

ĐẶC ĐIỂM CẤU TRÚC CỦA AGAR POLYSACCHARIDE TRONG MỘT SỐ LOÀI RONG ĐỎ SỐNG TẠI VÙNG BIỂN NAM TRUNG BỘ

Trần Thị Thanh Vân, Bùi Minh Lý, Ngô Quốc Bửu
Phân Viện Khoa Học Vật Liệu tại Nha Trang

TÓM TẮT Agar chiết từ 4 loài rong *G. fisherii*, *G. tenuispititata*, *G. heteroclada* and *Gelidiella acerosa* ở Việt Nam có hàm lượng agarose và 3,6 anhydro nói chung là thấp hơn mẫu agar cũng chiết từ những loài này trên thế giới. Hàm lượng này giảm theo thứ tự như sau: *Gelidiella acerosa* > *G. heteroclada* > *G. tenuispititata* > *G. fisherii*. Mức độ methyl hóa của gốc D-galactose của agar chiết từ *Gracilaria* lớn hơn *Gelidiella*. Tất cả các mẫu agar đều chứa gốc L-galactose 6 sulphate và hàm lượng của nó được xếp theo thứ tự: *G. heteroclada* > *G. tenuispititata* > *G. fisherii* > *Gelidiella acerosa*.

STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF AGAR POLYSACCHARIDE EXTRACTED FROM SOME RED SEAWEED SPECIES IN THE SOUTHERN CENTRAL VIETNAM

Tran Thi Thanh Van, Bui Minh Ly, Ngo Quoc Buu
Branch of The Institute of Materials Science in Nha Trang

ABSTRACT The agar polysaccharides extracted from Vietnamese red seaweed species *G. fisherii*, *G. tenuispititata*, *G. heteroclada* and *Gelidiella acerosa* were separated on a DEA-Sephadex A-50 column and analyzed by IR, ¹H NMR spectroscopy methods and chemical analysis. The agarose content in the agar extracts was found to be lower than that from Japanese and Canadian *Gracilaria* seaweed species. The content of agarose in the agar polysaccharides decreases as follows: *Gelidiella acerosa* > *G. heteroclada* > *G. tenuispititata* > *G. fisherii*. It was found that the content of methoxyl group in agar from *Gracilaria* was higher than agar from *Gelidiella* genus, meanwhile pyruvyl group was identified only in agar from *Gelidiella acerosa*. All agar polysaccharides contain α -L-galactose 6-sulphate as an agarose precursor. The content of L-galactose 6-sulphate in agar decreased in the following order: *G. heteroclada* > *G. tenuispititata* > *G. fisherii* > *Gelidiella acerosa*.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Agar là một loại polysaccharide hầu như chỉ có trong Rong Đỏ (Rhodophyta). Cấu trúc cơ bản của phân tử agar là một dimer gồm một β -

D-galactose và một 3,6 - anhydro α -L-galactose được nối với nhau qua liên kết (1-4); trong khi các dimer được liên kết với nhau qua cầu nối (1-3). Cấu trúc trên thường biến đổi bởi sự thế các nhóm hydroxyl (OH) bằng các nhóm

sulphate hemiester hoặc/và methyl eter, pyruvic axit. Số các nhóm thế trên thay đổi tùy theo các loài rong khác nhau [9]. Agar có hai thành phần chính là agarose và agaropectin. Agarose hay phân đoạn agar trung tính là phân tử mạch dài với sự lặp lại của các disaccharide agarobiose, còn agaropectin là phân tử agar mang điện tích bao gồm gốc porphyran và khung agarose, trong đó các nhóm OH được thay thế một phần bởi các nhóm sulfate, pyruvic axit [1]. Porphyran được gọi là chất tiền tố của agarobiose (biological precursor of agarobiose) - là gốc duy nhất có thể tách SO_4^{2-} để tạo thành agarobiose khi được xử lý bằng kiềm hay phân hủy enzym [10].

Khả năng tạo gel của agar phụ thuộc thuận chiều vào hàm lượng agarose và ngược chiều vào hàm lượng agaropectin có trong agar [9]. Vì vậy khi biết được đặc điểm cấu trúc của agar từ các loài rong khác nhau không những cho phép đánh giá khả năng tạo gel của sản phẩm agar mà còn cho phép lựa chọn các loài rong thích hợp cho nguyên liệu đầu vào của công nghệ chế biến agar.

