

## NGHIÊN CỨU THU NHẬN PHYCOCYANIN TỪ TẢO *SPIRULINA*

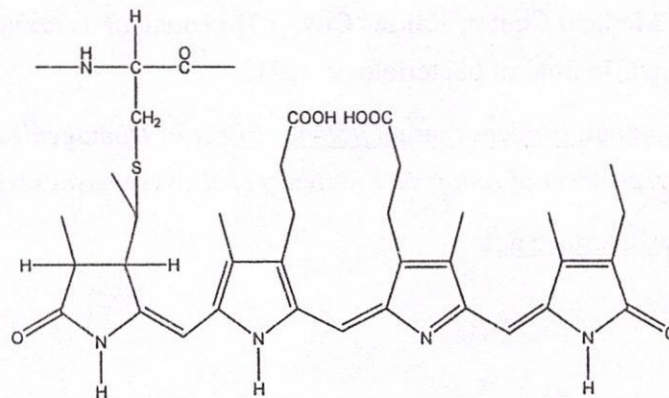
Trần Bích Lam, Nguyễn Thị Mỹ Phúc, Phạm Quang Sơn

Khoa Công Nghệ Hoá Học, Trường ĐH Bách Khoa – ĐHQG – HCM

(Bài nhận ngày 28 tháng 3 năm 2005, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 20 tháng 5 năm 2005)

**TÓM TẮT:** Trong nghiên cứu này, phycocyanin đã được tách chiết bằng phương pháp diêm tích, sử dụng  $(NH_4)_2SO_4$  ở các nồng độ 15% và 35%, tốc độ ly tâm tương ứng là 4000 vòng/phút và 6000vòng/phút trong 10 phút, kết tủa được làm sạch bằng phương pháp thẩm tích trong 8 tiếng. Dịch sau thẩm tích được sấy phun thu chế phẩm. Thử nghiệm tinh sạch chế phẩm bằng phương pháp sắc ký cột trên cột Sephadex G-100 thu được phân đoạn tốt nhất có  $A_{620}/A_{280} = 4,36$ . Chế phẩm bền màu trong điều kiện bảo quản lạnh tránh ánh sáng, pH sử dụng là lớn hơn hoặc bằng 4,5.

### 1. Đặt vấn đề



C-Phycocyanin (C-PC) là thành phần chính của phycobiliprotein trong nhiều loài tảo lam và chiếm thứ 2 trong một số tảo đỏ. Trong tảo *Spirulina* phycocyanin là sắc tố có hàm lượng cao. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy khả năng ứng dụng rộng rãi của phycocyanin trong thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm (các loại kem làm trắng da, chất chống oxi hóa) và trong y học (khả năng kháng bệnh ung thư)[1]. Việc nghiên cứu tách chiết phycocyanin đã được nhiều nhà khoa học trong và ngoài nước tiến hành, nhiều phương pháp cũng đã được đưa ra [1, 2, 3]. Tuy nhiên cho đến nay Việt Nam vẫn chưa sản xuất phycocyanin thương phẩm và vẫn phải nhập phycocyanin với giá rất cao.

Thực hiện đề tài này chúng tôi mong muốn đưa ra được một phương pháp thu nhận phycocyanin đơn giản, đồng thời nghiên cứu khả năng tinh sạch phycocyanin. Nội dung đề tài nghiên cứu bao gồm: nghiên cứu chọn điều kiện trích ly, tạo chế phẩm; nghiên cứu tinh sạch và bảo quản chế phẩm.

### 2. Nguyên liệu và phương pháp

#### 2.1 Nguyên liệu

Nguyên liệu: bột tảo thương phẩm do công ty Vĩnh Hào cung cấp.

#### 2.2 Phương pháp tách chiết

Bột tảo *spirulina* được ngâm trong dung dịch đệm photphat 50mM pH 6,8 sau đó ly tâm thu dịch màu. Tách một phần tạp chất bằng phương pháp kết tủa phân đoạn ammonium sulfate (SA) nồng độ thấp và ly tâm loại tủa. Thu kết tủa phycocyanin bằng SA nồng độ cao. Loại các muối vô cơ bằng phương pháp thẩm tích đối nước. Dịch sau thẩm tích được đem sấy phun thu chế phẩm.

### 1.3 Phương pháp nghiên cứu

Phycocyanin có phổ hấp thụ cực đại tại bước sóng 620nm. Độ hấp thụ ở bước sóng 620nm ( $A_{620}$ ) biểu thị cho cường độ sắc tố phycocyanin hay hàm lượng phycocyanin.

