

NGHIÊN CỨU VÀ KIỂM SOÁT QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT CHẤT MÀU THỰC PHẨM PHYCOCYANIN TỪ TẢO XOẮN SPIRULINA

Đến tòa soạn 29-10-2018

Đoàn Duy Tiên, Hà Thị Hải Yến, Lê Trường Giang
Viện Hóa Học, Viện Hàn Lâm Khoa Học Công Nghệ Việt Nam

Quản Cẩm Thúy

Trường Đại học Công nghiệp Việt Trì, Phú Thọ

Nguyễn Quang Trung

Trung Tâm Nghiên Cứu và Chuyển Giao Công Nghệ

SUMMARY

STUDY AND CONTROL PROCESS EXTRACT FOOD COLORING OF PHYCOCYANIN FROM SPIRULINA

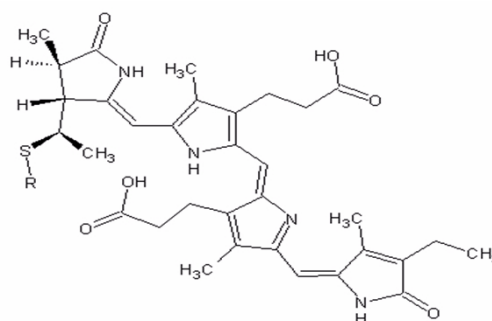
Phycocyanin is a protein pigment complex of the phycobiliprotein family that plays a role in absorbing sunlight for photosynthesis. Phycocyanin is used in the food and beverage industry as a natural "Lina Blue" colorant and which is widely used in candy, snacks and ice cream. Phycocyanin is also used in cosmetics such as lipstick and eyeliner. Spirulina contains very high levels of phycocyanin (15%), and it is easily adapted to cultured conditions in Vietnam. In this study, we carry on a study on the extraction of phycocyanin from spirulina with high efficiency (> 80%) by ultrasonic extraction and developed a method to determine the phycocyanin content in Spirulina algae which was commercially available with repeatability and high repetition (RSD < 10%).

Key words: *Phycocyanin, spirulina, food additives, HPLC, ultrasonic extraction.*

1. MỞ ĐẦU

Phycocyanin là một phức sắc tố protein thuộc họ phycobiliprotein có vai trò hấp thụ ánh sáng mặt trời cho quá trình quang hợp. Khối lượng phân tử của nó khoảng 70.000 đến 110.000 Dalton. Cấu trúc của phycocyanin bao gồm chuỗi α và β với tỷ lệ tương đương. Phycocyanin được hình thành qua liên kết lưu huỳnh của hợp phần Cystein trong trình tự polypeptit với cacbon mang nhóm vinyl của tetrapyrrol Phycocyanobilin (Hình 1) [1].

Trong cấu trúc của tảo spirulina, phycocyanin tan trong nước và tập hợp thành nhóm và liên kết với màng tế bào tạo thành phycobilisomes [2-9]



Hình 1: Cấu trúc của Phycocyanin với R là hợp phần protein



Hình 2: Phycocyanin thành phẩm

Phycocyanin có màu xanh huỳnh quang đặc trưng (Hình 2), cực đại hấp thụ ánh ở vùng 620 nm và phát huỳnh quang ở vùng 650 nm. Màu của phycocyanin sắc nét và có cường độ cao. Phycocyanin có tính chất huỳnh quang nên được sử dụng làm chất hiện màu trong các xét nghiệm miễn dịch [1].

Phycocyanin mang lại đa lợi ích về công nghệ và ứng dụng. Ngoài vai trò làm chất màu thực phẩm, phycocyanin còn được sử dụng trong các xét nghiệm miễn dịch, làm thực phẩm chức năng cung cấp protein, nó mang lại nhiều tính chất quý giá như: bảo vệ màng tế bào, chống oxy hóa ở ngưỡng 10 μ M, ngăn chặn quá trình oxy hóa lipid, bảo vệ gan, chống viêm, cải thiện hệ miễn dịch, tăng cường chức năng cho tế bào tùy sống, giải độc, hỗ trợ điều trị ung thư theo cơ chế apoptosis [8-9]

