

**NGHIÊN CỨU CẤU TRÚC VÀ TÍNH CHẤT CỦA POLYSACARIT
TÁCH CHIẾT TỪ TẢO SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN
TẠI RUỘNG LÚA TỈNH PHÚ THỌ**

Đến tòa soạn 31 – 3 - 2015

Trần Thị Hằng, Vũ Đình Ngo

Khoa Công nghệ Hóa học, Trường Đại học Công nghiệp Việt Trì

Maiko Okajima, Tatsuo Kaneko

School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology

SUMMARY

**STUDY ON STRUCTURE AND PROPERTIES OF POLYSACCHARIDE
EXTRACTED FROM ALGAE WHICH INHABIT RICE PADDIES
IN PHU THO PROVINCE**

Polysaccharide was extracted from algae which inhabit rice paddies in Phu Tho province (PS-PT) using NaOH extraction and isopropanol precipitation. The yield was calculated at 52 wt% of dry algae. The chemical structure of PS-PT was confirmed by FT-IR measurement that it had carboxyl and sulfate groups, as well as the typical functional groups of sugar. In addition, zeta-potential of PS-PT showed the anionic sugar. PS-PT was constituted from monosaccharide such as rhamnose, glucose, galactose, xylose, mannose, fucose, arabinose, ribose, which were confirmed by GC-MS measurement. GPC measurement in water indicated that PS-PT had an ultra-high molecular weight and narrow polydispersity. Furthermore, PS-PT showed high viscosity and thermal stability.

Keywords: *algae, polysaccharide, anionic sugar, ultra-high molecular weight, high viscosity, high thermal stability*

1. MỞ ĐẦU

Polysaccharit (PS) được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm,... được tổng hợp từ nhiều nguồn nguyên liệu, trong đó từ các loài tảo đang được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu. Có nhiều nghiên cứu về cấu

trúc, thành phần hóa học của PS và ảnh hưởng của các điều kiện sinh trưởng lên quá trình tổng hợp PS [1-4]. Tùy thuộc loài tảo mà sản sinh lượng PS khác nhau, cấu trúc, thành phần cũng như phân tử lượng của PS cũng khác nhau. Một số công trình đã công bố về quy trình tách, chiết PS từ

tảo, nhưng nhìn chung về cơ bản các quy trình giống nhau, chỉ khác nhau về điều kiện thời gian, nhiệt độ, nồng độ,... Nhóm nghiên cứu của M. Okajima đã công bố phương pháp tách chiết các hợp chất có hoạt tính sinh học trong tảo *Anphanothece Sacrum* sử dụng NaOH 0,1M ở 70°C và sử dụng isopropanol để thu hồi [5]. Nhóm nghiên cứu của T. Hayashi tách chiết PS bằng phương pháp tách chiết hồi lưu nhiệt, sau đó sử dụng etanol để thu hồi [6]. Nhóm nghiên cứu của Z. Chi đã tách chiết PS bằng phương pháp đun nóng 100°C trong nước, sau đó dùng etanol để tái kết tủa và thu hồi [7].

Ở khu vực ruộng lúa tỉnh Phú Thọ (tảo Phú Thọ) xuất hiện loài tảo có khả năng sản sinh lượng lớn PS (thời gian xuất hiện từ tháng 6 đến tháng 12 hàng năm). Tỷ lệ nước chứa trong loài tảo này chiếm trên 98%. Nhóm nghiên cứu đã thành công trong việc phân ly, nuôi cấy và xác định loài của loài tảo này [8]. Tuy nhiên, đến nay chưa có công trình nào công bố về cấu trúc và tính chất của PS được tách chiết từ loài tảo sinh trưởng và phát triển ngoài thiên nhiên này.

Báo cáo này trình bày về phương pháp tách chiết, cấu trúc hóa học và một số kết quả nghiên cứu về tính chất của PS được tổng hợp từ loài tảo sinh trưởng và phát triển tại ruộng lúa tỉnh Phú Thọ (PS-PT).

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Tảo được vớt từ ruộng lúa tỉnh Phú Thọ, rửa sạch để loại đất bùn trước khi sử dụng. NaOH, isopropanol, alginat natri, metanol, phenol, axit sunfuric (Wako, Nhật Bản) được sử dụng không qua tinh chế.

