



Bài báo nghiên cứu

**ẢNH HƯỞNG CỦA NITƠ (NITRATE) LÊN SỰ TĂNG TRƯỞNG,
HÀM LƯỢNG PROTEIN VÀ KHẢ NĂNG CHỐNG OXY HÓA
CỦA *SPIRULINA* SP.**

Võ Hồng Trung*, Nguyễn Thị Hồng Phúc, Trần Đình Phương

Bộ môn Hóa sinh – Độc chất, Khoa Dược, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

*Tác giả liên hệ: Võ Hồng Trung – Email: vohongtrung2503@gmail.com

Ngày nhận bài: 22-8-2019; ngày nhận bài sửa: 16-10-2019; ngày duyệt đăng: 22-11-2019

TÓM TẮT

Spirulina sp. là sản phẩm thiên nhiên có giá trị dinh dưỡng và sinh học cao, được sử dụng làm thức ăn, dược phẩm chữa bệnh. Điều kiện nuôi cấy là yếu tố quan trọng quyết định đến chất lượng sản phẩm từ *Spirulina*. Trong môi trường có nồng độ NaNO_3 (5,0 g/L) cho sinh khối đạt (0,60 g/L) và hàm lượng protein (34,41%) cao hơn so với khối lượng sinh khối và hàm lượng protein được tạo ra khi nuôi cấy trong điều kiện nồng độ NaNO_3 thấp (1,25 g/L và 2,5 g/L). Khả năng chống oxy hóa, tích lũy protein và thành phần acid amin đều cao ở cả 2 chủng *Spirulina* sp. Mĩ và Nhật trong điều kiện nuôi cấy có nồng độ NaNO_3 5,0 g/L. Ngoài ra, hàm lượng phenolic tổng và khả năng chống oxy của hai chủng *Spirulina* sp. này có mối tương quan dương với nhau.

Từ khóa: *Spirulina* sp.; phương pháp Bradford; nitrate; protein; acid amin; chống oxy hóa

1. Giới thiệu

Spirulina là vi khuẩn quang hợp, sử dụng ánh sáng Mặt Trời như nguồn năng lượng, nước như chất cho electron và carbon dioxide như nguồn carbon tạo ra chất hữu cơ. *Spirulina platensis* có cấu trúc sợi, sử dụng nitrate, không cố định nitơ, giàu sắc tố như diệp lục tố *a*, carotenoid và phycobiliprotein. *Spirulina platensis* có hàm lượng protein cao chứa khoảng 60%-70% so với sinh khối khô, gồm 9 loại acid amin thiết yếu. Nitơ là thành phần thiết yếu để đồng hóa nitơ hoặc liên hợp với các phân tử chức năng và cấu trúc quan trọng ở sinh vật (Esen, & ÜREK, 2014).

Spirulina được xem là một nguồn thực phẩm chức năng do chứa một hàm lượng cao dinh dưỡng (protein, acid amin và acid béo thiết yếu, polysaccharid, carotenoid, vitamin và sắt) (Miranda, Cintra, Barros, & Mancini Filho, 1998). Nhiều nghiên cứu cho thấy *Spirulina* chứa khoảng 62,84% protein, acid amin thiết yếu (38,46% của protein), vitamin B12 (175 $\mu\text{g}/10\text{g}$) và acid folic (9,92 mg/100g), calci (922,28 mg/100g) và sắt (273,2mg/100g) (Sharoba, 2014).

Cite this article as: Vo Hong Trung, Nguyen Thi Hong Phuc, & Tran Dinh Phuong (2019). Effect of nitrogen (nitrate) on growth, protein content, and antioxidant capacity of the *Spirulina* sp.. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 16(12), 1018-1033.

Spirulina chứa các chất chống oxy hóa acid phenolic, tocopherol và beta-caroten (Miranda et al., 1998). *Spirulina* có vai trò trong hỗ trợ điều trị bệnh như hypercholesterolemia, hyperglycerolemia, bệnh tim mạch, bệnh viêm nhiễm, ung thư và nhiễm virus. Vai trò điều trị bệnh tim mạch nhờ vào hoạt tính tan trong lipid, chống oxy hóa và kháng viêm (Deng, & Chow, 2010). Môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng quan trọng lên sự sản xuất sinh khối và các hợp chất quan trọng. Nồng độ nitơ trong môi trường (tối ưu ở 2,5 g/L) và nguồn nitơ (urê tốt hơn ammonium và nitrate) có ảnh hưởng lớn lên sự sản xuất sinh khối của *Spirulina* (Delrue et al., 2017). Vì vậy, nghiên cứu này nhằm mục đích khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dinh dưỡng nitơ (nitrate) trong môi trường nuôi cấy lên sự tăng trưởng, hàm lượng protein, thành phần acid amin và hoạt tính chống oxy hóa của *Spirulina* sp.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Chủng *Spirulina* và môi trường nuôi cấy

Hai chủng tảo *Spirulina* sp. (Mĩ, nguồn gốc từ Mĩ) và *Spirulina* sp. (Nhật, nguồn gốc từ Nhật Bản) được cung cấp bởi Phòng Công nghệ Tảo – Trường Đại học Quốc tế – ĐHQG TPHCM. *Spirulina* sp. được nuôi cấy trên môi trường Zarrouk, pH = 8,5 - 9,0 (Pandey, Tiwari, & Mishra, 2010).

2.2. Các phương pháp phân tích

2.2.1. Quan sát hình thái tế bào *Spirulina* sp.

Hình thái tế bào *Spirulina* sp. được quan sát bằng kính hiển vi quang học với độ phóng đại 400X sau các ngày nuôi cấy.

2.2.2. Xác định sinh khối tế bào *Spirulina* sp.

Lấy 10 mL dịch nuôi cấy tảo lọc qua màng sợi thủy tinh, với đường kính màng là 47mm, đường kính lỗ 0,7 μm. Sau đó tảo được rửa với 20 mL nước cất hấp vô trùng, và sấy khô ở 103°C suốt 6 tiếng hoặc cho đến khi trọng lượng khô không đổi [A(g)]. Trọng lượng khô này tiếp tục được đốt ở 550°C để tạo tro [B(g)] (khoáng chất). Sinh khối [C(g)]: C=A-B (g) (Zhu, & Lee, 1997).

2.2.3. Xác định tốc độ tăng trưởng đặc hiệu

Sinh khối tế bào ở hai thời điểm khác nhau trong quá trình tăng trưởng của mẫu tảo được dùng để tính tốc độ tăng trưởng đặc hiệu (μ: g/L/ngày) trong khoảng thời gian đó theo công thức (Levasseur, Thompson, & Harrison, 1993):

$$\mu = \frac{\ln(Bio_2 / Bio_1)}{t_2 - t_1}$$

Trong đó: Bio₁, Bio₂: Sinh khối tế bào tại thời điểm 1 và 2

t₁, t₂: thời điểm 1 và 2

2.2.4. Xác định hàm lượng protein của *Spirulina* sp. bằng phương pháp Bradford

- Pha thuốc thử: cân 10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 hòa tan trong 50 mL ethanol 95%. Thêm 100 mL H₃PO₄ 85%, thêm nước cất vừa đủ 1000 mL (Bradford, 1976).

- Xác định hàm lượng protein tổng:

Lấy 1,0 mL dung dịch tảo li tâm 10.000 vòng trong 15 phút, loại bỏ dịch, cần được rửa nhiều lần với 1 mL nước cất (hấp vô trùng) bằng cách li tâm 10.000 vòng trong 15 phút. Thêm 1 mL ethanol tuyệt đối vào cần, trộn đều, đun cách thủy 5 phút ở nhiệt độ 50-60°C, sau đó làm nguội bằng nước lạnh đến nhiệt độ phòng. Li tâm 5000 vòng trong 5 phút, loại bỏ dịch lấy cần. Tiếp tục cho 200 µl nước cất hấp vô trùng, thêm 1 mL thuốc thử trộn đều và ủ 10 phút. Đo quang ở bước sóng 595 nm (Bradford, 1976).