Bằng phương pháp chiết siêu âm, chúng tôi tiến hành tối ưu qui trình tách chiết phycocyanin từ tảo spirulina với dung môi thân thiện với môi trường là nước vì vậy sản phẩm tạo thành đạt tiêu chuẩn thực phẩm [9-10]. Các yếu tố ảnh hưởng đến qui trình chiết tách này chính là thời gian chiết siêu âm, và số lần chiết. Chúng tôi cũng đã xây dựng được phương pháp xác định phycocyanin trong tảo spirulina vì hàm lượng phycocyanin trong loài tảo spirulina phụ thuộc vào kỹ thuật nuôi trồng, môi trường sinh sống (ảnh hưởng của nồng độ HCO₃⁻ và Mg, Fe, N, P), bảo quản và thời gian thu hoạch.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất

Chất chuẩn Phycocyanin (>98%, Sigma Aldrich), natri acetat, natri clorua, amoni sulfat, axit acetic (Merck), axetonitril (Thermo Fisher), nước khử ion (Millipore).

Cân 10 mg chuẩn phycocyanin bằng cân 4 chữ số, sau đó hòa tan chất chuẩn bằng 10,00 mL dung môi axetonitril thu được dung dịch chuẩn có hàm lượng 1000 μ g/mL. Từ dung dịch chuẩn này, tiến hành pha loãng thành những dung dịch có nồng độ 1, 10, 20, 50, 100 ng/mL.

2.2. Dụng cụ - Thiết bị

Thiết bị: Hệ thống sắc kí lỏng cao áp Ultimate 3000 plus (Thermo Scientific, USA) được ghép nối với đầu dò huỳnh quang Ultimate 3000 Fluorescence Detector. Cột sắc kí Hypersil GOLD C4 (250 \times 4.6 mm, 5 μ m) (Thermo Scientific), máy đông khô, máy xay, bể siêu âm, cân phân tích 4 chữ số

Dụng cụ: Cốc thủy tinh các loại, phễu lọc, ống ly tâm 50 mL, bình tam giác nút nhám, đĩa thủy tinh, giấy lọc băng xanh.

2.3. Điều kiện sắc kí lỏng

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng cột sắc kí Hysersil GOLD C4 để phân tách hợp chất phycocyanin và chlorophyl có chứa trong tảo spirulina. Dung môi sử dụng cho hệ thống sắc kí lỏng bao gồm: pha động (A) axit acetic 0.1% (pH = 4.5) được pha trong nước khử ion và pha động (B) là dung môi axetonitril. Chương trình dung môi như sau: cột sắc kí được cân bằng trong dung môi ban đầu là A:B = 60:40 (v/v), sau đó tăng tỉ lệ dung môi lên tỉ lệ A:B = 20:80 (v/v) trong 7 phút. Tốc độ dòng sử dụng là 1.0 mL/phút. Sử dụng đầu dò huỳnh quang có bước sóng kích thích (λ_{ex}) là 609 nm và bước sóng phát xạ (λ_{em}) là 643 nm. Thể tích tiêm là 20 μ L và nhiệt độ lò cột được sử dụng là 35^oC.

2.4. Quá trình tinh chế phycocyanin từ tảo spirulina

Quá trình chiết phycocyanin:

Cân 1 g tảo spirulina đã được đông khô, đồng nhất vào ống ly tâm 50 mL. Sau đó cho thêm vào bình tam giác 10 mL đệm acetat (nồng độ

đậm là 20 mM) có chứa 50 mM natri clorua. Siêu âm trong 20 phút ở tần số 50 kHz và nhiệt độ là 30°C. Sau đó thu lấy phần dịch trong và tiến hành chiết cạn thêm 2 lần như trên. Dịch chiết sau 3 lần chiết sẽ được lọc qua giấy lọc băng xanh để loại đi cặn bẩn. Dịch lọc thu được được định mức thành 50 mL.

