



ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT LƯỢNG ÁNH SÁNG LÊN SỰ TĂNG TRƯỞNG, HÀM LƯỢNG CARBOHYDRATE VÀ PROTEIN Ở *SPIRULINA SP.*

Võ Hồng Trung^{1*}, Nguyễn Thị Bích Ngọc¹, Trần Huỳnh Phong¹, Nguyễn Thị Hồng Phúc²

¹Bộ môn Hóa sinh - Độc chất, Khoa Dược – Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

²Bộ môn Kiểm nghiệm Dược phẩm, Khoa Dược – Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

Ngày nhận bài: 03-5-2017; ngày nhận bài sửa: 19-9-2017; ngày duyệt đăng: 20-12-2017

TÓM TẮT

Spirulina là vi khuẩn lam, tế bào dạng sợi hình xoắn ốc, chứa hàm lượng cao các chất dinh dưỡng và hoạt tính sinh học. Nghiên cứu cho thấy, sau 5 ngày nuôi cấy trong điều kiện ánh sáng đỏ *Spirulina sp.* đạt sinh khối, tốc độ tăng trưởng và hàm lượng carbohydrate cao hơn khi được nuôi cấy trong điều kiện ánh sáng trắng và xanh dương. Trong khi đó, sau 15 ngày nuôi cấy, ở điều kiện ánh sáng xanh dương và ánh sáng trắng hàm lượng carbohydrate đạt được cao hơn so với trong điều kiện ánh sáng đỏ. Hàm lượng protein của *Spirulina sp.* thu được trong hai điều kiện nuôi cấy ánh sáng xanh dương và trắng cao hơn so với điều kiện ánh sáng đỏ và đạt cực đại sau 5 ngày nuôi cấy.

Từ khóa: *Spirulina*, hàm lượng carbohydrate và hàm lượng protein tổng.

ABSTRACT

Effect of light quality on the growth, carbohydrate and protein contents of *Spirulina sp.*

Spirulina is a filamentous, spiral-shaped cyanobacterium, known as a natural source of nutraceuticals and bioactive compounds. The study showed that after 5 days of culture, under red light condition, biomass, specific growth rate and carbohydrate content of *Spirulina sp.* were achieved higher than those under blue and white light conditions. Meanwhile, after 15 days of culture, the carbohydrate contents under blue and white light conditions were higher than those under red light condition. Protein contents of *Spirulina sp.* obtained under the blue and white light conditions were higher those obtained under the red light condition, reaching maxima after 5 days of culture.

Keywords: *Spirulina*, total carbohydrate and protein contents.

1. Giới thiệu

Spirulina là vi khuẩn lam có dạng sợi, là một trong những dạng sống cổ xưa nhất sống trên Trái Đất trong khoảng 3,5 tỉ năm qua. Cấu trúc tế bào có dạng sợi hình xoắn ốc giống như cấu trúc của các tế bào prokaryote đơn giản. Các loài *Spirulina* được sử dụng làm thực phẩm chức năng phổ biến nhất là *Spirulina platensis* và *Spirulina*

* Email: vohongtrung2503@gmail.com

maxima. Các loài này được sử dụng làm thực phẩm và có thể tăng trưởng ở nhiều nơi trên toàn thế giới [1].

Các loài *Spirulina* chứa một lượng đáng kể protein, acid amin thiết yếu, vitamin, beta-carotene, các chất khoáng, acid béo thiết yếu, polisaccharide, glicolipid, sulpholipid... [2]. Chúng được xem như là thực phẩm chức năng có nguồn gốc tự nhiên, có thể mang lại lợi ích sức khỏe cho con người. *Spirulina* chứa lượng lớn vitamin B, khoáng gồm canxi, sắt, magie, mangan, kali, kẽm [3].

Spirulina có hoạt tính sinh học đa dạng và ý nghĩa về dinh dưỡng do chúng có hàm lượng cao các chất dinh dưỡng tự nhiên, có chức năng điều hòa chức năng sinh học và miễn dịch. Nhiều *Spirulina* ảnh hưởng lên hệ thống miễn dịch thông qua tăng hoạt tính của đại thực bào, kích thích tạo ra kháng thể, cytokine, tăng tích lũy tế bào NK trong các mô, sự hoạt động và di chuyển của tế bào T và B. *Spirulina* cũng có vai trò điều hòa quá trình chuyển hóa carbohydrate và lipid thông qua các dạng glucose và lipid đúng với hoạt tính ở các mô thí nghiệm và ở các bệnh nhân bệnh tiểu đường [4].

