

CHẾ TẠO CHẤT TĂNG TRƯỞNG TẢO OLIGOALGINATE BẰNG PHƯƠNG PHÁP CHIẾU XẠ γ -Co-60

LÊ QUANG LUÂN, NGUYỄN HUỲNH PHƯƠNG UYÊN

Trung tâm Hạt nhân Tp Hồ Chí Minh

NGUYỄN THỊ KIM LINH

Trường Đại học Nông lâm Tp Hồ Chí Minh

Alginate có khối lượng phân tử (Mw) ban đầu khoảng 903,8 kDa được chiếu xạ trực tiếp ở dạng bột trong khoảng liều xạ 100-1.000 kGy để cắt mạch và chế tạo chế phẩm oligoalginate. Kết quả nhận được cho thấy, Mw của alginate đã bị giảm đi khi liều chiếu xạ gia tăng. Các mẫu alginate sau khi chiếu xạ được sử dụng để nghiên cứu hiệu ứng tăng trưởng đối với tảo *Spirulina platensis*. Tất cả các mẫu alginate chiếu xạ đều có hiệu ứng tốt đối với sự sinh trưởng và phát triển của tảo và mẫu oligoalginate có Mw~13,6 kDa đã có tác dụng tăng trưởng sinh khối tươi ở mức 74,9% và hàm lượng chất khô ở mức 7,9%. So với đối chứng không xử lý, sự bổ sung oligoalginate trong khoảng nồng độ 40-150 ppm đều gia tăng có ý nghĩa thống kê sinh khối tươi cũng như hàm lượng chất khô và nồng độ bổ sung tối ưu đã xác định được là khoảng 100 ppm. Chế phẩm oligoalginate đã cho thấy đây là một sản phẩm có tiềm năng và triển vọng lớn cho sản xuất sinh khối tảo.

Từ khóa: alginate, chiếu xạ, oligoalginate, *Spirulina platensis*, tia γ .

PRODUCTION OF ALGAE GROWTH PROMOTER OLIGOALGINATE BY γ -CO-60 IRRADIATION METHOD

Summary

Alginate with molecular weight (Mw)~903.8 kDa has been directly irradiated in powder state at dose range of 100-1,000 kGy for degradation and preparation of Oligoalginate product. The results have shown that the Mw of alginate has been decreased corresponding to the increasing of irradiation dose. The degraded alginates have been used to study its effectiveness on the growth of algae namely *Spirulina platensis*. All of irradiated alginate samples have displayed an positive effect on the growth of the algae and the oligoalginate with Mw~13.6 kDa has promoted the fresh biomass to 74.9% and the dried matter content to 7.9% compared to those of the untreated control. In a comparison to the control, the supplementation of oligoalginate at the concentrations from 40 to 150 ppm has shown a significant increase of fresh biomass and dried matter content, and the optimum concentration of supplementation has been found to be about 100 ppm. The oligoalginate has shown as a very potential and promising product for biomass production of algae.

Keywords: *Spirulina platensis*, alginate, oligoalginate, irradiation, γ -rays.

Đặt vấn đề

Oligoalginate đã được chứng minh là một hoạt chất tự nhiên không chỉ có tác dụng tăng trưởng thực vật mà còn có tác dụng gia tăng hoạt tính kháng bệnh đối với cây trồng (Akimoto, *et al.*, 1999). Chiếu xạ là một phương pháp rất hữu hiệu để chế tạo oligoalginate từ alginate nhờ có nhiều ưu điểm, đó là quá trình xử lý ở nhiệt độ thường, sản phẩm kiểm soát rất hữu hiệu, dễ điều chỉnh, sản phẩm tạo không cần tinh chế và có thể áp dụng ở quy mô lớn. Hàng loạt các nghiên cứu trước đây đã cho thấy, oligoalginate có tác dụng thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển của thực vật, cụ thể là gia tăng sự phát triển rễ cây lúa mì, cà rốt và sinh khối củ cải (Adachi, *et al.*, 1989; Tomoda, *et al.*, 1994); thúc đẩy tăng trưởng thân ở cây lúa, ngũ cốc, thuốc lá, rau

