ml) và ung thư cổ tử cung - Hela (IC<sub>50</sub> 54.79 ±3.22 µg/ml).

**Từ khóa:** Polysaccharide, rong xanh, *Caulerpa torta*, đặc điểm cấu trúc, hoạt tính gây độc tế bào.

## 1. Mở đầu

Rong lục chi *Caulerpa* hay còn gọi là rong guột hay rong cầu lục chùm, phân bố rộng rãi ở các vùng biển nhiệt đới, chúng có thể sống trong nhiều vùng biển khác nhau như vùng có nền đáy cứng chủ yếu là đá, san hô hay phân bố trên vùng có nền đáy mềm là bùn cát, thuần cát [1]. Rong lục chi *Caulerpa* là nhóm loài có sản lượng lớn và có giá trị đặc biệt đối với sự phát triển kinh tế địa phương, chúng có giá trị dinh dưỡng cao, có các vitamin A, C và các khoáng chất, vi lượng cần thiết cho cơ thể con người [2-4]. Theo các kết quả nghiên cứu đã công bố trên thế giới thì sulfate polysaccharide từ rong lục chi *Caulerpa* có nhiều hoạt tính tốt như chống oxi hóa, kháng khuẩn, chống đông tụ máu, hạ mỡ máu, chống ung thư, kháng nấm,... [3-4, 15].

Các nghiên cứu về thành phần và cấu trúc hóa học của polysaccharide từ rong lục chi *Caulerpa* cho thấy, chúng có thành phần đường chính là galactose và các đường xylose, glucose, rhamose, arabinose, fucose, mannose với hàm lượng ít hơn và nhóm sulfate tạo thành cấu trúc chuỗi qua các liên kết glycoside. Thành phần và cấu trúc hóa học của các sulfate polysaccharide có thể khác nhau phụ thuộc vào loài rong, phương pháp chiết tách, mùa thu hoạch và điều kiện sinh trưởng [3-6].

Ở Việt Nam, cấu trúc và hoạt tính sinh học của polysaccharide từ các chi rong lục khác như *Ulva*, *Enteromorpha* hay *Chetomorpha* đã được chúng tôi nghiên cứu [7-10]. Tuy nhiên, đặc điểm cấu trúc và hoạt tính sinh học của các polysaccharide từ các loài rong lục thuộc chi *Caulerpa* chưa được nghiên cứu. Với mục đích đóng góp cho việc nghiên cứu về các loài rong lục chứa polysaccharide ở biển Việt Nam, bài báo này công bố các kết quả nghiên cứu về phân lập, thành phần hóa học, đặc trưng cấu trúc và hoạt tính gây độc tế bào của

\* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: thuyttt@ich.vast.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5369>

polysaccharide chiết tách được từ rong lục *Caulerpa torta* thu hái ở biển Nha Trang.

## 2. Thực nghiệm

### 2.1. Thu thập, xử lý mẫu rong và chiết tách polysaccharide từ rong

Thu thập và xử lý mẫu rong: Rong lục *Caulerpa torta* được thu ở Nha Trang tháng 3/2019 và định danh bởi TS. Võ Thành Trung (Viện nghiên cứu và ứng dụng công nghệ Nha Trang). Mẫu rong biển sau khi thu thập về được rửa sạch rác, cát và mùn bằng nước biển, rửa tiếp dưới vòi nước chảy rồi đem phơi khô trong bóng râm, sau đó nghiền mịn thành bột, bảo quản ở nơi mát tránh ánh sáng.

Phương pháp chiết tách [4]: 30 g bột rong khô được xử lý với hỗn hợp MeOH - CHCl<sub>3</sub> để loại màu và chất béo, sau đó được chiết với nước ở nhiệt độ 90 °C trong 3 h, lọc lấy dung dịch. Bã rong được chiết tiếp lần 2 ở điều kiện như trên. Gộp dịch chiết trong 2 lần và cô quay để giảm thể tích, thêm cồn vào để tủa polysaccharide (Vcồn: Vdịch = 4:1). Ly tâm lấy tủa, rửa tủa nhiều lần bằng acetone thu được 1,02 g polysaccharide (Kí hiệu P<sub>CT</sub>), hiệu suất chiết tách là 3,4% theo khối lượng rong khô. Mẫu P<sub>CT</sub> được loại protein theo phương pháp Sevag [11]: Hòa tan hoàn toàn polysaccharide trong nước cất, thêm hỗn hợp chloroform: butanol (tỉ lệ 5:1), lắc mạnh, để lắng, loại bỏ kết tủa. Thêm cồn vào dung dịch để kết tủa polysaccharide sạch (Vcồn: Vdịch = 4:1).