Do bản chất cromoprotein nên giống như các protein khác phycocyanin cũng hấp thụ ở 280nm, độ hấp thụ ở bước sóng 280nm ( $A_{280}$ ) biểu thị cho nồng độ protein.

Trong quá trình nghiên cứu trích ly và thu nhận phycocyanin, độ tinh khiết của dung dịch phycocyanin được xác định bằng hệ số  $A_{620}/A_{280}$  [1]

Thử nghiệm tinh sạch bằng phương pháp sắc ký lọc gel trên cột Sephadex G-100 (2x50cm).

## 3. Kết quả và bàn luận

### 3.1. Chọn điều kiện tách chiết

Tào sau khi ngâm trong dung dịch đệm được đem đi ly tâm thu dịch, để chọn điều kiện cho quá trình ly tâm ta tiến hành ly tâm ở các tốc độ khác nhau (1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000 vòng/phút) với thời gian ly tâm được cố định là 10 phút.

Kết quả chọn được tốc độ ly tâm thích hợp là 4000 vòng/phút có tỉ lệ  $A_{620}/A_{280}$  cao nhất là 1,876. Cố định tốc độ vòng là 4000 vòng/phút, thay đổi thời gian ly tâm 5, 10, 15, 20 phút chọn được thời gian ly tâm thích hợp là 10 phút. Qua thí nghiệm cũng nhận thấy tốc độ ảnh hưởng nhiều đến hiệu quả của quá trình ly tâm hơn là thời gian do đó chọn thời gian cho các lần ly tâm sau này là 10 phút.

#### 3.1.1. Chọn điều kiện loại tạp chất

Dịch màu thu được sau ly tâm được bổ sung  $(NH_4)_2SO_4$ , nồng độ thay đổi, kết tủa protein tạp. Kết quả chọn được nồng độ  $(NH_4)_2SO_4$  15%, ly tâm loại tủa ở 4000 vòng/phút thời gian ly tâm 10 phút, nhiệt độ ly tâm 4°C.

#### 3.1.2. Chọn điều kiện kết tủa phycocyanin

Dùng  $(NH_4)_2SO_4$  bão hòa kết tủa phycocyanin, thay đổi tốc độ ly tâm từ 1000 - 6000 vòng/phút. Thấy rằng chỉ ở tốc độ 6000 vòng/phút mới kết tủa được hoàn toàn phycocyanin. Thử nghiệm ở các nồng độ  $(NH_4)_2SO_4$  33%, 35%, 37%. Chọn được nồng độ thích hợp là 35%.

#### 3.1.3. Thẩm tích

Tiến hành quá trình thẩm tích loại các tạp chất vô cơ qua màng celophan trong điều kiện lạnh và tránh ánh sáng, thay nước mỗi 2 giờ. Sau 8 giờ, kiểm tra bằng  $Ba(NO_3)_2$  không còn thấy xuất hiện kết tủa.

### 3.2. Tạo chế phẩm

Để thu chế phẩm dạng khô, tăng khả năng bảo quản và tiện dụng đã dùng phương pháp sấy phun với chất mang sử dụng là maltodextrin. Đây là loại chất mang thông dụng nhất trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm. Các thông số của quá trình sấy: nhiệt độ tác nhân vào 165°C; nhiệt độ tác nhân ra 60°C; thời gian lưu 10 giây; tốc độ dòng vào 22,5 ml/phút; áp suất khí nén làm quay vòi phun 3,5 bar (tương đương với tốc độ quay là 20000 vòng/phút).

Sau khi sấy thu được 9,32g chế phẩm, độ ẩm 5%. Hiệu suất thu hồi chất màu là 75,94%.

### 3.3. Nghiên cứu tính chất chế phẩm

#### 3.3.1. Ảnh hưởng của pH

Hòa tan chế phẩm trong các dung dịch pH khác nhau. Kết quả so màu được ghi trong bảng 1.

Bảng 1: Ảnh hưởng của pH đến cường độ màu của chế phẩm

pH	3	3.5	4	4.5	5	6	7	8	8.5	9
$A_{620}$	0,121	0,159	0,164	0,172	0,181	0,174	0,17	0,155	0,142	0,116

Màu phycocyanin bền trong các môi trường có pH 4,5-7.

Khảo sát độ bền màu trong các môi trường pH theo thời gian bằng cách giữ các dung dịch trên 12 giờ, ở điều kiện nhiệt độ phòng, sau đó kiểm tra lại cường độ màu, được kết quả như trong bảng 2.