cải và xà lách (Luan, *et al.*, 2012)... Trong nuôi cấy mô thực vật, oligoalginate cũng có tác dụng thúc đẩy sự tăng trưởng chiều cao cây, chiều dài rễ và sinh khối tươi các cây hoa cúc, sao tím và cát tường (Luan, *et al.*, 2003). Ngoài ra, oligoalginate cũng có hiệu ứng thúc đẩy gia tăng sinh khối đối với nấm *Penicillium chrysogenum* (Ariyo, *et al.*, 1997). Bên cạnh đó, tảo *Spirulina* đã được nghiên cứu và biết đến với nhiều chức năng, công dụng khác nhau và trở thành một loài vi tảo quý giá, như dùng làm thức ăn cho người và động vật (Ahsan, *et al.*, 2008), làm thực phẩm chức năng (Nguyễn Hữu Thuốc, 1988)... Ngoài ra, tảo *Spirulina* còn được ứng dụng trong xử lý nước thải (Chuntapa, *et al.*, 2003; Olguin, *et al.*, 2003), xử lý kim loại nặng như đồng (Solisio, *et al.*, 2006), thủy ngân (Amber, *et al.*, 2007) và cadimi (Murugesan, *et al.*, 2008). Bài viết nghiên cứu hiệu ứng của chế phẩm oligoalginate chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ lên sự tăng trưởng sinh khối của tảo *Spirulina platensis* với mục tiêu ứng dụng loại hoạt chất tăng trưởng có nguồn gốc tự nhiên phục vụ công nghệ nuôi trồng loài tảo vốn giàu tiềm năng này.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Alginate sử dụng do Hãng Katokichi Chemical (Nhật Bản) cung cấp. Tảo *Spirulina platensis* do Bộ môn Công nghệ sinh học (Trường Đại học Nông lâm Tp Hồ Chí Minh) cung cấp. Nguồn xạ sử dụng nguồn gamma Co-60 tại Viện Nghiên cứu hạt nhân Đà Lạt. Môi trường nuôi tảo sử dụng môi trường Zarrouk (Đặng Đình Kim và Đặng Hoàng Phước Hiền, 1998). Máy sắc ký gel thẩm qua (GPC: Gel Permeation Chromatography) model CO-8020 và cột sử dụng là của Hãng Tosho Co. Ltd. (Nhật Bản). Chất chuẩn sử dụng là polyethylene glycol (PEG) và pullulan của Hãng Wako Co. Ltd. (Nhật Bản).

Chế tạo oligoalginate bằng công nghệ bức xạ

Alginate dạng bột có Mw ban đầu khoảng 903,8 kDa được cho vào lọ thủy tinh có thể tích 50 ml, sau đó tiến hành chiếu xạ ở các liều xạ 100, 200, 400, 600, 800 và 1.000 kGy với xuất liều 3 kGy/giờ để cắt mạch.

Xác định Mw

Mẫu oligoalginate sau khi chiếu xạ được xác định Mw trên máy GPC sử dụng 3 cột TSKgel PW_{XL} (300 mmx7,8 mm) bao gồm G6000PW_{XL}, G3000PW_{XL} và

G2500PW_{XL} được kết nối với cột bảo vệ TSK guard column PW_{XL} (40 mmx6,0 mm). Dung dịch alginate được đo với nồng độ 1% trong dung môi NaNO₃ 0,1 Mol/l ở nhiệt độ 40°C sử dụng detector tán xạ RI-8020 (Tosho Co. Ltd. Japan) và chất chuẩn là PEG có Mw là 210²-610³ và pullulan có Mw là 5,9.10³-7,9.10⁵.

