

ĐẶC ĐIỂM CẤU TRÚC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA POLYSACCHARIDE KHÔNG TẠO GEL CHIẾT TỪ MỘT SỐ LOÀI RONG AGAROPHYTE VIỆT NAM

¹Trần Thị Thanh Vân, ¹Bùi Minh Lý, ¹Phạm Đức Thịnh, ²Lê Tấn Sĩ
¹*Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang*
²*Trường Trung học Lý Tự Trọng Nha Trang*

Tóm tắt Polysaccharide không tạo gel chiết từ một số loài rong có agar đã được nghiên cứu bằng phương pháp hóa học và phương pháp quang phổ. Chúng là hỗn hợp của hai loại disaccharide agarobiose (4-O-β-D-galactopyrannosyl-3,6 anhydro-L-galactose) và Agarane (4-O-β-D-galactopyrannosyl-L-galactose). Kết quả nghiên cứu cho thấy đây là các polysaccharide dạng galactan sulfat hóa phức tạp trong đó các nhóm thế có mặt ở các vị trí liên kết khác nhau không theo qui luật, gốc D-galactopyrannosyl bị sulfat hóa tại vị trí DG2, DG4 và gốc L-galactopyrannosyl bị sulfat hóa tại các vị trí LG2, LG3 và LG6. Tất cả các mẫu polysaccharide đã được tiến hành thử hoạt tính kháng ung thư và vi sinh vật kiểm định. Kết quả cho thấy trong số 6 mẫu thì 3 mẫu chiết từ các loài rong *G. tenuistipitata* sinh trưởng tại miền bắc, *G. tenuistipitata* sinh trưởng tại miền trung và *Gracilariopsis bailinea* có hoạt tính chống ung thư gan và ung thư màng tim trong khi tất cả các mẫu đều có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định.

STRUCTURAL CHARACTERISTICS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF NON GELLING POLYSACCHARIDES EXTRACTED FROM SOME AGAROPHYTES IN VIETNAM

¹Tran Thi Thanh Van, ¹Bui Minh Ly, ¹Pham Duc Thinh, ²Le Tan Si
¹*Institute of Technological Research and Application, 02 Hung Vuong St.,
Nhatrang city, Vietnam*
²*Ly Tu Trong High School, Nha Trang city*

Abstract Non gelling polysaccharides extracted from some red seaweeds (Agarophytes) have been examined by chemical and spectroscopic techniques. These polysaccharides consist of repeating units of both 4-O-β-D-galactopyrannosyl-3.6 anhydro-L-galactose (agarobiose) and 4-O-β-D-galactopyrannosyl-L-galactose (Agarane). Glycosyl link analysis of polysaccharides revealed a complex sulfated galactan but the substitution and linkage pattern were not obvious, the 3-link D-galactopyranose - residue sulfated was at 2,4 positions, while the 4-link L-galactopyranose residue sulfated was at 2, 3, 6 positions. Other minor substitution included 6-O-methyl and 2-O-methyl. Polysaccharides were tested for anticancer and antibacterial activity. The tested results

show that among 6 samples, there are only three samples extracted from *G. tenuistipitata* growing in the north of Vietnam, *G. tenuistipitata* growing in the central of Viet Nam and *Gracilariopsis bailine* have the activity against some types of cancer such as liver and bladder cancers. Polysaccharides extracted from six samples in this study have the antibacterial activity.