2.2. Thiết bị

Nhóm chức của PS-PT được xác định bằng phổ hồng ngoại (FT-IR: Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR spectrometer, Mỹ). Phân tử lượng được xác định bằng sắc ký lọc gel (GPC: Shodex GPC-101, Showa Denko K. K., Nhật Bản). Tính chất nhiệt được xác định bằng phân tích nhiệt quét vi sai (DSC: EXSTRAR6100, Seiko Instruments, Nhật Bản) và phân tích nhiệt trọng trường (TGA: SSC/5200 Seiko Instruments, Nhật Bản) với tốc độ gia nhiệt 10°C/phút. Thế zeta được xác định bằng Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Anh). Thành phần nguyên tố được xác định bằng thiết bị phân tích nguyên tố CHNS (Yanako CHN coder MT-6, Nhật Bản) Độ nhớt được xác định bằng thiết bị đo độ nhớt dạng xoay (HAAKE MARS2, Đức). Monosacarit cấu thành PS-PT được xác định bằng sắc lý ghép khối phổ (GC-MS: Clarus500, Perkin - Elmer, Mỹ) sau khi trimetylsilylat hóa và phân hủy bằng phương pháp thủy phân metanol.

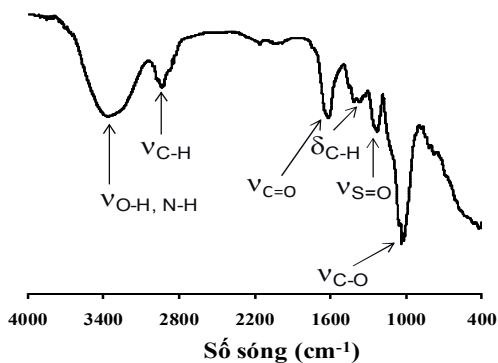
2.3. Tách chiết PS-PT

Vớt tảo, rửa sạch, ngâm trong isopropanol trong 24 giờ với tỷ lệ 1 kg tảo chứa nước/lít để loại một số hợp chất màu. Sau đó vớt tảo ra cho vào thùng khuấy có gắn bộ gia nhiệt với nồng độ 1 kg tảo/l dung dịch NaOH 0,1 M, gia nhiệt đến 80°C và khuấy trong 8 giờ. Sau 8 giờ, giảm nhiệt độ đến nhiệt độ phòng, dùng HCl 0,1M trung hòa dung dịch chiết đến khoảng pH 7, lọc lấy dung dịch trong. Dung dịch trong được tái kết tủa trong dung dịch isopropanol 99% (tỷ lệ dung dịch trong : isopropanol = 1 : 3), sau đó được sấy khô ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Cấu trúc và thành phần PS-PT

PS-PT thu được ở dạng sợi, chiếm 52 wt% so với khối lượng tảo khô. Theo phương pháp định lượng bằng phương pháp phenol – axit sunfuric thu được kết quả tương tự, điều này chứng tỏ PS-PT thu được có độ tinh khiết và hiệu suất tách chiết cao. PS-PT có độ hút ẩm cao, do đó cần lưu ý trong quá trình bảo quản và sử dụng.



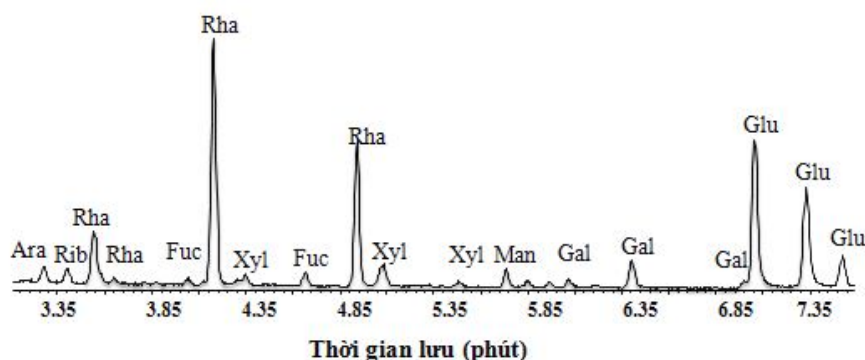
Hình 1. Phổ FT-IR của PS-PT

Để xác định nhóm chức trong phân tử PS-PT, mẫu được khảo sát bằng chụp phổ FT-IR (Hình 1). Trên phổ xuất hiện các pic hấp thụ ở vùng 3352 cm⁻¹ đặc trưng cho liên kết O-H và N-H, 2919 cm⁻¹ và 1380 cm⁻¹ đặc trưng cho liên kết C-H, 1600 cm⁻¹ đặc trưng cho liên kết C=O của nhóm cacboxyl, 1215 cm⁻¹ đặc trưng cho liên kết S=O trong nhóm sunfat và 1011 cm⁻¹ đặc trưng cho liên kết C-O. Kết quả cho thấy trong phân tử PS-PT chứa nhóm đặc trưng như cacboxyl và sunfat. Tỷ lệ thành phần các nguyên tố C : H : S : N chứa trong PS-PT lần lượt là 34,72 : 5,56 : 1,21 : 0,79. Như nhóm tác giả được biết, đến thời điểm hiện nay nhóm sunfat có trong cấu trúc PS chỉ