Chất lượng ánh sáng là yếu tố quan trọng ảnh hưởng mạnh lên quá trình tăng trưởng, hàm lượng các chất dinh dưỡng như carbohydrate, protein, lipid và tổng hợp các sắc tố quang hợp ở thực vật. Vì vậy, thí nghiệm này nhằm khảo sát ảnh hưởng của ánh sáng trắng, đỏ và xanh dương lên tăng trưởng, hàm lượng carbohydrate và protein của *Spirulina* sp. Các kết quả của nghiên cứu là cơ sở cho ứng dụng ánh sáng để thu nhận các thành phần dinh dưỡng khác nhau trong quá trình nuôi trồng *Spirulina*.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Chủng *Spirulina* và điều kiện nuôi cấy

Chủng tảo *Spirulina* được cung cấp bởi Trần Ngọc Đức - Phòng Công nghệ Tảo - Trường Đại học Quốc tế - ĐHQG TPHCM. *Spirulina* được nuôi cấy trên môi trường Zarouk, pH = 9.0 [5], cường độ ánh sáng 30 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ liên tục, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.2. Thiết kế thí nghiệm

Spirulina sp. đạt giai đoạn tăng trưởng sau khoảng 5 ngày nuôi cấy trên môi trường Zarouk được sử dụng để bố trí thí nghiệm. Thí nghiệm sử dụng bình tam giác 250 mL với 100 mL môi trường và chiếu sáng ở cường độ ánh sáng 30 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ liên tục với ánh sáng trắng, đỏ (600-700nm), xanh dương (400-500nm) bằng hệ thống đèn LED. Hình thái, sinh khối, hàm lượng carbohydrate và protein của tế bào ở các nghiệm thức được xác định sau mỗi 5 ngày nuôi cấy. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

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

Hình thái tế bào *Spirulina* sp. được quan sát bằng kính hiển vi quang học (X40) sau mỗi 5 ngày nuôi cấy.

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

10 ml dịch nuôi cấy tảo được lọc qua màng sợi thủy tinh, với đường kính màng là 47mm, đường kính lỗ 0,7 μm . Sau đó tảo được rửa với 5ml ammonium formiate (0,5M), 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)] là phần khác biệt giữa khối lượng khô và phần khoáng sau khi đốt ($C=A-B$) [6], [7].

2.5. 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 được dùng để tính tốc độ tăng trưởng đặc hiệu (G : g/l/ngày) trong khoảng thời gian đó theo công thức [8]:

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

trong đó:

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

t₁, t₂: thời điểm 1 và 2

2.6. Xác định hàm lượng carbohydrate của *Spirulina* sp.

Xác định hàm lượng carbohydrate tổng: Lấy 1,5 ml dung dịch tảo li tâm 10.000 vòng trong 15 phút, loại bỏ dịch, cần được rửa nhiều lần với 1ml nước cất (hấp vô trùng) bằng cách li tâm 10.000 vòng trong 15 phút. Thêm 3,2 ml H₂SO₄ đậm đặc, sau đó làm mát trong bể nước. Thêm 50 μl phenol, trộn đều, để yên trong 30 phút. Đo quang ở bước sóng 486 nm [9].

Đường chuẩn carbohydrate được xây dựng với nồng độ glucose chuẩn từ 0,01 đến 0,2 g/l và nồng độ carbohydrate tổng thông qua phương trình $y = 29,557x + 0,0957$, $R^2 = 0,9996$

2.7. Xác định hàm lượng protein của *Spirulina* sp. bằng phương pháp Kjeldahl

Lấy 1,5 ml dung dịch tảo li tâm 10.000 vòng trong 15 phút, loại bỏ dịch, cần được rửa nhiều lần với 1ml nước cất (hấp vô trùng) bằng cách li tâm 10.000 vòng trong 15 phút. Cần được vô cơ hóa bằng hệ thống Kjeldahl với 2ml H₂SO₄ đậm đặc, 1g chất xúc tác (9g K₂SO₄ + 1g CuSO₄) và khoảng 6-8 giọt H₂O₂, thời gian khoảng: 45 – 60 phút. Chung cất bằng máy chưng cất đậm Berh-S3 với 20 ml H₂SO₄ N/50 vào bình tam giác hứng dịch chưng cất, chương trình chưng cất 5ml NaOH, 5ml nước cất và thời gian 5 phút [10], [11].

Định lượng protein tổng bằng phương pháp acid – base: Định lượng bằng dung dịch NaOH N/25, chỉ thị đỏ metil khi dung dịch chuyển từ màu đỏ sang màu vàng.