Trong bài báo này chúng tôi nghiên cứu đặc điểm cấu trúc của agar được chiết rút từ một số loài Rong Câu kinh tế ở các tỉnh phía Nam Trung Bộ.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu rong đã được lấy tại vùng biển Nam Trung Bộ - Việt Nam như sau:

1/ *Gracilaria fisherii*: ngày 14/4/2000 tại Quy Nhơn.

2/ *Gracilaria tenuistipitata*: ngày 14/4/2000 tại Quy Nhơn.

3/ *Gracilaria heteroclada*: ngày 16/4/2000 tại Phú Yên.

4/ *Gelidiella acerosa*: ngày 22/4/2000 tại Nha Trang.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Chiết agar polysaccharide và tách phân đoạn:

Chiết agar theo quy trình của Whyte và Englas [14] và ký hiệu mẫu như sau:

M₁: Agar chiết từ *G. fisherii*

M₂: Agar chiết từ *G. tenuistipitata*

M₃: Agar chiết từ *G. heteroclada*

M₄: Agar chiết từ *Gel. acerosa*

2.2. Tách phân đoạn và phân tích thành phần:

Agar polysaccharide hòa tan trong nước nóng có nồng độ 1mg/ml rồi cho chạy qua cột nhựa DEAE - Sephadex A50 (d=1cm, l=25 cm). Sau đó rửa giải lần lượt bằng các dung dịch NaCl có nồng độ 0,5, 1,0, 1,5, 2,5, 5N. Mỗi phân đoạn đều được đem phân tích.

2.3. Phân tích hóa học:

* Tổng hàm lượng cacbonhydrat: xác định bằng phương pháp phenol-sulphuric [4].

* Hàm lượng 3,6-anhydro - L - galactopyranose: xác định bằng phương pháp Resorcinol [17] với fructose làm chất chuẩn.

* Hàm lượng galactose và dẫn xuất của nó: xác định bằng phương pháp sắc ký khí thông qua phản ứng acetyl hóa các sản phẩm thủy phân của

agar theo qui trình [12].

Tất cả các thí nghiệm về phân tích hóa học được thực hiện tại phòng Hóa phân tích và triển khai công nghệ - Phân viện Khoa học Vật liệu tại Nha Trang. Phép đo thực hiện trên máy: UVPC - 1601 và GC - 17A của hãng Shimadzu.

3. Phân tích cấu trúc bằng phương pháp phổ hấp thụ hồng ngoại (IR)

Các mẫu polysaccharide được khảo sát bằng phương pháp phổ hồng ngoại trên máy Impac - 410 của hãng Nicolet sản xuất tại Đức, tại Viện Hóa - Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia.

Mẫu được ép viên với KBr theo tỷ lệ 20 mg mẫu/ 200 mg KBr phổ hấp thụ hồng ngoại được đo trong vùng 4000 - 400 cm^{-1} .

4. Phân tích cấu trúc bằng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

Phổ ^1H NMR được đo trên máy Bruker - 500 MHz trong dung môi D_2O và DMSO tại phòng Cộng hưởng từ hạt nhân - Viện Hóa Học - Trung tâm KHTN & CNQG.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tách phân đoạn và phân tích hóa học

Kết quả phân tích hóa học của từng phân đoạn trình bày trên bảng 1 cho thấy hàm lượng 3,6-anhydro galactose (AG) của các mẫu agar chiết từ các chi Rong Đỏ khác nhau có thể khác nhau một cách đáng kể. Đối với chi *Gracilaria* hàm lượng 3,6-AG trong

khoảng (23 - 27 %) còn đối với chi *Gelidiella* hàm lượng 3,6-AG là 40,2%. Trong khi đó hàm lượng trong cùng một chi ít thay đổi hơn. Chi *Gracilaria* có hàm lượng 3,6-AG thay đổi từ 25,3% (*G. fisherii*) đến 27,4% (*G. heteroclada*).

So với hàm lượng agarose và 3,6-AG của các mẫu agar chiết từ *Gracilaria* và *Gelidiella* của Nhật Bản và Chilê, hàm lượng agarose và 3,6-AG trong agar của Việt Nam nhỏ hơn đáng kể [2, 3, 15].