được tìm thấy ở các loài tảo nước mặn. Hiện nay, đối với các loài tảo nước ngọt chỉ được tìm thấy ở tảo *Anphanothece Sacrum* [5] và tảo trong nghiên cứu này. Theo một số công trình đã công bố, polysaccharit sulfat có tính kháng một số loại virus [9,10]. Ngoài ra, mẫu được đo thế zeta ở điều kiện nhiệt độ phòng với nồng độ 1mg PS-PT/1 ml nước cất. Kết quả cho thấy mẫu có thế zeta -85 mV, chứng tỏ rằng PS-PT mang tính anion. Từ các kết quả này cho thấy PS-PT có khả năng ứng dụng trong hấp phụ ion kim loại nặng, xử lý môi trường, dược phẩm,...

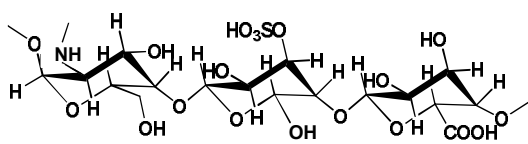
Phân tích GC – MS của các mẫu PS-PT đã trimetylsilylat hóa bằng phương pháp thủy phân metanol chỉ ra rằng monosaccharit cấu thành polysaccharit là rhamnose, glucose, galactose, xylose, mannose, fucose, arabinose, ribose, và một số monosaccharit khác với tỷ lệ tương ứng 38,6 : 13,8 : 4,8 : 4,8 : 2,4 : 3,5 : 2,0 : 0,6 : 6,5, (Hình 2). Rhamnose và glucose chiếm hơn 50% lượng monosaccharit cấu thành PS-PT, do đó PS-PT được phân loại như một rhamnoglucan sunfat.

Tính chất của PS-PT bị ảnh hưởng bởi phân tử lượng. Kết quả đo GPC cho thấy PS-PT trong nghiên cứu này có phân tử lượng rất lớn ($M_w = 7,2 \times 10^6$ Da) độ phân tán phân tử lượng nhỏ ($d = 1.27$). Theo nhóm tác giả được biết thì phân tử lượng của PS-PT thu được cao hơn nhiều so với PS tách chiết từ các loài tảo, thực vật khác [11]. Tuy phân tử lượng lớn, nhưng PS-PT vẫn có thể tan trong nước, thể hiện tính tan cao.



Hình 2. Phổ GC-MS của PS-PT. Ara: arabinose, Gal: galactose, Glu: glucose, Fuc: fuctose, Man: mannose, Rha: rhamnose, Xyl: xylose, Rib: ribose.

Từ kết quả khảo sát phổ FT-IR, GC-MS, thể zeta, công thức PS-PT được sự đoán như Công thức 1.