Đường chuẩn protein: sử dụng nồng độ protein chuẩn 0,01 đến 0,2 g/l và xác định nồng độ protein trong mẫu *Spirulina* sp. bằng phương trình $y = 0,1607x + 9,375$ $R^2 = 0,9643$.

2.8. Xử lý số liệu

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 $p < 0,05$.

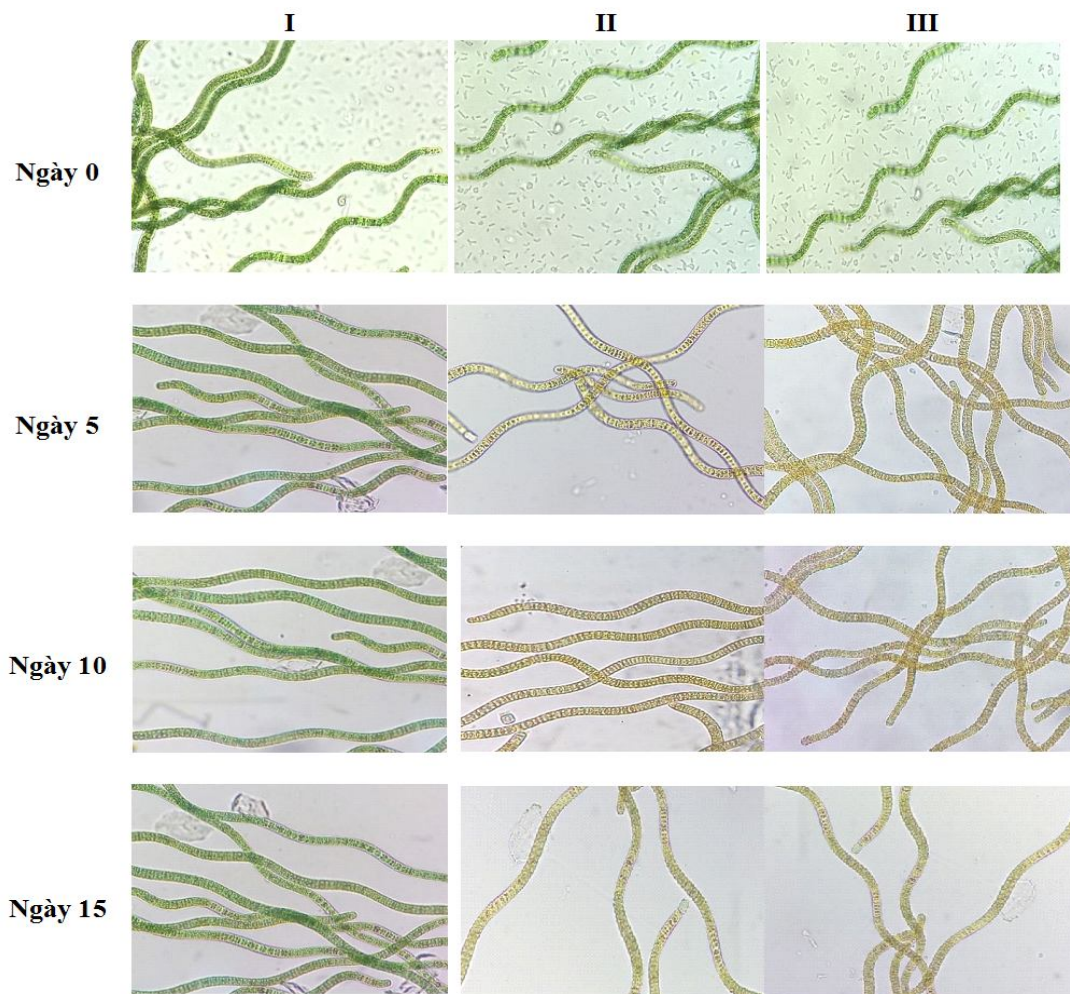
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Hình thái tế bào *Spirulina* sp.

Trong điều kiện ánh sáng xanh dương tế bào và dịch nuôi cấy *Spirulina* sp. có màu xanh. Trong khi đó ở điều kiện ánh sáng đỏ và ánh sáng trắng tế bào và dịch nuôi chuyển sang màu vàng cam sau 5 ngày nuôi cấy (Ảnh 1, Ảnh 2). Theo Olaizola và Duerr (1990), *Spirulina platensis* (UTEX 1928), hàm lượng carotenoid có sự thay đổi trong điều kiện ánh sáng khác nhau. Riêng carotenoid, đặc biệt β -carotene và myxoxanthophyll thể hiện rõ những thay đổi với phổ ánh sáng khác nhau. Hàm lượng β -carotene và echinenone cao ở cả trong điều kiện cường độ ánh sáng cao và thấp. Hàm lượng myxoxanthophyll và lutein/zeaxanthin không thay đổi ở trong các phổ ánh sáng giống nhau. Ở điều kiện ánh sáng đỏ và xanh dương hàm lượng myxoxanthophyll giảm, trong khi β -carotene tăng, và lutein/zeaxanthin và echinenone thay đổi ít. Kết quả cho thấy điều kiện ánh sáng đỏ và trắng kích thích tế bào *Spirulina* sp. tạo carotenoid cao sau 5 ngày nuôi cấy so với ánh sáng xanh dương.

