

ĐÁNH GIÁ HÀM LƯỢNG MỘT SỐ HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC TỪ CHỦNG *SPIRULINA PLATENSIS* ST, TL VÀ BM THU ĐƯỢC Ở ĐIỀU KIỆN NUÔI TRONG MÔI TRƯỜNG SOT

Nguyễn Thị Liên⁽¹⁾

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một

Ngày nhận bài 01/04/2023; Ngày gửi phản biện 06/04/2023; Chấp nhận đăng 30/04/2023

Liên hệ email: liennt@tdmu.edu.vn

<https://doi.org/10.37550/tdmu.VJS/2023.04.447>

Tóm tắt

*Nghiên cứu đã đánh giá được hàm lượng chlorophyll, carotenoid, carbohydrate và lipid từ 3 chủng *Spirulina platensis* ST, TL và BM thu được ở điều kiện nuôi trong môi trường SOT. Kết quả cho thấy chủng TL là chủng có thành phần carbohydrate, carotenoid, chlorophyll và lipid cao hơn so với 2 chủng ST và BM cụ thể như sau: hàm lượng carbohydrate của 3 chủng TL, ST, BM lần lượt là 5,25; 4,67 và 2,98mg/g; hàm lượng carotenoid của 3 chủng TL, ST, BM lần lượt là 2,86; 2,76 và 2,34mg/g; hàm lượng lipid của 3 chủng TL, ST, BM lần lượt là 3,42; 1,51 và 2,98mg/g và hàm lượng chlorophyll của 3 chủng TL, ST, BM lần lượt là 13,9; 12,11 và 11,12mg/g.*

Từ khóa: *carbohydrate và lipid từ vi tảo, carotenoid, *Spirulina platensis*, thành phần chlorophyll*

Abstract

EVALUATION OF BIOACTIVE COMPOSITION FOR THREE STRAINS OF *SPIRULINA PLATENSIS* ST, TL, BM GROWN UNDER AQUEOUS CONDITION USING SOT MEDIUM

*The study evaluated chlorophyll, carotenoid, carbohydrate and lipid content from 3 strains of *Spirulina platensis* ST, TL and BM grown under aqueous conditions using SOT medium. The results showed that the TL strain had a higher carbohydrate, carotenoid, chlorophyll and lipid composition than the two ST and BM strains, specifically as follows:*

The carbohydrate content of the 3 strains TL, ST, BM was 5.25, 4.67 and 2.98mg/g respectively; the carotenoid content of 3 strains TL, ST, BM was 2.86; 2.76 and 2.34mg/g; the lipid content of 3 strains TL, ST, BM was 3.42; 1.51 and 2.98mg/g and the chlorophyll content of 3 strains TL, ST, BM was 13.9; 12.11 and 11.12mg/g respectively.

1. Đặt vấn đề

Tảo xoắn *Spirulina* được xem là nguồn dinh dưỡng số một của thiên nhiên với đủ các thành phần thiết yếu như protein, lipid, glucid cùng nhiều loại khoáng, vitamin và nhiều loại acid amin không thể thay thế là: lysine, metionin, penylalalin, triptophan. Ngoài ra, tảo xoắn *Spirulina* còn chứa phong phú vitamin B₁₂, β-carotene, xanthophyll. Hiện nay, đã có rất nhiều nghiên cứu đã chứng minh được tảo xoắn *Spirulina platensis* có những công dụng rất độc đáo như: tăng cường sức khỏe toàn diện thông qua việc cung cấp đầy đủ cho cơ thể các vitamin, khoáng chất và các acid amin thiết yếu, ngăn chặn việc tích trọng lượng thừa trong cơ thể, giảm cảm giác đói nhưng vẫn cung cấp đủ cho cơ thể các chất cần thiết cho sự sống và phòng ngừa ung thư (Fu và ctv., 2017).

