

# ĐIỀU CHẾ AXIT ALGINIC KHỐI LƯỢNG PHÂN TỬ THẤP CÓ CẤU TRÚC ĐẶC TRƯNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP THỦY PHÂN ALGINAT TÁCH TỪ RONG MƠ KHU VỰC VEN BIỂN MIỀN TRUNG

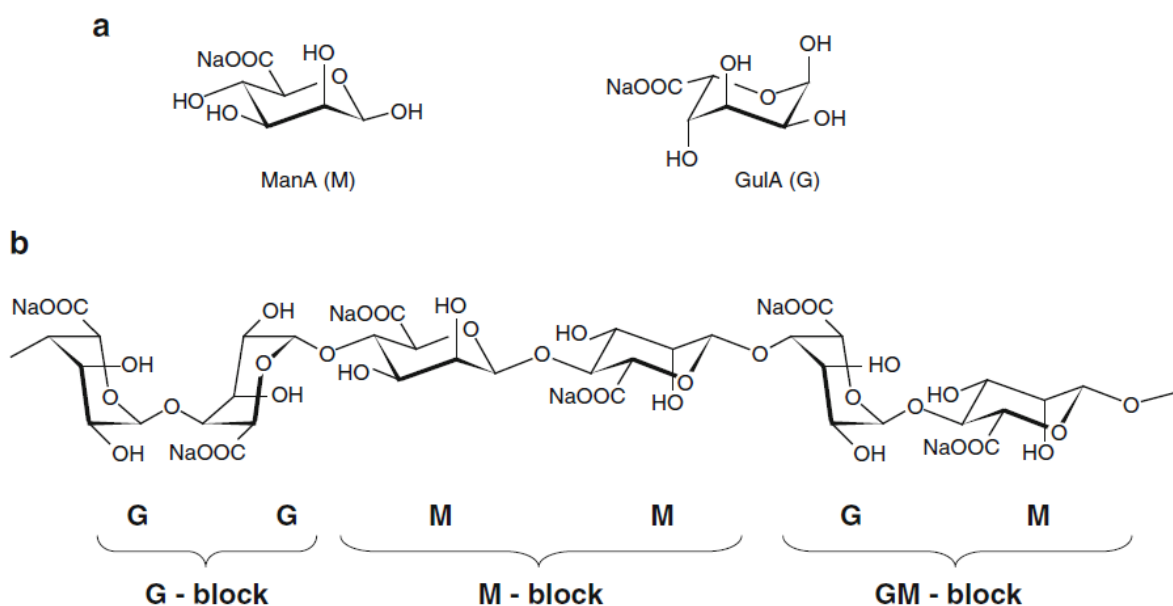
Trần Vĩnh Thiện\*

**TÓM TẮT:** Axit alginic giàu các hợp phần homopolyme: axit polymannuronic (MM), axit polyguluronic (GG) và các hợp phần heteropolyme (MG) đã được điều chế từ alginat tách từ rong mơ khu vực ven biển miền Trung bằng phương pháp điều chỉnh pH. Alginat được thủy phân trong môi trường axit trong điều kiện thủy nhiệt. Các hợp phần axit alginic giàu MM, GG hay MG được phân lập bằng cách điều chỉnh pH từ 7 đến 1,3 và được đặc trưng bằng  $^1\text{H-NMR}$ . Kết quả khảo sát hoạt tính sinh học cho thấy các hợp phần thu được đều có khả năng kích thích nảy mầm và kích thích tăng trưởng cây lúa nhưng với mức độ khác nhau.

## 1. Mở đầu

Vùng ven biển các tỉnh miền Trung được xem là có nguồn lợi rong mơ phong phú với sản lượng có thể khai thác hàng năm hàng trăm ngàn tấn rong tươi [1]. Rong mơ là nguồn nguyên liệu quan trọng để sản xuất alginat, một polysaccarit có nhiều ứng dụng quan trọng trong nhiều ngành công nghiệp như sợi, dệt, giấy, thực phẩm, mỹ phẩm và gần đây còn được tìm thấy một số ứng dụng rất đặc thù trong y dược và công nghệ sinh học.