- Đường chuẩn protein:

Sử dụng nồng độ protein chuẩn 10 đến 120 µg/mL được pha từ Bovine serum albumin và xác định nồng độ protein trong mẫu *Spirulina* sp. bằng phương trình $y = 0,003x + 0,0124$; $R^2 = 0,9951$.

2.2.5. Xác định hàm lượng phenolic tổng

➤ Xác định hàm lượng phenolic tổng (Goiris et al., 2012; Hajimahmoodi et al., 2010; Lim, Cheung, Ooi, & Ang, 2002):

- Lấy 1,0 mL dung dịch tảo li tâm 10.000 vòng trong 15 phút, loại bỏ dịch, cần được rửa nhiều lần với 1 mL nước cất (hấp vô trùng) bằng cách ly tâm 10.000 vòng trong 15 phút. Thêm 1 mL methanol tuyệt đối vào cần, trộn đều. Li tâm 5000 vòng trong 5 phút, bỏ cần thu được dịch chiết.
- Lấy 0,5 mL dịch chiết cho vào eppendorf 2 mL, cho thêm 0,5 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu's phenol, tiếp tục cho từ từ 0,5 mL dung dịch Na₂CO₃ 10%.
- Ủ 90 phút trong tối.
- Đo quang ở bước sóng 750 nm.

➤ Đường chuẩn phenolic:

Sử dụng nồng độ acid gallic chuẩn 10 đến 200 mg/L và xác định nồng độ phenolic tổng trong mẫu *Spirulina* sp. bằng phương trình: $y = 30,263x - 0,0638$; $R^2 = 0,9948$.

2.2.6. Xác định hoạt tính chống oxy hóa

➤ Pha thuốc thử DPPH: pha dung dịch thuốc thử DPPH với nồng độ 0,004% trong methanol (Tran, Doan, Louime, Giordano, & Portilla, 2014; Yaltirak, Aslim, Ozturk, & Alli, 2009).

➤ Lấy 1,0 mL dung dịch tảo li tâm 10.000 vòng trong 15 phút, loại bỏ dịch, cần được rửa nhiều lần với 1 mL nước cất (hấp vô trùng) bằng cách li tâm 10.000 vòng trong 15 phút. Thêm 1 mL ethanol tuyệt đối vào cần, trộn đều và ủ 4 tiếng ở 4°C. Li tâm 5000 vòng trong 5 phút, bỏ cần lấy dịch chiết.

➤ Lấy 0,5 mL dịch chiết cho vào eppendorf 2 mL, cho thêm 1 mL thuốc thử DPPH trộn đều. Ủ 30 phút trong tối, ở nhiệt độ phòng. Đo quang ở bước sóng 517nm.

➤ Khả năng chống oxy hóa (I%) được tính theo công thức (Albayrak, Aksoy, Sagdic, & Hamzaoglu, 2010; Tran et al., 2014; Yaltirak et al., 2009):

$$I\% = \frac{A_{\text{Mẫu trắng}} - A_{\text{Mẫu thử}}}{A_{\text{Mẫu thử}}} \times 100$$

Trong đó:

I%: Tỷ lệ phần trăm ức chế (Percentage inhibition)

A Mẫu trắng: độ hấp thụ của mẫu trắng tại bước sóng 517 nm

A Mẫu thử: độ hấp thụ của mẫu thử tại bước sóng 517 nm.

2.2.7. Xác định hàm lượng các acid amin theo hệ thống Pico – Tag

Sau 5 ngày nuôi cấy, tiến hành thu sinh khối *Spirulina* sp. bằng cách lọc dịch tảo qua túi lọc nylon monofilament với đường kính lỗ lọc là 25 µm. Sau đó rửa tảo nhiều lần với nước cất hấp vô trùng, lấy tảo trải đều trên giấy bạc và sấy khô ở nhiệt độ 60°C. Tảo sau khi sấy khô được bảo quản trong falcon có quần giấy bạc, để vào tủ đông -20°C.

Mẫu *Spirulina* đã sấy khô sẽ được gửi đến Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường (Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh) phân tích các thành phần và hàm lượng các acid amin thiết yếu bằng phương pháp Pico – Tag.

2.3. Phương pháp thiết kế thí nghiệm

2.3.1. Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của yếu tố nitơ lên sự tăng trưởng và hàm lượng protein ở *Spirulina* sp.

Spirulina sp. (Mĩ) đạt giai đoạn tăng trưởng sau khoảng 5 ngày nuôi cấy trên môi trường Zarrouk; pH = 8,5 – 9,5 (Pandey et al., 2010); được chiếu sáng liên tục với cường độ ánh sáng 30 µmol/phonton/m²/s, nhiệt độ 25 ± 2°C được sử dụng để bố trí thí nghiệm.

Thí nghiệm thực trên các bình nhựa 5L bao gồm: dịch tảo đạt giai đoạn tăng trưởng và thể tích môi trường Zarrouk vừa đủ 3,5L; sục khí liên tục và được chiếu sáng ở cường độ 100 µmol photon/m²/s (với chu kỳ sáng: tối, 12 giờ: 12 giờ) trong điều kiện ánh sáng cho hiệu suất tối ưu với 3 nồng độ NaNO₃ như sau: 1,25 g/L; 2,5 g/L; 5,0 g/L. Sau mỗi 2 ngày nuôi cấy, tiến hành phân tích các nghiệm thức.

2.3.2. Thí nghiệm 2: Nuôi cấy, thu sinh khối và phân tích thành phần acid amin

Hai chủng *Spirulina* sp. đạt giai đoạn tăng trưởng sau khoảng 5 ngày nuôi cấy trên môi trường Zarrouk; pH = 8,5-9,5 (Pandey et al., 2010); được chiếu sáng liên tục với cường độ ánh sáng 30 µmol/phonton/m²/s, nhiệt độ 25 ± 2°C được sử dụng để bố trí thí nghiệm.

Thí nghiệm thực trên các bình nhựa 5L bao gồm: dịch tảo đạt giai đoạn tăng trưởng và vừa đủ 3,5L môi trường Zarrouk, sục khí liên tục và được chiếu sáng ở cường độ 100 µmol photon/m²/s (với chu kỳ sáng: tối, 12 giờ: 12 giờ) trong điều kiện ánh sáng và nồng độ NaNO₃ cho hiệu suất tối ưu ở thí nghiệm 1 và 2. Vào ngày nuôi cấy thứ 3,4,5 phân tích các nghiệm thức và các nghiệm thức lặp lại 3 lần

Sau 5 ngày nuôi cấy tiến hành thu sinh khối tảo. Lọc dịch tảo qua túi lọc nylon monofilament với đường kính lỗ lọc là 25 µm. Sau đó rửa tảo nhiều lần với nước cất hấp vô

trùng, lấy tảo trải đều trên giấy bạc và sấy khô ở nhiệt độ 60°C. Tảo sau khi sấy khô được bảo quản trong falcon có quần giấy bạc, để vào tủ đông -20°C.

Mẫu *Spirulina* sp. đã sấy khô sẽ được gửi đến Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường (Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh) phân tích các thành phần và hàm lượng các acid amin thiết yếu bằng phương pháp Pico – Tag

2.4. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý bằng Microsoft office Excel 2013 và phân tích one way ANOVA bằng phần mềm SPSS 20.0 với sai số ý nghĩa $p < 0,05$. Tất cả các số liệu trong thí nghiệm được trình bày dưới dạng: Trung bình (Mean) \pm Sai số chuẩn (SE).