Trước những giá trị mà *Spirulina platensis* mang lại thì việc đánh giá và chọn lọc được chủng tảo cho hàm lượng các chất có hoạt tính sinh học cao là hết sức cần thiết. Xuất phát từ lý do trên tiến hành đề tài: **Đánh giá hàm lượng một số hợp chất có hoạt tính sinh học từ chủng *Spirulina platensis* ST, TL và BM thu được ở điều kiện nuôi trong môi trường SOT.**

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Vật liệu nghiên cứu:

Tảo *S. platensis* được cung cấp từ Bộ sưu tập giống của Phòng Công nghệ Tảo, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.1.2. Thành phần môi trường SOT nuôi tảo

Môi trường nuôi cấy tảo: Môi trường SOT

Pha môi trường SOT trong 1 lít: 500mL dung dịch A + 500mL dung dịch B + 1mL A₅

Bảng 1. Các thành phần trong môi trường SOT

DD A (định mức 500mL bằng nước cất)	NaHCO ₃	16,8g
	K ₂ HPO ₄	0,5g
DD B (định mức 500mL bằng nước cất)	NaNO ₃	2,5g
	NaCl	1g
	K ₂ SO ₄	1g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,04g
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01g
	EDTA ₂ Na	0,08g
A ₅ (sử dụng 1mL cho 1 lít tảo)		1mL/L

Dung dịch A₅ pha trong 200mL nước cất theo công thức

Bảng 2. Dung dịch A₅ trong (200mL)

Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,005g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,044g
H ₃ BO ₃	0,57g
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,0088g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,016g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,362g

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tách chiết carbohydrate của tảo xoắn *Spirulina*

Được xác định bằng cách thủy phân hoàn toàn bằng acid và đo đường khử tạo ra bằng phương pháp DNS theo Dubois và ctv. (1956).

Cách tiến hành:

1. Cách xử lý mẫu: Cân m g bột khô sinh khối. Bổ sung 10mL HCl 2,5M vào, đun cách thủy 100°C, 30 phút, để nguội ở nhiệt độ phòng. Sử dụng NaOH 5M (khoảng 5,1mL) để chuẩn pH đạt 7-8. Định mức lên 25mL bằng nước cất. Hút 1mL mẫu li tâm 12.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C, thu được dịch trong.

2. Cách xác định cacbohydrate: Trộn 0,6mL dung dịch DNSA 1% + 0,6mL mẫu (dịch trong) theo tỉ lệ 1:1 đựng trong ống eppendorf 1,5mL đục 1 lỗ nhỏ trên nắp. Đun sôi 10 phút. Làm nguội ở nhiệt độ phòng trong 30 phút - 1 tiếng. Pha loãng ba lần bằng cách: hút 1mL dung dịch từ phản ứng trên pha với 2mL nước cất. Đo ở bước sóng 540nm, sử dụng nước cất làm blank.

3. Thay giá trị OD vào phương trình chuẩn trên được nồng độ cacbohydrate (mg/mL).

2.2.2. Phân tích carotenoid của tảo xoắn *Spirulina*

Cách tiến hành:

Phân tích sắc tố bằng phương pháp quang phổ theo mô tả của Wellburn và Lichtenthaler (1984) sử dụng acetone 80%.

1. Lấy V mL tảo lọc qua giấy lọc GF/C, giấy lọc chứa sinh khối được nghiền trong cát thủy tinh để phá vỡ tế bào. Nghiền cho đến khi thu được hỗn hợp mịn.

2. Bổ sung thêm 5mL acetone 80% tạo thành hỗn hợp và cho vào ống nghiệm (được bọc giấy bạc).

3. Lặp lại 2 để tráng cỏi chày sứ, giữ mẫu trong ít nhất 2 giờ.

4. Lọc hỗn hợp sau khi tách chiết qua giấy lọc GF/C. Sau đó, định mức lên 10mL bằng acetone 80% và cho vào ống đựng mẫu sạch.

Chú ý: Tất cả quá trình tách chiết được tiến hành trong lạnh và tối.

