

Chiết tách và nghiên cứu một số tính chất của galactan từ rau câu *Gracilaria verrucosa* Việt Nam

Extraction and Characterization of Galactan from Seaweed *Gracilaria Verrucosa* of Vietnam

Nguyễn Thu Hà¹, Nguyễn Thị Thu Trang¹, Toshiaki Ougizawa², Nguyễn Ngọc Huệ^{1*}

¹Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Công nghệ Tokyo, Nhật Bản

*Email: tue.nguyennhoc@hust.edu.vn

Tóm tắt

Trong công trình này, chúng tôi nghiên cứu tách galactan từ rau câu *Gracilaria verrucosa* Việt Nam và khảo sát những tính chất đặc trưng của nó. Rau câu được ngâm trong nước ở các nhiệt độ khác nhau để thu được dung dịch chứa galactan, sau đó đông tụ dung dịch và tinh chế để thu galactan ở dạng bột. Các phương pháp Kjeldahl, phổ hồng ngoại, xác định độ nhớt đặc trưng và đo nhiệt quét vi sai (DSC) được thực hiện để nghiên cứu đặc trưng cấu trúc và tính chất của sản phẩm. Kết quả cho thấy mẫu galactan thu được có cấu trúc agar, không chứa nhóm thế sunfat. Mẫu tách trong nước ở 40 °C có hàm lượng protein cao hơn, độ nhớt và độ bền nhiệt đều cao hơn so với mẫu tách trong nước ở 100 °C.

Từ khóa: *Gracilaria verrucosa*, galactan, đặc trưng cấu trúc, cấu trúc, độ nhớt đặc trưng, DSC

Abstract

In this study, we extracted galactan from seaweed *Gracilaria verrucosa* of Vietnam and investigated its structure and properties. The seaweed was immersed in water in different temperatures to obtain a solution of galactan. Thereafter, the solution was coagulated and purified to obtain galactan as a powder. Kjeldahl method, infrared spectroscopy, viscosity determination and differential scanning calorimetry (DSC) were used to characterize structure and properties of the resulting material. It was found that the obtained galactan had agar structure without sulfate as a substitute group. Proteins content, intrinsic viscosity and thermal resistance of the galactan extracted in water at 40 °C were higher than those of the galactan extracted in water at 100 °C.

Keywords: *Gracilaria verrucosa*, galactan, structural characterization, intrinsic viscosity, DSC

1. Giới thiệu

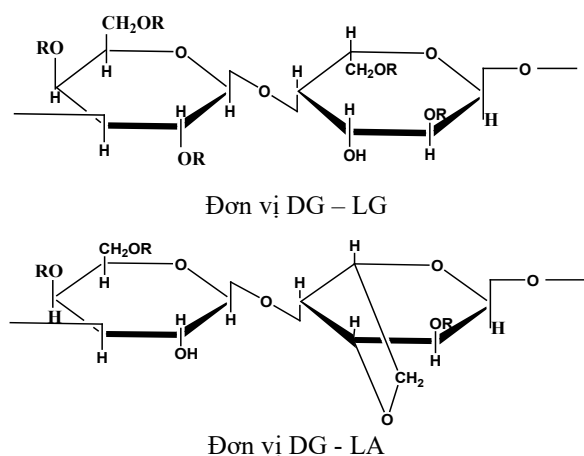
Rau câu chỉ vàng là một loại rong phổ biến ở bờ biển Việt Nam, có tên khoa học là *Gracilaria verrucosa* (*G. verrucosa*), thuộc ngành rong đỏ *Rhodophyta* [1,2]. Từ lâu, loại rau câu này đã được người dân dùng làm thức ăn. Nhiều món ăn quen thuộc được chế biến từ rau câu như nộm, thạch hoặc canh. Theo các tài liệu đã công bố, trong *G. verrucosa* chứa các galactan tan tốt trong nước tạo thành gel [3,4]. Loại galactan này có thể dùng làm chất tạo đông trong thực phẩm hoặc trong các ngành kỹ thuật, dùng chế tạo thạch agar làm môi trường nuôi cấy vi khuẩn, chế thuốc nhuận tràng, làm chất nhũ hóa...