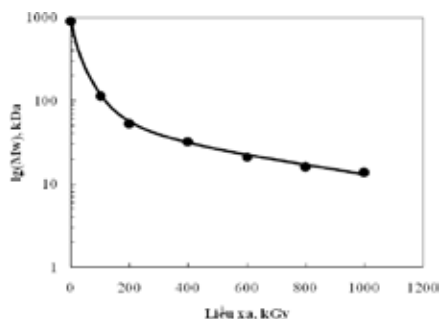
Xác định hiệu ứng tăng trưởng của oligoalginate lên sự tăng trưởng tảo

Cho 10 ml dịch tảo vào chai thủy tinh có chứa 500 ml môi trường Zarrouk có và không có bổ sung oligoalginate chế tạo ở các liều xạ khác nhau. Mỗi nghiệm thức gồm 9 chai và được lắc đều, sau đó nuôi ở nhiệt độ 34-37°C sục khí liên tục và chiếu sáng liên tục với cường độ chiếu sáng là 25.000-30.000 lux. Tại các thời điểm 0, 2, 4, 6 và 7 ngày nuôi cấy, lấy 30 ml dịch nuôi cấy để xác định các chỉ tiêu bao gồm sinh khối tươi và khô. Số liệu sau khi thu nhận được tiến hành xử lý thống kê bằng phần mềm MSTATC.

Kết quả và thảo luận

Cắt mạch bức xạ alginate và xác định Mw của oligoalginate

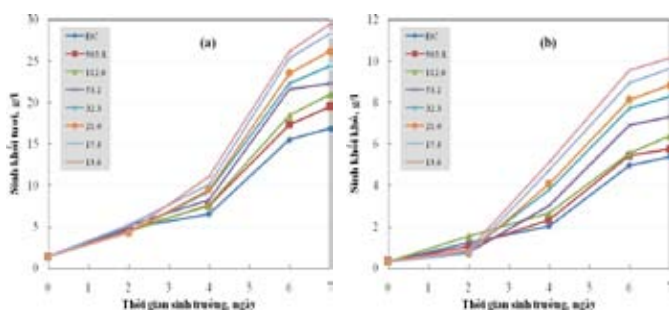
Nhiều công trình nghiên cứu trước đây đã cho thấy, oligoalginate có tính chất ưu việt hơn rất nhiều so với alginate. Có nhiều phương pháp để cắt mạch alginate trong quá trình chế tạo oligoalginate như sử dụng các tác nhân sinh học, hóa học và vật lý. Trong nhiều nghiên cứu trước đây đã cho thấy, khi chiếu xạ dung dịch alginate thì Mw suy giảm rất nhanh, quá trình cắt mạch tỷ lệ nghịch với nồng độ alginate trong dung dịch và tỷ lệ thuận với liều xạ (Luan, *et al.*, 2003). Trong nghiên cứu này, alginate được chiếu xạ trực tiếp ở dạng bột mà không cần pha loãng trong nước, đây chính là ưu điểm rất rõ của phương pháp chiếu xạ so với những phương pháp khác nhằm tạo ra sản phẩm có độ tinh khiết cao và tiện lợi trong quá trình sử dụng. Kết quả nhận được từ hình 1 cho thấy, Mw của alginate sau khi chiếu xạ bị giảm dần theo sự gia tăng của liều xạ và tốc độ suy giảm khá nhanh trong khoảng liều 100-400 kGy, cụ thể là từ Mw ban đầu là ~903,8 kDa đã suy giảm còn 32,3 kDa ở liều xạ 400 kGy. Khi tiếp tục chiếu xạ ở liều cao hơn thì sự suy giảm Mw chậm dần và đạt giá trị ~13,6 kDa tại liều chiếu xạ 1.000 kGy.



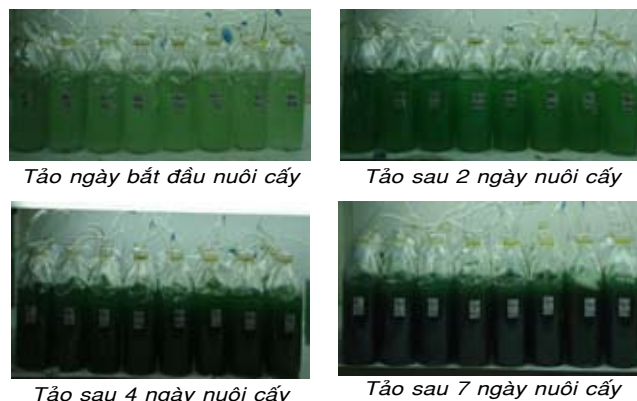
Hình 1: sự suy giảm Mw của alginate theo liều xạ