3. Kết quả và Thảo luận

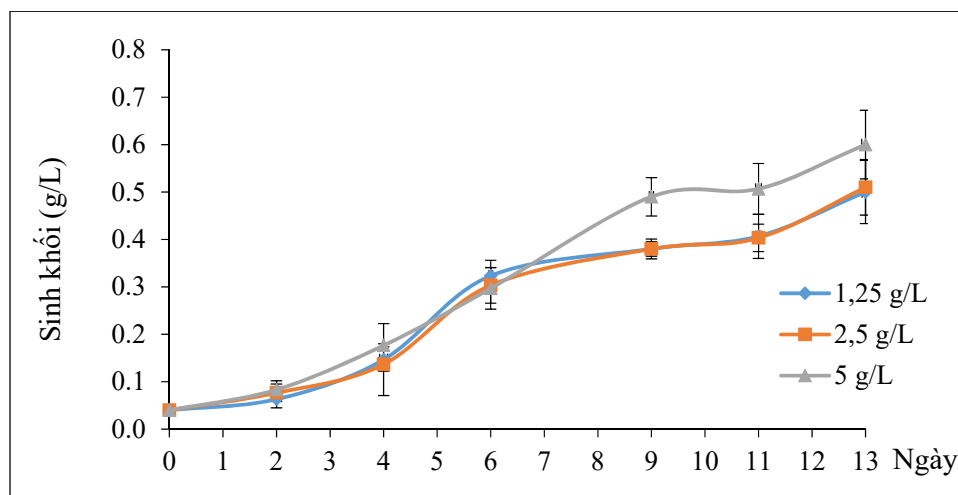
3.1. Ảnh hưởng của yếu tố nitơ lên sự tăng trưởng và hàm lượng protein ở *Spirulina* sp.

3.1.1. Sự tăng trưởng của *Spirulina* sp.

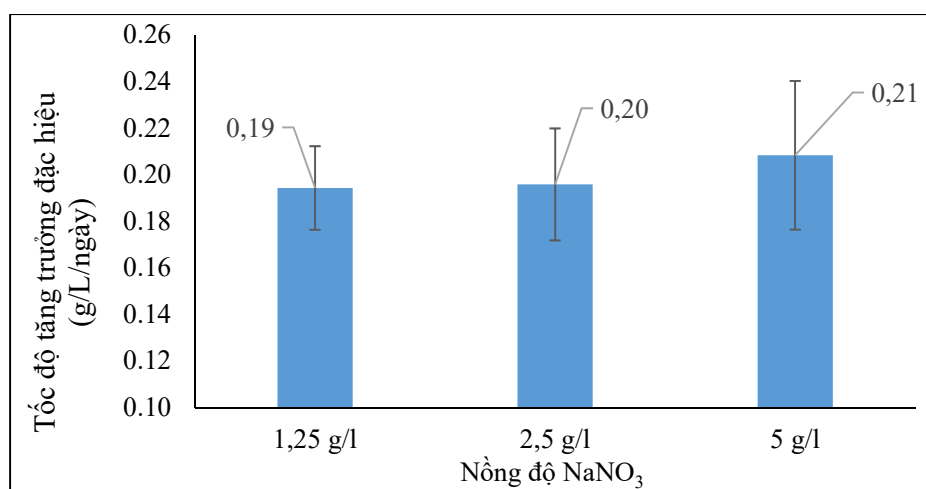
Kết quả thí nghiệm cho thấy, nồng độ NaNO_3 trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng lên sự tăng trưởng của quần thể tảo *Spirulina* sp. Tảo được nuôi cấy trong môi trường có nồng độ NaNO_3 cao (5,0 g/L) cho sinh khối đạt (0,60 g/L) sau 13 ngày nuôi cấy cao hơn so với khối lượng sinh khối được tạo ra khi nuôi cấy trong điều kiện nồng độ NaNO_3 1,25 g/L và 2,5 g/L (Hình 3.1).

Nồng độ nitơ cũng ảnh hưởng lên tốc độ tăng trưởng của *Spirulina* sp., tốc độ tăng trưởng đặc hiệu đạt cao nhất (0,21 g/L/ngày) khi nuôi cấy ở điều kiện môi trường có nồng độ NaNO_3 so với 2 điều kiện còn lại có nồng độ NaNO_3 thấp hơn (0,20 g/L/ngày và 0,19g/L/ngày). Tuy nhiên, không có sự khác biệt ý nghĩa về sinh khối và tốc độ tăng trưởng đặc hiệu của *Spirulina* sp. trong các điều kiện nuôi cấy với những nồng độ NaNO_3 khác nhau ($p > 0,05$) (Hình 3.1 và 3.2).

Sinh khối và quá trình tăng trưởng bị ảnh hưởng bởi các yếu tố hóa lí như chất dinh dưỡng, chất lượng và cường độ ánh sáng, nhiệt độ, độ pH và độ mặn (Bartley, Boeing, Daniel, Dungan, & Schaub, 2016; Kim, & Bum Hur, 2013; Yen, Hu, Chen, & Chang, 2014). Trong số các yếu tố dinh dưỡng, nitơ được coi là một trong những chất dinh dưỡng quan trọng cho sự tăng trưởng, vì nó là một thành phần trong tất cả các protein cấu trúc và chức năng như peptide, enzyme, diệp lục tố, phân tử truyền năng lượng và vật chất di truyền trong tế bào tảo (Cai, Park, & Li, 2013). Đặc biệt nguồn nitơ ảnh hưởng rất lớn đến khả năng tăng trưởng, tích lũy protein và lipid của tảo (Norici, Dalsass, & Giordano, 2002; Wan et al., 2012).