Từ bảng 1 ta thấy hàm lượng 3,6-AG giảm dần theo sự tăng nồng độ chất điện ly (NaCl) ở trong tất cả các mẫu nghiên cứu. Nhưng với 2 mẫu agar chiết từ *G. fisherii* và *G. tenuispititata*, từ phân đoạn 2,5 N NaCl đến phân đoạn 5,0 N - NaCl thì hàm lượng 3,6-AG lại tăng lên. Điều này có thể giải thích như sau: khi tăng nồng độ chất điện ly trong dung dịch rửa giải thì phân đoạn rửa giải càng chứa agar có nhiều nhóm tích điện (nhóm SO_4^{2-}). Nhóm SO_4^{2-} tồn tại chủ yếu ở gốc L-galactose 6 sulphate và D-galactose 4 sulphate. Nếu nhóm SO_4^{2-} đính ở gốc L-galactose 6 sulphate thì, trong mạch phân tử agar, gốc này thay thế gốc 3-6 anhydro L-galactose [14] và do đó làm giảm hàm lượng 3,6-anhydro L-galactose. Còn nếu nhóm SO_4^{2-} tồn tại ở gốc D-galactose 4-sulphate thì không ảnh hưởng đến hàm lượng 3,6-AG. Trong trường hợp này, với phân đoạn 5N NaCl 2 mẫu agar trên có thể chứa cả nhóm SO_4^{2-} ở gốc D galactose, do đó phân tử agar trở thành đối tượng mang điện tích. Vì vậy có thể dự đoán rằng mẫu agar chiết từ hai loài rong *G. fisherii* và *G. tenuistipitata* có thể chứa gốc D-galactose 4-sulphate.

Các sản phẩm thủy phân của các mẫu agar đã được axetyl hóa và cho chạy qua cột sắc kí khí dùng phương pháp nội chuẩn để xác định định tính galactose và dẫn xuất của nó.

Bảng 1: Thành phần các phân đoạn rửa giải trên nhựa DEAE - Sephadex A50 của agar polysaccharide

Mẫu	Phân đoạn	3,6-AG (trong từng phân đoạn), %	Sulphate tổng số, %	% phân đoạn (tính theo % cacbua hydrat)
Agar chiết từ <i>G. fisherii</i>	Agar	23,50	5,2	-
	H ₂ O	35,5		32,67
	0,5 N - NaCl	31,0		26,45
	1,0 N - NaCl	21,1		18,78
	2,5 N - NaCl	16,0		16,7
	5,0 N - NaCl	20,0		1,8
Agar chiết từ <i>G. tenuistipitata</i>	Agar	25,3	6,0	-
	H ₂ O	37,8		47,8
	0,5 N - NaCl	30,2		29,7
	1,0 N - NaCl	16,7		12,3
	2,5 N - NaCl	12,7		7,1
	5,0 N - NaCl	21,7		5,1
Agar chiết từ <i>G. heteroclada</i>	Agar	27,4	5,0	-
	H ₂ O	35,4		48
	0,5 N - NaCl	30,4		27
	1,0 N - NaCl	22,6		20,8
	2,5 N - NaCl	20,3		2,8
	5,0 N - NaCl	20,2		1,3
Agar chiết từ <i>Gel. acerosa</i>	Agar	40,2	2,7	-
	H ₂ O	46,2		71,0
	0,5 N - NaCl	37,0		8,0
	1,0 N - NaCl	36,0		6,5
	2,5 N - NaCl	33,5		11,5
	5,0 N - NaCl	29,0		4,0

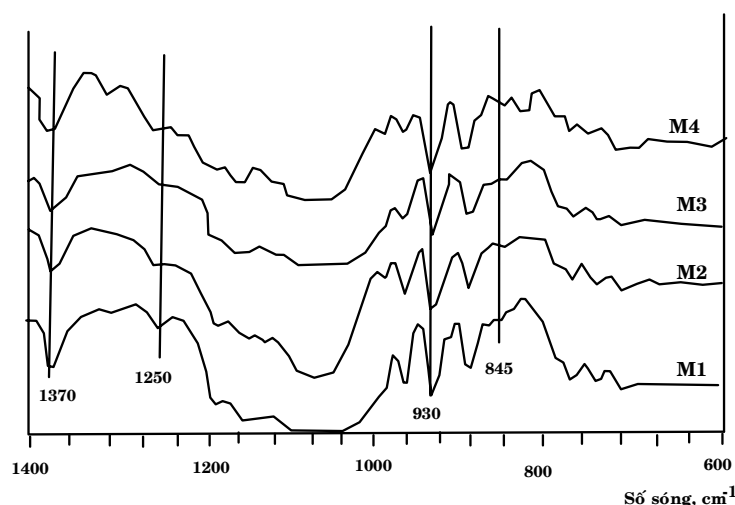
Bảng 2: Thành phần các loại đường chính có trong agar polysaccharide