Ảnh hưởng của Mw oligoalginate lên sự tăng trưởng của tảo Spirulina

Oligoalginate đã được chứng minh là một loại hoạt chất tự nhiên có hiệu ứng tăng trưởng tốt đối với nhiều loại thực vật và nấm *Penicillium chrysogenum*. Tuy nhiên, mức độ của hiệu ứng mà hoạt chất này tạo nên đối với cây trồng đã được chứng minh là phụ thuộc rất lớn vào khối lượng phân tử của chúng (Adachi, *et al.*, 1989; Ariyo, *et al.*, 1997; Iwasaki and Matsubara, 2000; Luân, *et al.*, 2003; Tomoda, *et al.*, 1994). Thí nghiệm được tiến hành nhằm khảo sát ảnh hưởng của các chế phẩm oligoalginate chế tạo bằng kỹ thuật bức xạ có Mw trong khoảng 13,6-903,8 kDa với mục tiêu xác định Mw phù hợp của oligoalginate cho sự gia tăng sinh khối tảo. Kết quả nhận được từ hình 2 cho thấy, trong 2 ngày đầu tảo phát triển không đáng kể có thể là do tảo phải có thời gian thích nghi với môi trường. Từ ngày thứ 4 trở đi, tảo bắt đầu tăng trưởng nhanh hơn (xem hình 3) và sự khác biệt về sinh khối tươi và khô của tảo giữa các lô thí nghiệm đều có ý nghĩa thống kê so với lô đối chứng không bổ sung oligoalginate và lô bổ sung alginate không cắt mạch bức xạ. Điều đáng chú ý ở đây là, sinh khối tảo thu nhận được tăng dần theo chiều giảm khối lượng của oligoalginate và đạt cao nhất là ở lô bổ sung oligoalginate có Mw~13,6 kDa chế tạo được ở liều xạ 1.000 kGy.



Hình 2: sự gia tăng sinh khối tươi (a) và khô (b) của tảo Spirulina theo thời gian khi bổ sung oligoalginate có Mw khác nhau



Hình 3: tảo nuôi cấy trên môi trường bổ sung oligoalginate chế tạo bằng kỹ thuật bức xạ có Mw khác nhau

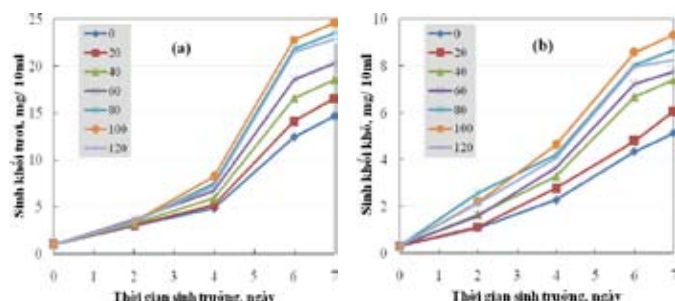
Kết quả nhận được ở bảng 1 sau 7 ngày nuôi cấy cho thấy, khi bổ sung oligoalginate đã có tác dụng gia tăng sinh khối tươi của tảo từ 22,4 đến 74,9%, trong khi đó sinh khối khô có mức độ gia tăng cao hơn (từ 18,8 đến 88,7%); điều đó cho thấy, oligoalginate không chỉ có tác dụng gia tăng sinh khối mà còn gia tăng cả hàm lượng chất khô. Nhiều nghiên cứu trước đây cũng cho thấy, khi bổ sung oligoalginate đã có tác dụng thúc đẩy quá trình quang hợp, gia tăng hấp thu dinh dưỡng và tăng cường hoạt tính của nhiều enzyme trong tế bào (Akimoto, *et al.*, 1999; Tomoda, *et al.*, 1994). Chế phẩm oligoalginate có Mw~13,6 kDa đã thể hiện hoạt tính cao nhất lên sự gia tăng sinh khối tươi (79,4%), sinh khối khô (88,7%) và hàm lượng chất khô (2,53%) so với đối chứng và alginate không cắt mạch. Kết quả này cũng khá phù hợp với các kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi trên đối tượng thực vật với Mw tối ưu là khoảng 14 kDa (Luan, *et al.*, 2003 and 2012).