Đo OD bằng máy đo quang phổ ở các bước sóng.

Xử lý kết quả:

$$\text{Hàm lượng carotenoid (A = 200) (mg/g)} = \frac{OD_{460} \cdot V_{ml}}{A_{carotenoid} \cdot m_{SKK}}$$

Trong đó:

OD: Giá trị đo được bằng máy đo quang phổ ở các bước sóng. Ghi lại giá trị OD

V: Thể tích

m_{SKK} : Khối lượng sinh khối khô (g)

2.2.3. Phân tích chlorophyll của tảo xoắn *Spirulina*

Cách tiến hành:

Phân tích sắc tố bằng phương pháp quang phổ theo mô tả của Wellburn và Lichtenthaler (1984) sử dụng acetone 80%

1. Lấy V mL tảo lọc qua giấy lọc GF/C, giấy lọc chứa sinh khối được nghiền trong cát thủy tinh để phá vỡ tế bào. Nghiền cho đến khi thu được hỗn hợp mịn.

2. Bổ sung thêm 5mL acetone 80% tạo thành hỗn hợp và cho vào ống nghiệm (được bọc giấy bạc)

3. Lặp lại 2 để tráng cối chày sứ, giữ mẫu trong ít nhất 2 giờ

4. Lọc hỗn hợp sau khi tách chiết qua giấy lọc GF/C. Sau đó, định mức lên 10mL bằng acetone 80% và cho vào ống đựng mẫu sạch.

Chú ý: Tất cả quá trình tách chiết được tiến hành trong lạnh và tối.

Đo OD bằng máy đo quang phổ ở các bước sóng. Ghi lại giá trị OD

Xử lý kết quả:

$$\text{Hàm lượng chlorophyll (A = 82,4) (mg/g)} = \frac{OD_{662} \cdot V_{ml}}{A_{chlorophyll} \cdot m_{SKK}}$$

Trong đó:

OD: giá trị đo được bằng máy đo quang phổ ở các bước sóng. Ghi lại giá trị OD

V: Thể tích

m_{SKK} : khối lượng sinh khối khô (g)

2.2.4. Phương pháp tách chiết lipid của tảo xoắn *Spirulina* (Guo và ctv., 2014):

Cách tiến hành:

1. Cân m g SKK nghiền trong cối chày sứ với hỗn hợp và ngâm chiết trong V₁ mL hỗn hợp chloroform:methanol (2:1) theo tỉ lệ 1:40, w/v khoảng 30 phút.

2. Loại bỏ bã sau khi lọc qua giấy lọc GF/C Whatman và chuyển phần đi qua giấy lọc lên phễu chiết.

3. Tiến hành bổ sung V₂ ml thêm dung dịch NaCl 0,9% (theo tỉ lệ 1:15, w/v), trộn đều và để tĩnh. Thu lớp dưới chứa lipid.

4. Rửa lớp trên bằng chloroform cho đến khi hết màu xanh để thu được toàn bộ mẫu.

5. Loại bỏ dung môi ở 70°C thu được lipid tổng số.

6. Hoà tan mẫu lại trong n-hexane, lọc qua giấy lọc để loại bỏ cặn và làm bay hơi dịch sau lọc ở 70°C thu được lipid tổng số (m_2).

Hàm lượng lipid tổng số được tính theo công thức sau:

$$\text{Lipid tổng (\%)} = \frac{m_2}{m_1} \times 100$$

2.2.5. Phương pháp xác định độ ẩm (TCVN 1867:2001)

Nguyên tắc: Dùng sức nóng làm bay hơi hết hơi nước trong mẫu. Cân trọng lượng mẫu trước và sau khi sấy khô, từ đó tính ra phần trăm nước có trong mẫu.