Mẫu	Thành phần các loại đường					
	Galactose	2me- gal	6 me- gal	4 me -gal	Xylose	Glucose
M ₁	+	+	+	+	+	+
M ₂	+	+	+	+	+	+
M ₃	+	+	+	+	+	+
M ₄	+	-	-	-	+	+

Bảng 2 dẫn ra thành phần các loại đường được tìm thấy trong các sản phẩm thủy phân của agar. Từ bảng 2 dễ dàng thấy rằng với agar chiết từ *Gelidiella acerosa* trong sản phẩm thủy phân không thấy có các dẫn xuất của galactose. Điều này chứng tỏ rằng không có hoặc có rất ít nhóm methyl được gắn với gốc D-galactose của phân tử agar. Trong khi đó các mẫu agar chiết từ chi *Gracilaria* như *G. fisherii*, *G. tenuistipitata*, *G. heteroclada*, trong

sản phẩm thủy phân đều có các dẫn xuất của galactose ở các vị trí C-2, C-4, C-6. Vì vậy có thể nói rằng agar chiết từ chi *Gracilaria* đã được methyl hóa một phần ở các vị trí C4, C2, C6 của gốc D-galactose trong phân tử agar của chúng. Kết quả trên phù hợp với kết quả nghiên cứu của các công trình [5, 16].

2. Phân tích cấu trúc bằng phương pháp phổ hồng ngoại



Hình 1: Phổ hồng ngoại của các sản phẩm agar từ *G. fisherii* (M₁), *G. tenuistipitata* (M₂), *G. heteroclada* (M₃) và *Gel. acerosa* (M₄) lấy tại vùng biển Nam Trung Bộ

Trên phổ hồng ngoại của các mẫu agar (hình 1) thấy xuất hiện các giải hấp thụ ứng với các tần số sau: 2.920 cm^{-1} (dao động hóa trị của liên kết C-H), 1.250 cm^{-1} và 1.370 cm^{-1} (dao động hóa trị của liên kết S=O), 930 cm^{-1} (dao động hóa trị của liên kết C-O trong gốc 3,6-AG), đồng thời theo các số liệu đã được công bố [8, 11, 13], thì cường độ hấp thụ mạnh ở tần số này cũng do dao động hóa trị của liên kết C-O-S trong monomer D-galactose 4-sulfate.

Theo Rochas C. [11] có thể lấy đại lượng tỷ lệ cường độ hấp thụ của cặp tần số 930/2920 để đánh giá sự có mặt của gốc 3,6-AG cũng như gốc D-galactose 4-sulfate và cặp tần số 1250/2920 để đặc trưng cho tỷ lệ sunphat tổng số trên lượng đường tổng số đối với từng mẫu agar. Bảng 3 trình bày tỷ số cường độ của các cặp tần số hấp thụ hồng ngoại thu được đối với các mẫu M₁, M₂, M₃ và M₄.

Bảng 3: Tỷ số cường độ hấp thụ của các cặp tần số

Mẫu	930/2920	1250/2920
M ₁	1,296	1,037
M ₂	1,220	1,098
M ₃	0,788	0,990
M ₄	1,561	0,970

Số liệu dẫn ra trên bảng 3 cho thấy hàm lượng sulphate trong các mẫu agar giảm dần theo thứ tự sau: Mẫu 2 > Mẫu 1 > Mẫu 3 > Mẫu 4. Từ tỷ lệ cường độ hấp thụ của cặp tần số 930/2920 ta thấy chỉ có mẫu 3 có tỷ lệ < 1 còn lại các mẫu khác có tỷ lệ > 1. Điều này chứng tỏ rằng trong Mẫu 1, Mẫu 2 và Mẫu 4, ngoài 3,6-AG còn có chứa gốc D-galactose 4-sulphate [11]. Đồng thời trên phổ hồng ngoại của các mẫu này còn thấy xuất hiện giải hấp thụ ở tần số 845 cm⁻¹ (Dao động hóa trị của liên kết C-O-S của galactose 4-sulfate) [11] với cường độ yếu.