Cấu trúc của galactan tách từ *Rhodophyta* cũng được công bố rộng rãi trong nhiều công trình nghiên cứu [5-8]. Các loại mắt xích thường thấy trong các chuỗi galactan này là β -D-galactopyranosơ (G), α -D-galactopyranosơ (DG) và α -L-galactopyranosơ (LG). Thông thường, các mạch galactan này được tạo thành

do sự lặp lại của G-DG hoặc G-LG. Nếu chuỗi galactan gồm các đơn vị G-DG thì được gọi là cấu trúc cacrageenan, nếu gồm các đơn vị G-LG thì được gọi là cấu trúc agar. Đôi khi, các mắt xích DG và LG có thể tồn tại ở dạng anhidrit tương ứng là 3,6-anhydro- α -D-galactopyranosơ (DA) và 3,6-anhydro- α -L-galactopyranosơ (LA). Thí dụ, các cấu trúc có thể có của agar được trình bày trên hình 1. Một đặc điểm quan trọng trong cấu trúc galactan tách từ *Rhodophyta* nói chung và *G. verrucosa* nói riêng là sự tồn tại của các nhóm thế sắp xếp ngẫu nhiên trên mạch galactan. Nguyên tử H trong các nhóm OH của vòng galactopyranosơ thường bị thay thế bởi các nhóm như metyl, sulfat, pyruvat... Tùy thuộc điều kiện tự nhiên như thời điểm thu hoạch, thời tiết, nhiệt độ, thổ nhưỡng, rau câu sẽ cho galactan với số nhóm thế trong mỗi vòng galactopyranosơ rất khác biệt. Các nhóm thế này quyết định các đặc tính hoá lý cũng như chất lượng của galactan.

Các nghiên cứu về cấu trúc, tính chất của galactan tách từ *G. verrucosa* đã được tiến hành khắp nơi trên thế giới. Tuy nhiên như đã biết, tính chất và cấu trúc của loại galactan này tách phụ thuộc rất lớn vào điều kiện sinh trưởng của cây. Ở Việt Nam, các nghiên cứu về loài rau câu chỉ vàng chủ yếu nhằm

phân loại, tìm hiểu ứng dụng của nó trong thực phẩm, thuốc chữa bệnh [1,9]. Trong công trình này, chúng tôi tiến hành chiết tách galactan bằng cách ngâm rau câu trong nước nóng ở các nhiệt độ khác nhau. Sau đó chúng tôi thực hiện quy trình tinh chế để xác định rõ cấu trúc và tính chất của sản phẩm. Thành phần, cấu trúc của galactan được xác định thông qua phương pháp xác định hàm lượng nitơ và phổ hồng ngoại FT-IR. Đặc tính nhớt và tính chất nhiệt của galactan được xác định thông qua phương pháp đo độ nhớt và nhiệt quét vi sai (DSC). Nghiên cứu này nhằm khảo sát những đặc điểm về cấu trúc và một số tính chất của galactan tách từ *G. verrucosa*, từ đó góp phần nâng cao giá trị của loại rau câu phổ biến này.



Hình 1. Các đơn vị trong cấu trúc agar (R có thể là H, hoặc các nhóm thế như methyl, sunfat, pyruvat).

2. Thực nghiệm

2.1. Nguyên liệu và hoá chất

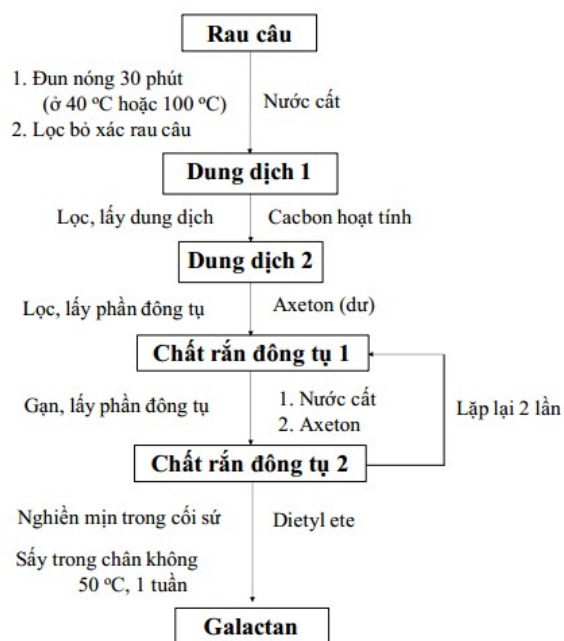
Rau câu chỉ vàng *G. verrucosa* được thu hoạch vào tháng 5 và tháng 6 tại bờ biển tỉnh Nam Định - Việt Nam. Rau câu thu hoạch xong được rửa sạch đất cát, ngâm trong dung dịch NaOH 10% trong 8 giờ để tẩy trắng. Sau đó, rau câu được lấy ra rửa sạch đến khi nước rửa trung tính, phơi khô dưới ánh sáng mặt trời trong 24 giờ.