Bảng 2: Ảnh hưởng của pH đến màu của chế phẩm sau 12 giờ.

pH	3	3,5	4	4,5	5	6	7	8	8,5	9
A <sub>620</sub>	0,099	0,115	0,139	0,162	0,18	0,172	0,163	0,147	0,129	0,109

Kết quả trên bảng cho thấy môi trường thích hợp cho việc sử dụng sản phẩm là trung tính hoặc acid yếu (pH 4,5-7). Sự kém bền màu của phycocyanin trong môi trường acid sẽ hạn chế khả năng bổ sung trực tiếp chế phẩm vào các sản phẩm nước trái cây vì hầu hết các sản phẩm loại này đều có tính acid.

### 3.3.2. Ảnh hưởng của ánh sáng và nhiệt độ

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của ánh sáng và nhiệt độ theo thời gian được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3: Ảnh hưởng của ánh sáng, nhiệt độ và thời gian đến độ bền của chế phẩm.

Điều kiện lưu mẫu	A <sub>620</sub>	Ban đầu	Sau 2 tuần	Sau 4 tuần
Có ánh sáng, nhiệt độ phòng		0,191	0,135	0,111
Không ánh sáng, nhiệt độ phòng		0,191	0,168	0,125
Không ánh sáng, nhiệt độ lạnh 5°C		0,191	0,178	0,156

Từ các kết quả có thể thấy rằng phycocyanin là một sắc tố mẫn cảm với ánh sáng và lưu mẫu trong điều kiện không ánh sáng ở nhiệt độ 5°C thì cường độ màu giảm ít nhất. Vì vậy chế phẩm nên được bảo quản ở nhiệt độ lạnh và tránh ánh sáng.

### 3.3.3. Ảnh hưởng của trạng thái chế phẩm

Độ bền của phycocyanin ở trạng thái dung dịch (lấy từ giai đoạn sau thẩm tích) và dạng bột được so sánh trong bảng 4.

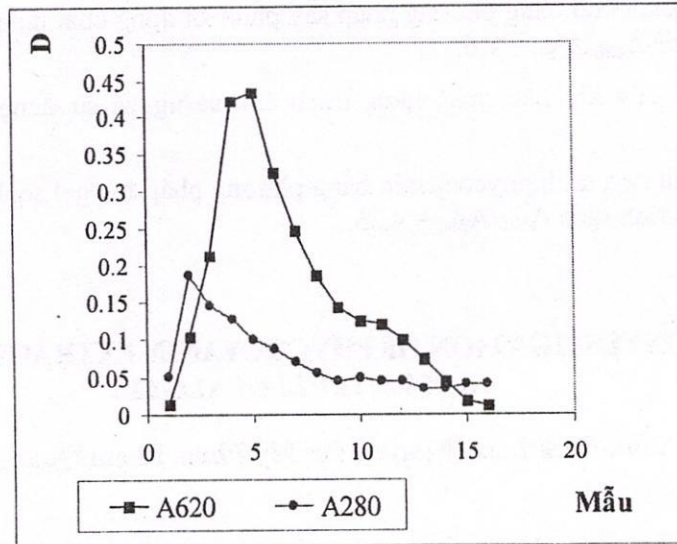
Bảng 4: Ảnh hưởng của trạng thái chế phẩm đến độ bền màu.

Trạng thái	A <sub>620</sub>	Ban đầu	Sau 4 tuần	Còn lại (%)
Dạng bột		0,191	0,156	81
Dung dịch		0,308	0,043	14

Ta thấy cường độ màu giảm sau 4 tuần lưu trữ. Tuy nhiên ở dạng bột, sản phẩm bền màu hơn nhiều so với khi ở trạng thái dung dịch. Nguyên nhân là hoạt tính của nước cao và các quá trình hóa học cũng như sinh học dễ xảy ra trong dung dịch nên sắc tố kém bền hơn ở dạng bột, hầu hết nước đã bị tách hết ra khỏi sản phẩm do đó các biến đổi khó có thể diễn ra, sản phẩm sẽ bền hơn.

### 3.4. Nghiên cứu tinh sạch

Dịch đem chạy sắc ký A<sub>620</sub>/A<sub>280</sub> = 0,308/0,112 = 2.75, là dung dịch sau quá trình thẩm tích. Pha loãng 20 lần, đem chạy sắc ký lọc gel Sephadex G-100, tốc độ chảy trung bình 0,6 ml/phút. Thu các phân đoạn 4ml và xác định độ tinh khiết bằng phương pháp quang phổ UV-Vis, kết quả được trình bày trong hình 1.

