

Bài báo nghiên cứu

NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP POLY(LACTIC AXIT)
TỪ DỊCH NHỰA CÂY DỪA NƯỚC KIÊN GIANG (*NYPA FRUTICANS*)Nguyễn Quốc Trung^{1*}, Nguyễn Quốc Đạt¹,
Nguyễn Hồ Đức An¹, Võ Thị Thùy Giang¹, Hà Thúc Huy²¹Trường THPT Chuyên Huỳnh Mãn Đạt, Kiên Giang, Việt Nam²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam*Tác giả liên hệ: Nguyễn Quốc Trung – Email: quoctrungmd@gmail.com

Ngày nhận bài: 01-5-2021; ngày nhận bài sửa: 14-6-2021; ngày duyệt đăng: 18-6-2021

TÓM TẮT

Trong các loại polyme phân hủy sinh học hiện nay, Poly(lactic axit) (PLA) và các chất dẫn xuất có vai trò thực tiễn cao trong nhiều lĩnh vực. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tổng hợp PLA từ dịch nhựa cây dừa nước (*Nypa fruticans*). Kích thích budding dừa nước 14 ngày để thu được dịch nhựa. Dịch nhựa được lên men lactic bằng chủng *Lactobacillus plantarum* và *Lactobacillus acidophilus* sau đó trùng ngưng thu được PLA. Cấu trúc của sản phẩm được xác định bằng quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân (¹H-NMR). Đặc tính lí hóa của PLA được xác định bằng giản đồ nhiệt trọng lượng (TGA). PLA từ dịch nhựa cây dừa nước hứa hẹn sẽ trở thành vật liệu thay thế các loại nhựa có nguồn gốc từ dầu mỏ gây ô nhiễm môi trường như hiện nay.

Từ khóa: axit lactic; cây dừa nước; *Nypa fruticans*; Poly(lactic axit) (PLA)

1. Giới thiệu

Poly(lactic axit) (PLA) là một polyeste được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi nhất lịch sử loài người (Farah et al., 2016). Những thách thức về môi trường, kinh tế đã thôi thúc những nhà khoa học nghiên cứu giảm thiểu một phần nhựa có nguồn gốc từ hóa dầu bằng nhựa có thể phân hủy sinh học. PLA là một trong những polyme đi đầu trong “cuộc chạy đua xanh” này. PLA được chứng minh có khả năng thay thế các loại nhựa có nguồn gốc hóa dầu hay vật liệu sinh học dùng trong một số lĩnh vực y tế (Lopes et al., 2016; Jamshidian et al., 2010).

Dừa nước (*Nypa fruticans*) thuộc họ cau dừa (Plamae) là loài cây nhiệt đới chỉ mọc ở vùng nước lợ tập trung nhất là các cửa sông, dọc theo các kênh rạch và các con sông đào vùng ven biển. Dừa nước có thân cây và hệ thống rễ chằng chịt mọc ngang dưới lòng đất, chỉ có lá và cuống hoa mọc lên trên. Cây trồng thường ra hoa sau 3 năm, tập trung theo mùa.

Cite this article as: Nguyen Quoc Trung, Nguyen Quoc Dat, Nguyen Ho Duc An, Vo Thi Thuy Giang, & Ha Thuc Huy (2021). Research on synthesizing Poly(lactic acid) from Kien Giang's Nipa palm tree (*Nypa fruticans*). *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 18(6), 1126-1133.

Ở Việt Nam, mùa chính là từ tháng 6-10, đôi khi sớm hơn từ tháng 5 hoặc muộn hơn tháng 11, hoa có sớm hoặc muộn phụ thuộc vào nhiều yếu tố như thời tiết, dinh dưỡng đất, độ tuổi cây... (Ngo-Hoang et al., 2019). Dừa nước phân bố nhiều ở các nước Đông Nam Á, diện tích lớn nhất ở Indonesia (700.000 ha) (Flach et al., 1996). Tại Việt Nam, dừa nước tập trung chủ yếu ở vùng Đông và Tây Nam Bộ như: Thành phố Hồ Chí Minh, Bến Tre, Trà Vinh, Sóc Trăng, Bạc Liêu, Cà Mau... Ở Kiên Giang, dừa nước phân bố ở hầu hết các huyện nhưng chủ yếu là ở huyện An Biên, An Minh, U Minh Thượng, thành phố Hà Tiên, thành phố Phú Quốc.