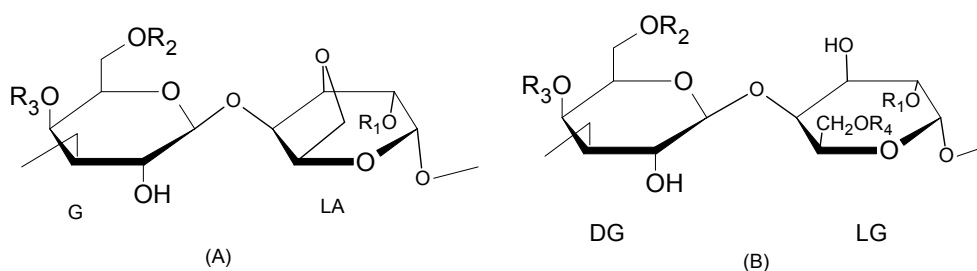
I. MỞ ĐẦU

Cho đến những năm 90 của thế kỷ trước, polysaccharide dạng agar chiết từ các loài rong *Agarophyte* chỉ được biết đến như là chất có khả năng tạo gel và có cấu trúc bao gồm agarose và agarpectin (trong đó có porphyran). Những ứng dụng của agar trong các lĩnh vực khoa học và sản xuất chủ yếu dựa vào khả năng tạo gel của chúng. Những năm gần đây nhờ áp dụng các phương pháp nghiên cứu cấu trúc hiện đại như sắc ký khí, khối phổ, hồng ngoại, cộng hưởng từ hạt nhân kết hợp với các phương pháp biến đổi hóa học mà cấu trúc tinh vi của polysaccharide chiết từ các loài rong *Agarophyte* đã được phát hiện, nhờ đó, các nhà khoa học (Lahay, 2001; Usov, 2001) đã xác định được thêm các loại polysaccharide dạng agar không có khả năng tạo gel là agaran và agaran sulfat. Tuy nhiên các loại polysaccharide này còn ít được quan tâm nghiên cứu.

Các nghiên cứu về hoạt tính sinh học của polysaccharide dạng agar mới được nghiên cứu trong những năm gần đây nhưng số các công trình nghiên cứu không nhiều, đối tượng nghiên cứu tập trung chủ yếu vào polysaccharide chiết từ các loài rong mọc tự nhiên tại các vùng biển nước ấm như vùng biển Ấn Độ, Trung Quốc và Nam Mỹ (Kuda và *cs.*, 2005; Maria và *cs.*, 2004; Zang và *cs.*, 2003; Zhao và *cs.*, 2006). Năm 2003, lần đầu tiên xuất hiện các công trình nghiên cứu về hoạt tính chống oxy hóa và kháng virus của agarpectin và agaran sulfat của các nhà khoa học Trung Quốc và Nhật Bản (Zang và *cs.*, 2003; Zhu và *cs.*, 2003). Các tác giả đã xác định được các polysaccharide chiết từ chi rong đỏ *Porphyra* có cấu trúc chủ yếu là porphyran và một lượng nhỏ agarose methyl hóa ở vị trí DG6 và LA2 đều có hoạt tính chống oxy hóa. Hoạt tính chống virus HSV loại I và II của polysaccharide dạng agaran và agaran sulfat chiết từ các loài rong agarophyte (*Acanthophora spicifera* và *Gracilaria corticata*) cũng đã được nghiên cứu (Maria và *cs.*, 2004; Mazumder và *cs.*, 2002).

Vùng biển nước ta có nguồn tài nguyên rong biển có agar (*Agarophytes*) hết sức phong phú. Đã có những công trình công bố về phân loại, nuôi trồng, chế biến agar từ các loài rong này, tuy nhiên chưa có công trình nghiên cứu nào về hoạt tính sinh học cũng như cấu trúc của các polysaccharide không có khả năng tạo gel chiết từ các loài rong này được công bố. Để định hướng cho việc sử dụng và chế biến các loài rong này, chúng tôi nghiên cứu cấu trúc và hoạt

tính sinh học của polysaccharide không có khả năng tạo gel chiết từ một số loài rong *Agarophyte* Việt Nam.



$R_1, R_2, R_3, R_4 = H, \text{ hoặc } CH_3, \text{ hoặc } SO_4$; A-Agarobiose, B- Agarane

Hình 1. Một số dạng cấu trúc của polysaccharide dạng agar

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu rong thuộc loài *Gracilaria* và *Gelidiella* được thu thập tại ven biển Hải Phòng, Huế, Quảng Ngãi, Phú Yên và Kiên Giang và được lưu lại dưới dạng tiêu bản ép khô. Các tiêu bản này hiện đang được lưu trữ tại Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ, Nha Trang. Địa điểm, thời gian lấy mẫu và ký hiệu mẫu lưu được trình bày trên bảng 1.