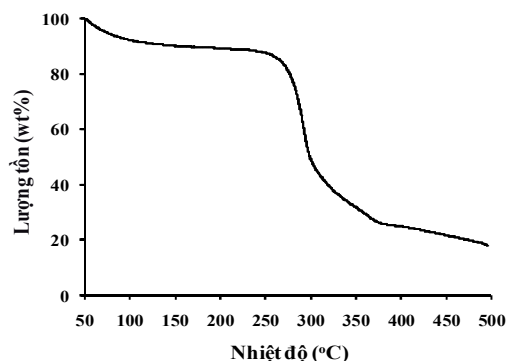


Công thức 1. Công thức cấu tạo của PS-PT

3.2. Tính chất nhiệt của PS-PT

Tính chất nhiệt của PS-PT được khảo sát bằng phương pháp DSC và TGA. Kết quả DSC trong khoảng từ nhiệt độ phòng đến 300°C với tốc độ gia nhiệt 10°C/phút cho thấy không xuất hiện pic thể hiện sự kết tinh hay nóng chảy, cho biết PS-PT thu được trong nghiên cứu này là polyme vô định hình. Để xác định độ ổn định nhiệt, mẫu được phân tích bằng phương pháp TGA với tốc độ gia nhiệt 10°C/phút, trong môi trường khí nitơ (Hình 3). Kết quả thu được giống như PS được tổng hợp từ một số loài tảo khác như *Cyanothece* sp. ATCC51142 và *Nostoc* spp. cũng như một số polyme khác như xanthan gum, và guar gum [12]. Sự phân hủy nhiệt xảy ra 3 giai đoạn. Giai đoạn I, từ 50°C đến khoảng 260°C, PS-PT giảm khoảng 14 wt%, có thể là do mất nước hấp thụ trên bề mặt. Khi nhiệt độ đạt 260°C, PS-PT bắt đầu phân

hủy (giai đoạn 2) đến khoảng 380°C, trong giai đoạn này khối lượng PS-PT giảm nhanh, tổng khối lượng đã bị phân hủy đạt tới 74%. Khi gia nhiệt trên 380°C, tốc độ giảm chậm lại và ở 500°C vẫn còn khoảng 19% khối lượng. Có thể là do các hợp chất vô cơ như các ion kim loại tạo phức với PS-PT.

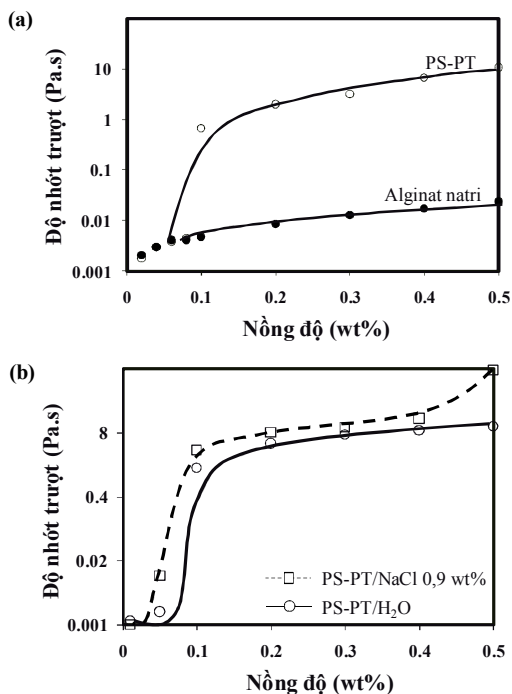


Hình 3. Giảm đồ TGA của PS-PT dưới tốc độ gia nhiệt 10°C/phút, trong môi trường khí nitơ.

3.3. Độ nhớt của PS-PT

Thông thường, polyme có phân tử lượng lớn khó tan trong nước, nhưng với PS-PT vẫn tan tốt trong nước, do đó có thể cho một số tính chất đặc trưng. Kết quả đo độ nhớt ở nhiệt độ phòng cho thấy, khi nồng độ PS-PT càng cao thì độ nhớt càng cao (Hình 4). Khi nồng độ nhỏ hơn 0,1 wt%, độ nhớt của PS-PT và alginate natri không

khác nhau, nhưng khi tăng nồng độ, độ nhớt của PS-PT cao hơn nhiều so với alginat natri (Hình 4a). Đây là do phân tử lượng của axit alginic thiên nhiên chỉ có trong khoảng 10.000 – 600.000 Da. Được biết rằng, trong dung dịch muối, độ nhớt tăng, do đó độ nhớt của PS-PT trong dung dịch NaCl 0,9 wt% đã được khảo sát. Đúng như dự đoán, trong dung dịch NaCl 0,9 wt%, độ nhớt của PS-PT tăng đáng kể so với trong nước. PS-PT ở nồng độ 0,5 wt% , trong dung dịch NaCl 0,9 wt% độ nhớt đạt khoảng 160 Pa.s, trong khi đó trong nước cắt độ nhớt chỉ đạt khoảng 8 Pa.s, giảm 20 lần (Hình 4b). Đây có thể là do trong dung dịch muối, ion kim loại tương tác với các ion âm của nhóm cacboxyl hay sunfat làm cho sự linh động của mạch PS-PT giảm.