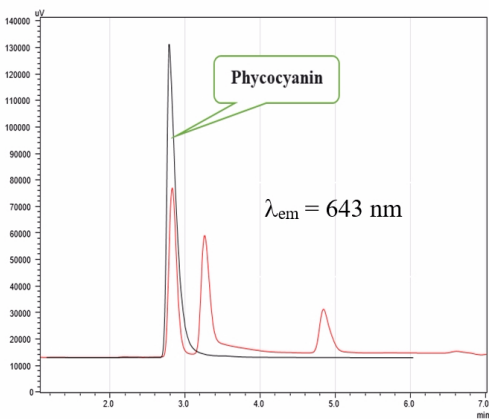
Quá trình kết tủa và tinh chế phycocyanin:

Sau khi định mức thành 50 mL, dịch lọc được chuyển vào bình tam giác có nút nhám, tiếp tục cho vào dịch chiết 3 g (NH₄)₂SO₄, tiến hành lắc mẫu trong 6 giờ ở điều kiện nhiệt độ 4°C. Kết tủa thu được có màu xanh chính là phycocyanin. Lọc kết tủa bằng giấy lọc băng xanh sử dụng hệ thống lọc áp suất thấp thu được phycocyanin thô. Tiếp tục rửa kết tủa bằng 3 lần × 100 mL nước khử ion được làm lạnh ở 5°C, sau đó 2 lần × 10 mL ethanol để loại đi tạp chất. Sản phẩm sau lọc được đem đi đông khô và bảo quản.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Điều kiện sắc kí lỏng

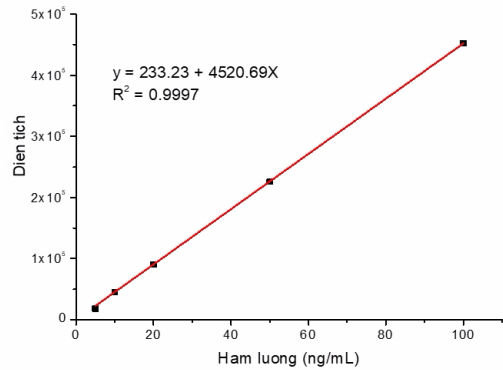
Sử dụng cột sắc kí có pha tĩnh là C4 kết hợp với chương trình dung môi thích hợp, nghiên cứu này đã xây dựng được điều kiện sắc kí lỏng tối ưu cho phycocyanin. Píc sắc kí sắc, nhọn, đối xứng, thời gian phân tích ngắn và có độ lặp lại cao (RSD_{IR} < 5%). Sắc kí đồ của phycocyanin trong dung dịch chuẩn và mẫu được thể hiện ở Hình 3.



Hình 3: Sắc kí đồ của hợp chất phycocyanin trong chuẩn (màu đen) và trong dịch chiết (màu đỏ)

Từ Hình 3, cho thấy chương trình dung môi của chúng tôi sử dụng có khả năng tách được

phycocyanin với những chất tạp trong dịch chiết. Do đó, phép định lượng của chúng tôi không bị ảnh hưởng của nền mẫu làm ảnh hưởng đến kết quả phân tích. Từ đó, chúng tôi tiến hành xây dựng đường chuẩn của phycocyanin. Kết quả được thể hiện trong Hình 4.



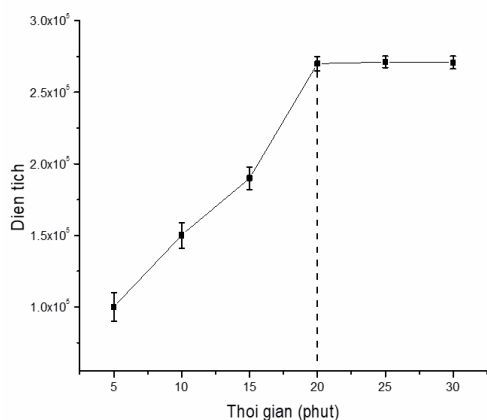
Hình 4: Đường chuẩn của Phycocyanin

3.2. Tối ưu quá trình chiết phycocyanin bằng phương pháp chiết siêu âm

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật chiết siêu âm để chiết phycocyanin từ tảo spirulina. Hiệu suất chiết của kỹ thuật chiết siêu âm chịu ảnh hưởng mạnh mẽ của hai yếu tố là thời gian chiết và số lần chiết. Đây là hai thông số quan trọng, cần được tối ưu để có thể đạt được hiệu suất chiết lớn nhất.