Hình 3.1. Sinh khối của *Spirulina* sp. trong các nồng độ NaNO_3 khác nhau

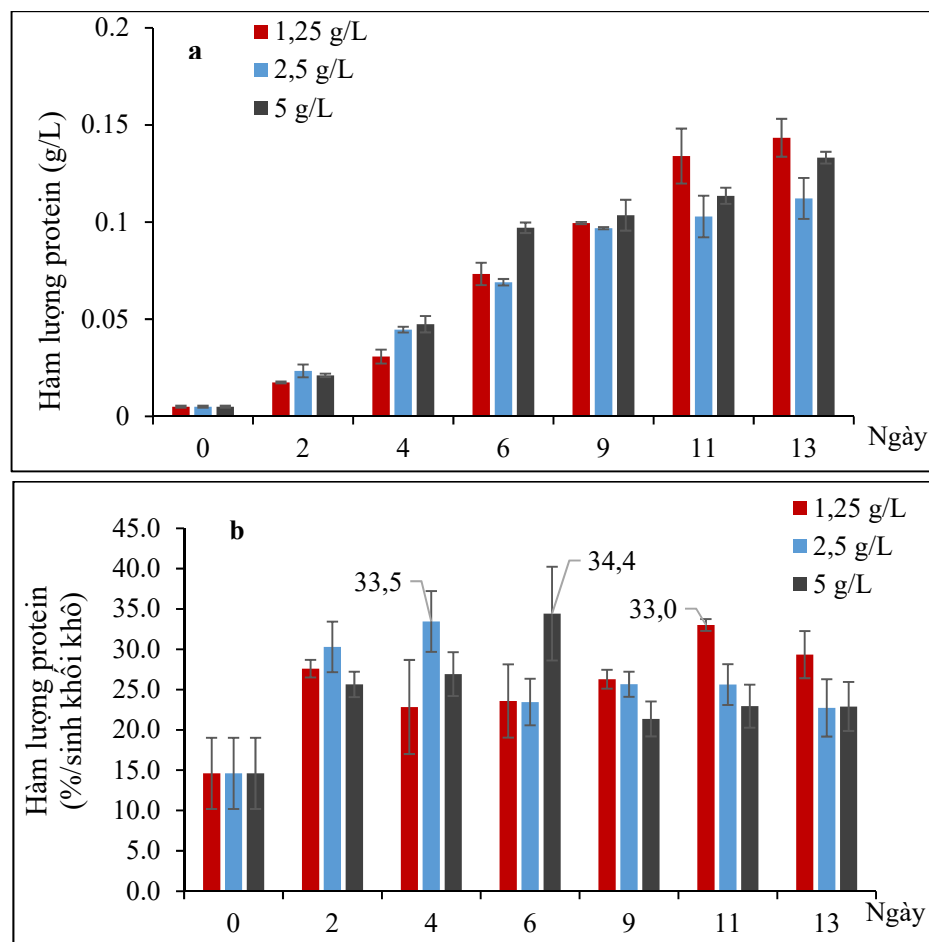


Hình 3.2. Tốc độ tăng trưởng đặc hiệu của *Spirulina* sp. trong các nồng độ NaNO_3 khác nhau

3.1.2. Hàm lượng protein của *Spirulina* trong các điều kiện nồng độ NaNO_3 khác nhau

Sự tích lũy hàm lượng protein (g/L) của *Spirulina* ở trong 3 điều kiện nồng độ NaNO_3 khác nhau có xu hướng tăng dần. Sau 13 ngày nuôi cấy, nồng độ protein ở 3 điều kiện NaNO_3 1,25 g/L; 2,5 g/L và 5,0 g/L lần lượt là: 0,14 g/L; 0,11 g/L và 0,13 g/L, $p > 0,05$ (Hình 3.3a).

Ở nồng độ NaNO_3 cao nhất (5 g/L) hàm lượng protein đạt được là lớn nhất (34,41%) sau 6 ngày nuôi cấy, hai nồng độ NaNO_3 thấp hơn (1,25 g/L và 2,5 g/L) có hàm lượng protein thấp hơn (33,02% sau 11 ngày nuôi cấy và 33, 45% sau 4 ngày nuôi cấy) (Hình 3.8b). Tuy không có sự khác biệt ý nghĩa về hàm lượng protein giữa các nồng độ NaNO_3 khác nhau ($p > 0,05$).



Hình 3.3. Hàm lượng protein tổng (g/L) (a) và phần trăm protein (%) (b) của *Spirulina* trong các nồng độ NaNO_3 khác nhau

Tóm lại, ta có thể thấy nồng độ NaNO_3 trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng khá rõ lên sự tăng trưởng và tích lũy protein của *Spirulina*. Khi tăng nồng độ NaNO_3 trong môi trường Zarrouk từ 1,25 g/L đến 5 g/L thì sinh khối, tốc độ tăng trưởng đặc hiệu và hàm lượng protein tổng của *Spirulina* tăng theo. Quá trình sản xuất các sản phẩm chính như protein, carbohydrate và các chất chuyển hóa của vi sinh vật bị ảnh hưởng rất lớn bởi điều kiện tăng trưởng (Abd El Baky, & El baroty, 2016). Nito là thành phần cơ bản cấu tạo các acid amin và các phân tử protein trong tế bào nên khi cung cấp đầy đủ nito, quá trình sinh tổng hợp protein được tăng cường và tạo tăng trưởng nhanh (Sukenic, Zmora, & Carmeli, 1993). Ngược lại, thiếu hụt nito trong môi trường nuôi là nguyên nhân làm giảm sinh khối, chậm tốc độ tăng trưởng tế bào, tăng hàm lượng lipid hoặc carbohydrate và giảm tổng hợp protein trong tế bào tảo (Pruvost, Van Vooren, Cogne, & Legrand, 2009). Sự gia tăng hàm lượng protein (30,02-34,41%) tương ứng với sự gia tăng các mức nito (1,25-5,0 g/L) trong nghiên cứu này là phù hợp với xu hướng chung của các kết quả nghiên cứu trước đó (Guillard, 1973;

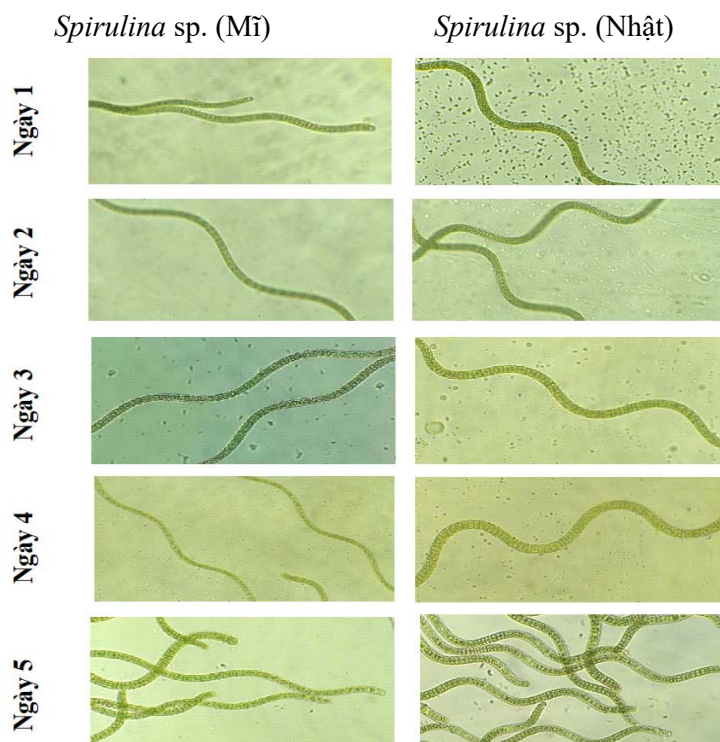
Ho, Ye, Hasunuma, Chang, & Kondo, 2014). Vì thế, ở Thí nghiệm 3 sử dụng nồng độ NaNO_3 5 g/L để nuôi cấy 2 chủng *Spirulina* sp. tiến hành xác định hàm lượng protein tổng, khả năng chống oxy hóa, thu sinh khối và định lượng các acid amin thiết yếu sau 5 ngày nuôi cấy.

3.2. Nuôi cấy, thu sinh khối và phân tích thành phần acid amin

3.2.1. Hình thái của các chủng *Spirulina* sp.

Màu sắc và kích thước tế bào của cả 2 chủng *Spirulina* không thay đổi, vẫn giữ màu xanh từ ngày nuôi cấy đầu tiên đến ngày thứ 5. Mức độ xoắn của các sợi ở cả 2 chủng hầu như không thay đổi trong 5 ngày nuôi cấy (Hình 3.4).