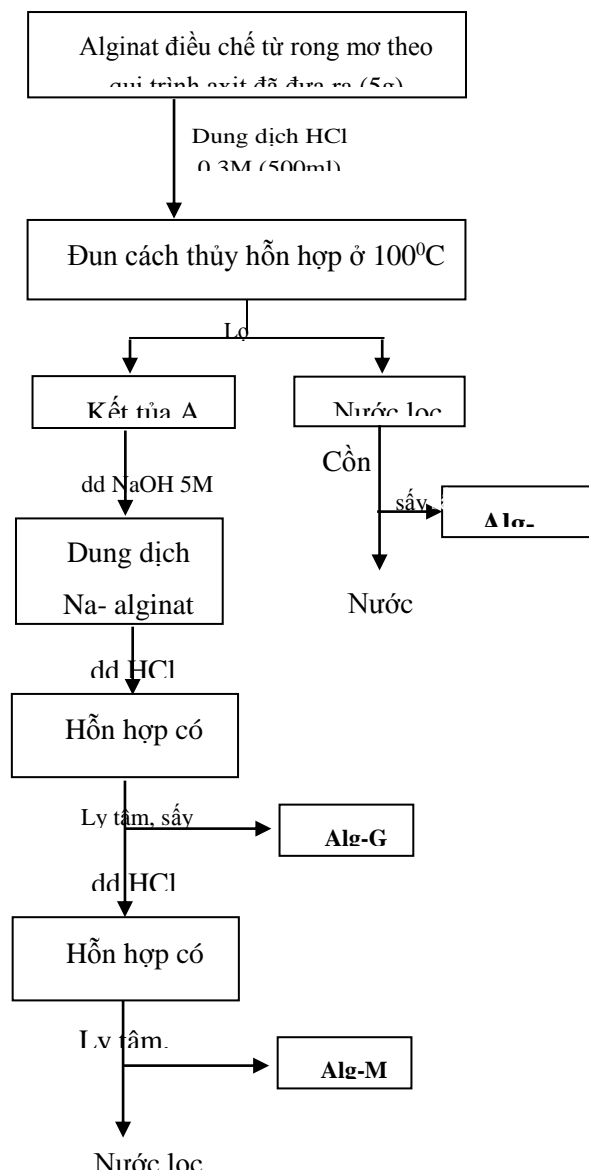
**Hình 1.** Đặc trưng cấu trúc của alginat: (a) Cấu dạng  $^4\text{C}_1$  của axit  $\beta$ -D-mannuronic (M) và  $^1\text{C}_4$  của axit  $\alpha$ -L-guluronic (G); (b) Các kiểu phân bố các block trong mạch



\* TS, Trường Đại học Phú Yên.

Hình 1 trình bày cấu trúc của một đoạn mạch alginat [2]. Cùng với độ dài của chuỗi mạch polyme (thể hiện ở đại lượng khối lượng phân tử trung bình), tỉ lệ và tần suất của các monome (thể hiện bằng các chỉ số M/G và các giá trị  $F_{MM}$ ,  $F_{GG}$ ,  $F_{MG}$ ) trong chuỗi mạch là các đặc điểm cấu trúc quan trọng của sản phẩm alginat cũng như các oligome từ alginat vì chúng quyết định tính chất và vì thế là khả năng và các lĩnh vực ứng dụng của các sản phẩm này [3]. Những nghiên cứu gần đây cho thấy, các oligosaccarit điều chế từ alginat (oligoalginat) nhờ enzym có những tính chất quý như thúc đẩy tăng trưởng vi khuẩn đường ruột *bifidobacteria*, thúc đẩy quá trình nảy mầm hạt giống và phát triển rễ, thân, lá của cây [3], có khả năng kháng virus [4],... Các oligoalginat với thành phần và trật tự monome thích hợp được ghi nhận là có những ứng dụng quan trọng và rất đặc hiệu