Hàm lượng diệp lục tố a ở điều kiện ánh sáng đỏ chỉ khoảng 2/3 so với điều kiện ánh sáng trắng. Kết quả này có thể là do tăng hiệu quả hấp thụ ánh sáng của phycobiliprotein trong điều kiện ánh sáng đỏ. Ở điều kiện ánh sáng xanh dương, chỉ có một sự thay đổi trong thời gian ngắn của hàm lượng diệp lục tố a [12].

Ở vi tảo *Ulva pertusa* sự phát triển cấu trúc màng thylakoid của tế bào thì ánh sáng xanh dương có hiệu quả cao hơn so với ánh sáng đỏ. Quá trình duy trì cấu trúc tế bào là cần thiết nhất cho quá trình tăng trưởng và phân chia tế bào, cho thấy ánh sáng xanh dương là hiệu quả hơn. Hơn nữa, cấu trúc tế bào *Ulva* phát triển tương đối tốt trong điều kiện nuôi cấy ánh sáng xanh dương so với ánh sáng đỏ và ánh sáng trắng. Toàn bộ phần ánh sáng trắng cung cấp năng lượng cho hoạt động của phytochrome và thụ thể ánh sáng (photoreceptor), tạo ra nguồn năng lượng cao cho sự duy trì và tăng trưởng tối ưu của tế bào. Điều này cho thấy phần phổ ánh sáng đỏ không đủ để kích thích tăng trưởng, nhưng không ức chế tăng trưởng hoặc duy trì cấu trúc tế bào. Tuy nhiên, năng lượng này là không đủ cho các quá trình chuyển hóa khác [13].



Ảnh 1. Hình thái tế bào *Spirulina* sp. trong các điều kiện nuôi cấy ánh sáng xanh dương (I), ánh sáng đỏ (II) và ánh sáng trắng (III)