Dụng cụ:

Tủ sấy điều chỉnh nhiệt độ

Cân phân tích, độ chính xác 0,0001g

Cách tiến hành:

Cân khối lượng các mẫu phân tích (m_1), sau đó cho vào tủ sấy điều chỉnh nhiệt độ thích hợp trong thời gian quy định và đem đi cân lại khối lượng sau khi sấy (m_2).

$$\% \text{ độ ẩm} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100$$

Trong đó:

m_1 là khối lượng trước khi sấy

m_2 là khối lượng sau khi sấy

2.2.6. Phương pháp phân tích số liệu

Một nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Statgraphics

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Thí nghiệm 1: Đánh giá thành phần carotenoid trong 3 chủng tảo *Spirulina platensis*

Bảng 3. Thành phần carotenoid trong 3 chủng tảo

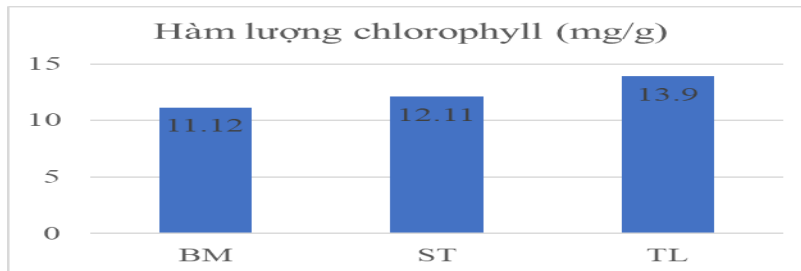
Chủng	Hàm lượng caroten (mg/g)
BM	2,34 ±0,01 ^c
TL	2,86±0,02 ^a
ST	2,76±0,05 ^b

* Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê theo phân tích ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Qua bảng 3 ta thấy hàm lượng carotenoid của chủng TL là cao nhất đạt 2,86(mg/g), xếp cuối cùng có hàm lượng carotenoid thấp nhất là chủng BM đạt 2,34(mg/g). Saefurahman và ctv. (2021) cũng đã xác định hàm lượng caroten từ *S.*

platensis, kết quả tổng caroten đạt được là 7,9µg/mL. Kết quả còn cho thấy hiệu quả khi chiết xuất carotene tối ưu được thực hiện ở nhiệt độ thấp. Theo nghiên cứu của tác giả Abdo và ctv. (2012) đã đánh giá thành phần caroten của tảo *Anabaena spaerica* thấy hàm lượng carotenoid là 0,24mg/g thấp hơn so với 3 chủng ST, BM và TL. Như vậy chủng TL có hàm lượng cao hơn gấp 12 lần so với tảo *Anabaena spaerica*.

3.2. Thí nghiệm 2: Đánh giá thành phần chlorophyll trong ba chủng tảo



Hình 1. Biểu đồ chlorophyll của 3 chủng tảo

Chlorophyll được sử dụng làm chất tạo màu tự nhiên trong thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm. *Spirulina platensis* được xem là một nguồn sinh khối giàu hàm lượng sắc tố chlorophyll. Tuy nhiên hàm lượng chlorophyll phụ thuộc vào loại giống tảo cũng như điều kiện nuôi cấy.

Nhìn vào hình 1 ta thấy kết quả hàm lượng chlorophyll trong chủng TL cao nhất đạt 13,9(mg/g), tiếp là chủng ST đạt 12,11(mg/g) và cuối cùng xếp thứ 3 là chủng BM. Sự chênh lệch giữa BM và ST khoảng 1(mg/g). Saefurahman và ctv. (2021) đã xác định hàm lượng các sắc tố của *Spirulina platensis*. Kết quả đạt được tổng chlorophyll là 52,28µg/mL (trong đó 25,28µg/mL chlorophyll a và 27µg/mL chlorophyll b) và tổng hàm lượng carotenoid là 7,9µg/ml. Kết quả này thấp hơn so với hàm lượng sắc tố của chủng *Spirulina platensis* TL.