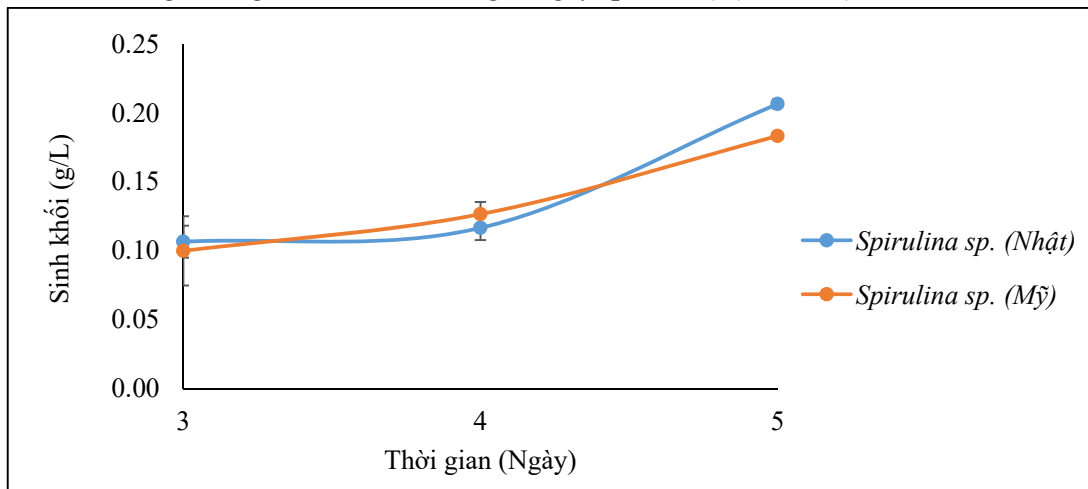
Đối với tảo lam khi được nuôi cấy trong điều kiện thiếu nitơ, số lượng và kích thước các lục lạp nhỏ hơn so với điều kiện có đủ lượng nitơ. Bởi vì lục lạp thường chứa một lượng lớn các sắc tố (diệp lục tố a và b, và β - carotene) và các glycolipid (MGDGs – Monogalactosyldiacylglycerol, DGDGs – Digalactosyldiacylglycerols, SQDGs – Sulfoquinovosyldiacylglycerols) giống như màng thylakoid (Thompson, 1996), lượng chất béo và lipid giảm tương ứng với giảm kích thước lục lạp (Ito et al., 2013). Thiếu hụt nitơ là nguyên nhân làm giảm tốc độ sinh trưởng, sinh khối, thời gian duy trì mật độ cực đại, hàm lượng sắc tố, protein, lipid, axit béo không no, vitamin, carotenoids, phycocyanin, enzyme... ở nhiều loài tảo trong đó có tảo *Spirulina* sp. (Uslu, Isik, Koç, & Göksan, 2011).



Hình 3.4. Hình thái của 2 chủng *Spirulina* sp.

3.2.2. Sự tăng trưởng của các *Spirulina* sp.

Sinh khối của 2 chủng *Spirulina* sp. tăng dần từ ngày nuôi cấy thứ 3 đến ngày nuôi cấy thứ 5 và gần như bằng nhau. Chủng *Spirulina* sp. (Nhật) cho sinh khối đạt 0,207 g/L và tốc độ tăng trưởng đặc hiệu đạt 0,33 g/L/ngày; chủng *Spirulina* sp. (Mỹ) cho sinh khối 0,183 g/L và tốc độ tăng trưởng đặc hiệu đạt 0,32 g/L/ngày ($p > 0,05$) (Hình 3.5).

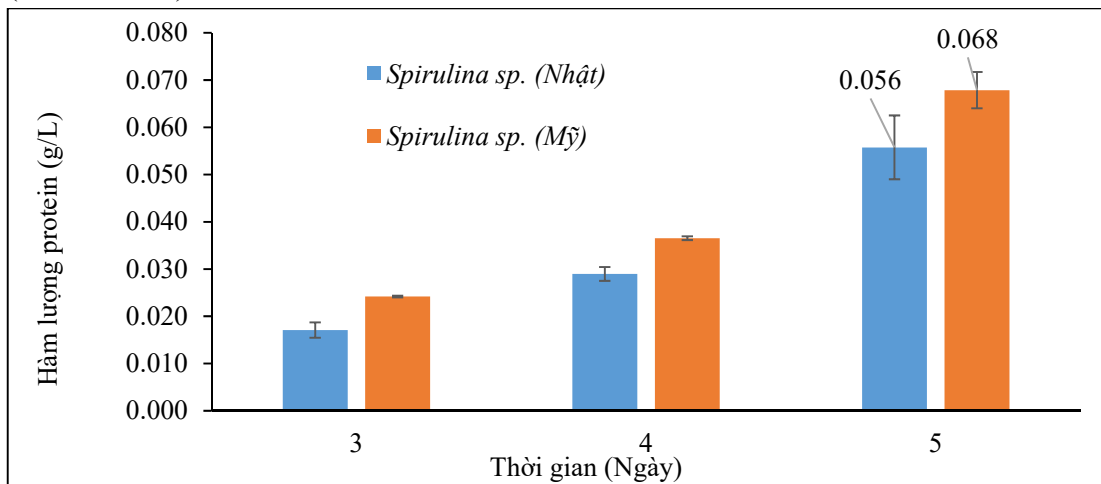


Hình 3.5. Sinh khối của 2 chủng *Spirulina* sp.

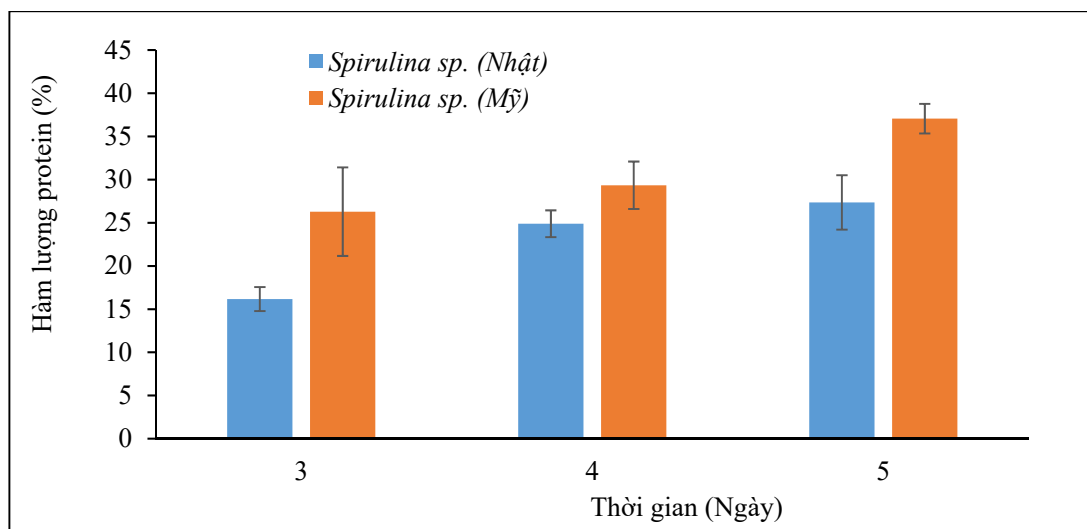
3.2.3. Hàm lượng protein tổng và thành phần acid amin của các chủng *Spirulina*

❖ Hàm lượng protein tổng

Hàm lượng protein tổng của cả 2 chủng có nồng độ cao tăng dần cho đến ngày nuôi cấy thứ 5. Ở chủng *Spirulina* sp. (Mỹ) cho hàm lượng protein tổng đạt 0,068 g/L (37,63%) so với sinh khối khô, chủng *Spirulina* sp. (Nhật) đạt 0,056 g/L (27,36%) sau 5 ngày nuôi cấy (Hình 3.6, 3.7).



Hình 3.6. Hàm lượng protein tổng (g/L) của 2 chủng *Spirulina* sp. ở nồng độ NaNO_3 5,0 g/L



Hình 3.7. Hàm lượng phần trăm protein tổng của 2 chủng *Spirulina sp.* ở nồng độ NaNO_3 5,0 g/L

❖ **Thành phần acid amin của các chủng *Spirulina sp.***

Kết quả cho thấy hai chủng *Spirulina sp.* được nuôi cấy trong môi trường Zarrouk có sự đa dạng về thành phần acid amin gồm acid amin thiết yếu, bán thiết yếu và không thiết yếu. Ở chủng *Spirulina sp.* (Nhật) có hàm lượng các acid amin (%) cao hơn so với chủng *Spirulina sp.* (Mỹ). Ở cả 2 chủng *Spirulina sp.*, hàm lượng của 2 acid amin: L – Alanine và L – Proline cao nhất (khoảng từ 9,95% đến 15,16%) (Bảng 3.1). Hai acid amin này là một trong những loại acid amin không thiết yếu. L – Alanine có vai trò hỗ trợ quá trình chuyển hóa glucose, phát triển cơ bắp, điều tiết glycogen và được sử dụng như là nguồn năng lượng khi glycogen bị cạn kiệt chính (Felig, Pozefsky, Marliss, & Cahill, 1970).