### 2.2. Phân tích thành phần hóa học

Thành phần đường trung tính: xác định theo phương pháp của Billan và CS [12].

Hàm lượng sulfate: xác định bằng phương pháp đo độ đục [13].

### 2.3. Sắc ký thẩm thấu gel GPC

GPC đo trên máy HPLC Agilent 1100 với pha động là NaNO<sub>3</sub> 0,1N, sử dụng detector RI pullulan làm chất chuẩn.

### 2.4. Phổ IR

Phổ hồng ngoại được đo trên máy FT-IR Affinity-1S SHIMADZU.

### 2.5. Phổ NMR

Phổ NMR đo trên máy Bruker AVANCE III 500MHz với dung môi D<sub>2</sub>O ở nhiệt độ 70 °C, sử dụng DSS làm chất chuẩn nội với kỹ thuật đo khử tín hiệu của nước.

### 2.6. Hoạt tính gây độc tế bào

Phép thử này được thực hiện theo phương pháp của Skekan và CS [14]. Phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ Ức chế} = 100\% - \frac{OD(\text{chất thử}) - OD(\text{ngày 0})}{OD(\text{đối chứng âm}) - OD(\text{ngày 0})}$$

% Ức chế tế bào sống = 100% - % sống sót

Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine được sử dụng là chất đối chứng dương và DMSO được sử dụng như đối chứng âm. Giá trị IC<sub>50</sub> (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve.

## 3. Kết quả và thảo luận

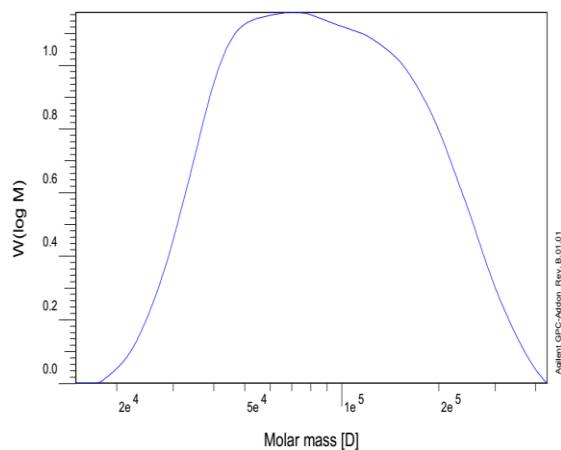
Kết quả phân tích thành phần hóa học trên bảng 1 cho thấy P<sub>CT</sub> được tạo thành từ 2 thành phần đường chính là galactose và glucose cùng với các đường mannose, xylose, lượng nhỏ arabinose, rhamnose và nhóm sulfate. Vậy P<sub>CT</sub> là một polysaccharide dạng sulfate galactan. So sánh với các nghiên cứu trên thế giới cho thấy, polysaccharide chiết tách từ loài rong lục *Caulerpa torta* ở vùng biển Nha Trang của Việt nam có hàm lượng sulfate ở mức trung bình so với polysaccharide chiết tách từ các loài rong *Caulerpa* ở những vùng biển khác (12,86% - 26,72%) [3-6] và tương tự với các polysaccharide chiết tách từ các loài rong lục khác mà chúng tôi đã nghiên cứu (13%-19%) [7-10].