Dịch nhựa cây dừa nước lấy từ cuống buồng đã được chứng minh có tiềm năng trong việc sản xuất etanol, sản xuất đường. Việc khai thác dịch nhựa dừa nước không những không ảnh hưởng đến cây mà còn giúp cho người dân bản địa có thêm nguồn thu nhập từ việc lấy nhựa. Philippines là một trong 3 nước đứng đầu thế giới về sản lượng dừa nước, họ chủ yếu sản xuất rượu mật hoa dừa theo cách lên men từ mật hoa dừa và làm ra loại rượu vang danh tiếng (Tamunaidu et al., 2013). Hiện nay, đã có nhiều công trình nghiên cứu liên quan đến việc lên men rượu từ dịch nhựa cây dừa nước do hàm lượng đường trong dịch nhựa rất cao, nhưng chưa thấy tài liệu nào công bố nghiên cứu lên men lactic từ nguồn nguyên liệu phong phú này.

Do đó, mục đích của nghiên cứu này là đánh giá khả năng lên men tạo axit lactic từ đường có trong dịch nhựa dừa nước tại Kiên Giang sau đó tiến hành trùng ngưng tổng hợp PLA. Dừa nước là nguồn nguyên liệu đầy hứa hẹn để sản xuất nhựa sinh học vì chứa nhiều đường hơn so với các loại cây nguyên liệu khác (Phetrit et al., 2020). Hơn nữa, dừa nước có tốc độ sinh sôi nhanh, không đòi hỏi chăm sóc, bón phân, không chiếm diện tích đất nông nghiệp. Đây là nguồn nguyên liệu khả thi và có triển vọng cao.

2. Vật liệu và phương pháp

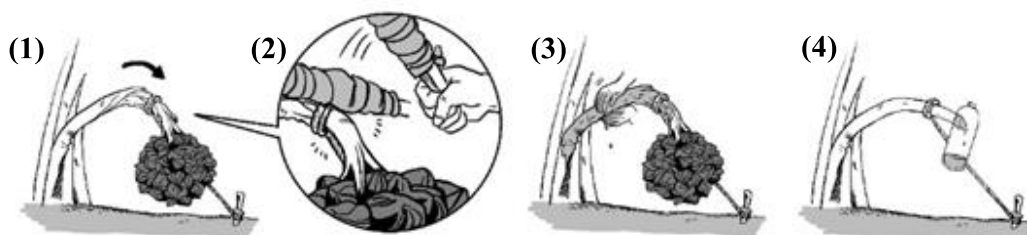
2.1. Hóa chất

Tất cả hóa chất sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm: $C_{32}H_{64}O_4Sn$, $CaCO_3$, NaOH, $(NH_4)_2SO_4$, MRS agar, MRS Broth, CH_3OH , C_2H_5OH , *p*-xylen của Merck.

Chủng *Lactobacillus plantarum* và *Lactobacillus acidophilus* được cung cấp bởi Phòng Thí nghiệm Sinh học Phân tử, Khoa Nông nghiệp và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Tiền Giang. Giống được giữ trong glycerol 10% ở nhiệt độ $-18^\circ C$.

2.2. Phương pháp thu dịch nhựa dừa nước

Kích thích cuống buồng bằng cách uốn cong buồng dừa xuống sát mặt đất sau đó dùng khúc gỗ vỗ vào cuống buồng. Dùng bùn vuốt đều từ gốc lên sát cuống buồng để tạo động lực cho nhựa chảy ra. Thực hiện tương tự cả sáng và chiều, liên tiếp không ngắt quãng. Thí nghiệm được khảo sát với 5 nghiệm thức: không kích thích buồng dừa, kích thích 5 ngày, 10 ngày, 14 ngày, 21 ngày. Tiến hành thu dịch nhựa 2 lần/ngày, mỗi lần cách nhau 12 giờ để tránh dịch nhựa tự lên men (Ngo-Hoang et al., 2019).