Các hoá chất dùng trong nghiên cứu bao gồm: NaOH (99,9%), axeton (99,5%), dietyl ete (99,5%), than hoạt tính (99,9%) là sản phẩm của Nacalai Tesque (Nhật Bản). K_2SO_4 (99,9%), $CuSO_4$ (99,9%), H_2SO_4 (98%) và thuốc thử Nessler là hoá chất của Merck (Đức). Các hoá chất sử dụng không cần tinh chế lại.

2.2. Quy trình tách galactan từ rau câu

Chúng tôi thử nghiệm tách galactan trong rau câu *G. verrucosa* theo hai quy trình: tách ở 40 °C và ở 100 °C. Trước hết, rau câu được xay nhỏ mịn, ngâm trong nước cất 8 giờ, sau đó đun nóng (ở 40 °C hoặc ở 100 °C) trong 30 phút. Lọc bỏ xác rau câu, thu được dung dịch 1. Thêm than hoạt tính vào dung dịch 1, lắc trong 2 giờ, sau đó lọc, thu được dung dịch 2. Đổ từ

từ dung dịch 2 vào axeton (lấy dư), lọc thu được chất rắn đông tụ 1. Hoà tan chất rắn này trong nước cất để thu được dung dịch, tiếp tục đông tụ dung dịch bằng axeton, thu được chất rắn đông tụ 2. Lặp lại quá trình này hai lần để làm sạch các tạp chất trong mẫu. Cuối cùng rửa chất rắn đông tụ 2 bằng axeton, sau đó cho vào cối sứ, rót thêm dietyl ete và nghiền mịn, thu được galactan. Sản phẩm dạng bột được làm khô ở 50 °C trong 1 tuần. Quy trình này được trình bày trong hình 1. Sản phẩm thu được bằng cách đun rau câu ở 40 °C và ở 100 °C được kí hiệu lần lượt là G40 và G100. Các mẫu được bảo quản trong bình hút ẩm.



Hình 2. Quy trình tách galactan từ rau câu.

2.3. Nghiên cứu đặc trưng cấu trúc và tính chất

Phổ hồng ngoại (FT-IR) của G40 và G100 được đo trên máy phổ Jasco FT/IR 480 Plus theo kỹ thuật ATR. Mẫu được trộn đều với bột KBr, sau đó ép viên. Quá trình đo được thực hiện ở nhiệt độ phòng, số vòng quét 64, tần số quét từ 400 đến 4000 cm^{-1} .

Hàm lượng nitơ trong mẫu được xác định bằng phương pháp Kjeldahl theo TCVN 9937 : 2013 (trương đương với ISO 5378 : 1978). Lấy khoảng 0,5 gam galactan và 0,75 gam xúc tác (gồm K_2SO_4 và $CuSO_4$ với tỉ lệ 97:3 theo khối lượng), trộn đều rồi cho vào bình hình quả lê. Cho 20 ml dung dịch H_2SO_4 98% vào bình, đun trong 2 giờ để đảm bảo vô cơ hoá hoàn toàn mẫu, nitơ trong mẫu chuyển thành dạng $(NH_4)_2SO_4$. Thêm dung dịch NaOH 40% vào hỗn hợp sau phản ứng và chưng cất, NH_3 sinh ra được thu vào bình hứng chứa 25 ml dung dịch axit sunfuric 0,1N. Lấy V ml dung dịch thu được, thêm nước cất và 1,0 ml thuốc thử Nessler để thể tích dung dịch là 50 ml. Đo mật độ quang của dung dịch này trên máy quang phổ V-7200 UV-VIS-NIR tại bước sóng 430 nm. Nồng độ nitơ trong mẫu được xác định dựa