2. Phương pháp nghiên cứu

Chiết polysaccharide: 40 g rong khô đã cắt nhỏ, được xử lý với hỗn hợp MeOH- $CHCl_3$ để loại màu và chất béo và sau đó được chiết với dung dịch HCl 0,1 % ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ, thu được dung dịch polysaccharide, lọc lấy dung dịch. Làm sạch polysaccharide bằng thẩm tách qua màng lọc rây phân tử, rửa bằng ethanol và sấy khô chân không thu được polysaccharide dạng bột.

Xác định thành phần monosaccharide bằng phương pháp của Stevenson và Furneaux (1991) các mẫu alditol axetate của các mẫu đường được phân tích trên máy GC-FID.

Phân tích liên kết bằng phương pháp methyl hóa theo qui trình Aspinall (1982) các mẫu alditol axetate của các mẫu đường sau khi methyl hóa được phân tích trên máy GC-MS. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) của polysaccharide được đo trên máy Bruker 500 MHz trong dung môi D_2O ở nhiệt độ $80^\circ C$.

Bảng 1. Địa điểm, thời gian lấy mẫu và kí hiệu mẫu

Stt	Tên loài rong	Địa điểm lấy mẫu	Thời gian lấy mẫu	Ký hiệu mẫu lưu	Ký hiệu mẫu polysaccharide
1	<i>Gracilaria tenuistipitata</i>	Hải Phòng	4-2003	IOH 9362	1S
2	<i>Gracilaria tenuistipitata</i>	Huế	6-2003	IMS 981120	5S
3	<i>Gracilariopsis bailinea</i>	Phú Yên	6-2003	ION 00601	8S
4	<i>Gelidiella acerosa</i>	Quảng Ngãi	6-2003	IMS 97001	9S
5	<i>Gracilaria fisheri</i>	Kiên Giang	3-2003	IMS202110	10S
6	<i>Gracilaria firma</i>	Kiên Giang	3-2003	IMS 203290	11S

Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào được tiến hành với các dòng tế bào ung thư người như Hep-G2 (ung thư gan), RD (ung thư màng tim), ung thư phổi (LU) theo phương pháp đang được tiến hành tại Viện Nghiên cứu Ung thư Quốc gia Mỹ (NCI). Thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định được tiến hành trên phiên vi lượng 96 giếng theo phương pháp của Vandan và Vlietink (1991).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tên gọi và viết tắt của các gốc đường trong polysaccharide theo Knutsen và *cs.* (1994) như sau: DG là (1-3) β -D galactopyranose, LG là (1-4) α -L galactopyranose, LA là α -L 3,6 anhydrogalactopyranoza. Các monome có các nhóm OH được thay thế bởi nhóm methyl (M) hoặc nhóm sulfat (S) được viết tắt bằng cách viết thêm số chỉ vị trí của nhóm thế. Ví dụ G4S có nghĩa là 4 sulfat galactose và G6M là 6 methyl-galactose.

1. Phân tích thành phần monosaccharide

Từ kết quả dẫn ra ở bảng 2 cho thấy rằng thành phần chính của các mẫu polysaccharide là galactose, các dẫn xuất của chúng, 3,6 anhydrogalactose (LA) và sulfat, hàm lượng các thành phần trên thay đổi theo các loài rong. Ngoài ra còn có mặt một lượng nhỏ các loại đường khác như xylose, mannose và glucose.

Sự có mặt của galactose và 3,6 anhydrogalactose đã chứng tỏ rằng phân tử cơ bản của polysaccharides là disaccharide agarobiose (DG-LA) đã được methyl hóa và sulfat hóa. Tuy nhiên khi tính tỷ lệ mol (DG + DG6M) : (LA+LA2M), chúng tôi nhận được kết quả rất lý thú, đó là tất cả các mẫu

ngiên cứu đều có tỷ lệ số mol DG + DG6M lớn hơn rất nhiều so với số mol LA + LA2M. Từ đây, chúng tôi cho rằng trong các mẫu polysaccharide ngoài lượng chính galactose nằm trong các disaccharide agarobiose còn một lượng đáng kể galactose nằm trong các disaccharide dạng agaran và liên kết với các agarobiose qua liên kết glycoside (1-3).