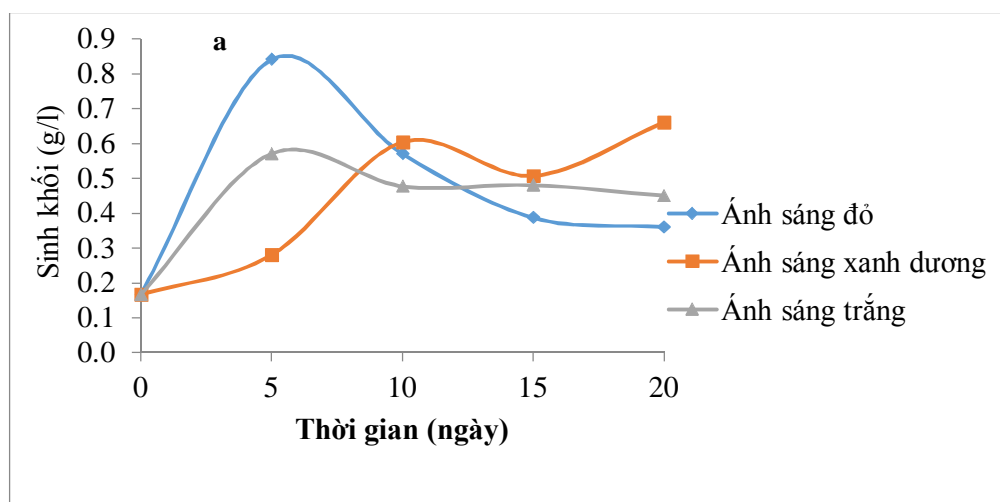


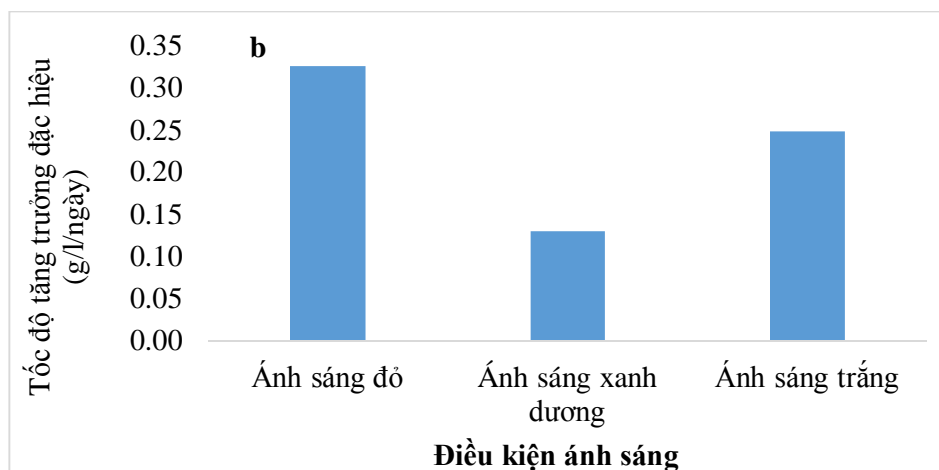
Ảnh 2. Màu sắc dịch nuôi ngày thứ 10 trong điều kiện nuôi cấy ánh sáng xanh dương (a), ánh sáng đỏ (b) và ánh sáng trắng (c)

3.2. Sự tăng trưởng của *Spirulina* sp.

Sự tăng trưởng của *Spirulina* sp. cho thấy ở Hình 1a, ở điều kiện ánh sáng đỏ tảo tăng trưởng mạnh với lượng sinh khối tích lũy cao sau 5 ngày nuôi cấy. Trong khi đó, trong điều kiện ánh sáng xanh dương và trắng tăng trưởng thấp hơn. Tốc độ tăng trưởng của *Spirulina* sp. trong điều kiện nuôi cấy ánh sáng đỏ cao hơn so với các điều kiện ánh sáng khác (Hình 1b). Chất lượng ánh sáng ảnh hưởng tương đối lên khả năng sản xuất sinh khối, hàm lượng lipid tổng, loại acid béo ở vi tảo *Chlorella vulgaris* [14]. Cả cường độ và chất lượng ánh sáng đều ảnh hưởng đến thành phần và cấu trúc hóa học, tốc độ hấp thu carbon và tổng hợp polimer. Ở tất cả cường độ ánh sáng hàm lượng diệp lục tố a ở điều kiện ánh sáng xanh dương và trắng cao hơn ánh sáng đỏ. Tốc độ tổng hợp protein, hấp thu carbon và hô hấp ở điều kiện ánh sáng xanh dương và đỏ cao hơn ánh sáng trắng trong điều kiện bằng mức năng lượng [15].

Trong điều kiện nuôi cấy ánh sáng xanh dương tảo tăng trưởng gấp đôi so với trong điều kiện ánh sáng trắng. Theo hiệu năng của tảo trong môi trường ánh sáng xanh lam chúng đáp ứng tốt với hàm lượng diệp lục tố cao. Ngoài ra, cùng một loài tảo cũng đáp ứng với phổ ánh sáng khi được nuôi dưới điều kiện ánh sáng trắng bằng cách làm tăng hàm lượng diệp lục tố [16]. Theo Niizawa và cs. (2014), ở vi tảo tốc độ hấp thu bức xạ ánh sáng xanh dương cao hơn ánh sáng đỏ. Tuy nhiên, bức xạ ánh sáng đỏ tạo ra hiệu quả năng lượng cho sản xuất sinh khối cao hơn so với ánh sáng xanh dương.