Hình 1. Các bước thu dịch nhựa dừa nước: Uốn cong buồng dừa xuống sát mặt đất (1); dùng gậy gỗ vỗ nhẹ vào cuống buồng (2); sử dụng bùn vuốt từ gốc đến ngọn của cuống (3); bắt đầu thu nhựa (4)

2.3. Phương pháp lên men axit lactic

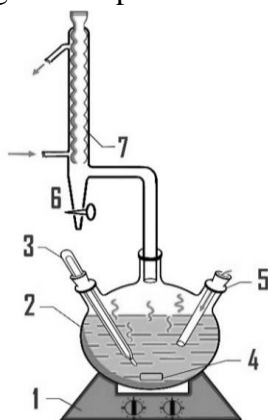
Axit lactic được lên men theo quy trình sau:

Hoạt hóa và tăng sinh vi sinh vật: Chủng *L. plantarum* và *L. acidophilus* được hoạt hóa bằng môi trường MRS Agar, sau đó nhân giống trong môi trường MRS Broth có bổ sung thêm 5% dịch nhựa dừa nước. Quá trình nhân giống được thực hiện trong bình tam giác trong thời gian 24 giờ ở $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Lên men dịch nhựa dừa nước: 1,0 L dịch nhựa dừa nước được bổ sung CaCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và điều chỉnh pH đến 6 ± 1 bằng dung dịch NaOH 1M. Cấy chủng vi khuẩn đã được tăng sinh đến mật độ 10^9 tế bào/mL. Đưa các bình tam giác vào máy lắc ổn định nhiệt ở $37 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 84 giờ để quá trình lên men kỵ khí xảy ra. Dịch sau khi lên men được diệt tế bào và li tâm để tách bỏ xác tế bào. Sau đó tiếp tục làm sạch dịch bằng than hoạt tính.

2.4. Tổng hợp PLA bằng phương pháp trùng ngưng trong dung dịch kèm tách loại nước

Cho 13,5 g axit lactic (0,15 mol) (đã làm khan trước khi phản ứng) trùng ngưng trực tiếp trong dung môi xylen, sử dụng xúc tác là $\text{C}_{32}\text{H}_{64}\text{O}_4\text{Sn}$ 1%. Cấp nhiệt cho hệ thống bằng bếp khuấy từ gia nhiệt từ đến khi sôi hỗn hợp và duy trì nhiệt độ từ $140 \pm 2^\circ\text{C}$ trong suốt quá trình phản ứng. Thời gian phản ứng là 30 giờ trong môi trường khí N_2 (được tính từ khi quan sát thấy nước và dung môi xylen ngưng tụ tại ống sinh hàn). Nước sinh ra trong quá trình phản ứng được tách bằng bộ phận tách nước. Kết tinh PLA ở nhiệt độ $5 \pm 1^\circ\text{C}$ bằng hỗn hợp metanol:nước. Lọc hút chân không thu sản phẩm.



Hình 2. Bộ thí nghiệm tổng hợp PLA: Bếp khuấy từ gia nhiệt (1); bình cầu ba cổ (2); nhiệt kế (3); cá từ (4); ống dẫn khí N_2 (5); bẫy tách nước (6); ống sinh hàn (7)

2.5. Phân tích tính chất của sản phẩm

Cấu trúc sản phẩm được xác định bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$ được thực hiện trên máy cộng hưởng từ hạt nhân NMR (Bruker 500MHz, Mỹ) tại Viện Hóa học (Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) và phổ hồng ngoại biến đổi FT-IR được thực hiện trên máy FT-IR (PerkinElmer, Mỹ) tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng (Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam). Hàm lượng axit lactic được kiểm tra bằng phương pháp sắc kí trao đổi ion trên máy IC-MS (Thermo Fisher, Mỹ). Độ bền nhiệt của PLA được đánh giá bằng giản đồ nhiệt trọng lượng trên máy TGA: SETARAM TA-Q200 (Setaram, Pháp).