vào đường chuẩn nồng độ amoni sunfat – mật độ quang được xây dựng từ trước. Tiến hành thí nghiệm tương tự với mẫu trắng là đường saccarozo. Hàm lượng nitơ tổng (% khối lượng) trong mẫu được tính theo công thức:

$$N(\%) = \left(\frac{m_1 - m_2}{V} \right) \times \frac{1}{50m_o} \quad (1)$$

Trong đó: V là thể tích của phần dung dịch chung cất được (ml), m_o là khối lượng galactan đã dùng (g); m_1 là khối lượng nitơ trong V ml dung dịch chung cất từ mẫu thử đã phân hủy; m_2 là khối lượng nitơ trong V ml dung dịch chung cất từ mẫu trắng. Giá trị m_1 và m_2 đều xác định được từ đường chuẩn, tính bằng microgram (μg). Mỗi phép đo được lặp lại 3 lần với một mẫu và lấy kết quả trung bình.

Độ nhớt của mẫu được đo bằng nhớt kế Ubbelohde ở 25 °C. Galactan được pha trong nước cất với các nồng độ khác nhau. Các dung dịch được lần lượt cho vào nhớt kế, đo thời gian chảy của chất lỏng giữa hai vạch cố định trên nhớt kế. Độ nhớt riêng của mẫu galactan được tính theo công thức:

$$\eta = \frac{t - t_o}{t_o} \quad (2)$$

Trong đó: t là thời gian chảy của dung dịch galactan (s), t_o là thời gian chảy của nước cất (s). Mỗi phép đo được lặp lại 3 lần với một mẫu và lấy kết quả trung bình. Vẽ đồ thị $\frac{\eta}{C} = f(C)$, ngoại suy đến giá trị $C = 0$ sẽ thu được giá trị độ nhớt đặc trưng của mẫu.

Nhiệt quét vi sai (DSC) được đo trên máy DSC 7020 (SII NanoTechnology Inc.). Mẫu được nén trong chén nhôm tiêu chuẩn và hàn kín. Phép đo được tiến hành từ nhiệt độ phòng tới 250°C, tốc độ gia nhiệt là 10°C/phút.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Hàm lượng nitơ trong mẫu

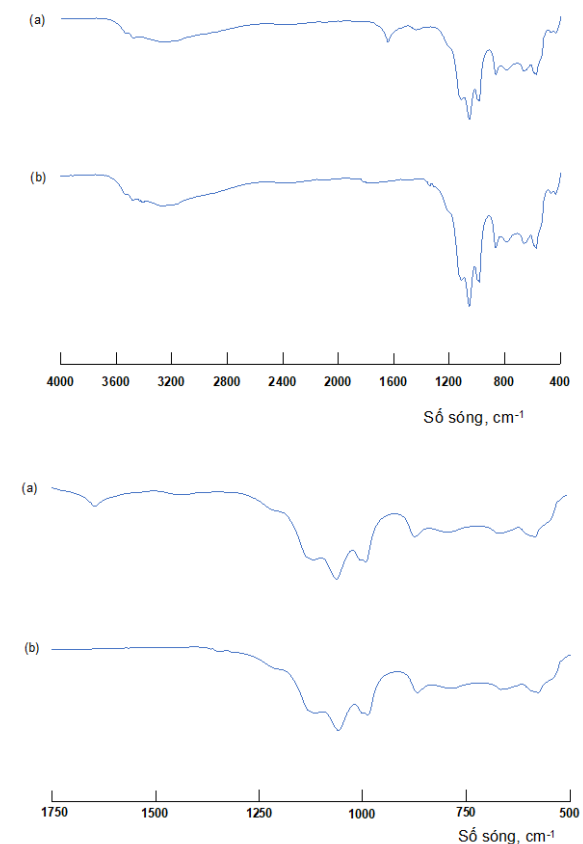
Bảng 1 trình bày kết quả xác định hàm lượng nitơ tổng có trong các mẫu. Kết quả khảo sát cho thấy mẫu galactan chiết ở nhiệt độ thấp (mẫu G40) có hàm lượng nitơ cao gấp hơn 4 lần mẫu chiết ở nhiệt độ cao (mẫu G100). Hàm lượng nitơ tỉ lệ thuận với hàm lượng protein, từ đó có thể suy ra mẫu G40 có hàm lượng protein cao hơn G100. Điều này có thể giải thích là do ở nhiệt độ cao, protein trong rau câu đã phân hủy một phần, nên galactan tách từ rau câu sẽ có hàm lượng protein thấp. Protein trong rau câu thường đóng vai trò quan trọng, thí dụ là chất chống oxy hoá [10]. Như vậy, từ kết quả thí nghiệm có thể suy ra rằng việc đun sôi rau câu trong nước làm giảm đáng kể giá trị của galactan.