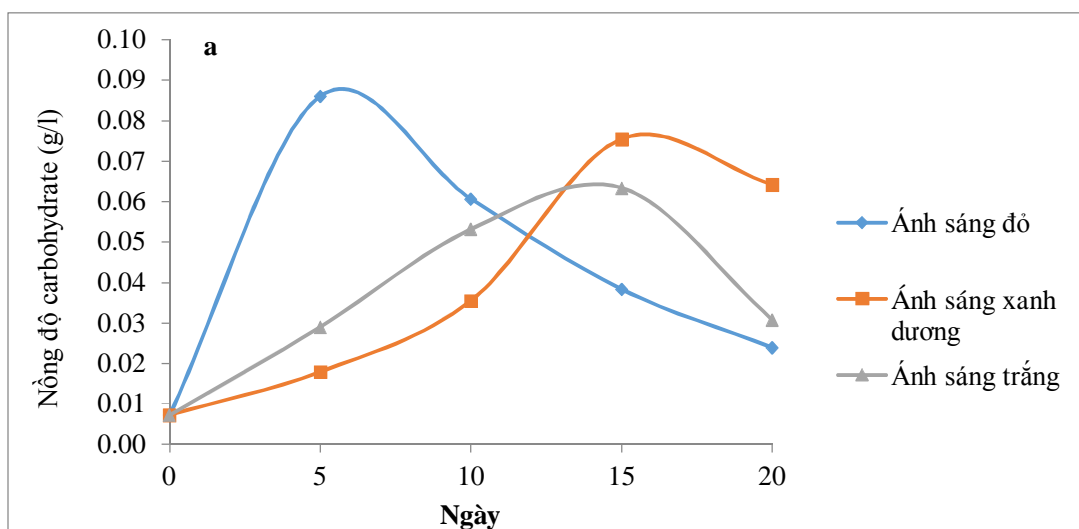


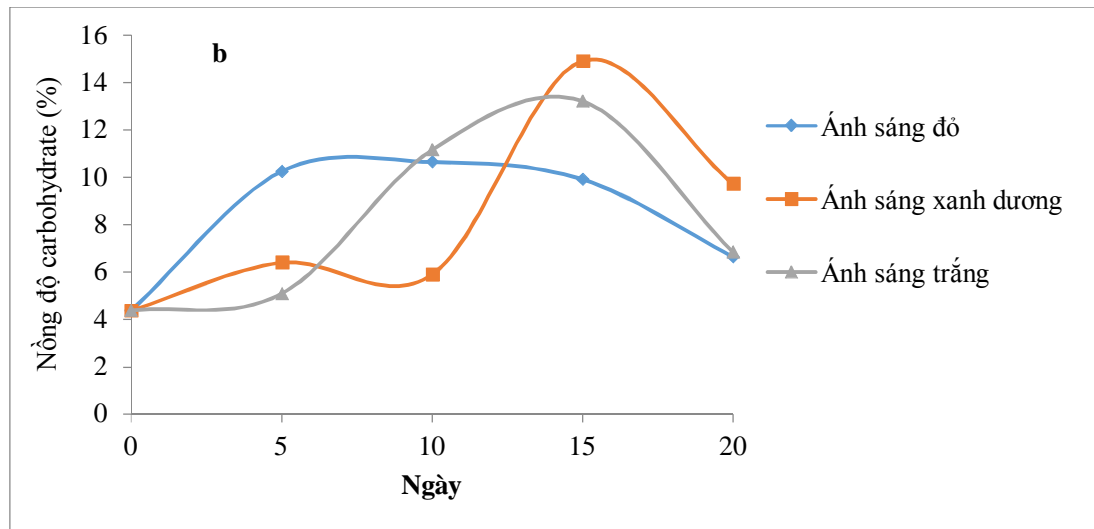
Hình 1. Sinh khối (a), tốc độ tăng trưởng đặc hiệu (b) của *Spirulina* sp. trong các điều kiện ánh sáng khác nhau

3.3. Hàm lượng carbohydrate của *Spirulina* sp.

Ở điều kiện nuôi cấy ánh sáng đỏ, hàm lượng carbohydrate tổng (g/l và %) của *Spirulina* sp. đạt nồng độ cao sau 5 ngày nuôi cấy. Trong khi điều kiện ánh sáng xanh dương và trắng hàm lượng carbohydrate tổng đạt nồng độ cao sau 15 ngày nuôi cấy (Hình 2). *Spirulina plutensis* chứa khoảng 13,6% carbohydrate, thành phần đường chủ yếu là glucose cùng với rhamnose, mannose, xylose, galactose và hai đường khác [17].

Theo Marchetti và cs. (2013), ở *Isochrysis* sp. điều kiện ánh sáng xanh dương có hàm lượng carbohydrate thấp hơn trong điều kiện ánh sáng trắng tuy nhiên hàm lượng diệp lục tố a và cường độ quang hợp cao hơn.

