

**NGHIÊN CỨU CÁC YẾU TỐ MÔI TRƯỜNG NUÔI TRỒNG ẢNH HƯỞNG
ĐẾN HOẠT TÍNH ĐỘNG TỤ MÁU CỦA LECTIN CHIẾT TỪ
RONG KAPPAPHYCUS ALVAREZII**

Lê Đình Hùng, Huỳnh Quang Năng, Trần Kha, Ngô Quốc Bưu
Phân Viện Khoa Học Vật Liệu Tại Nha Trang

TÓM TẮT Những yếu tố môi trường nuôi trồng như nhiệt độ, độ muối, cường độ ánh sáng và dinh dưỡng đã ảnh hưởng một cách đáng kể đến hàm lượng và hoạt tính đông tụ máu của lectin chiết từ Rong Đỏ *Kappaphycus alvarezii*. Số liệu thực nghiệm cho thấy lectin không bền ở điều kiện nhiệt độ cao, bức xạ mặt trời mạnh. Vì vậy, việc nghiên cứu các yếu tố môi trường nuôi trồng tối ưu cho rong *Kappaphycus alvarezii* với chất lượng lectin cao đã được tiến hành.

Những kết quả thu được cho thấy các yếu tố môi trường (nhiệt độ, độ muối, pH, dinh dưỡng và cường độ ánh sáng) trong nuôi trồng rong *Kappaphycus alvarezii* giữ một vai trò quan trọng trong sự quyết định hàm lượng và hoạt tính của lectin. Để thu nhận dịch chiết có hàm lượng và hoạt tính lectin cao từ rong *Kappaphycus alvarezii*, điều kiện nuôi trồng phù hợp là: dinh dưỡng: $NH_4Cl + KH_2PO_4$ hoặc dạng $KNO_3 + KH_2PO_4$, pH: 8,1 – 8,3, độ muối: 33 – 34 ppt, nhiệt độ: $28 \pm 0,5^\circ C$ và cường độ ánh sáng: 10.000 – 15.000 lux. Do đó, việc nuôi trồng Rong Sụn nên được quy hoạch tại những vùng có các yếu tố môi trường phù hợp từ kết quả nghiên cứu này. Kết quả này cũng đang được ứng dụng để nuôi trồng rong *Kappaphycus alvarezii* tại một số ao, đầm ở các tỉnh phía Nam.

**STUDY ON ENVIRONMENTAL FACTORS IN CULTURE
AFFECTING THE HEMAGGLUTINATION ACTIVITY
OF LECTIN FROM KAPPAPHYCUS ALVAREZII**

Le Dinh Hung, Huynh Quang Nang, Tran Kha, Ngo Quoc Bui
Institute of Materials Science, Nha Trang Branch

ABSTRACT Environmental factors such as temperature, salinity, light intensity, nutrient... affect strongly to the quantity and quality (hemagglutination activity-HA) of lectin extracted from the red seaweed *Kappaphycus alvarezii*. The experimental data showed that lectin is unstable under conditions of high temperature and intensive solar irradiation. The study on optimum environmental condition in order to receive the high quantity and quality lectin from cultured *Kappaphycus alvarezii* was carried out.

The results showed that the environmental factors as temperature, salinity, pH, nutrient and intensity were important for both quantity and quality of *Kappaphycus alvarezii* lectin. The optimum environmental conditions are

nutrient: $NH_4Cl + KH_2PO_4$ or $KNO_3 + KH_2PO_4$, pH: 8.1 – 8.3, salinity: 33 – 34 ppt, t° : $28 \pm 0.5^{\circ}C$ and light intensity: 10,000 – 15,000 lux.

Therefore, the culture of red seaweed should be planned in areas with similar environmental conditions as indicated in this study. This result has been applied for culture of *Kappaphycus alvarezii* in some lagoons and ponds in South Vietnam.