như oligoalginat giàu các khối G được dùng để loại bỏ các ion kim loại độc hại như chì, stronti và bari, trong khi đó, các oligoalginat giàu các khối M được chứng tỏ là có tác dụng kích thích các tế bào trong cơ chế bảo vệ bằng miễn dịch để chống lại sự nhiễm trùng và các tổn thương do phóng xạ,... Vì vậy việc nghiên cứu điều chế axit alginic với cấu trúc thích hợp có thể kiểm soát được sẽ góp phần mở ra những hướng ứng dụng mới của sản phẩm này. Trong nước đã có một số công trình nghiên cứu điều chế oligoalginat nhưng tất cả đều nhằm điều chế các sản phẩm có độ trùng hợp xác định [5,6]. Trong khi đó, theo một số nghiên cứu, axit alginic với cấu trúc giàu M hoặc giàu G sẽ có nhiều tính chất khác nhau như khả năng tạo gel, trao đổi ion [3], khả năng kháng virus khác nhau [4] ... nên có rất nhiều ứng dụng khác nhau trong công nghiệp thực phẩm, mỹ phẩm, dược phẩm, nông nghiệp, [2,3]. Vì vậy việc nghiên cứu điều chế axit alginic với cấu trúc thích hợp sẽ góp phần mở ra những hướng ứng dụng mới của sản phẩm này. Trong bài viết này, chúng tôi đề cập đến việc điều chế axit alginic giàu các hợp phần axit mannuronic (MM), axit guluronic (GG) và giàu các khối heteropolyme (MG) từ alginat tách từ rong mơ khu vực ven biển miền Trung bằng phương pháp thủy phân. Đặc trưng các sản phẩm điều chế



**Hình.2.** Sơ đồ qui trình điều chế các hợp phần của axit alginic bằng phương pháp thủy phân

của axit alginic bằng phương pháp thủy phân. Đặc trưng các sản phẩm điều chế

được bằng  $^1\text{H-NMR}$  và kết quả khảo sát khả năng kích thích nảy mầm và kích thích tăng trưởng cây lúa của các sản phẩm này.

## 2. Thực nghiệm

Sơ đồ qui trình điều chế các axit alginic giàu các hợp phần dựa vào khả năng tạo kết tủa dạng gel khác nhau của các hợp phần MM, GG và MG (ký hiệu lần lượt là Alg-M, Alg-G và Alg-MG) ở các giá trị pH khác nhau được đưa ra trong hình 2. Natri alginat được điều chế từ rong mơ *Sargassum swartzii* (Turn.) C.Ag thu được tại vùng biển Nha Trang (Khánh Hòa) theo qui trình đã được đề cập trước [7]. Cân 5g natri alginat (sau khi sấy đến khối lượng không đổi) cho vào 500ml dung dịch HCl 0,3M, khuấy đều. Đun cách thủy hỗn hợp thu được trong 4 - 5 giờ ở  $100^\circ\text{C}$ . Để nguội hỗn hợp ở nhiệt độ phòng. Lọc, rửa kết tủa được nước lọc 1 và kết tủa A. Hòa tan kết tủa A trong một lượng dung dịch NaOH 5M đến pH = 7, pha loãng bằng nước cất để được dung dịch chứa khoảng 1% natri alginat. Dùng dung dịch HCl 0,25M điều chỉnh pH dung dịch đến pH  $\approx 2,4$ . Ly tâm hỗn hợp, rửa kết tủa nhiều lần bằng nước cất thu được nước lọc 2 và kết tủa. Sấy khô kết tủa ở nhiệt độ phòng bằng máy sấy chân không thu được Alg-G. Thêm dung dịch HCl 0,25M vào phần nước lọc 2 đến pH  $\approx 1,3$ . Ly tâm hỗn hợp và rửa, sấy kết tủa ở nhiệt độ phòng bằng máy sấy chân không thu được Alg-M. Thêm cồn  $65^\circ$  vào dịch lọc 1 với tỉ lệ 1:1 về thể tích. Vớt gel thu được, sấy khô ở nhiệt độ phòng bằng máy sấy chân không đến khối lượng không đổi được Alg-MG. Hiệu suất tách các sản phẩm được tính bằng phần trăm khối lượng sản phẩm thu được sau khi sấy đến khối lượng không đổi so với khối lượng alginat ban đầu.

Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của các sản phẩm được ghi bằng máy hiệu Bruker, 500MHz, ở 353K, dung môi NaOD 1% trong  $\text{D}_2\text{O}$  để xác định cấu trúc chuỗi của các sản phẩm điều chế được. Khối lượng phân tử trung bình ( $\overline{M}_v$ ) của alginat và các sản phẩm điều chế được tính toán theo phương trình Mark-Houwink,  $[\eta] = K\overline{M}_v^\alpha$ , trong đó  $[\eta]$  là độ nhớt đặc trưng,  $K = 6,9 \times 10^{-6}$  và  $\alpha = 1,13$  đối với alginat giàu G;  $K = 7,3 \times 10^{-5}$  và  $\alpha = 0,92$  đối với alginat giàu M [8]. Việc xác định độ nhớt đặc trưng  $[\eta]$  được thực hiện lặp lại 3 lần cho mỗi dung dịch, mỗi mẫu 6 nồng độ khác nhau bằng cách ghi thời gian chảy của mỗi dung dịch qua nhớt kế Ubbelohde 0,6 mm đặt trong máy ổn nhiệt, nhiệt độ  $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$ .

Thử nghiệm khả năng kích thích nảy mầm: Hạt giống lúa được bố trí thành các mẫu thí nghiệm khảo sát, mỗi mẫu khoảng 200 hạt giống lúa được lấy ngẫu nhiên được ngâm 24h: trong nước (mẫu đối chứng), trong các dung dịch nghiên cứu nồng độ 100 mg/l bao gồm alginat, alg-G, alg-M. Sau đó cho nảy mầm trong đĩa petri. Sau 3 ngày, đếm số hạt đã nảy mầm và xác định tỷ lệ nảy mầm theo công thức: tỷ lệ nảy mầm =  $\frac{b}{a} * 100\%$ , trong đó a: số hạt giống đem gieo, b: số hạt nảy mầm. Thí nghiệm lặp lại 3 lần được ký hiệu lần lượt là các thí nghiệm 1, 2 và 3 cho mỗi công thức xử lý. Tỷ lệ nảy mầm ứng với mỗi công thức là kết quả trung bình của 3 thí nghiệm lặp này.

Khảo sát khả năng kích thích tăng trưởng: Các cây giống sau giai đoạn nảy mầm được tiếp tục nuôi trồng trong đĩa petri chứa cát được làm ẩm với dung dịch dinh dưỡng là môi trường cơ bản Murashige-Skoog (MS). Ngoại trừ đĩa đối chứng hằng ngày chỉ được phun nước, các đĩa thí nghiệm khảo sát được phun các dung dịch alginat và các chế phẩm nghiên cứu có nồng độ 100 mg/l vào thân và lá 1 lần/ngày vào buổi sáng và được chiếu sáng bằng đèn neon 12 giờ/ngày. Sau 12 ngày, xác định chiều cao cây bằng cách đo chiều dài từ gốc đến đỉnh lá cao nhất bằng thước cặp milimet. Chọn ngẫu nhiên mỗi mẫu 40 cây để đo. Số liệu thu được được xử lý bằng phương pháp thống kê để kết luận về khả năng kích thích tăng trưởng [9].