Bảng 1. Hàm lượng nitơ có trong các mẫu.

Tên mẫu	Hàm lượng nitơ (% khối lượng)
G40	0,88
G100	0,21

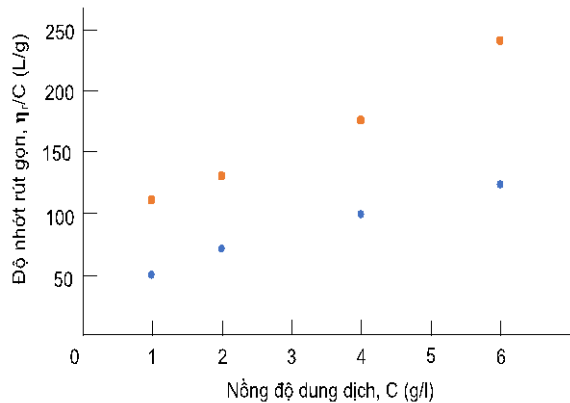
3.2. Cấu trúc galactan

Để xác định rõ hơn thành phần và cấu trúc của các mẫu G40 và G100, chúng tôi phân tích phổ FT-IR của chúng. Phổ FT-IR của mẫu G40 và G100 được trình bày trong hình 3. Có thể nhận thấy phổ của G40 và G100 tương đối giống nhau. Trên các phổ này đều xuất hiện một dải tín hiệu rộng trong khoảng từ 3600 đến 2800 cm^{-1} . Dải tín hiệu này có thể quy kết cho dao động kéo dãn của liên kết O-H. Đây là tín hiệu quen thuộc xuất hiện trong phổ của các galactan. Bên cạnh đó, trong các phổ đều xuất hiện vân hấp thụ tại 1083 cm^{-1} , 1056 cm^{-1} và 987 cm^{-1} . Theo các tài liệu tham khảo [6,11], các tín hiệu này lần lượt được quy kết cho dao động kéo dãn của liên kết C-O, liên kết C-C và nhóm C-O-C trong vòng 3,6-anhydro- α -L-galactopyranose. Thêm vào đó, trên phổ FT-IR của G40 và G100 xuất hiện tín hiệu tại 868 cm^{-1} và 779 cm^{-1} . Đây là tín hiệu đặc trưng của cấu trúc agar [7]. Như vậy, có thể kết luận rằng galactan đã được chiết tách thành công từ *G. verrucosa* và cấu trúc của chúng chủ yếu là agar.



Hình 3. Phổ FT-IR của mẫu (a) G100, (b) G40.

Điểm khác biệt quan trọng trong phổ FT-IR của G40 và G100 là: trên phổ của G40 xuất hiện hai đỉnh peak ở 1643 và 1420 cm^{-1} , trong khi đó trên phổ của G100 hầu như không thấy tín hiệu này. Theo tài liệu đã công bố, những tín hiệu này có thể quy kết cho dao động của các nhóm amin bậc I và bậc II trong protein [11]. Điều này chứng tỏ sự tồn tại của protein trong G40, phù hợp với kết quả thu được trong phần xác định hàm lượng nitơ.



Hình 4. Đồ thị biểu diễn mối liên hệ giữa độ nhớt rút gọn và nồng độ của dung dịch. ■: G100, ●: G40.