I. GIỚI THIỆU

Lectin là một chất có khả năng đông tụ máu (agglutinin), đặc trưng cho từng nhóm máu người và động vật. Nó gồm một protêin liên kết với carbohydrate (glycoprotêin) không có nguồn gốc miễn dịch (non-immunological) và có thể bị ức chế bởi những đường đơn [8]. Hoạt tính sinh học đầu tiên để nhận biết lectin là khả năng của chúng làm đông kết hồng cầu máu người hoặc động vật đã được xử lý với papain hoặc trypsin [3]. Lectin được dùng để tinh chế và nghiên cứu cấu trúc của những polyme chứa carbohydrate, khảo sát cấu trúc của carbohydrate phức tạp trên bề mặt của tế bào động vật, khuẩn và virus, xác định cấu trúc bề mặt tế bào và sự thay đổi của nó đối với sự biến đổi của bệnh ung thư, nghiên cứu cấu tạo của nhiễm sắc thể tế bào và phát hiện những nhiễm sắc thể lạ cũng như nghiên cứu cấu trúc của nhóm máu, nhận diện dạng máu mới (sự định bệnh của những chất tiết ra từ máu), xác định vị trí liên kết carbohydrate đặc trưng trên protêin...[4]. Vai trò sinh hóa của lectin hiện nay không rõ ràng, có người cho rằng lectin đóng một vai trò trong những phản ứng bảo vệ động vật không có xương sống với chức năng như một thành phần huyết thanh và tác dụng như những thuốc bảo vệ

chống khuẩn [6] hoặc chức năng không miễn dịch cũng như sự cộng sinh trung gian và thúc đẩy sự tái tổ hợp tế bào [7, 10].

Đã có nhiều kết quả nghiên cứu về lectin trên thế giới và ở Việt Nam chủ yếu từ các loài thực vật bậc cao và động vật (kể cả các loài động vật thân mềm - mollusca ở biển), song lectin trong rong biển còn ít được đề cập. Boyd (1966) [1] đã phát hiện sự có mặt của lectin trong rong biển ở Anh và Đức [11]. K. Hiro (1981) đã xác định sự có mặt của lectin trong 100 mẫu rong (trong tổng số 260 mẫu) từ Rong Lục (Chlorophyte), Rong Nâu (Phaeophyte), Rong Đỏ (Rhodophyte) ở Nhật Bản [5].

Khác với lectin trong các loài thực vật bậc cao, lectin từ các loài Rong Đỏ có trọng lượng phân tử thấp (từ 4.200 trong *Hypnea japonica* [5] đến 64.500 trong *Ptilota serrata* [9]), đặc biệt là hoạt tính của nó không bị biến đổi đối với pH và nhiệt độ, không phụ thuộc vào các cation hóa trị hai và có thể bảo quản trong một thời gian dài trong điều kiện ở nhiệt độ thấp.

Bài báo này trình bày một số kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của các yếu tố môi trường nuôi trồng (chủ yếu là nhiệt độ, độ mặn, cường độ ánh sáng, các chất dinh dưỡng) đến hoạt tính đông tụ máu của lectin trong rong *Kappaphycus alvarezii*.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng

Đối tượng nghiên cứu là loài Rong Sụn - *Kappaphycus alvarezii* có nguồn gốc từ Philippines. Nó là nguyên liệu chính cho chế biến Kappa - Carrageenan hiện nay trên thế giới, được Phân viện Khoa học Vật liệu tại Nha Trang di trồng và đang được phát triển nuôi ở các loại thủy vực khác nhau: vùng biển hở, trong các đầm phá, trong ao đầm tự nhiên và nhân tạo ven biển phía Nam Việt Nam.

2. Phương pháp nghiên cứu

Hệ thống bể nuôi:

Dùng các bể kính (dung tích 60 lít) (B) và nước biển tự nhiên có hệ thống lọc và sục khí tuần hoàn, rong được cho vào các khung lưới và treo cố định trong các bể nuôi, ở thời gian nuôi mỗi đợt thí nghiệm là 20 ngày và xác định hoạt tính đông tụ máu của lectin (hemagglutination activity HA) so với hoạt tính ban đầu.

Kiểm soát các điều kiện nuôi trồng:

Nhiệt độ (bằng hệ thống điều khiển nhiệt độ tự động của Nhật Bản Rei - sea, Temp - controller TG). Ánh sáng (bằng hệ thống đèn huỳnh quang và ánh sáng tự nhiên, được đo bằng máy đo cường độ ánh sáng Custom lux Meter Lx 1332 (Nhật Bản). Độ mặn (pha mẫu nước biển và nước ngọt theo độ mặn mong muốn bằng máy đo độ muối Refractometer ATAGO S/MILL).

Muối dinh dưỡng: các muối NH_4Cl , KNO_3 , KH_2PO_4 .

Phương pháp chiết dịch lectin:

Hóa chất: NaCl, Trypsin, concanavalin A do phòng thí nghiệm Marine Green Japan cung cấp.