Sử dụng chuẩn  $T$  của Student để kiểm tra mức ý nghĩa của các kết quả thực nghiệm. Nếu  $|T_m| < t_{(0.05, n_1+n_2-2)}$  thì tỉ lệ nảy mầm ứng với 2 công thức đang xét được xem như không có sự khác nhau. Ngược lại, nếu  $|T_m| > t_{(0.05, n_1+n_2-2)}$  thì sự khác nhau về tỉ lệ nảy mầm ứng với 2 công thức đang xét là có ý nghĩa [9].

Việc thử nghiệm khả năng kích thích nảy mầm và tăng trưởng cây lúa được tiến hành với hạt giống lúa Khang Dân của công ty giống cây trồng và vật nuôi Thừa Thiên Huế đã qua 9 tháng bảo quản.

### 3. Kết quả và thảo luận

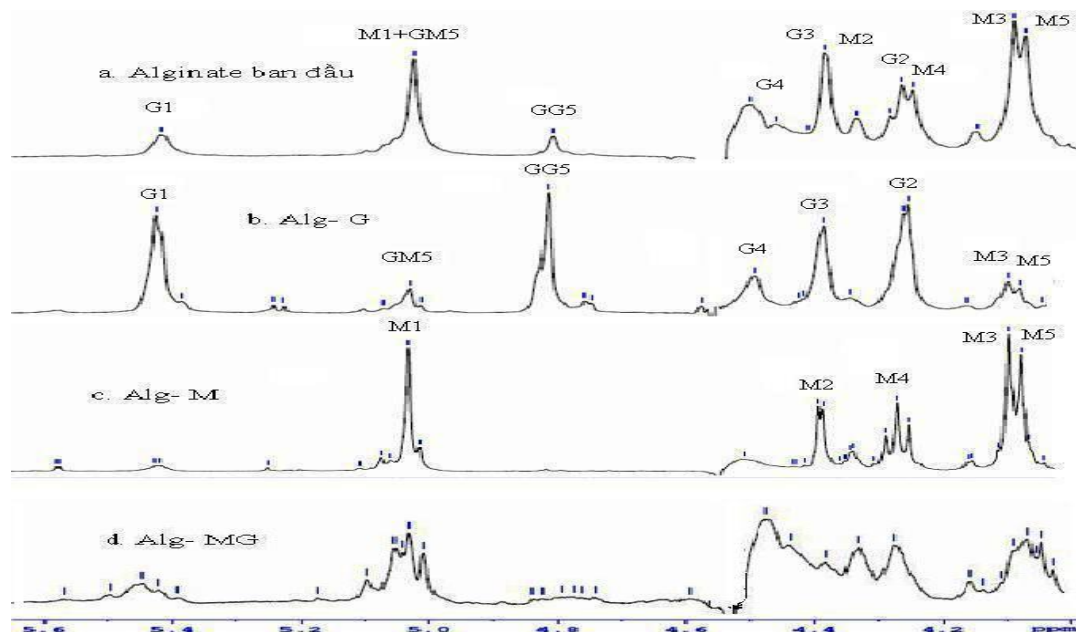
Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của alginat ban đầu và các oligoalginat điều chế được trình bày trên hình 3, tại hình này, việc quy kết các pic cộng hưởng được thực hiện dựa theo sự phân tích các phổ COSY, TOCSY, HSQC đã được trình bày trong công trình trước đây của chúng tôi [7]. Có thể thấy trong phổ của Alg-G, các pic cộng hưởng ứng với các proton của M1, M3 và M5 đều có cường độ giảm mạnh so với các pic tương ứng trong phổ của alginat ban đầu, ngược lại cường độ các pic ứng với các proton G1, G5 tăng lên rất nhiều. Vì vậy có thể nói mẫu Alg-G giàu các gốc của axit guluronic và giàu các khối homopolyme GG. Ngược với mẫu Alg-G, trong phổ của mẫu Alg-M, cường độ các pic ứng với cộng hưởng của các proton G1, G5, G4 là rất thấp, trong khi đó các pic ứng với M1, M3, M5 tăng lên đáng kể. Kết quả này cho thấy mẫu Alg-M giàu các gốc của axit mannuronic và các khối homopolyme MM. Trong phổ của Alg-MG, có thể thấy pic ứng với cộng hưởng của proton H5 của gốc G liên kết trực tiếp với gốc G khác (GG5) có cường độ rất thấp, trong khi đó các pic ứng với các proton G1, M1, M3, M5 bị tách thành nhiều vạch. Điều này chỉ có thể giải thích bằng việc các gốc của axit mannuronic và axit guluronic tương ứng kết hợp xen kẽ với nhau trong chuỗi mạch. Như vậy có thể kết luận rằng mẫu Alg-MG chứa chủ yếu các khối xen kẽ heteropolyme (MG).