Hàm lượng chlorophyll của chủng ST, BM thấp hơn trong khi chủng TL lại cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Rangel-Yagui và ctv. (2004). Theo Rangel-Yagui và ctv. (2004) khi đánh giá thành phần chlorophyll trong sinh khối *Spirulina platensis* thu được khi nuôi trong môi trường có bổ sung 500mg/l urea ở những cường độ chiếu sáng khác nhau. Kết quả cho thấy ở cường độ chiếu sáng 3500 Lux thì hàm lượng chlorophyll thu được cao nhất đạt 13,1mg/g. Kết quả này thấp hơn so với hàm lượng chlorophyll trong chủng TL (13,9mg/g), nhưng cao hơn không đáng kể so với chủng ST (12,11mg/g) (Rangel-Yagui và ctv., 2004).

3.3. Thí nghiệm 3: Đánh giá thành phần carbohydrate trong ba chủng tảo

Bảng 4. Thành phần carbohydrate trong 3 chủng tảo

Chủng	Carbohydrate (%)
ST	4,67±0,17 ^b
TL	5,25±0,14 ^a
BM	2,98±0,14 ^c

* Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê theo phân tích ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Kết quả khảo sát thành phần carbohydrate thì hàm lượng carbohydrate của chủng tảo BM là thấp nhất đạt 2,98% thấp hơn so với chủng tảo ST và TL. Qua khảo sát trên nhận thấy chủng TL phần trăm carbohydrate là cao nhất 5,25%.

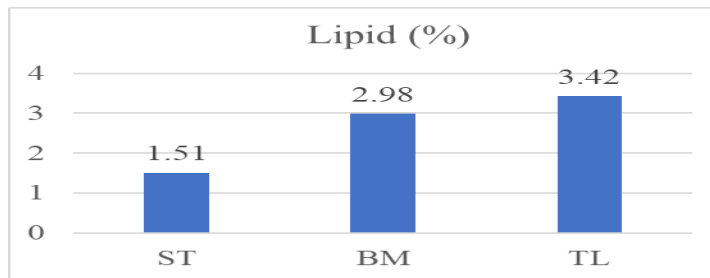
Vyas và ctv. (2022) đã đánh giá thành phần carbohydrate của tảo *Chlorella sorokiniana* nuôi trong điều kiện quang tự dưỡng và dị dưỡng. Kết quả nghiên cứu cho thấy tổng hàm lượng carbohydrate khi nuôi trong điều kiện quang tự dưỡng (6,39 %) và dị dưỡng (8,66 %). Như vậy chủng *Spirulina platensis* TL, ST và BM khi nuôi trong môi trường SOT có hàm lượng carbohydrate thấp hơn so với nghiên cứu của Vyas và ctv. (2022) trên *Chlorella sorokiniana*.

3.4. Thí nghiệm 4: Đánh giá thành phần lipid trong 3 chủng tảo

Bảng 5. Thành phần lipid trong 3 chủng tảo

Chủng	Lipid (%)
ST	1,51±0,02 ^c
BM	2,98±0,01 ^b
TL	3,42±0,05 ^a

* Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê theo phân tích ANOVA ($\alpha = 0,05$).



Hình 2. Biểu đồ lipid của 3 chủng tảo

Nhìn vào kết quả bảng 5 và hình 2 ta thấy kết quả khảo sát lipid ở 3 chủng tảo dao động từ 1,51%-3,42%. Phần trăm lipid của chủng TL là cao nhất so với 2 chủng còn lại đạt 3,42%. Tiếp đến là hàm lượng lipid của chủng BM 2,98%, cuối cùng là chủng ST đạt 1,51% có hàm lượng lipid thấp nhất. Vyas và ctv. (2022) đã đánh giá thành phần lipid của tảo *Chlorella sorokiniana* nuôi trong điều kiện quang tự dưỡng và dị dưỡng. Kết quả cho thấy hàm lượng lipid đạt $(3,19 \pm 0,23\text{g/L})$ ở tỷ lệ C/N 60 sau 72 giờ sinh trưởng ở chế độ dị dưỡng. Kết quả này cao hơn so với hàm lượng lipid của chủng BM, ST nhưng tương đương với hàm lượng lipid của chủng *Spirulina platensis* TL nghiên cứu.