Bảng 2: Hàm lượng và thành phần hóa học của polysaccharide

Ký hiệu mẫu	Hàm lượng polysaccharide không tạo gel (%)	Hàm lượng SO ₄ (%)	Thành phần monosaccharide trung tính						
			LA2M	LA	DG6M	DG	Xylose	Mannose	Glucose
1S	4,2	8,7	-	8,9	-	85,8	-	-	2,1
5S	6,3	8,3	-	13,5	-	86,9	-	-	-
8S	8,7	7,8	2,5	17,1	18,2	47,7	-	-	-
9S	6,9	13,7	4,9	14,1	15,7	60,5	3,9	1,6	-
10S	5,5	13,9	2,0	16,8	4,6	73,2	-	3,2	-
11S	7,3	7,7	-	5,3	4,0	80,0	2,0	6,0	1,8

2. Phân tích liên kết bằng phương pháp methyl hóa

Kết quả phân tích methyl hóa các mẫu polysaccharide ở bảng 3, cho thấy có 03 kiểu liên kết glycoside tồn tại trong chúng, là các liên kết 4-anhydrogalactopyranose (4-Angal), 3-galactopyranose (3-Gal), 4-galactopyranose (4-Gal). Trong đó các liên kết 3-Gal và 4-Angal thuộc về liên kết trong disaccharide agarobiose, liên kết 3-Gal và liên kết 4-Gal là liên kết của disaccharide agaran. Từ kết quả này chúng tôi tính toán và đưa ra tỷ lệ agarobiose/agaran trong các mẫu nghiên cứu là (1:4,0) với mẫu 1S, (1:2,5) với mẫu 5S, (1:1,5) với mẫu 8S, (1:1,36) với mẫu 9S, (1:1,33) với mẫu 10S, (1:4,6) với mẫu 11S và như vậy, tỷ lệ của 2 disaccharide này thay đổi tùy theo các polysaccharide chiết từ các loài rong khác nhau. Tuy nhiên trong thành phần của chúng luôn chứa các disaccharide agaran lớn hơn agarobiose và điều này giải thích tính chất không tạo gel của chúng.

Vị trí các nhóm sulfat trong các mẫu nghiên cứu chủ yếu là ở các vị trí DG4, LG6 và một lượng nhỏ sulfat ở các vị trí DG2, DG6 và LA2. Tất cả các mẫu polysaccharide cùng có hàm lượng DG4S lớn nhất và có giá trị từ 7,8 đến 17,2 %.

3. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

Cấu trúc của các polysaccharide rong biển rất phức tạp. Phổ ¹³C NMR của các polysaccharide không tạo gel chiết từ loài rong *Gracilaria firma* (Hình 2) thể hiện nhiều đỉnh trùng chập và chen lẫn nhau vì vậy việc phân tích phổ một

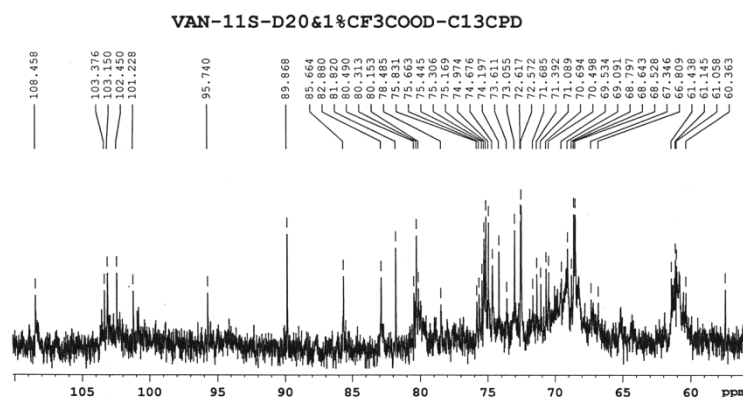
cách hoàn toàn chính xác là không thể thực hiện được. Phổ ^{13}C NMR của các mẫu nghiên cứu có độ dịch chuyển hóa học của cacbon anomer trong vùng (92-110 ppm) tách biệt rất rõ và không hề trùng chập với các cộng hưởng ở các vị trí còn lại (80-65 ppm) kết quả này tương tự công trình (Lahay và *cs.*, 1985; Miller và Blunt, 2005; Usov, 1998). Phân tích phổ dựa vào độ dịch chuyển hóa học của cacbon anomer.