Nhóm acid amin chiếm hàm lượng cao thứ 2 là: L – Isoleucine, L – Leucine, L – Lysine và L – Phenylalanine (thuộc nhóm acid amin thiết yếu) chiếm hàm lượng khoảng từ 7,10% đến 10,29%. Các acid amin thiết yếu là những loại acid amin không được tổng hợp bởi cơ thể con người mà được cung cấp bởi thức ăn. L – Isoleucine và L – Leucine có vai trò rất quan trọng trong quá trình phục hồi sức khỏe và điều hòa lượng glucose trong máu. L – Phenylalanine có chức năng bồi bổ não, tăng cường trí nhớ và tác động trực tiếp đến mọi hoạt động của não bộ (Jonker, Engelen, & Deutz, 2012). Cuối cùng là những acid amin còn lại thuộc nhóm thiết yếu, bán thiết yếu và không thiết yếu chứa hàm lượng thấp hơn (Bảng 3.1).

Vì vậy, hàm lượng nitơ trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng rõ rệt lên hàm lượng protein và thành phần acid amin của các chủng *Spirulina sp.* khác nhau. Trong đó môi trường nuôi cấy Zarrouk bổ sung NaNO_3 5 g/L cả 2 chủng *Spirulina sp.* có hàm lượng protein và thành phần acid amin cao.

Bảng 3.1. Hàm lượng thành phần acid amin của *Spirulina* sp.

STT	Các acid amin	<i>Spirulina</i> sp. Mỹ		<i>Spirulina</i> sp. Nhật	
		mg/g	% protein	mg/g	% protein
Thiết yếu					
1	L – Isoleucine	27,35	7,36	27,70	10,24
2	L – Leucine	27,48	7,40	27,84	10,29
3	L – Lysine	22,40	6,03	25,44	9,40
4	L – Methionine	8,32	2,24	9,48	3,50
5	L – Phenylalanine	26,40	7,10	26,73	9,88
6	L – Threonine	16,93	4,56	17,78	6,57
7	L – Valine	7,85	2,11	8,95	3,31
Bán thiết yếu					
8	L – Arginine	4,17	1,12	8,14	3,01
9	L – Histidine	16,70	4,49	21,11	7,80
Không thiết yếu					
10	L – Aspartic acid	18,25	4,91	21,29	7,87
11	L – Alanine	38,76	10,43	42,98	15,89
12	L – Cystine	12,87	3,46	15,48	5,72
13	L – Glutamic acid	13,25	3,57	15,45	5,71
14	Glycine	12,82	3,45	15,44	5,71
15	L – Proline	36,97	9,95	41,00	15,16
16	L – Serine	17,95	4,83	21,61	7,99
17	L – Tyrosine	24,52	6,60	27,96	10,34

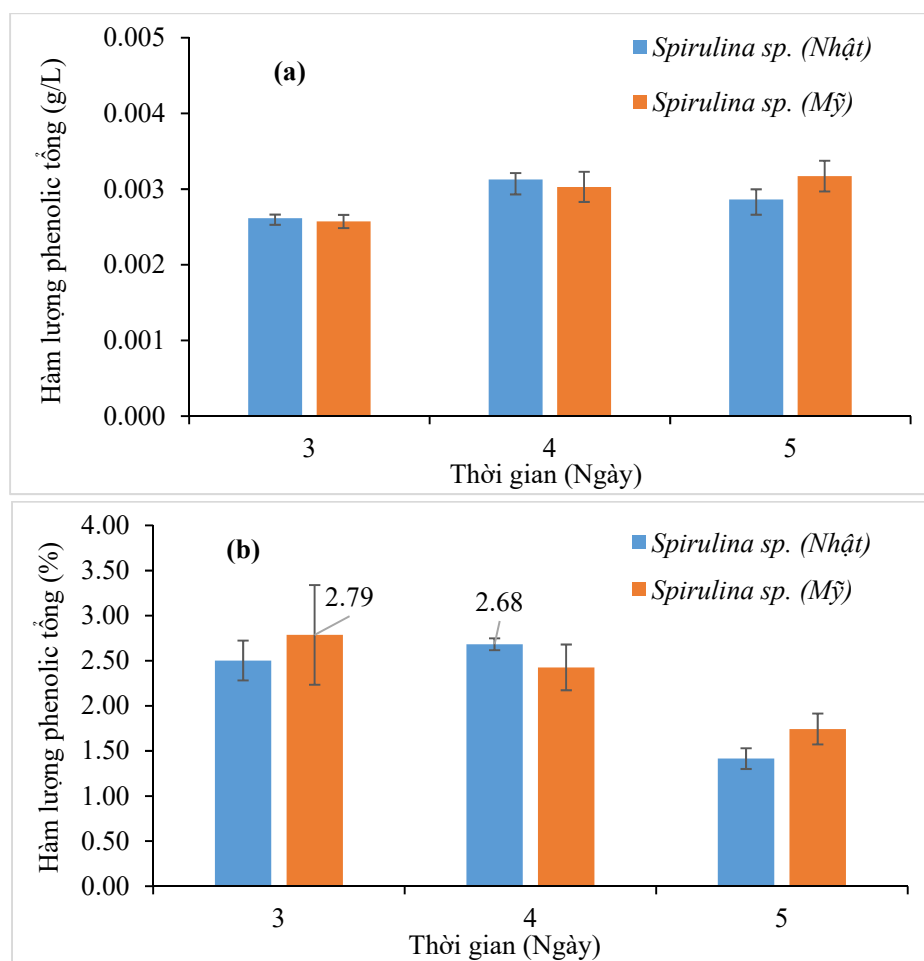
3.2.4. Khả năng chống oxy hóa của các chủng *Spirulina* sp.

❖ Hàm lượng phenolic tổng

Nồng độ NaNO₃ có ảnh hưởng đến khả năng tích lũy phenolic của cả 2 chủng *Spirulina* sp. Hình 3.8 cho thấy, khi nuôi cấy cả 2 chủng *Spirulina* ở môi trường Zarouk có nồng độ NaNO₃ 5,0 g/L thì lượng phenolic được tích lũy khá cao. Chủng *Spirulina* sp. (Mỹ) hàm lượng phần trăm phenolic cao sau 3 ngày nuôi cấy (2,79%) và sau đó giảm dần, chủng *Spirulina* sp. (Nhật) cao sau 4 ngày nuôi cấy (2,68%) và cũng giảm dần.

Kết quả này cao hơn gần 4 lần so với thí nghiệm của Abd El-Baky và cộng sự (2009) khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ NaNO₃ và phenylalanine lên hàm lượng phenolic và flavonoid của *Spirulina maxima*. Trong thí nghiệm này, *Spirulina* được nuôi cấy trong môi trường Zarrouk với lượng NaNO₃ lần lượt 2,5 g/L; 3,125 g/L; 3,777 g/L cho kết quả phenolic tương ứng 0,45%; 0,52%; 0,65% thấp hơn rất nhiều so với khi nuôi ở nồng độ NaNO₃ 5,0 g/L (Adb El Baky, K. El Baz, & El baroty, 2009).