Bảng 1. Thành phần hóa học của P<sub>CT</sub>

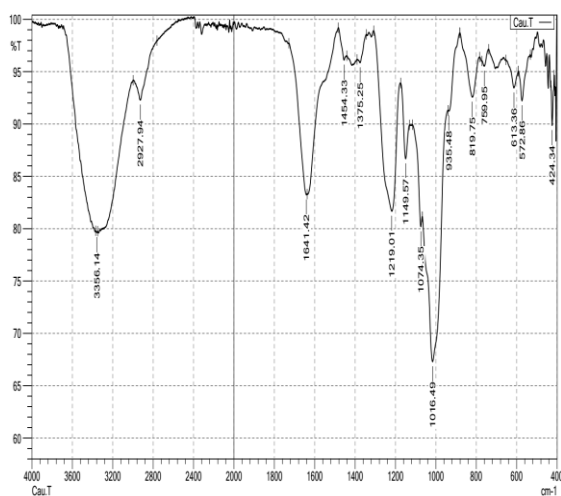
Thành phần monosaccharide (% mol)						
Gal	Glu	Xyl	Man	Rham	Ara	Sulfate
1,00	0,74	0,21	0,21	0,02	0,01	15,34

Một trong các yếu tố cấu trúc đầu tiên cần phải kiểm tra khi nghiên cứu các polyme tự nhiên là trọng lượng phân tử trung bình  $M_w$  và mức độ phân tán trọng lượng phân tử  $M_w/M_n$ .

Kết quả đo GPC (Hình 1) cho thấy, cũng giống với các polysaccharide chiết tách từ các loài rong lục khác mà chúng tôi đã nghiên cứu trước [7-10], polysaccharide chiết tách từ rong lục *Caulerpa torta* có độ đa phân tán đặc trưng cho phân tử polysaccharide tự nhiên, thể hiện qua sự phân bố trọng lượng phân tử  $M_w/M_n$  là 1,54; trọng lượng phân tử trung bình  $M_w$  là 107.410 g/mol. Như vậy,  $M_w$  của polysaccharide từ rong lục *Caulerpa torta* Việt Nam có giá trị tương đương với các công bố trước (80.000 g/mol - 216.400 g/mol) [5, 6].

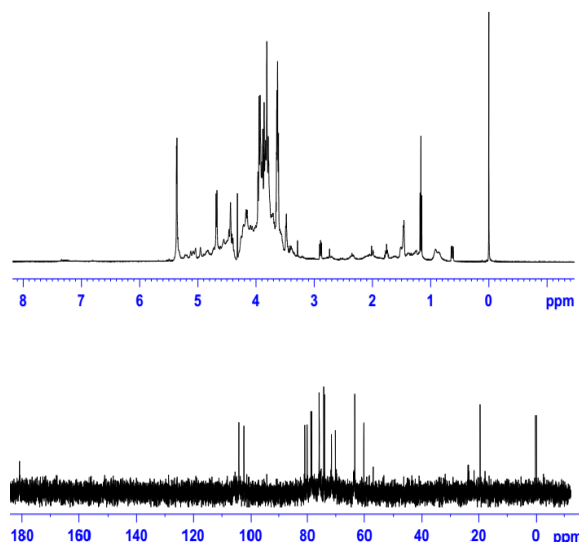


Hình 1. Sắc ký đồ GPC của PCT.



Hình 2. Phổ IR của PCT.

Trên phổ FT-IR của PCT (Hình 2) có những dải hấp thụ đặc trưng cho phân tử sulfate polysaccharide như: tín hiệu ở  $1219 \text{ cm}^{-1}$  và  $819 \text{ cm}^{-1}$  được gán cho dao động hóa trị của liên kết C-O-S có nhóm sulfate ở vị trí equatorial của vòng pyranose. Ngoài ra còn có tín hiệu tại vùng  $759 \text{ cm}^{-1}$  là dao động đặc trưng cho liên kết C-O-S của nhóm sulfate ở vị trí axial. Dải hấp thụ có cường độ mạnh ở  $3356 \text{ cm}^{-1}$ , là do dao động của liên kết OH trong phân tử. Thêm nữa, dải hấp thụ ở  $2927 \text{ cm}^{-1}$  ứng với dao động hóa trị của liên kết C-H của đường, còn tín hiệu dao động với cường độ mạnh ở  $1016 \text{ cm}^{-1}$  được gán cho dao động của nhóm CO có liên kết với OH.



Hình 3. Phổ  $^1\text{H}$  a) và  $^{13}\text{C-NMR}$  b) của PCT.