Bảng 3. Thành phần đường trong phân tích methyl hóa

Thành phần đường	Monomer	Mẫu polysaccharide					
		1S	5S	8S	9S	10S	11S
4-Angal	LA	9,7	13,8	19,8	20,1	21,0	7,3
2,4-Angal	LA2S	-	-	-	1,0	1,0	1,0
3-Gal	DG	34,0	34,0	34,3	21,3	28,0	28,2
4-Gal	LG	39,3	35,2	30,0	28,9	28,0	38,7
3,4-Gal	DG4S	12,0	11,5	11,7	17,2	9,4	7,8
3,6-Gal	DG6S	1,0	1,0	1,0	3,0	4,0	3,0
4,6-Gal	LG6S	4,0	4,5	4,0	1,5	1,0	4,0
2,3,6-Gal	DG2S, DG6S	-	-	-			
2,4,6-Gal	LG2S, LG6S				3,0	5,0	2,0
Xylose		-	-	-	3,0	-	1,0
Mannose		-	-	-	1,0	2,5	4,0

Theo các công trình (Usov và *cs.* 1980; Usov và *cs.*, 1997) thì cặp tín hiệu trong vùng 103, 101 ppm và 102, 96 ppm thuộc về disaccharide 3DG-4LA, porphyran và 3DG4S-4LA và những tín hiệu này đều xuất hiện trên phổ ^{13}C NMR của tất cả các mẫu. Kết quả này khẳng định thêm rằng polysaccharide không tạo gel chiết từ các loài rong *agarophyte* bao gồm agaropectin và agaran. Cặp tín hiệu trong vùng 102 và 99 ppm tương ứng với sự có mặt của disaccharide agarobiose chỉ xuất hiện trên phổ của các mẫu 5S, 8S, 9S và 10S mặc dù kết quả phân tích thành phần monosaccharide đều xác định sự có mặt dimer này trong tất cả các mẫu nghiên cứu. Điều này có thể do hàm lượng monomer LA quá nhỏ không đủ lớn để có hiệu ứng cộng hưởng. Tín hiệu 67,5 ppm thuộc về monomer DG6S (Usov và *cs.*, 1980) chỉ xuất hiện trên phổ của các mẫu 9S và 10S chứng tỏ rằng các mẫu này có tồn tại monomer DG6S. Ngoài ra trên phổ NMR của mẫu 11S còn có 03 tín hiệu đặc biệt là 66,6 ppm; 70,6 ppm; 74,9 ppm. Theo Usov A.V. và *cs.* (Usov và *cs.* 1997) đây là các tín hiệu xác nhận sự có mặt của đường xylose trong mẫu nghiên cứu.

Như vậy kết quả thu được trên phổ ^{13}C NMR của các mẫu polysaccharide hoàn toàn phù hợp với kết quả phân tích thành phần và phân tích liên kết trừ một số mẫu do hàm lượng một số monomer quá nhỏ nên sự có mặt của chúng không được chứng minh qua phổ ^{13}C NMR.



Hình 2. Phổ ^{13}C NMR của polysaccharide không tạo gel chiết từ loài rong *Gracilaria firma*

4. Hoạt tính sinh học của polysaccharide

4.1. Hoạt tính gây độc các dòng tế bào ung thư người nuôi cấy *in vitro*

Hoạt tính gây độc tế bào của các mẫu polysaccharide được tiến hành thử trên 2 dòng tế bào ung thư là Hep-G2 và RD với các mẫu 1S, 5S và 8S và thử trên 3 dòng tế bào ung thư là Hep-G2, RD và LU với các mẫu 9S, 10S và 11S. Các kết quả thử nghiệm được trình bày trên bảng 4 và giá trị IC_{50} của các mẫu dương tính được đưa ra ở bảng 5. Kết quả cho thấy các mẫu 1S, 5S, 8S có hoạt tính kháng ung thư trên 2 dòng tế bào Hep-G2 và RD các mẫu còn lại 9S, 10S và 11S không có hoạt tính kháng ung thư, trong đó mẫu 1S và 5S cho hoạt tính cao.