3.2.1. Thời gian chiết

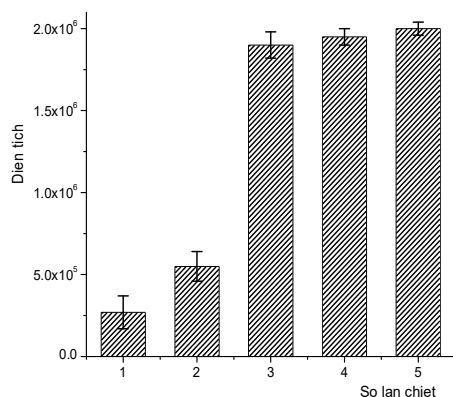
Thời gian chiết chiếm vai trò quan trọng trong chiết siêu âm. Nếu thời gian chiết quá ngắn thì hiệu suất chiết không đạt được giá trị tối ưu vì chưa phá vỡ cấu trúc thành tế bào cũng như lõi kéo hợp chất cần phân tích ra khỏi tế bào. Ngược lại, nếu thời gian chiết quá dài dẫn đến tiêu tốn thời gian cũng như làm tăng khả năng ảnh hưởng của môi trường đến chất phân tích. Dựa vào diện tích píc sắc kí của phycocyanin khi chiết 0.1g tảo spirulina đã được đông khô với thể tích dung môi chiết là 10mL, chúng tôi tiến hành khảo sát thời gian chiết ở những mốc thời gian như: 5, 10, 15, 20, 25, 30 phút. Kết quả được thể hiện trong Hình 5.



Hình 5: Khảo sát thời gian chiết siêu âm

3.2.2. Khảo sát số lần chiết

Dựa vào thời gian tối ưu đã được khảo sát, chúng tôi tiếp tục tối ưu số lần chiết siêu âm. Dựa vào diện tích pic sắc kí của phycocyanin khi chiết 0.1g tảo spirulina đã được đông khô với dung môi chiết là 10 mL. Ở mỗi khảo sát số lần chiết, dịch chiết thu được sẽ được gộp chung và định mức thành 50 mL. Kết quả được thể hiện ở Hình 6. Từ hình 6, cho thấy từ lần chiết thứ 3 gần như hoàn toàn phycocyanin đã được chiết ra khỏi tế bào của tảo, sau đó dù có tăng số lần chiết lên thì hiệu suất chiết cũng không thay đổi.



Hình 6: Khảo sát số lần chiết

Từ hai khảo sát trên, chúng tôi tối ưu qui trình chiết phycocyanin như sau: chiết mẫu 3 lần, mỗi lần với 10 mL dung môi chiết, thời gian cho mỗi lần chiết là 20 phút ở điều kiện tần số siêu âm 50 kHz và nhiệt độ chiết là 30°C.

3.3. Hiệu suất thu hồi của quá trình tinh chế

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp thêm chuẩn để đánh giá hiệu suất của quá trình tinh chế phycocyanin. Cân chính xác 0.1 g chuẩn phycocyanin, sau đó hòa tan chuẩn này bằng 50 mL dung dịch chiết. Sau đó tiến hành kết tủa và kết tinh phycocyanin như mục 2.4. Kết quả thu được ở Bảng 1. Hiệu suất thu hồi cả quá trình tinh chế phycocyanin đạt được trên 80%.

Bảng 1: Hiệu suất thu hồi quá trình tinh chế phycocyanin khi dùng phương pháp thêm chuẩn

Lý thuyết (g)	Thực tế (g)	Hiệu suất thu hồi (%)
0.1	0.0846 ± 0.0024	84.6 ± 2.4

3.4. Ứng dụng nghiên cứu để đánh giá hàm lượng phycocyanin trong tảo spirulina thương mại

Hàm lượng phycocyanin trong tảo spirulina phụ thuộc nhiều vào môi trường sống, điều kiện dinh dưỡng, ánh sáng cũng như tuổi đời của tảo khi thu hoạch. Do đó, việc tầm soát được hàm lượng phycocyanin trong tảo nguyên liệu có thể giúp nhà sản xuất thu được lợi nhuận cao hơn vì đạt được năng suất sản xuất lớn nhất. Từ đó, chúng tôi sử dụng phương pháp chiết phycocyanin trong nghiên cứu này để đánh giá hàm lượng phycocyanin có trong tảo đã được thương mại hóa và tất cả sản phẩm đã được đông khô loại đi hàm lượng nước.

Kết quả thu được thể hiện trong Bảng 2.