Phổ  $^1\text{H-NMR}$  và  $^{13}\text{C-NMR}$  của phân tử galactan chiết tách từ loài rong lục *Caulerpa torta* là đặc trưng cho dạng phổ của polysaccharide. Trên phổ  $^1\text{H-NMR}$  có các tín hiệu của proton anomer tại khoảng 4,5-5,5 ppm, proton vòng pyranose và furanose nằm trong vùng 3,2-4,4 ppm. Vùng anomeric của phổ  $^1\text{H-NMR}$  có 2 tín hiệu với cường độ lớn tại 4,6 ppm và 5,3 ppm có thể gán cho 2 đường có hàm lượng cao nhất là galactose và glucose (Bảng 1). Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  cho thấy sự có mặt của các tín hiệu của carbon anomer ở khoảng 100ppm-110 ppm cụ thể là 2 tín hiệu ở 102,3 ppm và 104,1 ppm tương ứng với 2 đường có hàm lượng lớn. Điều này phù hợp với việc phân tích phổ  $^1\text{H-NMR}$  ở

trên. Các tín hiệu ở vùng có độ dịch chuyển hóa học 65 ppm - 82 ppm đặc trưng cho các carbon trong vòng pyranose và furanose. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  không có tín hiệu tại khoảng 6 - 7 ppm, chứng tỏ trong mẫu không có mặt protein.

Như vậy, sulfate polysaccharide từ loài rong lục chi *Caulerpa* này được gọi là sulfate galacotan, khác với các sulfate polysaccharide từ rong lục chi *Ulva* có dạng ulvan và *Chaetomorpha* là sulfate arabinogalactan [7-10]

Các nghiên cứu trên thế giới về hoạt tính sinh học của sulfate polysaccharide chiết tách từ loài rong lục thuộc chi *Caulerpa* thường có hoạt tính chống oxy hóa và chống đông tụ rất tốt [1-4, 15], nhưng chưa thấy có công bố nào về khả năng gây độc tế bào của chúng. Do vậy, chúng tôi tiến hành đánh giá hoạt tính gây độc tế bào trên 3 dòng tế bào ung thư là ung thư cổ tử cung (Hela), ung thư đại tràng (HT-29) và ung thư tuyến giáp (8505C) của mẫu P<sub>CT</sub> chiết tách được. Kết quả thu được ở bảng 2 cho thấy, mẫu nghiên cứu đã thể hiện hoạt tính trên cả 3 dòng tế bào ung thư, khi tăng nồng độ mẫu thử lên thì phần trăm (%) ức chế tế bào sống tăng và đạt 100% khi nồng độ P<sub>CT</sub> ở 100  $\mu\text{g/ml}$ . Kết quả này cho thấy, polysaccharide chiết tách từ loài rong lục chi *Caulerpa* có hoạt tính gây độc tế bào thấp hơn các polysaccharide từ những loài rong lục chi khác (như chi *Ulva*) mà chúng tôi đã nghiên cứu trước đó [8, 10].

Bảng 2. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào

Mẫu	Nồng độ ( $\mu\text{g/ml}$ )	% ức chế tế bào sống		
		Hela	HT-29	8505C
P <sub>CT</sub>	100	107,51	95,55	97,98
	20	13,77	13,97	14,80
	4	1,56	2,03	-0,38
	0.8	0,04	-1,51	-3,06
	IC <sub>50</sub>	54,79 $\pm$ 3,22	57,26 $\pm$ 2,06	55,55 $\pm$ 1,84
Ellipticine	100	104,69	98,09	100,53
	20	75,13	71,50	85,89
	4	48,61	50,89	51,48
	0.8	20,15	23,84	24,22
	IC <sub>50</sub>	0,46 $\pm$ 0,05	0,44 $\pm$ 0,04	0,35 $\pm$ 0,04

#### 4. Kết luận

Sulfate polysaccharide phân lập được từ loài rong lục *Caulerpa torta* thu thập ở biển Nha Trang có dạng sulfate galactan, nhóm sulfate nằm ở cả vị trí equatorial và axial trong vòng pyranose. Phân tử polysaccharide này đã thể hiện hoạt tính gây độc trên các dòng tế bào thử nghiệm với giá trị IC<sub>50</sub> từ 54,79 - 57,26  $\mu\text{g/ml}$ . Các kết quả này có ý nghĩa khoa học và có khả năng áp dụng thực tiễn làm thực phẩm chức năng.

#### Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam trong đề tài nghiên cứu cơ sở mã số VHH.2021.13.