Hình 4. Đồ thị quan hệ giữa nồng độ và độ nhớt trượt của (a) PS-PT và alginat natri trong nước, (b) PS-PT trong nước và dung dịch NaCl 0,9 wt%

4. KẾT LUẬN

Đã tách chiết thành công PS từ tảo Phú Thọ. Hàm lượng PS-PT chiếm 52 wt% so với khối lượng tảo khô. Cấu trúc phân tử PS-PT đã được xác định, trong phân tử chứa nhóm chức đặc trưng như cacboxyl và sunfat, thể hiện tính anion. Có trên 8 loại monosacharit cấu thành PS-PT. PS-PT có tính bền nhiệt cao, phân hủy nhiệt bắt đầu xảy ra ở trên 260°C. Đặc biệt, tuy PS-PT có phân tử lượng rất lớn ($M_w = 7,2 \times 10^6$ Da), nhưng vẫn tan trong nước, có độ nhớt cao, cao hơn cả alginat natri và trong dung dịch NaCl 0,9 wt% độ nhớt tăng. PS-PT có thể kỳ vọng là nguyên liệu tiềm năng, ứng dụng trong một số lĩnh vực như hóa mỹ phẩm, dược phẩm, xử lý môi trường,....

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. T.J. Painter, (1983) "Algal polysaccharides", In Aspinall GO (ed.), The polysaccharides, vol2. Academic Press, New York, 195-285.
2. J.M. Panoff, B. Priem, H. Morvan, F. Joset, (1988) "Sulphated exopolysaccharides produced by two unicellular strains of cyanobacteria", *Synechocystis* PCC 6803 and 6714. *Arch. Microbiol.*, 150, 558-563.
3. E.J. Philips, C. Zeatn, P. Hansen, (1989) "Growth, photosynthesis, nitrogen fixation and carbohydrate production by a unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp", *J. Appl. Phycol.*, 1, 137-145.
4. M. Vincenzini, R. De Philippis, C. Sili, R. Materassi, (1990) "Studies on exopolysaccharide release by diazotrophic batch cultures of *Cyanospiracapsulata*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 392-396.

5. M. Okajima, M. Ono, K. Kabata, T. Kaneko, (2007) "Extraction of novel sulfated polysaccharides from *Aphanothece sacrum* (Sur.) Okada, and its spectroscopic characterization", *Pure Appl. Chem.*, 79, 2039–2046.
6. K. Kanekiyo, K. Hayashi, J-B. Lee, H. Takenaka, T. Hayashi, (2008) "Structure and antiviral activity of an acidic polysaccharide from edible blue-green alga, *Nostoc flagelliforme*", *J. Pharm. Soc. of Japan*, 128, 725–731.
7. Z. Chi, C.D. Su, W.D. Lu, (2007) "A new exopolysaccharide produced by marine *Cyanothece* sp. 113", *Biores. Tech.*, 98, 1329–1332.
8. K. Ohki, Q.T. Nguyen, S. Yoshikawa, Y. Kanesaki, M. Okajima, T. Kaneko, H.T. Tran, (2014) "Exopolysaccharide production by a unicellular freshwater cyanobacterium *Cyanothece* sp. isolated in a rice field of Viet Nam", *J. Appl. Phycol.*, 26, 265–272.
9. M. Hasui, M. Matsuda, K. Okutani, S. Shigeta (1995) "In vitro antiviral activities of sulfated polysaccharides from marine microalga against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses", *J. Biol. Macromol.*, 17, 293–297.
10. M. Witvrouw, E. De Clercp, (1997) "Sulfated polysaccharide extracted from sea algae as potential antiviral drugs", *Gen. Pharmacol*, 29, 497–511.
11. S. Pereira, A. Zille, E. Micheletti, P. Moradas-Ferreira, R. De Philippis, P. Tamagnini, (2009) "Complexity of cyanobacterial exopolysaccharaides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly", *FEMS. Microbiol. Rev.*, 33, 917–941.
12. A. Parikh, D. Madamwar, (2006) "Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria", *Biores. Tech.*, 97, 1822–1827.

PHÂN TÍCH VÀ ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ Ô NHIỄM.....(tiếp theo tr. 170)

7. Quy chuẩn quốc gia QCVN 01:2009/BYT, Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng nước ăn uống.
9. Nguyễn Thị Hạ Sự hình thành thành phần hóa học nước dưới đất trong trầm tích Đệ Tứ vùng đồng bằng Bắc Bộ và ý nghĩa của nó đối với cung cấp nước, Luận án tiến sĩ địa chất, Trường Đại học Mỏ Địa chất, Hà Nội (2006).
10. Hoàng Vượng, Đoàn Quy hoạch và Điều tra tài nguyên nước 707, Báo cáo "Đề tài nghiên cứu thành lập bản đồ nước ngầm vùng trọng điểm kinh tế huyện Đạ Tẻh tỉnh Lâm Đồng", (2007).