4.2. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định (VSVKĐ) của các mẫu polysaccharide:

Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định được dẫn ra trên bảng 6 cho thấy tất cả mẫu đều không có hoạt tính kháng nấm men và vi khuẩn Gr (+) *S. aureus*. Mẫu 1S và 8S có hoạt tính kháng 3 trong số 8 vi sinh vật kiểm định, mẫu 8S kháng cả 3 đại diện là vi khuẩn Gr (-) *E. coli*, vi khuẩn Gr (+) *B. subtilis* và nấm mốc là *F. oxysporum* trong khi mẫu 1S kháng vi khuẩn Gr (+) *B. subtilis* và đặc biệt cả 2 loại nấm mốc là *Asp. niger* và *F. oxysporum*. Mẫu 5S và 9S có hoạt tính kháng 2 VSVKĐ, mẫu 11S kháng 1 VSVKĐ. Đặc biệt mẫu 11S có hoạt tính kháng trực khuẩn mủ xanh là *P. aeruginos*.

Bảng 4. Hoạt tính gây độc tế bào của các mẫu polysaccharide

Stt	Ký hiệu mẫu	Dòng tế bào (Tỷ lệ sống sót)			Kết luận
		Hep-2 (Ung thư gan)	RD (Ung thư màng tim)	LU (Ung thư phổi)	
01	DMSO	100 ±0,0	100 ±0,0	100 ±0,0	
02	Chứng	2,0 ±0,0	1,5 ±0,0	2,2 ±0,0	
03	1S	37,9 ±2,4	8,1 ±0,2	Kxđ	Dương tính cả 02 dòng
04	5S	26,6 ±0,0	8,1 ±0,6	Kxđ	Dương tính cả 02 dòng
05	8S	35,1 ±2,6	8,8 ±1,5	Kxđ	Dương tính cả 02 dòng
06	9S	104,2 ±0,0	102,7 ±0,0	106,7 ±0,0	Âm tính
07	10S	100 ±1,8	90,4 ±1,7	101,2 ±0,8	Âm tính
08	11S	95,1 ±0,7	106,2 ±0,2	107,0 ±1,2	Âm tính

DMSO: Dimethyl sulfoxide

Bảng 5. Giá trị IC₅₀ của các mẫu có hoạt tính

Stt	Kí hiệu mẫu	Dòng tế bào Giá trị IC ₅₀ (µg/ml)		Kết luận
		Hep-2	RD	
01	Chứng (+)	0,25	0,1	
02	1S	5,9	2,2	Dương tính cả 2 dòng
03	5S	1,28	1,98	Dương tính cả 2 dòng
04	8S	15,4	16,36	Dương tính cả 2 dòng

Bảng 6. Kết quả hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các mẫu polysaccharide

Số TT	Kí hiệu mẫu	Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC : µg/ml)							
		Vi khuẩn Gr (-)		Vi khuẩn Gr (+)		Nấm mốc		Nấm men	
		<i>Ec</i>	<i>Pa</i>	<i>Bs</i>	<i>Sa</i>	<i>An</i>	<i>Fo</i>	<i>Cs</i>	<i>Sc</i>
01	1S	(-)	(-)	200	(-)	200	200	(-)	(-)
02	5S	(-)	(-)	200	(-)	(-)	200	(-)	(-)
03	8S	200	(-)	200	(-)	(-)	200	(-)	(-)
04	9S	200	(-)	(-)	(-)	(-)	200	(-)	(-)
05	10S	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	200	(-)	(-)
06	11S	(-)	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Ec: *E.coli*; *Pa*: *P.aeruginosa*; *Bs*: *B. subtilis*; *Sa*: *S.aures*; *An*: *Asp.niger*; *Fo*: *F.oxysporum*; *Cs*: *C.albicans*; *Sc*: *S.cerevisiae*

IV. KẾT LUẬN

Polysaccharide không tạo gel chiết từ một số loài rong như *Gracilaria tenuistipitata*, *Gracilariopsis bailinea*, *Gelidiella acerosa*, *Gracilaria fisheri*, *Gracilaria firma* là hỗn hợp của 02 loại polysaccharide dạng agar: agaran và agarose được sulfat hóa ở các vị trí DG4, DG6 và LG6. Tỷ lệ hai dạng agarose và agaran cũng như mức độ sulfat hóa của chúng thay đổi phụ thuộc vào polysaccharide chiết từ các loài rong khác nhau. Cấu trúc của chúng rất phức tạp do sự có mặt các nhóm sulfat ở các vị trí khác nhau trong các disaccharide cơ bản. Chúng có khả năng kháng từ 1 đến 3 vi sinh vật kiểm định.