Có thể tính toán tỉ lệ thành phần monome và tần suất các bộ đôi trong mạch của các mẫu tương ứng từ cường độ tương đối của các pic cộng hưởng trong phổ  $^1\text{H-NMR}$  theo phương pháp của Grasdalen và cộng sự [10]. Kết quả được trình bày trong bảng 1 đã xác nhận các đặc trưng cấu trúc của các mẫu oligome phù hợp với các kết luận trên.

**Bảng 1.** Thành phần monome và tần suất các bộ đôi của alginat và các mẫu oligoalginat điều chế từ mẫu alginat này.

Mẫu oligome	Thành phần monome	Tần suất các bộ đôi	M/G
-------------	-------------------	---------------------	-----

	$F_M$	$F_G$	$F_{MM}$	$F_{MG}=F_{GM}$	$F_{GG}$	
Alginate ban đầu	0,72	0,28	0,58	0,14	0,14	2,57
Alg-G	0,10	0,90	0,07	0,03	0,87	0,11
Alg-M	0,90	0,10	0,86	0,04	0,06	9,00
Alg-MG	0,61	0,39	0,27	0,24	0,15	1,56



**Hình 3.** Phổ  $^1H$ -NMR của alginate ban đầu và của các sản phẩm điều chế được

Hiệu suất các sản phẩm điều chế được tính bằng phần trăm khối lượng sản phẩm thu được trên khối lượng alginate ban đầu. Khối lượng phân tử của alginate và các mẫu sản phẩm được xác định bằng phương pháp đo độ nhớt. Kết quả xác định được trình bày ở bảng 2 cho thấy hiệu suất và phân tử lượng trung bình của alginate giàu G cao hơn alginate giàu M và khối lượng phân tử trung bình của alginate giàu các khối luân phiên (MG) là thấp nhất. Điều này có thể được lý giải dựa trên cơ chế của phản ứng cắt mạch alginate. Trong sự có mặt của axit, phản ứng thủy phân phân cắt liên kết glicozit xảy ra. Do liên kết C-O-C glycozit giữa các gốc guluronat (GG) bền vững hơn so với giữa các gốc manuronat (MM) và giữa gốc guluronat với gốc mannuronat (GM) nên khả năng bị cắt mạch của các block GG là thấp hơn so với MM và GM. Khối lượng phân tử trung bình của mẫu alg-MG thấp nhất cho thấy liên kết GM và MG là kém bền vững nhất.