Từ Bảng 2, cho thấy đa phần các loại tảo thương mại có hàm lượng phycocyanin từ 13 đến 15% khối lượng tảo. Điều này phù hợp với những nghiên cứu của thế giới về loại tảo này. Tuy nhiên, xuất hiện trường hợp hàm lượng phycocyanin chiếm 7% khối lượng của tảo. Nguyên nhân việc này có thể do cách chăm sóc tảo, điều kiện sống hoặc phối trộn các loại tảo khác. Điều này dẫn đến sự đáng lo ngại về chất lượng sản phẩm tảo spirulina trên thị trường hiện nay.

Bảng 2: Hàm lượng phycocyanin trong các mẫu tảo thương mại

Sản phẩm (1g)	Hàm lượng phycocyanin sau khi chiết (mg/mL)	Hàm lượng Phycocyanin sau khi được qui đổi (%)
T1	2.86 ± 0.13	14.3 ± 0.9
T2	3.24 ± 0.12	16.2 ± 0.8
T3	3.04 ± 0.15	15.2 ± 1.0
T4	1.42 ± 0.24	7.1 ± 1.5
T5	2.64 ± 0.13	13.2 ± 0.9

4. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thành công trong việc đưa ra được qui trình tinh chế phycocyanin từ tảo spirulina đạt hiệu suất trên 80%. Quy trình chiết siêu âm cũng như quá trình kết tinh có độ ổn định, độ lặp lại cao. Đồng thời, chúng tôi đã xây dựng được phương pháp xác định hàm lượng phycocyanin bằng hệ thống sắc kí lỏng ghép nối đầu dò huỳnh quang. Từ đó có thể giúp giám sát hàm lượng phycocyanin trong tảo nguyên liệu, giúp cho việc sản xuất mang lại hiệu quả cao hơn.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ đề tài VAST.TĐ.TP.04/16-18

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ch. Romay, I, R. González, I, N. Ledón, I, D. Remirez, I and V. Rimbau, Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects Current Protein and Peptide Science, 2003, 4, 207-216
- Bhat, V.B. and Madyastha, K.M. (2000), C-phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. Biochem. Biophys. Res. Commun., 275, 20-25.
- Madhava C. Reddy, J. Subhashini, S.V.K. Mahipal, Vadiraja B. Bhat, P. Srinivas Reddy, G. Kiranmai, K.M. Madyastha, and P. Reddanna, C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages, Biochemical and Biophysical Research Communications 304 (2003) 385–392
- Diadelis Ramirez, CA, Ricardo Gonzalez,

Nelson Merino, Sandra Rodriguez and Odelsa Ancheta Inhibitory effects of Spirulina in zymosan-induced arthritis in mice, Mediators of Inflammation, 11, 75–79 (2002)

5. Hui-Fen Chiu¹, Shih-Ping Yang², Yu-Ling Kuo³, Yuan-Shu Lai⁴ and Tz-Chong Chou Mechanisms involved in the antiplatelet effect of C-phycocyanin, British Journal of Nutrition (2006), 95, 435–440

6. C. Romay, N. Ledón and R. González V Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation, Volume 47, Number 8, 334-338, Inflammation Research

7. Osamu Hayashi^{1,*}, Shoji Ono, Kyoko Ishii, Yan Hai Shi, Tomohiro Hirahashi & Toshimitsu Katoh, Enhancement of proliferation and differentiation in bone marrow hematopoietic cells by Spirulina (Arthrospira) platensis in mice, Journal of Applied Phycology (2006) 18: 47–56

8. Ou Y, Zheng S, Lin L, Jiang Q, Yang X, Protective effect of C-phycocyanin against carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in vitro and in-vivo. Chem Biol Interact. 2010 Apr 29;185(2):94-100. Epub 2010 Mar 12

9. Roy KR, Nishanth RP, Sreekanth D, Reddy GV, Reddanna P. Hepatol, C-Phycocyanin ameliorates 2-acetylaminofluorene induced oxidative stress and MDR1 expression in the liver of albino mice, Res. 2008 May;38(5):511-20. Epub 2007 Nov 21.

10. C. C. Moraes, Luisa Sala, G. P. Cerveira and S. J. Kalil, C-Phycocyanin extraction from Spirulina platensis wet biomass, Brazilian Journal of Chemical Engineering, Vol. 28, No. 01, pp. 45 - 49, January - March, 2011