3. Phân tích cấu trúc bằng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân của các mẫu agar được trình bày trên hình 2. Trên phổ ¹H NMR của các mẫu agar trong dung môi DMSO thu được các tín

hiệu ¹H tương ứng với độ dịch chuyển hóa học từ 5,08 đến 3,18 ppm, nhưng với mẫu 6 (agar chiết từ *Gel. acerosa*) xuất hiện thêm 3 tín hiệu ở vùng trường cao là 1,55; 1,65; 1,68 ppm. Đây là những tín hiệu được gán cho ba proton của nhóm methyl trong khung pyruvic axit [6]. Như vậy agar chiết từ *Gelidiella acerosa* có chứa nhóm pyruvic axit.

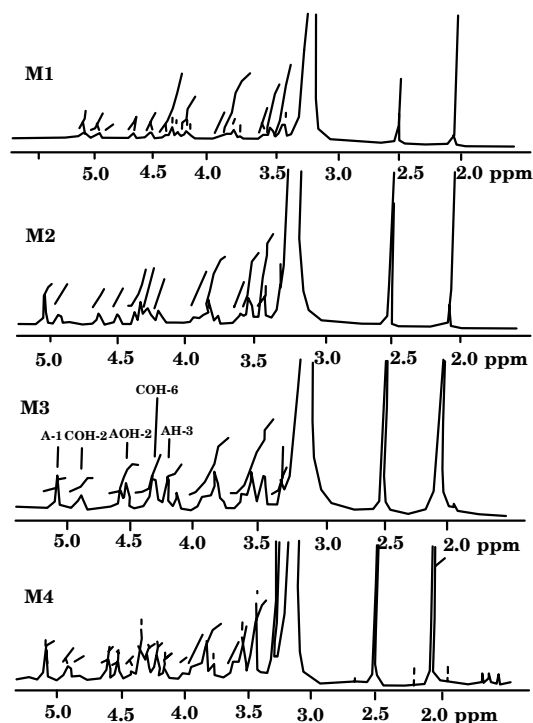
Trên phổ ¹H NMR của các mẫu agar trong dung môi D₂O ta thu được cụm hai tín hiệu của H ở trường thấp nhất ứng với độ dịch chuyển hóa học là 5,27 ppm và 5,15 ppm. Cụm tín hiệu này được gán cho nguyên tử H ở vị trí C₁ (A₁^{*}) của gốc L-galactose 6 - sulfate và nguyên tử H ở vị trí C₁ (A₁) của gốc L-galactose [7]. Theo M. Lahay [7] thì hàm lượng L-galactose 6-sulphate trên hàm lượng L-galactose được tính bằng công thức sau:

$$\frac{\text{L-galactose 6-sulfate}}{\text{L-galactose}} = \text{Tích phân} \frac{A_1^* \times 100}{A_1^* + A_1}$$

Tỷ lệ này được xem là đại lượng đặc trưng cho hàm lượng porphyran (precursor to agarobiose) có trong mẫu agar.

Từ số liệu thu được trên phổ ¹H NMR thay vào công thức ta thu được

kết quả như sau: 24% đối với agar chiết từ *G. fisherii*, 32% đối với agar chiết từ *G. tenuitispitata*, 35% đối với agar chiết từ *G. heteroclada*, 18% đối với agar chiết từ *Gel. acerosa*.