Máu cừu và thỏ do viện Pasteur Nha Trang cung cấp.

Phương pháp chiết mẫu:

Rong tươi được rửa sạch bằng nước, cắt nhỏ thành đoạn 5mm, nghiền nhuyễn và chiết với ethanol 20%, đưa toàn bộ dịch chiết vào ống ly tâm 50ml, lắc đều và giữ lạnh ở 5°C trong 12 giờ hoặc hơn để chiết lectin, sau đó ly tâm mẫu ở 2.000 vòng/phút trong 10 phút, chiết lấy phần nước ở trên cho vào 3 ống 1,8ml, bảo quản ở nhiệt độ 20°C để xác định hàm lượng protein (Lowry *et al.*, 1951), hàm lượng đường (Dubois *et al.*, 1956), hàm lượng lectin (phương pháp ELISA với chất chuẩn concanavalin A) và hoạt tính đông tụ máu với máu thỏ và cừu [1, 2, 10].

Xử lý máu: Máu động vật được đưa vào dung dịch NaCl 0,85%, lắc đều, ly tâm 1.800 vòng/phút, loại bỏ lớp trên và rửa lại vài lần với dung dịch NaCl 0,85%, sau đó xử lý hồng cầu ở dạng huyền phù với dung dịch trypsin 0,5% trong NaCl 0,85% ở nhiệt độ $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ trong 60 phút, ly tâm và rửa lại vài lần với NaCl 0,85%, cuối cùng pha hồng cầu ở dạng huyền phù trong NaCl 0,85%, bảo quản ở 2 - 4°C để thử hoạt tính của lectin. Dùng concanavalin A làm chất chuẩn để đánh giá khả năng đông tụ máu của lectin đối với hồng cầu đã xử lý trypsin.

Phương pháp thử hoạt tính đông tụ máu của lectin: 25 μl dung dịch NaCl 0,85% được cho vào mỗi lỗ của đĩa microtiter (96 lỗ), 25 μl dịch chiết lectin được cho vào bằng sự pha loãng gấp đôi liên tiếp theo hàng, sau đó 25 μl

huyền phù hồng cầu đưa vào mỗi lỗ, đĩa được trộn và lắc nhẹ, để yên ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ và xác định hoạt tính đông tụ máu. Mẫu lectin không có hoạt tính, hồng cầu tập trung ở đáy giống như là một vết đỏ, ngược lại mẫu có hoạt tính, hồng cầu dính kết và làm thành kết tủa xung quanh mỗi lỗ của đĩa. Hoạt tính đông tụ máu được xác định bằng số lần pha loãng như 2^4 hoặc 2^8 ...[10]. Hàm lượng lectin được xác định bằng phương pháp ELISA.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Ảnh hưởng của dinh dưỡng

Rong *Kappaphycus alvarezii* được nuôi trồng trong 6 bể (B) thí nghiệm bằng nước biển đã được lọc với các chế độ bổ sung dinh dưỡng khác nhau, các điều kiện còn lại thì giống nhau.

Điều kiện môi trường ở các bể: nhiệt độ: $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$; độ muối (S): 33‰; pH: 8,1; cường độ ánh sáng (LI): 35.000 - 45.000 Lux.

Bảng 1: Ảnh hưởng của dinh dưỡng đến hoạt tính đông tụ máu của lectin

Số bể	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆
Dinh dưỡng	không	KH ₂ PO ₄	KNO ₃	NH ₄ CL	KNO ₃ + KH ₂ PO ₄	NH ₄ CL+KH ₂ PO ₄
HA _t	4	4	4	4	4	4
HA _s	3,75	4	46,6	57,3	192	256

- HA_t : hoạt tính đông tụ máu của lectin của rong trước khi làm thí nghiệm.
- HA_s: hoạt tính đông tụ máu của lectin của rong sau khi kết thúc thí nghiệm.
- Giá trị HA được xác định từ giá trị trung bình của 3 lần thử.

Hoạt tính đông tụ máu của lectin thay đổi mạnh dưới tác dụng của muối dinh dưỡng (tùy từng loại cũng như kết hợp lại) được cho vào môi trường nuôi rong, trong đó muối NH₄CL tác dụng cao nhất (HA_s = 57,3) tiếp đến KNO₃ (46,6) và KH₂PO₄ hầu như không có tác dụng. Hỗn hợp muối (NH₄CL+KH₂PO₄) có tác dụng cao nhất (HA_s = 256) tiếp đến KNO₃ + KH₂PO₄

(HA_s = 192). Như vậy dạng muối NH₄CL+KH₂PO₄ có tác dụng cao nhất đối với sự tăng lên của hoạt tính đông tụ máu của lectin trong Rong Sụn.