**Bảng 2.** Hiệu suất điều chế và khối lượng phân tử trung bình của các sản phẩm.

Mẫu	Alginate ban đầu	Alg-G	Alg-M	Alg-MG
Hiệu suất (%)	100	41,8	10,7	30,7
$\bar{M}_v$ (kDa)	101,052	22,177	14,863	11,570

Kết quả các thí nghiệm lặp lại xác định tỷ lệ nảy mầm của hạt giống lúa ứng với các chế độ xử lý được trình bày ở bảng 3. Sử dụng chuẩn  $T$  của Student để kiểm

tra sự khác nhau của các kết quả cho thấy: So với đối chứng, các trường hợp được xử lý với alginat, alg-G, alg-M đều có  $|T_m| > t_{(0,05, n_1+n_2-2)}$  có nghĩa là với mức có nghĩa  $\alpha = 0,05$ , các chế phẩm này đều có tác dụng làm tăng tỉ lệ nảy mầm của hạt giống lúa, tuy mức độ có khác nhau. Alg-M và alg-G có tác dụng rõ ràng nhất. Điều này phù hợp với nhận định của Ikeda và cộng sự [11] chỉ ra rằng alginat và oligoalginat đồng nhất về cấu trúc có khả năng kích thích tăng trưởng đặc hiệu hơn.

**Bảng 3.** Tỷ lệ nảy mầm của hạt giống lúa khi được xử lý ở các chế độ khác nhau

STT	Chế độ xử lý	Tỷ lệ nảy mầm (%)			$\bar{x}$	$s^2$
		Thí nghiệm 1	Thí nghiệm 2	Thí nghiệm 3		
1	Đối chứng	81,5	82,9	84,3	82,90	1,96
2	Alginat	86,3	89,1	87,9	87,77	1,9733
3	Alg-G	91,2	88,1	89,8	89,70	2,41
4	Alg-M	92,5	91,2	89,6	91,10	2,11

Hạt giống lúa đã nảy mầm từ các thí nghiệm trên, được tiếp tục dùng để khảo sát khả năng kích thích tăng trưởng của các chế phẩm bằng cách đo chiều cao của 40 cây ngẫu nhiên đối với từng mẫu khảo sát sau 12 ngày xử lý chế phẩm. Sử dụng chuẩn  $T$  của Student để kiểm tra sự khác nhau của các kết quả (không được trình bày trong bài này) với mức có nghĩa  $\alpha = 0,05$ . Kết quả cho thấy: So với đối chứng, các trường hợp được xử lý với alginat, alg-G, alg-M đều có  $|T_m| > t_{(0,05, n_1+n_2-2)}$  nghĩa là với mức có nghĩa  $\alpha = 0,05$ , alginat, alg-G, alg-M đều có tác dụng kích thích tăng trưởng cây lúa, tuy mức độ có khác nhau. Trong đó alg-M có tác dụng kích thích mạnh nhất, trong khi đó alginat và alg-G đều có tác dụng kích thích nhưng sự khác nhau về hiệu quả kích thích giữa 2 chế phẩm này là không rõ ràng. Kết quả này phù hợp với công bố mới đây của Laporte và cộng sự theo đó, khi khảo sát về khả năng kích thích tăng trưởng của các oligosaccharit trên cây thuốc lá đã thấy rằng chiều cao cây thuốc lá khi được xử lý bằng alginat giàu M tăng cao nhất so với alginat giàu G và oligome từ galactan đã sunfat hóa (sulphated Poly-Ga) [12].

#### 4. Kết luận

Lần đầu tiên điều chế được các axit alginic phân tử lượng thấp giàu M, giàu G và giàu các khối luân phiên MG từ alginat tách từ rong mơ khu vực ven biển miền Trung bằng phương pháp thủy phân và điều chỉnh pH để kết tủa phân đoạn. Các sản phẩm điều chế được khảo sát bằng phương pháp đo độ nhớt, phổ  $^1\text{H-NMR}$ , XRD. Kết quả cho thấy các sản phẩm điều chế được là khá thuần nhất về thành phần monome, hiệu suất và khối lượng phân tử trung bình của alginat giàu G cao hơn so với alginat giàu M.