Ở tảo *Spirulina* sp. có chứa các chất chống oxy hóa như carotenoid và phycobiliprotein (Konickova et al., 2014; Schwartz, & Suda, 1988). Khả năng chống oxy hóa của tảo cũng bị ảnh hưởng rất nhiều bởi yếu tố nitơ được cung cấp trong môi trường nuôi cấy. Theo Miranda và cộng sự (1998), các hợp chất phenolic chính được tìm thấy trong *Spirulina* là: salicylic, trans-cinnamic, synaptic, chlorogenic, acid quimic và caffeic. Ngoài ra, *Spirulina* còn chứa 1 số hoạt chất chống oxi hóa khác như: β-carotene, α – ocopherol và các phycobiliprotein.



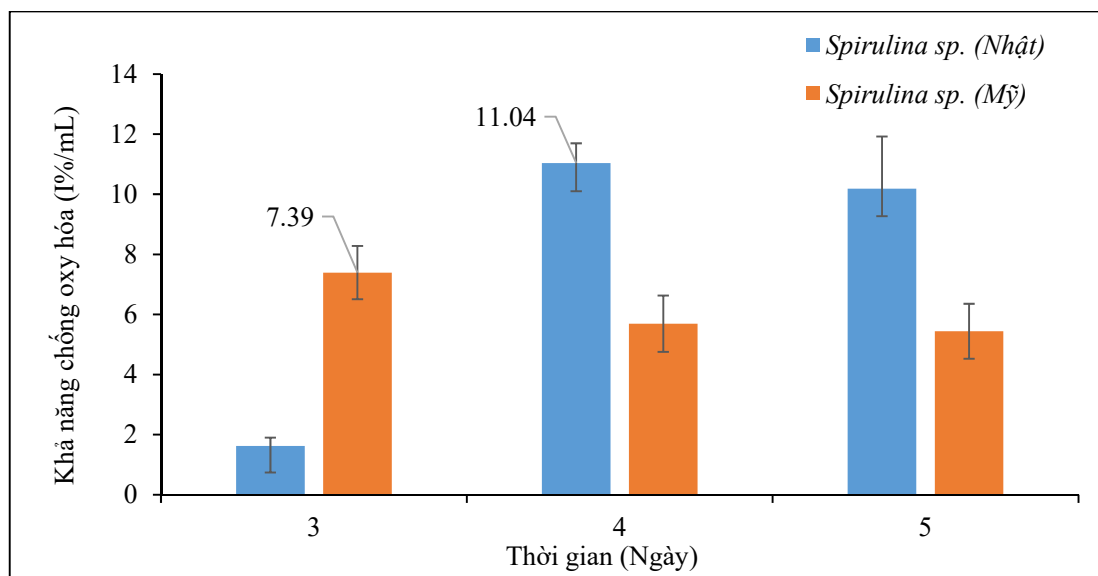
Hình 3.8. Hàm lượng phenolic tổng (g/L) (a) và phần trăm phenolic (%) (b) của 2 chủng *Spirulina sp.* ở nồng độ NaNO_3 5,0 g/L

❖ **Khả năng chống oxy hóa**

Qua kết quả ở Hình 3.9, cho thấy *Spirulina sp.* có khả năng chống oxy hóa. Cụ thể, đối với *Spirulina sp.* (Nhật) có hoạt tính chất chống oxy hóa cao sau 4 ngày nuôi cấy (11,04 %), *Spirulina sp.* (Mỹ) sau 3 ngày nuôi cấy (11,13 %). Hàm lượng phenolic và hoạt tính chống oxy hóa (ức chế triệt tiêu gốc tự do của DPPH) của *Spirulina sp.* có mối tương quan với nhau (Hình 3.8, 3.9).

Theo Sahu và cộng sự (2013) chỉ ra rằng có sự tương quan đáng kể giữa hàm lượng phenolic và khả năng khử các gốc tự do ở các loài thực vật qua đó cho thấy khả năng khử các gốc tự do có thể liên quan đến nồng độ của nhóm hydroxyl phenolic. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng các polyphenol góp phần đáng kể vào hoạt động chống oxy hóa và khử gốc tự do, chủ yếu là do đặc tính chống oxy hóa của chúng, đóng một vai trò quan trọng trong việc hấp phụ và trung hòa các gốc tự do, dập tắt các oxy hóa trị 1 và hóa trị 3 hoặc phân hủy peroxit (Sahu, Kar, & Routray, 2013). Các hợp chất phenolic không chỉ làm tăng thời hạn

sử dụng của thực phẩm mà còn hoạt động như chất chống oxy hóa trong nhiều hệ thống sinh học. Phenolic có khả năng chống oxy hóa và tương tác với các gốc tự do; hợp chất này có thể ức chế sự oxy hóa lipid trong *in vitro* bằng cách loại bỏ gốc tự do và hoạt động như chelat kim loại (Colla, Badiale-Furlong, & Costa, 2007). Estrada (2001) đã chứng minh phycobiliprotein; phycocyanin và allophycocyanin từ dịch chiết của *Spirulina* có hoạt tính chống oxy hóa mạnh và ức chế quá trình oxy hóa lipid tế bào (Pinero Estrada, Bermejo Bescos, & Villar del Fresno, 2001).



Hình 3.9. Hàm lượng chất chống oxy hóa tổng của 2 chủng *Spirulina sp.* ở nồng độ NaNO_3 5,0 g/L

4. Kết luận

Nồng độ NaNO_3 trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng khá rõ lên sự tăng trưởng và tích lũy protein của *Spirulina*. Khi tăng nồng độ NaNO_3 trong môi trường Zarrouk từ 1,25g/L đến 5 g/L thì sinh khối, tốc độ tăng trưởng đặc hiệu và hàm lượng protein tổng của *Spirulina* tăng. Ở môi trường nuôi cấy có nồng độ NaNO_3 5,0 g/L *Spirulina* cho sinh khối và hàm lượng protein tổng nhiều hơn so với 2 nồng độ NaNO_3 1,25 g/L và 2,5 g/L.

Cả hai chủng *Spirulina sp.* đều tăng trưởng tốt, tích lũy hàm lượng protein và thành phần acid amin cao trong môi trường nuôi cấy Zarrouk bổ sung NaNO_3 5 g/L. Ngoài ra, hàm lượng phenolic tổng và khả năng chống oxy của hai chủng *Spirulina sp.* này đạt giá trị cao và có mối tương quan dương với nhau.

❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abd El Baky, H., & El baroty, G. (2016). *Optimization of Growth Conditions for Purification and Production of L-Asparaginase by Spirulina maxima* (Vol. 2016). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: Hindawi Publishing Corporation.
- Adb El Baky, H., K. El Baz, F., & El baroty, G. (2009). Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects in vitro toward hepatotoxicity model. *African journal of pharmacy and pharmacology*, 3(4), 133-139.
- Albayrak, S., Aksoy, A., Sagdic, O., & Hamzaoglu, E. (2010). Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. *Food chemistry*, 119(1), 114-122. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.06.003
- Bartley, M. L., Boeing, W. J., Daniel, D., Dungan, B. N., & Schaub, T. (2016). Optimization of environmental parameters for *Nannochloropsis salina* growth and lipid content using the response surface method and invading organisms. *Journal of Applied Phycology*, 28(1), 15-24. doi:10.1007/s10811-015-0567-8
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72., 248-254.
- Cai, T., Park, S. Y., & Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, 360-369. doi:https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030
- Colla, L., Badiale-Furlong, E., & Costa, J. A. (2007). Antioxidant properties of *Spirulina* (Arthrospira) platensis cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. *Brazilian Archives Of Biology And Technology*, 50(1). doi:10.1590/S1516-89132007000100020
- Delrue, F., Alaux, E., Moudjaoui, L., Gaignard, C., Fleury, G., Perilhou, A.,... & Sassi, J. F. (2017). Optimization of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) Growth: From Laboratory Scale to Pilot Scale. *Fermentation*, 3(4), 59.
- Deng, R., & Chow, T. J. (2010). Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae *Spirulina*. *Cardiovasc Ther*, 28(4), e33-45. doi:10.1111/j.1755-5922.2010.00200.x
- Esen, M., & ÜREK, R. Ö. (2014). Nitrate and iron nutrition effects on some nitrate assimilation enzymes and metabolites in *Spirulina platensis*. *Turkish Journal of Biology*, 38(5), 690-700.
- Felig, P., Pozefsky, T., Marliss, E., & Cahill, G. F., Jr. (1970). Alanine: key role in gluconeogenesis. *Science*, 167(3920), 1003-1004.
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., & De Cooman, L. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology*, 24(6), 1477-1486.
- Guillard RRL. (1973). *Culture Methods and Growth Measurements*. Chambridge: Chambridge University Pres.
- Hajimahmoodi, M., Faramarzi, M. A., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M. R., & Nafissi-Varcheh, N. (2010). Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 22(1), 43-50.