Theo Rodrigues (2010) đã đánh giá thành phần lipid của tảo *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) khi nuôi ở cường độ chiếu sáng 13.000 Lux trong điều kiện sử dụng KNO_3 và NH_4Cl làm nguồn nitơ trong môi trường. Kết quả nghiên cứu cho thấy thu được sinh khối tảo *Spirulina* chất lượng cao với hàm lượng lipid là 20,5% cao hơn rất nhiều so với 3 chủng TL, ST và BM. Như vậy tùy thuộc vào điều kiện nuôi và giống tảo thì hàm lượng lipid sẽ khác nhau.

4. Kết luận

Sinh khối tảo xoắn được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm vì nó giàu chất sinh hóa và chất chống oxy hóa có lợi cho sức khỏe con người. *Spirulina platensis* được xem là nguồn sinh khối có giá trị để trích ly các chất có hoạt tính sinh học. Trong 3 chủng *spirulina platensis* nghiên cứu TL, BM, ST thì chủng TL là chủng có thành phần carbohydrate, caroten và lipid cao hơn so với 2 chủng ST và BM. Cần tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện môi trường tới hàm lượng protein cũng như các thành phần có hoạt tính sinh học khác của tảo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Abdo, M. S., Hetta, H. M., Samhan, A. F., El Din, S. A. R., và Ali, H. G. (2012). Phytochemical and Antibacterial Study of Five Freshwater Algae Species. *Asian Journal of Plant Sciences*, 1-8
- [2] Dubois G., Gilles K. A., Hamilton S. K., Rebers P. A., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem*, 28(3),350-356
- [3] Fu W., Nelson D. R., Yi Z., Xu M., Khraiweh B., Jijakli K., Chaiboonchoe A., Alzahmi A., Al-Khairy D., Brynjolfsson† S. and Salehi-Ashtiani K. (2017). *Bioactive Compounds From Microalgae: Current Development and Prospects. Studies in Natural Products Chemistry*, 199-225. doi:10.1016/b978-0-444-63929-5.00006-1
- [4] Guo, F.J., Wang, H., Wang, J.F., Zhou, W.J., Gao, L.L., Dong, Q.Z., Zhang, W., Liu, T.Z. (2014). Special biochemical responses to nitrogen deprivation of filamentous oleaginous microalgae *Tribonema sp.* *Bioresour. Technol*, 158, 19-24
- [5] Konstantinos N. Papadopoulos (2008). *In: Food Chemistry Research Developments: microalge in novel food products.* Nova Science Publishers, Inc.
- [6] Rangel-Yagui, C. de O., Danesi, E. D. G., de Carvalho, J. C. M., và Sato, S. (2004). Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. *Bioresource Technology*, 133-141.
- [7] Rodrigues, M. S., Ferreira, L. S., Converti, A., Sato, S., và Carvalho, J. C. M. (2010). Fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: Potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. *Bioresource Technology*, 4491-4498.
- [8] Saefurahman G., Rahman A. A., Hidayatuloh S., Farobie O. and Abidin Z. (2021). *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 749, 012005
- [9] Vyas S., Patel A., Risse E. N., Krikigianni E., Rova U., Christakopoulos P. and Matsakas L. (2022). Biosynthesis of microalgal lipids, proteins, lutein, and carbohydrates using fish farming wastewater and forest biomass under photoautotrophic and heterotrophic cultivation. *Bioresource Technology*, Vol 359, 127494. doi: 10.1016/j.biortech.2022.127494.
- [10] Wellburn A. R. and Lichtenthaler H. (1984). *Advances in Photosynthesis Research*, Vol 2, ISBN : 978-90-247-2943-2