2. Ảnh hưởng độ muối (salinity S ‰)

Điều kiện ở các bể thí nghiệm: nhiệt độ: $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$; pH: 8,1; dinh dưỡng: NH₄CL + KH₂PO₄; cường độ ánh sáng (LI): 10.000 - 15.000 lux.

Bảng 2: Ảnh hưởng độ muối đến hoạt tính đông tụ máu của lectin

Số bể	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅
S ‰	15	20	30	33	40
HA _t	16	16	16	16	16
HA _s	128	256	284	512	64

Kết quả này cho thấy rằng, nồng độ muối trong môi trường nuôi trồng thay đổi có ảnh hưởng mạnh đến sự tạo thành lectin trong quá trình phát triển của rong cũng như hoạt tính của lectin. So với hoạt tính ban đầu $HA_t = 16$, khi nồng độ muối giảm xuống $S\% = 15 - 20$ thì hoạt tính tăng không đáng kể ($HA_s = 128; 256$) khi nồng độ muối trong môi trường nuôi trồng tăng lên $S\% = 30 - 33$ (tương đương với

nồng độ muối trong nước biển) thì hoạt tính của lectin đạt cao nhất $HA_s = 512$, khi nồng độ muối cao hơn nữa $S\% = 40$ thì hoạt tính của lectin giảm rất nhanh $HA_s = 64$.

3. Ảnh hưởng nhiệt độ

Điều kiện nuôi trồng ở các bể: dinh dưỡng: $NH_4CL + KH_2PO_4$; pH: 8,1; độ muối (S): 33‰; cường độ ánh sáng (LI): 10.000 - 15.000 lux.

Bảng 3: Ảnh hưởng nhiệt độ đến hoạt tính đông tụ máu của lectin

Số bể	B1	B2	B3	B4
T ^o C	26 ± 0,5 ^o C	28 ± 0,5 ^o C	32 ± 0,5 ^o C	34 ± 0,5 ^o C
HA _t	96	96	96	96
HA _s	426,6	896	384	256

So với hoạt tính ban đầu ($HA_t = 96$), khi nhiệt độ môi trường nuôi trồng rong thay đổi thì hoạt tính của lectin cũng thay đổi theo. Bể B₁ (T^oC = 26 ± 0,5^oC) tương đương nhiệt độ trong mùa đông ở một số vùng biển phía Nam, hoạt tính tăng lên không nhiều ($HA_s = 426,6$); khi nhiệt độ tăng lên như ở bể B₂ (T^oC = 28 ± 0,5^oC) thì lectin cho hoạt tính cao nhất ($HA_s = 896,6$), trái lại khi nhiệt độ tăng cao hơn nữa như ở bể B₃ và B₄ thì hoạt tính của lectin giảm xuống rõ rệt, đặc biệt là ở B₄ (T^oC = 34) tương đương với nhiệt độ mùa hè ($HA_s = 256$), điều này lý giải tại sao

hàm lượng và hoạt tính của lectin trong mùa hè thấp.

4. Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng (LI)

Cường độ ánh sáng giữ một vai trò quan trọng trong quá trình quang hợp và trao đổi chất của thực vật, vì vậy nó ảnh hưởng đáng kể đến sự hình thành lectin (glycoprotein) trong sự phát triển của rong biển. Điều kiện thí nghiệm ở các bể (B) thì giống nhau, ngoại trừ cường độ ánh sáng.

Điều kiện nuôi trồng ở các bể: dinh dưỡng: $NH_4CL + KH_2PO_4$; pH: 8,1; độ muối (S): 33‰; nhiệt độ: 28 ± 0,5^oC.