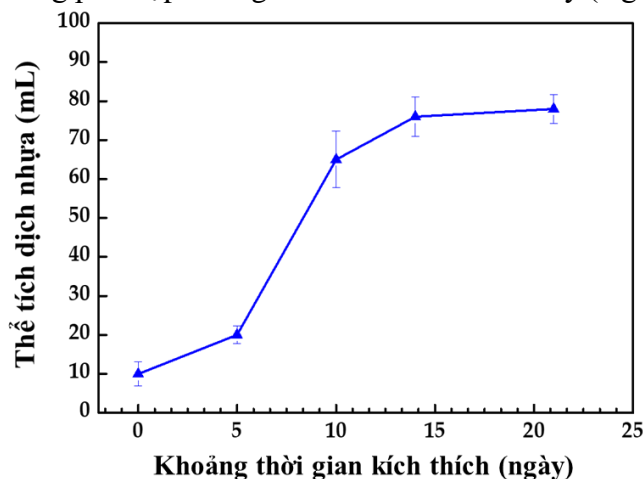
2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Phân tích kết quả được thực hiện bằng ORIGIN 8.5.1 (OriginLab Inc., Northampton, MA, USA). Thí nghiệm được thực hiện 3 lần và kết quả được biểu thị bằng trung bình \pm độ lệch chuẩn bằng phần mềm Microsoft Excel 2019. * ($p < 0,05$) được dùng để biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê và ns ($p \geq 0,05$) được dùng để biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của thời gian kích thích đến thể tích nhựa thu được

Kết quả cho thấy khi không kích thích buồng dứa lượng nhựa ra rất ít. Thể tích dịch nhựa tăng dần theo thời gian kích thích buồng dứa. So sánh các buồng được kích thích đến ngày thứ 14 và đến ngày 21, trong cùng một điều kiện kích thích, dịch nhựa thu được không có ý nghĩa thống kê ($p \geq 0,05$) (Hình 3). Vì vậy, thời gian kích thích buồng dứa nước tối ưu là 14 ngày, điều này cũng phù hợp với nghiên cứu đã có trước đây (Ngo-Hoang et al., 2019).

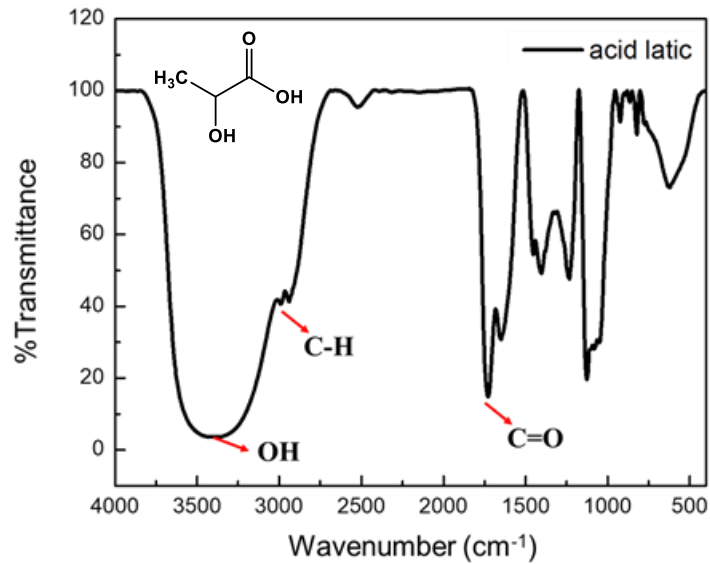


Hình 3. Sự ảnh hưởng của thời gian kích thích đến thể tích nhựa thu được

3.2. Kết quả lên men axit lactic

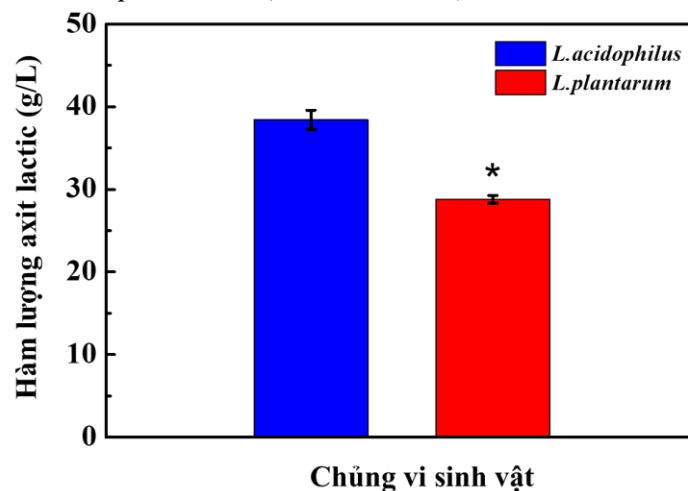
Phổ hồng ngoại của axit lactic (Hình 4) cho thấy vân hấp thụ đặc trưng cho liên kết OH tại $3386,53 \text{ cm}^{-1}$. Vân hấp thụ tại $2990,8 \text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho tín hiệu dao động hóa trị

C-H. Vân hấp thụ tại $1728,09\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho dao động hóa trị nhóm C=O, các vân hấp thụ tại $1127,38\div 1051,91\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho liên kết C-O.