Một số loại polysaccharide chiết từ các loài rong *G. tenuistipitata* (5S, 5S) và *Gracilariopsis bailinea* (8S) có chiều hướng nghiêng về hoạt tính gây độc tế bào, trong đó mẫu 1S và 8S cho hoạt tính cao nhất.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Chương trình nghiên cứu cơ bản đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện đề tài mã số 518806.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aspinall G.O., 1982. Chemical characterization and structure determination of polysaccharides. In the polysaccharides, 35-131, Edited by A.G.O. (ed.), Orlando. Academic Press Inc.
- Knutsen S.H., D.E. Myslabodski, B. Larsen, A.I. Usov, 1994. A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Bot. Mar.*, 37: 163-169.
- Kuda Y., M. Tsunekawwa, H. Goto, Y. Arraki, 2005. Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. *J. food Comp. and Anal.*, 18(7): 625-633.
- Lahay M., 2001. Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. *J. Appl. Phycol.* 13: 173-184.
- Lahay M., W. Yaphe, C. Rochas, 1985. ¹³C NMR spectral analysis of sulfated and desulfated polysaccharides of agar type. *Carbohydr. Res.*, 143: 240-245.
- Maria E.R.D., P.C. Jean, G.N. Diego, D.N. Miguel, G.G. Alan, A.P. Carlos, B. Elsa, S.C. Alberto, 2004. The structure of the agaran sulfate from *Acanthopora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity, relation between structure and antiviral activity in agaran. *Carbohydr. Res.*, 339: 335-347.
- Mazumder S., P. K. Ghosal, C.A. Pujol, M.J. Carlucci, E.B. Darmonta, B. Ray, 2002. Isolation, chemical investigation and activity of polysaccharides from

- Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Inter. J. Biol. Macro.*, m31, 87-95.
- Miller I.J., J.W. Blunt, 2005. The application of ^{13}C NMR spectroscopy to the red algal polysaccharides of selected New Zealand species of Lomentaria. *Bot. Mar.* 45: 1-8.
- Stevenson T.T., R.H. Furneux, 1991. Chemical methods for the analysis of sulfated galactans from red algae. *Carbohydr. Res.* 210: 277-298.
- Usov A.I., 2001. Problemi i dostignenie v strukturnom analize sulfatirovannux polysakharidov krasnoi vodoroslei, *Khimia rastitelnogo suria*, 2, C7-20. (Tiếng Nga).
- Usov A.I., 1998. Structural analysis of red seaweed galactan of agar and carrageenan groups. *Hydrocol.*, 12: 301-308.
- Usov A.I., S.V. Varostky, A.S. Shashkov, 1980. ^{13}C NMR spectroscopy of red algal galactan. *Biopolymer*, 19: 997-990.
- Usov A.I., M.I. Bilan, Shashkov, 1997. Structure of a sulfated xylogalactan from the calcareous red alga *Corallina pilulifera* P. Et R. (Rhodophyta, Corallinaceae). *Carbohydr. Res.* 303, pp. 93-102.
- Vandan B., A.J. Vlietink, 1991. *Method in plant Biochemistry*, 4: 47-68.
- Zang Q., P. Yu, Z. Li, H. Zang, Z. Xu, P. Li, 2003. Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fraction from *Porphyra haitannensis*. *J. Appl. Phycol.*, 15: 305-310.
- Zhu W., V.E.C. Ooi, P.K.S. Chan, J.P.O. Ang, 2003. Inhibitory effect of extracts of marine algae from Hong Kong against simplex viruses. In Charman A.R.O., Andecson R.I., Vreeland V.I., Davison I.F. (eds). *Proceeding of the International Seaweed Symposium*, Oxford University Press, Oxford, pp. 159-164.
- Zhao T., Q. Zhang, H. Qi, H. Zhang, X. Niu, Z. Li, 2006. Degradation of *Porphyra haitanensis* and the antioxidant activities of the degraded porphyrans with different molecular weight. *Intern. J. Biol. Macro*, 38: 45-50.