#### Tài liệu tham khảo

- [1] T. D. Toai, C. V. Minh, Potentiality of Vietnam Algae, Science and Technics Publishing House, 2004 (in Vietnamese).
- [2] D. D. Hong, H. M. Hien, P. N. Son, Use of Vietnamese Seaweed for Functional Food, Medicine and Biofertilizer, Journal Applied Phycology, Vol. 19, No. 6, 2007, pp. 817-826.
- [3] L. Wang, X. Wang, H. Wu, R. Liu, Overview on Biological Activities and Molecular Characteristics of Sulfated Polysaccharides from Marine Green Algae in Recent Years, Mar, Drugs, Vol. 12, 2014, pp. 4984-5020.
- [4] H. Tian, H. Liu, W. Song, L. Zhu, X. Yin, Polysaccharide from *Caulerpa Lentillifera*: Extraction Optimization with Response Surface Methodology, Structure and Antioxidant Activities, Natural Product Research, 2019, <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1700507>.
- [5] M. S. S. P. Costa, J. A. Lima, E. H. C. Farias, Biological Activities of Sulfated Polysaccharides from Tropical Seaweeds, Biomed, Pharmacother, Vol. 64, 2010, pp. 21-28.
- [6] K. Chattopadhyay, U. Adhikari, P. Lerouge, B. Ray, Polysaccharides from *Caulerpa racemosa*: Purification and Structural Features, Carbohydrate Polymers, Vol. 68, No. 3, 2007, pp. 407-415.
- [7] Q. T. M. Thu, T. H. Bang, N. T. Nu, D. V. Luong, B. M. Ly, T. T. T. Van, T. T. T. Thuy, Structural Determination of Ulvan from Green Seaweed *Ulva*

- reticulata Collected at Central Coast of Vietnam, Chemistry Letters, Vol. 44, No. 6, 2015, pp. 788-790.
- [8] T. T. T. Thuy, Q. T. M. Thu, N. T. Nu, D. V. Luong, B. M. Ly, T. T. T. Van, Structure and Cytotoxic Activity of Ulvan Extracted from Green Seaweed *Ulva lactuca*, International Journal of Biological Macromolecules, Vol. 93, 2016, pp. 695-703.
- [9] Q. T. M. Thu, N. H. Minh, D. T. T. Xuan, D. V. Luong, T. T. T. Van, N. T. Nu, T. T. T. Thuy, Sulfated Polysaccharides Extracted from Green Seaweed *Cheatomorpha* genus: The Structural Characteristics and Anticoagulant Activity, Vietnam Journal of Chemistry, Vol. 57, No. 6E1, 2, 2019, pp. 117-120 (in Vietnamese).
- [10] Q. T. M. Thu, D. V. Luong, D. T. T. Xuan, N. Q. Tam, N. V. Quang, T. T. T. Van, T. T. T. Thuy, Structural Characteristics of Polysaccharide Extracted from Green Seaweed *Enteromorpha intestinalis*, Vietnam Journal of Chemistry, Vol. 57, No. 6E1, 2, 2019, pp. 113-116 (in Vietnamese).
- [11] A. M. Staub, Removal of Protein-Sevag Method, Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. 5, 1965, pp. 5-6.
- [12] M. I. Bilan, A. A. Grachev, N. E. Ustuzhanina, A Highly Regular Fraction of a Fucoidan from the Brown Seaweed *Fucus Distichus* L, Carbohydr Res., Vol. 339, 2004, pp. 511-517.
- [13] K. S. Dodgson, Determination of Inorganic Sulphate in Studies on the Enzymic and Non-enzymic Hydrolysis of Carbohydrate and Other Sulphate Esters, Biochem J., Vol. 78, 1961, pp. 312-319.
- [14] P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M. R. Boyd, New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening, Journal of the National Cancer Institute, Vol. 82, No. 13, 1990, pp. 1107-1112.
- [15] J. A. G. Rodrigues, E. S. O. Vanderlei, É. F. Bessa, Francisco de Araújo Magalhães, Regina Célia Monteiro de Paula, Vilma Lima and Norma Maria Barros Benevides, Anticoagulant Activity of a Sulfated Polysaccharide Isolated from the Green Seaweed *Caulerpa cupressoides*, Brazilian Archives of Biology and Technology, Vol. 54, No. 4, 2011, pp. 691-700.