Hình 4. Phổ hồng ngoại của axit lactic

Hàm lượng axit lactic được xác định thông qua phương pháp sắc kí trao đổi ion trên máy IC-MS (Thermo Fisher, Mỹ). So sánh hàm lượng axit lactic thu được của hai chủng *L. plantarum* và *L. acidophilus* (Hình 5), trong cùng điều kiện lên men, chủng *L. acidophilus* cho hàm lượng axit lactic là $38,4\pm 1,17\text{ g/L}$ cao gấp 1,3 lần so với chủng *L. plantarum* là $28,8\pm 0,47\text{ g/L}$ ($p < 0,05$). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu về lên men axit lactic sử dụng chủng *L. acidophilus* và *L. plantarum* (Le et al., 2020).

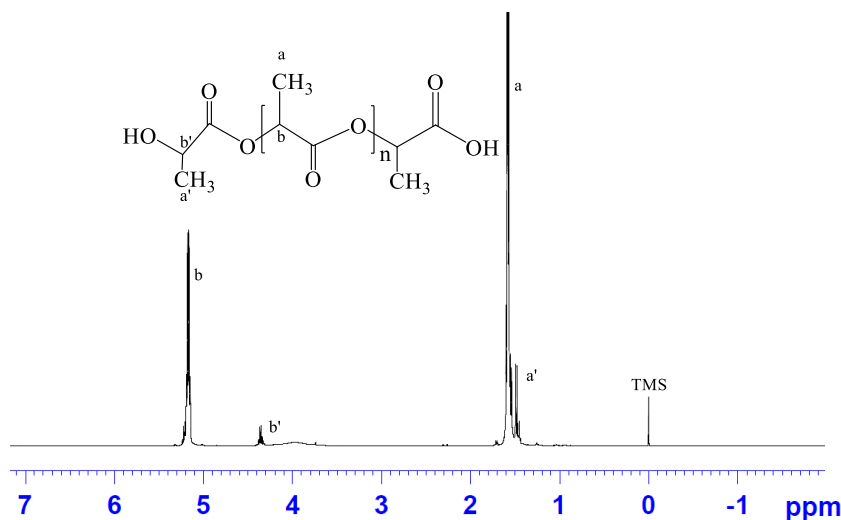


Hình 5. Kết quả lên men axit lactic của hai chủng vi sinh vật

*: ($p < 0,05$) Khác biệt có ý nghĩa thống kê.