Trong phổ của cả G40 và G100, các tín hiệu đặc trưng của nhóm thế sunfat và nhóm thế pyruvic hoàn toàn không xuất hiện. Như vậy, agar tách từ rau câu theo phương pháp này có cấu trúc mắt xích tương đối đồng đều, không chứa có nhiều nhóm thế phức tạp. Trong công trình đã công bố, Sekkal và cộng sự đã dùng quy trình tương tự như trong bài báo này để tách galactan từ *G. verrucosa* thu hoạch tại Pháp. Kết quả từ phổ FT-IR cho thấy sản phẩm galactan đó có cấu trúc phức tạp, hàm lượng nhóm sunfat rất cao. Trong khi đó, các mẫu galactan do chúng tôi tách *G. verrucosa* của Việt Nam hầu như không chứa nhóm sunfat, do đó khả năng tạo gel sẽ rất cao [13].

3.3. Độ nhớt của dung dịch galactan

Đồ thị biểu diễn liên hệ giữa độ nhớt rút gọn (đại lượng $\frac{\eta}{C}$) và nồng độ của các dung dịch galactan được biểu diễn trên hình 4. Đối với mẫu G40, mối liên hệ này có sự phù hợp khá tốt với phương trình:

$$\frac{\eta}{C} = 25847C + 79,756 \quad (R^2 = 0,9885) \quad (3)$$

Trong khi đó, mối liên hệ giữa độ nhớt rút gọn và nồng độ của dung dịch G100 phù hợp khá tốt với phương trình trình:

$$\frac{\eta}{C} = 14422C + 38,303 \quad (R^2 = 0,9897) \quad (4)$$

Từ các đồ thị này, suy ra độ nhớt rút gọn của G40 và G100 lần lượt là 79,756 và 38,303 (L/g). Như

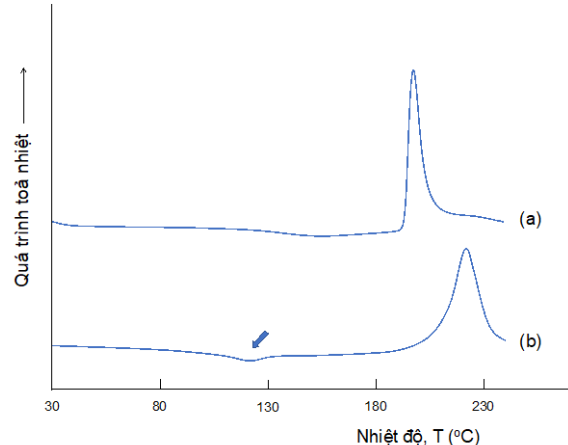
vậy, độ nhớt rút gọn của G40 cao gấp hơn 2 lần so với G100.

Theo các nghiên cứu đã công bố, trong dung dịch nước, các mạch galactan cuộn lại, thể tích các cuộn này càng lớn thì độ nhớt của dung dịch càng cao [5]. Như vậy, từ kết quả về độ nhớt ta suy ra rằng các cuộn polysacarit trong dung dịch G40 có thể tích lớn hơn so với dung dịch G100. Đặc tính này có thể liên quan đến thành phần protein có trong G40. Khi có protein, các cuộn galactan có thể mang điện tích (thường là điện tích âm). Do các điện tích đẩy nhau dẫn đến thể tích cuộn galactan tăng lên so với cuộn không mang điện tích. Đặc tính nhớt của dung dịch cũng liên quan đến khả năng tạo gel của các sản phẩm này. Có thể suy ra rằng, G40 dễ dàng tạo gel hơn G100.

Tính chất nhiệt là một đặc tính quan trọng, quyết định phạm vi ứng dụng của của loại galactan này. Chúng tôi nghiên cứu tính chất nhiệt của G40 và G100 thông qua giản đồ DSC, được thể hiện trên hình 5.