- Ho, S. H., Ye, X., Hasunuma, T., Chang, J. S., & Kondo, A. (2014). Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae--a critical review. *Biotechnol Adv*, 32(8), 1448-1459. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.09.002
- Ito, T., Tanaka, M., Shinkawa, H., Nakada, T., Ano, Y., Kurano, N.,... & Tomita, M. (2013). Metabolic and morphological changes of an oil accumulating trebouxiophycean alga in nitrogen-deficient conditions. *Metabolomics*, 9(1), 178-187. doi:10.1007/s11306-012-0463-z
- Jonker, R., Engelen, M. P., & Deutz, N. E. (2012). Role of specific dietary amino acids in clinical conditions. *Br J Nutr*, 108 Suppl 2, S139-148. doi:10.1017/s0007114512002358
- Kim, D. G., & Bum Hur, S. (2013). Growth and fatty acid composition of three heterotrophic *Chlorella* species. *Algae*, 28(1), 101-109. doi:10.4490/algae.2013.28.1.101
- Konickova, R., Vankova, K., Vanikova, J., Vanova, K., Muchova, L., Subhanova, I.,... & Vitek, L. (2014). Anti-cancer effects of blue-green alga *Spirulina platensis*, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds. *Ann Hepatol*, 13(2), 273-283.
- Lim, S. N., Cheung, P. C., Ooi, V. E., & Ang, P. O. (2002). Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *J Agric Food Chem*, 50(13), 3862-3866.
- Levasseur M., Thompson P. A., & Harrison, P. J. (1993). Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources. *J. Phycol*, 29(5), 587-595.
- Miranda, M. S., Cintra, R. G., Barros, S. B., & Mancini Filho, J. (1998). Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Braz J Med Biol Res*, 31(8), 1075-1079.
- Norici, A., Dalsass, A., & Giordano, M. (2002). Role of phosphoenolpyruvate carboxylase in anaplerosis in the green microalga *Dunaliella salina* cultured under different nitrogen regimes. *Physiol Plant*, 116(2), 186-191.
- Pandey J. P., Tiwari A., & Mishra, R. M. (2010). Evaluation of Biomass Production of *Spirulina maxima* on Different Reported Media. *J. Algal Biomass Utiln.*, 1(3), 70-81.
- Pinero Estrada, J. E., Bermejo Bescos, P., & Villar del Fresno, A. M. (2001). Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Farmaco*, 56(5-7), 497-500.
- Pruvost, J., Van Vooren, G., Cogne, G., & Legrand, J. (2009). Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresource Technology*, 100(23), 5988-5995. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.004
- Sahu, R., Kar, M., & Routray, R. (2013). DPPH Free radical scavenging activity of some leafy vegetables used by tribals of Odisha. India. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 4(1), 21-27.
- Schwartz J., G., S., & Suda D. Growth. (1988). Inhibition and destruction of oral cancer cells by extracts from spirulina. *Cancer & Nutrition*, 11(2), 127-134.
- Sharoba, A. M. (2014). Nutritional value of spirulina and its use in the preparation of some complementary baby food formulas. *Journal of Food and Dairy Sciences, Mansoura University*, 8, 517-538.
- Sukenik, A., Zmora, O., & Carmeli, Y. (1993). Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture*, 117(3), 313-326. doi:https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90328-V

- Thompson, G. A. (1996). Lipids and membrane function in green algae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1302(1), 17-45. doi:https://doi.org/10.1016/0005-2760(96)00045-8
- Tran, D., Doan, N., Louime, C., Giordano, M., & Portilla, S. (2014). Growth, antioxidant capacity and total carotene of *Dunaliella salina* DCCBC15 in a low cost enriched natural seawater medium. *World J Microbiol Biotechnol*, 30(1), 317-322. doi:10.1007/s11274-013-1413-2
- Uslu, L., Isik, O., Koç, K., & Göksan, T. (2011). The effects of nitrogen deficiencies on the lipid and protein contents of *Spirulina platensis*. *African Journal of Biotechnology*, 10(3), 386-389.
- Wan, M.-X., Wang, R. M., Xia, J. L., Rosenberg, J. N., Nie, Z. Y., Kobayashi, N.,... & Betenbaugh, M. J. (2012). Physiological evaluation of a new *Chlorella sorokiniana* isolate for its biomass production and lipid accumulation in photoautotrophic and heterotrophic cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(8), 1958-1964. doi:10.1002/bit.24477
- Yaltirak, T., Aslim, B., Ozturk, S., & Alli, H. (2009). Antimicrobial and antioxidant activities of *Russula delica* Fr. *Food Chem Toxicol*, 47(8), 2052-2056. doi:10.1016/j.fct.2009.05.029
- Yen, H. W., Hu, I. C., Chen, C.Y., & Chang, J.S. (2014). Chapter 2 - Design of Photobioreactors for Algal Cultivation. In A. Pandey, D.J. Lee, Y. Chisti, & C. R. Soccol (Eds.), *Biofuels from Algae* (pp. 23-45). Amsterdam: Elsevier.
- Zhu C. J., & Lee., K., Y. (1997). Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 9(2), 189-194.

**EFFECT OF NITROGEN (NITRATE) ON GROWTH, PROTEIN CONTENT,
AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF THE *SPIRULINA* SP.**

Vo Hong Trung**, *Nguyen Thi Hong Phuc*, *Tran Dinh Phuong

Department of Biochemistry and Toxicology – Nguyen Tat Thanh University, HCM City, Viet Nam

**Corresponding author: Vo Hong Trung – Email: vohongtrung2503@gmail.com*

Received: August 22, 2019; Revised: October 16, 2019; Accepted: November 22, 2019

ABSTRACT

Spirulina sp. is a natural product known as a natural source of nutraceuticals and bioactive compounds, responding to the demand of both food and medicinal products. Cultural conditions are the key point to determine the quality of Spirulina's products. Under the high NaNO₃ concentration supplied Zarrouk medium (5.0 g/L), the dry biomass (0.60 g/L) and the protein content (34.41%) which were higher than those under low NaNO₃ concentration supplied medium (1.25 g/L and 2.5g/L, the antioxidant capacity, protein content, and amino acid profiles were high in both strains of Spirulina sp. from USA and Japan under the cultural condition in which NaNO₃ concentration was of 5.0 g/L. In addition, there was a positive correlation between the total phenolic content and the antioxidant capacity of the two strains of Spirulina sp.

Keywords: *Spirulina* sp.; Bradford method; nitrate; protein; amino acid; antioxidant capacity