Bảng 1: sinh khối và hàm lượng chất khô của tảo Spirulina sau 7 ngày nuôi cấy có bổ sung oligoalginate chế tạo bằng kỹ thuật bức xạ có Mw khác nhau

Mw, kDa	Sinh khối tươi		Sinh khối khô		Hàm lượng chất khô, %
	mg/10 ml	% SVĐC	mg/10 ml	% SVĐC	
ĐC	16,85 ^b	100,0	5,38 ^a	100,0	31,91 ^b
903,8	19,51 ^a	115,8	5,75 ^a	106,9	29,49 ^c
112,6	20,63 ⁱ	122,4	6,39 ^f	118,8	30,95 ^{bc}
53,2	22,27 ^e	132,2	7,30 ^e	135,7	32,79 ^{ab}
32,3	24,38 ^d	144,7	8,29 ^d	154,1	34,01 ^a
21,0	26,18 ^c	155,4	8,84 ^c	164,3	33,78 ^a
15,8	28,27 ^b	167,8	9,35 ^b	179,2	34,09 ^a
13,6	29,47 ^a	174,9	10,15 ^a	188,7	34,44 ^a
CV %	1,06		2,21		2,39

ĐC: không bổ sung oligoalginate, CV: hệ số biến thiên, các ký tự khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p < 0,01$

Ảnh hưởng của nồng độ oligoalginate ($M_w \sim 13,6$ kDa) lên sự sinh trưởng của tảo *Spirulina*



Hình 4: sự gia tăng sinh khối tươi (a) và khô (b) của tảo *Spirulina* theo thời gian khi bổ sung oligoalginate ($M_w \sim 13,6$ kDa) ở các nồng độ khác nhau

Thí nghiệm tiến hành với mục đích khảo sát nồng độ sử dụng tối ưu của chế phẩm oligoalginate có M_w phù hợp nhằm ứng dụng một cách hiệu quả hơn nữa chế phẩm này trong nuôi trồng tảo *Spirulina*. Kết quả nhận được từ hình 4 và bảng 2 cho thấy, sự bổ sung oligoalginate với nồng độ từ 40 đến 120 ppm đều thể hiện hiệu ứng gia tăng sự sinh trưởng và phát triển của tảo rất rõ rệt từ ngày nuôi cấy thứ 4 trở đi và rõ nhất là ở giai đoạn thu hoạch sau 7 ngày nuôi cấy. Nồng độ bổ sung của chế phẩm oligoalginate ở mức 100 ppm đã xác định được là nồng độ hiệu quả nhất đối với sự gia tăng sinh khối tảo *Spirulina* (xem hình 5) và tại nồng độ bổ sung này, sinh khối tươi và sinh khối khô đã tăng so với đối chứng tương ứng là 67,7 và 81,9%.

Bảng 2: sự gia tăng sinh khối tảo *Spirulina* theo nồng độ bổ sung oligoalginate ($M_w \sim 13,6$ kDa) sau 7 ngày nuôi cấy

Nồng độ oligoalginate, ppm	Sinh khối tươi		Sinh khối khô		Hàm lượng chất khô, %
	g/10ml	% SVĐC	mg/10ml	% SVĐC	
0	14,68 ^f	100,0	5,13 ^f	100,0	34,95 ^e
20	16,57 ^a	112,9	6,07 ^a	118,3	36,66 ^{cd}
40	18,58 ^a	126,6	7,41 ^d	144,4	39,88 ^a
60	20,32 ^d	138,4	7,77 ^d	151,5	38,22 ^a
80	23,57 ^b	160,6	8,67 ^b	169,0	36,80 ^{cd}
100	24,62 ^a	167,7	9,33 ^a	181,9	37,90 ^{bc}
120	22,88 ^c	155,9	8,25 ^c	160,8	36,06 ^{de}
CV %	0,62		2,02		2,09