3.4. Tính chất nhiệt của galactan

Có thể nhận thấy sự khác biệt tương đối rõ rệt giữa tính chất nhiệt của G100 và G40. Trên đường DSC của G100 chỉ thấy một peak gây ra bởi quá trình toả nhiệt tại 198,8 $^{\circ}\text{C}$. Có thể suy ra rằng quá trình này là phản ứng phân huỷ bởi nhiệt của G100. Trên đường DSC của G40, chúng tôi nhận thấy 2 tín hiệu. Tín hiệu thứ nhất gây ra do quá trình thu nhiệt, xảy ra tại nhiệt độ 122,5 $^{\circ}\text{C}$; tín hiệu thứ hai gây ra do quá trình toả nhiệt, có đỉnh peak tại 223,2 $^{\circ}\text{C}$. Dựa vào đặc điểm thành phần, cấu trúc của G40, có thể kết luận rằng tín hiệu thứ nhất tại 122,5 $^{\circ}\text{C}$ tương ứng với sự chuyển pha của protein trong G40. Tín hiệu thứ hai có đỉnh peak tại 223,2 $^{\circ}\text{C}$ được quy kết cho quá trình phân huỷ của mẫu G40. Điều đáng chú ý là nhiệt độ phân huỷ của G40 cao hơn hẳn so với G100. Có thể thấy rằng do sự khác biệt trong cấu trúc của G40 (trong thành phần có hàm lượng protein tương đối cao) đã làm cho độ bền nhiệt của G40 cao hơn hẳn so với G100.



Hình 5. Giản đồ DSC của (a) G100 và (b) G40.

4. Kết luận

Chúng tôi đã thu được galactan từ rau câu *G. verrucosa* mọc tại bờ biển miền bắc Việt Nam bằng cách chiết với nước ở hai nhiệt độ khác nhau. Kết quả cho thấy galactan thu được có cấu trúc agar, không chứa các nhóm thế trong vòng galactopyranozo. Mẫu tách ở nhiệt độ thấp có chứa nhiều protein hơn, độ nhớt cao hơn và độ bền nhiệt tốt hơn so với mẫu tách ở nhiệt độ cao.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Bách khoa Hà Nội trong đề tài mã số T2018-PC-234.

Tài liệu tham khảo

- [1] V.K. Do. Status of production and utilization of seaweed in Vietnam. Proceedings of the Regional Workshop on the Culture & Utilization of Seaweeds, Philippines. FAO. 1990.
- [2] T.V. Nguyen, N.H. Le, S.M. Lin, F. Steen, O. De Clerck, A checklist of marine seaweeds of Vietnam, Bot. Mar. 56 (2013) 207-227.
- [3] E. Murano, Chemical structure and quality of agars from *Gracilaria*, J. Appl. Phyco. 7 (1995) 245-254.
- [4] R. Iyer, O. De Clerck, J.J. Bolton, V.E. Coyne, Morphological and taxonomic studies of *Gracilaria* and *Gracilariopsis* species (Gracilariales, Rhodophyta) from South Africa, S. Afr. J. Bot. 70 (2004) 521-539.
- [5] M. Lahaye, Chemistry and physico-chemistry of phycocolloids, Cah. Biol. Mar. 42 (2001) 137-157.
- [6] M. Lahaye, C. Rochas, Chemical structure and physico-chemical properties of agar, Hydrobiologia 221 (1991) 137-148.
- [7] A.I. Usov, Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups, Food Hydrocolloids 12 (1998) 301-308.
- [8] C.A. Stortz, A.S. Cerezo, Novel findings in carrageenans, agaroids and "hybrid" red seaweed galactans, Curr. Top. Phytochem. 4 (2000) 121-134.
- [9] D.H. Dang, M.H. Hoang, N.S. Pham, Seaweeds from Vietnam used for functional food, medicine and biofertilizer. J. Appl. Phycol. 19 (2007) 817-826.
- [10] B.W.S. Souza, M.A. Cerqueira, A. I. Bourbon, A.C. Pinheiro, J.T. Martins, J.A. Teixeira, M.A. Coimbra, A.A. Vicente, Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*, Food Hydrocolloids 27 (2012) 287-292.
- [11] E.G. Ordóñez, P. Rupérez, FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds, Food Hydrocolloids 25 (2011) 1514-1520.
- [12] M. Sekkal, J-P Huvenne, P. Legrand, B. Sombret, J-C. Mollet, A. Mouradi-Givernaud, M-C. Verdus, Direct structure identification of polysaccharides from red algae by FTIR microspectrometry I: Localization of agar in *Gracilaria verrucosa* sections, Mikrochim. Acta 112 (1993) 1-10.
- [13] T.T.T. Thanh, H. Yasunaga, R. Takano, H. Urakawa, K. Kajiwara, Molecular characteristics and gelling properties of carrageenan family 2. Tri-sulfated and tetra-sulfated carrageenans, Polym. Bull. 47 (2001) 305-312.