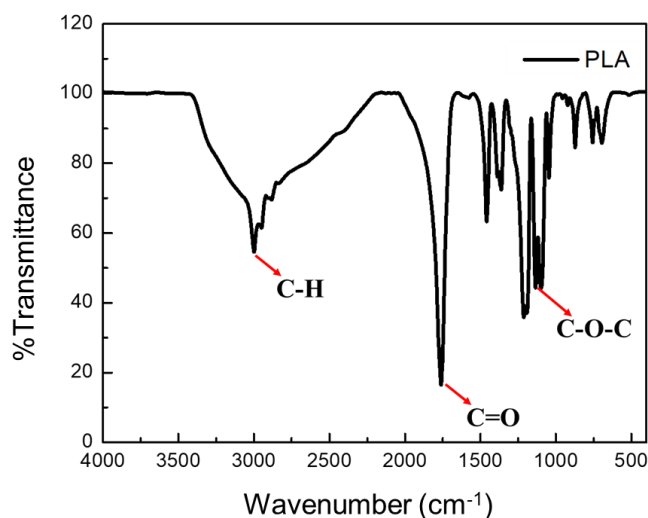
3.3. Kết quả tổng hợp PLA

PLA kết tinh được sấy chân không, sản phẩm thu được có khối lượng $6,18 \pm 1,47$ g. Kết quả phân tích $^1\text{H-NMR}$ (Hình 6) cho thấy độ dịch chuyển hóa học tương ứng với cấu trúc của PLA (500 MHz, CDCl_3) như sau: độ dịch chuyển hóa học của proton a và a' tại $\delta_{\text{H}} = 1,58$ ppm và $\delta_{\text{H}} = 1,48$ ppm, đỉnh doublet, tích phân 3 proton chứng tỏ có nhóm CH_3 cạnh nhóm CH , độ dịch chuyển hóa học của proton b và b' lần lượt tại $\delta_{\text{H}} = 5,18$ ppm và $\delta_{\text{H}} = 4,36$, đỉnh quartet, tích phân 1 proton chứng tỏ có nhóm CH cạnh CH_3 . Có sự khác nhau giữa độ dịch chuyển hóa học là do các proton b, b' nằm gần các nhóm chức hút điện tử nên hạt nhân bị giảm chắn và có vùng từ trường thấp hơn so với các proton a, a'.



Hình 6. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân của PLA

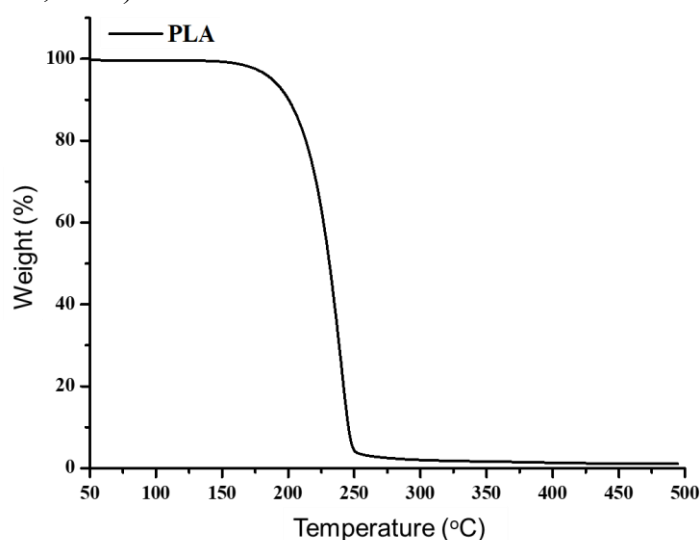
Phổ hồng ngoại của PLA (Hình 7). Vân hấp thụ tại $2998,75\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho tín hiệu dao động hóa trị nhóm $-\text{CH}$, vân $1760,11\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng dao động hóa trị $\text{C}=\text{O}$, các vân hấp thụ tại $1213,03\text{--}1098,26\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho liên kết $\text{C}-\text{O}-\text{C}$.



Hình 7. Phổ hồng ngoại của PLA

3.4. Giảm đồ nhiệt trọng lượng của PLA

Mẫu được nâng nhiệt từ 25-700°C với tốc độ 5°C/phút trong môi trường khí N₂ trên máy SETARAM TA-Q200 (Hãng sản xuất: SETARAM). Quan sát đường TG của mẫu (Hình 8) cho thấy mẫu bắt đầu có sự phân hủy ở nhiệt độ khoảng 150°C do sự mất nước trong cấu trúc của PLA và kết thúc ở nhiệt độ khoảng 250°C, giá trị cực đại của độ giảm khối lượng trên đường TGA ở 247,83°C. Ở nhiệt độ khoảng 250°C, quá trình nhiệt phân hủy đạt gần như hoàn toàn (98,95%) thành CO₂ và H₂O. Do mẫu vật tổng hợp trọng lượng phân tử còn thấp nên PLA của công bố có độ bền nhiệt thấp hơn so với nghiên cứu đã có trước đây (Vogel, & Siesler, 2008).



Hình 8. Giảm đồ nhiệt trọng lượng của PLA

4. Kết luận

Poly(lactic axit) đã được tổng hợp thành công thông qua axit lactic lên men từ dịch nhựa cây dừa nước. Thời gian kích thích buồng dừa nước tối ưu là 14 ngày. Hai chủng *Lactobacillus* khảo sát (*Lactobacillus acidophilus* và *Lactobacillus plantarum*) đều có khả năng lên men tạo axit lactic từ dịch nhựa cây dừa nước, trong đó chủng *Lactobacillus acidophilus* có khả năng lên men lactic cao hơn, đạt 38,4±1,17 g/L axit lactic. Hàm lượng PLA sau phản ứng trùng ngưng là 6,18±1,47 g. Đến nhiệt độ khoảng 250°C, PLA phân hủy gần như hoàn toàn (98,95%) (TGA). Kết quả của đề tài là tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn nhằm cải thiện khối lượng phân tử của Poly(lactic axit), bên cạnh đó còn nâng cao được giá trị sử dụng cây dừa nước ở Kiên Giang, góp phần mang lại lợi ích kinh tế cho người dân bản địa.

- ❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.
- ❖ **Lời cảm ơn:** Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn đến Trường THPT Chuyên Huỳnh Mẫn Đạt đã hỗ trợ chi phí thực hiện nghiên cứu này; chân thành cảm ơn Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng đã giúp đỡ thực hiện đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Farah, S., Anderson, D. G., & Langer, R. (2016). Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications—A comprehensive review. *Advanced drug delivery reviews*, 107, 367-392.
- Flach, M., & Rumawas, F. (1996). Plant resources of South-East Asia. *Backhuys Publ.*
- Jamshidian, M., Tehrani, E. A., Imran, M., Jacquot, M., & Desobry, S. (2010). Poly-lactic acid: production, applications, nanocomposites, and release studies. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9(5), 552-571.
- Le T. T. T., Ngo T. K. H. (2020). Investigation on lactic acid fermentation from molasses by *Lactobacillus*. *Can Tho University Journal of Science*, 56(4B), 54-60.
- Lopes, M. S., Jardini, A. L., & Maciel Filho, R. J. P. E. (2012). Poly (lactic acid) production for tissue engineering applications. *Procedia Engineering*, 42, 1402-1413.
- Ngo-Hoang, D. L. (2019). Exploiting and processing products from water soap of *nypa fruticans* wurmb in Mekong Delta (Vietnam), STINFO.
- Phetrit, R., Chaijan, M., Sorapukdee, S., & Panpipat, W. (2020). Characterization of nipa palm's (*Nypa fruticans* Wurmb.) sap and syrup as functional food Ingredients. *Sugar Tech*, 22(1), 191-201.
- Tamunaidu, P., Matsui, N., Okimori, Y., & Saka, S. (2013). Nipa (*Nypa fruticans*) sap as a potential feedstock for ethanol production. *Biomass and bioenergy*, 52, 96-102.
- Vogel, C., & Siesler, H. W. (2008). Thermal Degradation of Poly (ϵ -caprolactone), Poly (L-lactic acid) and their Blends with Poly (3-hydroxy-butyrates) Studied by TGA/FT-IR Spectroscopy. In *Macromolecular symposia* (Vol. 265, No. 1, pp. 183-194). Weinheim: WILEY-VCH Verlag.

RESEARCH ON SYNTHESIZING POLYLACTIC ACID
FROM KIEN GIANG'S NIPA PALM TREE (*NYPA FRUTICANS*)

Nguyễn Quốc Trung^{1*}, Nguyễn Quốc Đạt¹,

Nguyễn Hồ Đức An¹, Võ Thị Thủy Giang¹, Hà Thúc Huy²

¹Huynh Man Dat High School for the Gifted, Kien Giang province, Vietnam

²University Of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

*Corresponding author: Nguyễn Quốc Trung – Email: quoctrunghmd@gmail.com

Received: May 01, 2021; Revised: June 14, 2021; Accepted: June 18, 2021

ABSTRACT

Among biodegradable polymers, polylactic acid (PLA) and other derivatives are practical. This project aims to synthesize PLA from lactic acid (LA) pre-fermented, itself extracted from the sap of *Nypa fruticans*. The process begins with a 2-week stimulation process of the tree's fruit cluster to obtain the sap. It is then lactic acid fermented with *Lactobacillus plantarum* and subsequently condensed, producing PLA. Through Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and hydrogen-1 nuclear magnetic resonance (¹H-NMR), its structure was observed. PLA's physical and chemical properties were determined based on the thermalgravimetric analysis (TGA). PLA made from the sap of *Nypa fruticans* is expected to replace the environmentally-unsustainable petrochemical-based polymer.

Keywords: lactic acid; nipa palm tree; *nypa fruticans*; polylactic acid (PLA)