Hình 5: mật độ tảo *Spirulina* sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường Zarrouk không bổ sung (DC) và có bổ sung oligoalginate ($M_w \sim 13,6$ kDa) ở nồng độ 100 ppm

Kết luận

Đã chế tạo được oligoalginate có M_w khác nhau bằng phương pháp chiếu xạ trực tiếp bột alginate. Các chế phẩm oligoalginate chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ đã có tác dụng thúc đẩy mạnh quá trình sinh trưởng và phát triển cũng như gia tăng hàm lượng chất khô của tảo *Spirulina platensis*. Oligoalginate với $M_w \sim 13,6$ kDa và nồng độ sử dụng 100 ppm đã được xác định là tối ưu và hiệu quả nhất trong nuôi trồng và sản xuất sinh khối tảo nêu trên. Chế phẩm oligoalginate có nguồn gốc tự nhiên an toàn và hiệu quả cao chế tạo bằng công nghệ bức xạ hứa hẹn là một sản phẩm ứng dụng tiềm năng trong công nghệ nuôi trồng tảo và sản xuất sinh khối *Spirulina platensis*, đặc biệt là cho mục đích làm thực phẩm ■

Tài liệu tham khảo

1. Adachi T., Ishii T., Hidaka H., 1989. Manufacture of oligomeric alginic acid with lyase, Chem. Abstr., 110: 439.
2. Ahsan M., Habib B., Parvin M., 2008. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish, FAO Fisheries And Aquaculture Department, Rome, Italy.
3. Akimoto C., Aoyagi H., Tanaka H., 1999. Endogenous elicitor-like effects of alginate on physiological activities of plant cell. Appl Microbiol Biotechnol. 52: 429-436.
4. Amber C, Raveender V.L, Keith W., 2007. Cyanobacteria as a biosorbent for mercuric ion. Bioresource Technol., 99: 6578-6586.
5. Ariyo B.T., Bucke C., Keshavarz T., 1997. Alginate oligosaccharides as enhancers of penicillin production in cultures of *penicillium chrysogenum*. Biotechnol. Bioeng., 53: 17-20.
6. Chuntapa B., Powtongsook S., Menasveta P., 2003. Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp culture tank, J. of Aquacul., 220: 355-366.
7. Đặng Đình Kim, Đặng Hoàng Phước Hiền, 1998. Tảo lam. NXB Giáo dục Tp. Hồ Chí Minh.
8. Luan L.Q., Nagasawa N., Hien N.Q., Kume T., Yoshii F., Nakanishi T.M., 2003. Biological effect of radiation-degraded alginate on flower plants in tissue culture. Biotechnol. Appl. Biochem., 38: 283-288.
9. Luan L.Q., Ha V.T.T., Uyen N.H.P., Trang L.T.T., Hien N.Q., 2012. Preparation of oligoalginate plant growth promoter by gamma-irradiation of alginate solution containing hydrogen peroxide, Agric. Food Chem., 60: 1737-1741, 2012.
10. Murugesan A.G., Maheswari S., Bagirath G., 2008. Biosorption of Cadmium by Live and Immobilized Cells of *Spirulina Platensis*. Inter. J. Environ. Res., 2: 307-312.
11. Nguyễn Hữu Thuộc, 1988. Tảo *Spirulina* - Nguồn dinh dưỡng và dược liệu quý, NXB Khoa học kỹ thuật, Hà Nội.
12. Olguin J., Galicia S., Mercado G., and Pérez T., 2003. Annual productivity of *Spirulina* (Arthrospira) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. J of Appl Phycol., 15: 249-257.
13. Solisio C., Lodi A., Torre P., Converti A., Borghi D., 2006. Copper removal by dry and re-hydrated biomass of *Spirulina platensis*. Bioresource Technol., 97: 1756-1760.
14. Tomoda Y., Uemura K., Asachi T., 1994. Promotion of barley root elongation hypoxic condition by Alginate Lyase Lysate (A.L.L.). Biosci. Biotechnol. Biochem., 58: 202-203.