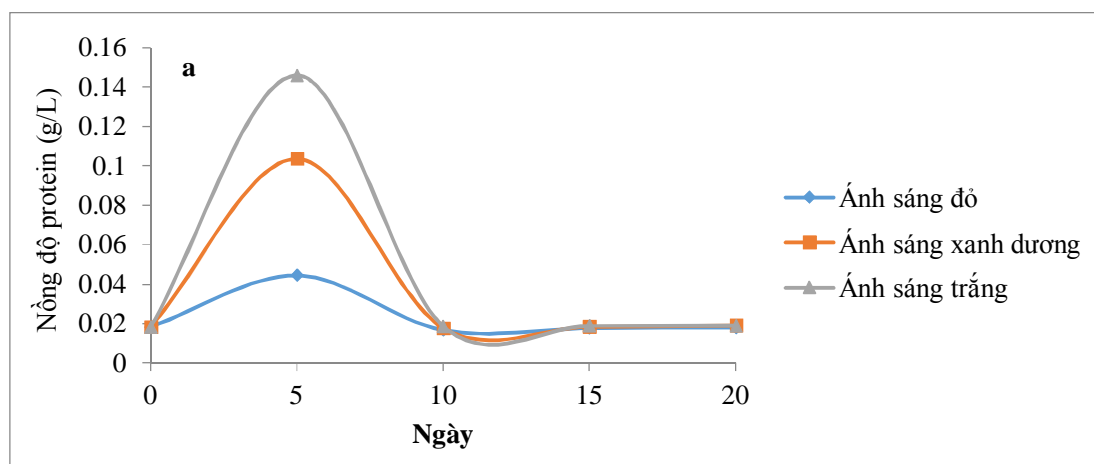


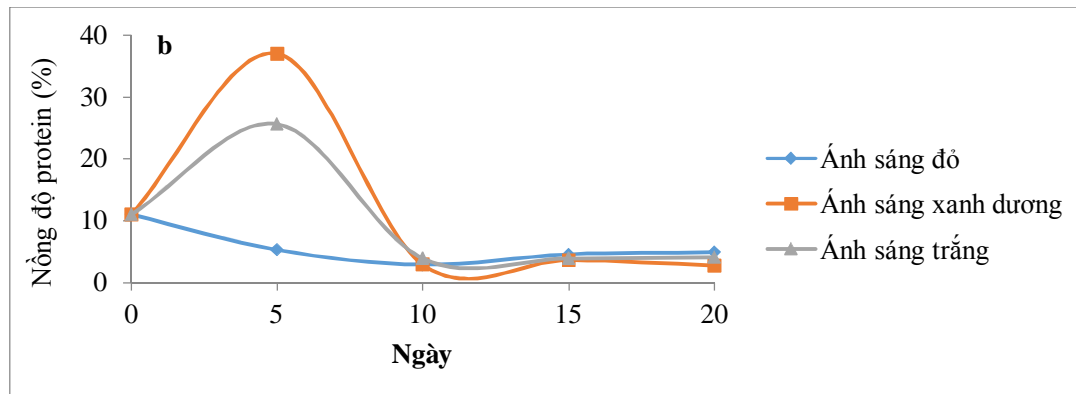


Hình 2. Hàm lượng carbohydrate tổng (g/l) (a) và phần trăm (%) (b) của *Spirulina* trong các điều kiện ánh sáng khác nhau

3.4. Hàm lượng protein của *Spirulina* sp.

Hình 3 cho thấy hàm lượng protein tổng của *Spirulina* sp. trong các điều kiện ánh sáng khác nhau đạt cao sau 5 ngày nuôi cấy và giảm dần sau đó. Hàm lượng protein có mối quan hệ âm tính với hàm lượng diệp lục tố. Phycobiliprotein được tổng hợp nhiều hơn so với diệp lục tố ở các bước sóng đặc hiệu. Vì thế hàm lượng protein trong điều kiện ánh sáng xanh lục cao hơn ở điều kiện ánh sáng xanh dương và ánh sáng đỏ. Điều kiện tăng trưởng tối ưu được thể hiện chặt chẽ với hàm lượng protein cao. Phycobiliprotein ở tảo lam có vai trò như các chất thu nhận ánh sáng trong quang hợp cũng như chất dự trữ nitrogen nội bào [18]. Các loài thực vật tăng trưởng ở điều kiện ánh sáng xanh dương tổng hợp nhiều acid amin và protein hơn ở điều kiện ánh sáng trắng hoặc ánh sáng đỏ [19].





Hình 3. Hàm lượng protein tổng (g/l)

(a) và phần trăm (%) (b) của *Spirulina* trong các điều kiện ánh sáng khác nhau

Các kết quả cho thấy *Spirulina* sp. trong điều kiện ánh sáng đỏ có tốc độ tăng trưởng và hàm lượng carbohydrate cao, và hàm lượng protein thấp sau 5 ngày nuôi cấy. Trong khi đó, ở điều kiện ánh sáng trắng và xanh dương tốc độ tăng trưởng thấp và hàm lượng carbohydrate đạt cao nhất sau 15 ngày nuôi cấy, và hàm lượng protein đạt cao nhất sau 5 ngày nuôi cấy (Hình 1, 2, 3). Như vậy, dưới điều kiện ánh sáng đỏ *Spirulina* sp. tăng hiệu quả cố định CO₂ tốt hơn so với các điều kiện ánh sáng còn lại sau 5 ngày nuôi cấy. Ngược lại điều kiện ánh sáng trắng và xanh dương kích thích tế bào *Spirulina* sp. tổng hợp protein cao và hiệu quả cố định CO₂ thấp hơn sau 5 ngày nuôi cấy.