Alginat và các chế phẩm điều chế được đều có tác dụng làm tăng tỉ lệ nảy mầm của hạt giống lúa, tuy mức độ có khác nhau, trong đó alginat giàu M và alginat giàu G có tác dụng rõ ràng nhất. Khi được phun ở nồng độ 100 mg/l thì alginat và các chế phẩm đều có tác dụng kích thích tăng trưởng cây lúa, trong đó alginat giàu M có tác dụng kích thích mạnh nhất, alginat và alginat giàu G đều có tác dụng kích

thích nhưng sự khác nhau về hiệu quả kích thích giữa 2 chế phẩm này là không rõ ràng.

Hy vọng rằng các kết quả này sẽ mở ra một hướng ứng dụng mới cho alginat từ rong mơ. □

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Hữu Đại (1997), *Rong mơ (sargassaceae) Việt Nam. Nguồn lợi & sử dụng*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Thành phố Hồ Chí Minh.
2. Haug A., Larsen B., and Smidrod O. (1974), "Uronic acid sequence in alginate from different sources", *Carbohydrate Research*, 32, pp. 217-225.
3. Moe S., Draget K., Skjåk-Brek G., Smidsrød O. (1995), *Alginates, Food Polysaccharides and Their Applications*, Marcel Dekker, New York.
4. Yoh Sano (1999), "Antiviral activity of alginate against infection by tobacco mosaic virus", *Carbohydrate Polymers* 38, pp 183-186.
5. Nguyễn Quốc Hiến, Lê Hải, Võ Tấn Thiện, Trương Thị Hạnh, Lê Quang Luân (1998), "Nghiên cứu cắt mạch alginat bằng kỹ thuật chiếu xạ để chế tạo oligoalginat", *Tạp chí Hóa học*, 36(4), tr. 19-23.
6. Nguyễn Quốc Hiến, Lê Hải, Trương Thị Hạnh, Lê Quang Luân (2001), "Xác định hiệu suất cắt mạch bức xạ ( $G_d$ ) của alginat trong dung dịch nước bằng phương pháp đo độ nhớt", *Tạp chí Hóa học*, 39(3), tr. 34-35.
7. Tran Vinh Thien, Chu Dinh Kinh, Tran Thai Hoa, and Dinh Quang Khieu (2008), "Characterization of alginate prepared from brown seaweeds in Thua Thien-Hue province", *Asean Journal on Science & Technology for Development*, 25(2), pp. 427-433.
8. Martinsen A., Skjåk-Bræk G., Smidsrød O. (1991), "Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates", *Carbohydrate Polymers*, 15, pp 171-193.
9. Nguyễn Thị Lan, Phạm Tiến Dũng (2005), *Giáo trình phương pháp thí nghiệm*, Trường Đại học Nông nghiệp 1, Hà Nội
10. Grasdalen H., Larsen B. and Smidsrød O. (1979), "A P.M.R. Study of the composition and sequence of uronate residues in alginates", *Carbohydrate Research*, 68, pp. 23-31.
11. Ikeda A., Takemura A., Ono H (2000), "Preparation of low-molecular weight alginic acid by acid hydrolysis", *Carbohydrate polymers*, 42, pp. 421-425.
12. Laporte, Daniel; Vera, Jeannette; Chandía, Nancy; Zúñiga, Elisa; Matsuhira, Betty; Moenne, Alejandra (2007), "Structurally unrelated algal oligosaccharides differentially stimulate growth and defense against tobacco mosaic virus in tobacco plants ", *Journal of Applied Phycology*, 19(1), pp. 79-88.

## Abstract

*The alginic acids with rich polymannuronic (MM), polyguluronic (GG) and rich heteropolyme (MG) composition have been prepared from alginate isolated from brown seaweeds in the Central coastal region by pH adjust method. The alginate are hydrolyzed by hydrochloride acid under hydrothermal treatment. The alginic acid fractions enriched in MM, GG and MG are obtained by adjusting pH from 7 to 1.3 and are characterized by  $^1\text{H-NMR}$ . The survey results on their biological activities showed that the obtained oligoalginates are capable of stimulating the germination of the rice seeds and the growth of the stimulating rice but with different degrees.*