Bảng 4: Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng (LI) đến hoạt tính đông tụ máu của lectin

Số bể	B1	B2	B3	B4
LI (Lux)	1.500 - 3.000	10.000 - 15.000	25.000 - 30.000	35.000 - 45.000
HA _t	18	28	18	18
HA _s	182,6	512	256	128

Ở cường độ ánh sáng thấp LI = 1.500 - 3.000 lux hoạt tính của lectin thấp ($HA_s = 182,6$) do khả năng quang hợp và trao đổi chất xảy ra chậm nên sự hình thành sản phẩm trung gian (lectin) glucoprotein thấp. Trong khi đó, khi cường độ ánh sáng tăng lên LI = 10.000 - 15.000 lux thì lectin đạt hoạt tính cao nhất ($HA_s = 512$), ở cường độ ánh sáng này hàm lượng glycoprotein được tích lũy cao nhất trong rong. Trái lại, khi cường độ ánh sáng tăng cao LI = 35.000 - 45.000 lux (B_4) thì hoạt tính của lectin giảm xuống rất nhiều ($HA_s = 128$). Như vậy ở cường độ ánh sáng 35.000 - 45.000 lux hoặc cao hơn nữa (tương tự như cường độ ánh sáng trong mùa hè) thì hàm lượng và hoạt tính của lectin rất thấp và hầu như không đáng kể.

IV. KẾT LUẬN

Những kết quả nghiên cứu thu được đã chỉ ra rằng, các yếu tố môi trường nuôi trồng rong *Kappaphycus alvarezii* (nhiệt độ; độ muối; pH; dinh dưỡng và cường độ ánh sáng) giữ một vai trò quan trọng trong sự quyết định hàm lượng và hoạt tính của lectin.

Để nhận được một dịch chiết lectin từ rong *Kappaphycus alvarezii* có hàm lượng và hoạt tính cao, các điều kiện nuôi trồng qua khảo sát thu được như: dinh dưỡng: $NH_4Cl + KH_2PO_4$ hoặc dạng $KNO_3 + KH_2PO_4$; pH: 8,1-8,3; độ muối (S): 33 - 34‰; nhiệt độ: $28 \pm 0,5^\circ C$ và cường độ ánh sáng: 10.000 - 15.000 Lux. Do đó, việc nuôi trồng Rong Sụn phải được qui hoạch tại những vùng có những yếu tố môi trường tương ứng với những kết quả

thu được ở trên và kết quả này chúng tôi đã và đang áp dụng để nuôi trồng rong *Kappaphycus alvarezii* trong một số ao, đầm ở các tỉnh phía Nam.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ và hỗ trợ trong quá trình nghiên cứu của phòng thí nghiệm Marine Greens Laboratory, Ehime Nhật Bản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Boyd W. C., Almodovar L. R., Boyd L. G., 1966. Transfusion (Philadelphia), 6: 82 - 83.
2. Fabregas J., A. Muñoz, Llovo, 1986. Hemagglutinins in brown seaweed. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., vol. 97: 213-219.
3. Goldstein I. J., Poretz R. D. (eds.), 1986. Properties, functions and applications in biology and medicine (Irwin J. Goldstein, Ronald D. Poretz: Isolation and chemical properties of lectins). pp. 35 - 211, Academic Press Inc., New York.
4. Goldstein I. J., Poretz R. D. (eds.), 1986. Properties, functions and applications in biology and medicine (Halina Lis, Nathan Sharon: Applications of lectins). pp. 294 - 355, Academic Press Inc., New York.
5. Kanji Hiro, Keisuke Miyazawa, Nobuhiro Fusetani, Kanehisa Hashimoto, Keiji Ito, 1986. Hypnins, low - molecular weight peptidic agglutinins isolated from a

- marine red alga, *Hypnea japonica*, pp: 228 - 236.
6. Ratcliffe N. A., Rowley A. F., Fitzgerald S. W., Rodes C. P. (eds), 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *Int. Rev. Cytol.*, 97: 183 – 350.
 7. Renwranz L., Stahmer A., 1983. Opsonizing properties of an isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin - like recognition molecules at the surface of hemocytes from *Mytilus edulis*. *J. Comp. Physiol.*, 149: 535 – 546.
 8. Rogers D. J., B. C. Fish, 1991. Marine algal lectins - *Lectin Reviews* .Volume 1, pp. 129 – 142.
 9. Rogers D. J., Fish. B. C., Barwell C. J., 1990. Biology, biochemistry, clinical biochemistry. Vol. 7, pp. 49 – 52. Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA.
 10. Thomas C. Chiles, Kimon T. Bird, 1989. A comparative study of animal erythrocyte agglutinins from marine algae. *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 94B(1): 107 - 111.
 11. Thomas C. Chiles, Kimon T. Bird, 1990. Gracilaria tikvahiae agglutinin. Partial purification and preliminary characterization of its carbohydrate specification; *carbohydrate research*, 207: 319 - 326.