Hình 2: Phổ ^1H NMR của các mẫu agar chiết rút từ các loài rong *G. fisherii* (M₁), *G. tenuispititata* (M₂), *G. heteroclada* (M₃) và *Gel. acerosa* (M₄) của Việt Nam

IV. KẾT LUẬN

- ◆ Agar chiết từ 4 loài rong (*Gracilaria heteroclada*, *G. tenuispititata*, *G. fisherii*, *Gelidiella acerosa*) có hàm lượng agarose và 3,6 anhydro nói chung là thấp hơn mẫu agar chiết từ các loài rong tương ứng trên thế giới và các giá trị hàm lượng này giảm theo thứ tự như sau: *Gelidiella acerosa* > *Gracilaria heteroclada* > *G. tenuispititata* > *G. fisherii*.
- ◆ Mức độ methyl hóa của gốc D-galactose của agar chiết từ chi *Gracilaria* lớn hơn chi *Gelidiella* và vị trí của các nhóm methyl là C-2, C-4 và C-6.
- ◆ Tất cả các mẫu agar đều chứa gốc L-galactose 6 sulphate và hàm

lượng của nó trong các mẫu agar được xếp theo thứ tự các loài rong như sau: *Gracilaria heteroclada* > *G. tenuispititata* > *G. fisherii* > *Gelidiella acerosa*.

- ◆ Agar được chiết từ loài rong *Gracilaria tenuispititata*, *G. fisherii*, *Gelidiella acerosa* có chứa gốc D-galactose 4-sulphate.
- ◆ Agar chiết từ loài *Gelidiella acerosa* có chứa axit pyruvic.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Araki C., 1937. Acetylation of the agar-like substance of *Gelidium amansii*. J. Chem. Soc. Japan 58, 1338-1350.
2. Araki C., 1966. Some recent studies on the polysaccharides of agarophytes. In Young EG, Mc

- Lachlan. J.L (eds), Proceedings of the Fifth International Seaweed Symposium, Pergamon Press, Oxford, 3-17.
3. Chapman V. J., 1980. Seaweed and their uses, Third Edition London, New York.
 4. Duboi M. *et al.*, 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances, Anal. Chem. 28, 350-356.
 5. Guiseley K. B., 1989. Chemical and physical properties of algal polysaccharides use for cell immobilization. Enzyme microb. technol. 11, 706-711.
 6. Izumi K., 1973. Structural analysis of agar - type polysaccharide by NMR spectroscopy. Biochem. Biophys. Acta. 320, 311-317.
 7. Lahaye M., J. F. Revol, C. Rochas, J. McLachlan., W. Yaphe, 1988. The chemical structure of *Gracilaria crassissima* (P. et H. Crouan, G. Tikvahae McLachlan 9 Gigartinales, Rhodophyta) cell-wall polysaccharides. Botanica Marina, 31, 491-501.
 8. Lloy A. G., Dogson K. S., Price R. G., Rose F. A., 1961. Infrared studies of sulphate esters. II-Monosaccharide sulfate. Bioch. Biophys. Acta 76, 116-120.
 9. Murano E., 1995. Chemical structure and quality of agar from *Gracilaria*, J. Appl. Phycol.7, 245-264.
 10. Rees D. A., 1961. Enzymic desulphation of porphyran. Biochem. J. 80, 449-453.
 11. Rochas C., Lahaye M., Yaphe W., 1988. Sulphate content of carrageenan and agar determined by infrared spectroscopy. Bot. Mar. 29, 335-340.
 12. Stevens T. T. and Furneaux R. H., 1991. Chemical methods for the analysis of sulphate galactans from red algae. Carbonhydr. Res., 210, 277-298.
 13. Ward Piman, Derekhorton, 1980. The carbonhydrades chemistry/biochemistry. Second edition, volume IB, Academic press.
 14. Whyte J. N. C. and Englar J. R., 1979. Agar elaborated by *Gracilaria* sp. from the coast of British Columbia. Part I: Properties of agars isolated from algae collected at Bamfield, Wiseman's Bay and Nuttallbay. Fisheries and marine service technical report No. 860. British Columbia Canada 6, 1x2.
 15. Whyte J. N. C., Englar J. R., Saunders R. G., Lindsay J. C., 1981. Seasonal variation in the biomass, quantity and quality of agar, from the reproductive and vegetative stages of *Gracilaria* (verrucose type). Botanica Marina 26, 493-501.
 16. Womer M. C., 1982. The agarose monograph. Marine colloidsdivision, FMC Cooperation, Rockland, ME, part 3, 16 - 22.
 17. Yaphe W. *et al.*, 1965. Improved resorcinol reagent for the determination of fructose and 3,6 anhydro - L - galactose in polysaccharides, Anal. Biochem. 3, 143 - 148.