4. Kết luận

Điều kiện ánh sáng đỏ sau 5 ngày nuôi cấy kích thích *Spirulina* sp. tăng trưởng và tổng hợp carbohydrate cao, tuy nhiên hàm lượng protein thấp. Ở điều kiện ánh sáng xanh dương và trắng *Spirulina* sp. tăng trưởng thấp và hàm lượng carbohydrate cao sau 15 ngày nuôi cấy, trong khi đó hàm lượng protein cao sau 5 ngày nuôi cấy.

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] O. Ciferri and O. Tiboni, "The biochemistry and industrial tential of *Spirulina*," *Ann. Rev. Microbiol.*, Vol. 39, pp. 503-526, 1985.
- [2] L. Campanella, M. V. Russo, P. Avino, "Free and total amino acid composition in blue-green algae," *Annali di Chimica*, vol. 92(4), pp. 343-352, 2002.
- [3] L. P. Blinkova, O. B. Gorobets, A. P. Baturo, "Biological activity of *Spirulina*," *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.*, vol. 2pp. 114-118, 2001.
- [4] Z. Khan, P. Bhadouria and P.S. Bisen, "Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina*," *Current Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 6, pp. 373-379, 2005.

- [5] J. P. Pandey, A. Tiwari and R. M. Mishra, "Evaluation of Biomass Production of *Spirulina maxima* on Different Reported Media," *J. Algal Biomass Utiln.*, vol. 1(3), pp. 70 – 81, 2010.
- [6] C. J. Zhu and Y. K. Lee, "Determination of biomass dry weight of marine microalgae," *Journal of Applied Phycology*, vol. 9(2), pp. 189-194, 1997.
- [7] Y.K. Lee and H. Shen, "Basic culturing techniques," In: A. Richmond, *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, UK: Blackwell Science Ltd, pp. 44 – 82, 2004.
- [8] M. Levasseur, P. A. Thompson and P. J. Harrison, "Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources," *J. Phycol.*, vol. 29, 1993, pp. 87-595.
- [9] S. S. Neiselsen, *Food Analysis Laboratory Manual*. Springer New York Dordrecht Heidelberg London, pp. 47-52, 2010.
- [10] C. V. González-López, M. C. C. García, F. G. A. Fernández, C. S. Bustos, Y. Chisti, J. M. F. Sevilla, "Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass," *Bioresource Technology*, vol. 101, pp. 7587–7591, 2010.
- [10] R. K. Owusu-Apenten, *Food Protein Analysis: Quantitative Effects on Processing*. Marcel Dekker, New York, 2002.
- [12] M. Olaizola and E. O. Duerr, "Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*," *Journal of Applied Phycology*, vol. 2, pp. 97-104, 1990.
- [13] B. Muthuvelan, T. Noro and K. Nakamura, "Effect of light quality on the cell integrity in marine alga *Ulva pertusa* (Chlorophyceae)," *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, vol. 31(1), pp. 21-25, 2002.
- [14] M. Hultberg, H. L. Jönsson, K-J. Bergstrand, A. S. Carlsson, "Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga *Chlorella vulgaris*," *Bioresource Technology*, vol. 159, pp. 465–467, 2014.
- [15] R. B. Rivkin, "Influence of irradiance and spectral quality on the carbon metabolism of phytoplankton," *Marine ecology progress series*, vol. 55, pp. 291-304, 1989.
- [16] M. Al-Qasmi, S. Talebi, S. Al-Rajhi, T. Al-Barwani, "A Review of Effect of Light on Microalgae Growth," *Proceedings of the World Congress on Engineering*, Vol. 1, pp. 608-610, 2012.
- [18] K. M. Shekharam, L. V. Venkataraman and P. V. Salimath, "Carbohydrate composition and characterization of two unusual sugars from the blue green alga, *Spirulina platensis*," *Phytochemistry*, vol. 26(8), pp. 2267-2269, 1987.
- [18] P. H. Ravelonandro, D. H. Ratianarivo, C. Joannis-Cassan, A. Isambert and M. Raherimandimby, "Influence of light quality and intensity in the cultivation of *Spirulina platensis* from Toliara (Madagascar) in a closed system," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 83, pp. 842–848, 2008.
- [19] D. G. Wallen and G. H. Geen, "Light quality in relation to growth, photosynthetic rates and carbon metabolism in two species of marine plankton algae," *Marine Biology*, vol. 10, pp. 34-43, 1971.