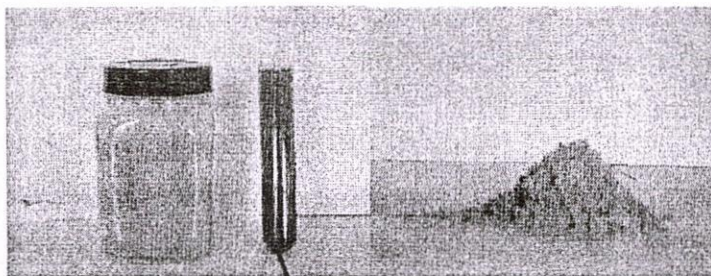


Hình 1: Đồ thị khảo sát quá trình sắc ký cột.

Từ kết quả lọc gel ta thấy rằng phân đoạn thứ 5 là phân đoạn có độ hấp thụ ở 620nm cao nhất (0,436) và có hệ số tỉ lệ  $A_{620}/A_{280}$  là lớn nhất (4,36), đây là phân đoạn phycocyanin có độ sạch cao nhất. Như vậy, phương pháp lọc gel Sephadex G100 tỏ ra khá hiệu quả trong việc tách và làm sạch phycocyanin so với kết quả nghiên cứu trước đây của Đặng Xuyên Như (1995) thu phân đoạn  $A_{620}/A_{280} = 4,08$  [1] và nhóm Minkova và đồng sự (2002) [2] có hệ số tỉ lệ là 4,3.

#### Tính hiệu suất thu hồi

- Hiệu suất thu hồi của quá trình loại tạp chất lần 1: H = 84,08%
- Hiệu suất thu hồi cho quá trình loại tạp chất lần 2: H = 92,37 %
- Hiệu suất thu hồi cho quá trình kết tủa thu phycocyanin: H = 88,26 %
- Hiệu suất thu hồi cho quá trình thẩm tích: H = 80,63 %
- Hiệu suất thu hồi của quá trình sấy: H = 75,94 %
- ❖ Hiệu suất thu hồi cho cả quá trình:  
 $H = 0,8408 \times 0,9237 \times 0,8826 \times 0,8063 \times 0,7594 \times 100 = 41,97 \%$



Hình 2: Các dạng chế phẩm thu được

#### 4. Kết luận

Từ các kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi rút ra quy trình tách chiết phycocyanin như sau: trích ly phycocyanin bằng dung dịch đệm photphate 50mM pH 6,8; tỉ lệ 1 : 20, thời gian 4 giờ. Ly tâm thu dịch ở 4000 vòng/phút trong 10 phút; loại tạp chất bằng  $(NH_4)_2SO_4$  15%; kết tủa phycocyanin bằng  $(NH_4)_2SO_4$  35%; loại  $(NH_4)_2SO_4$  dư bằng thẩm tích đối nước, thời gian thẩm tích: 8 giờ; sản phẩm sau thẩm tích có độ tinh khiết  $A_{620}/A_{280} = 2,75$ .

Tạo chế phẩm khô bằng phương pháp sấy phun sử dụng chất mang là maltodextrin, chế phẩm thu được có  $A_{620}/A_{280} = 1,6$ .

Chế phẩm bền khi bảo quản lạnh, tránh ánh sáng và sử dụng thích hợp ở pH gần trung tính.

Nghiên cứu tinh sạch phycocyanin bằng phương pháp lọc gel sephadex-G100, thu được phân đoạn có độ tinh sạch  $A_{620}/A_{280} = 4,36$ .

## INVESTIGATION OF PHYCOCYANIN EXTRACTION FROM *SPIRULINA* ALGAE.

Tran Bich Lam, Nguyen Thi My Phuc, Pham Quang Son

**ABSTRACT:** Extraction of phycocyanin was carried out by salting precipitation method using  $(NH_4)_2SO_4$  concentrations of 15% and 35% (w/v), centrifugation of 4000 rpm and 6000 rpm, 10 min. The precipitate was dialyzed in 8 hour with distilled water, and spray dried to powder. The purification of phycocyanin was realized by gel filtration on sephadex G100 column (2x50cm). The best fraction had high quality with  $A_{620}/A_{280} = 4.36$ . The produce was stable at  $pH \geq 4.5$ , should be preserved in cool and dark condition.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đặng Xuyên Như, *Nghiên cứu công nghệ sản xuất các chế phẩm giàu dinh dưỡng và giàu hoạt tính sinh học từ nguồn vi tảo để phục vụ cho dinh dưỡng người và động vật*, Hà Nội, 1995.
2. Minkova et al, *Purification of C-phycocyanin from Spirulina fusiformis*, Journal of biotechnology, 102 (2003), 55-59.
3. Tetsuya Saito et al, *Photostabilization of phycocyanin and anthocyanin in the presence of biopterin- $\alpha$ -glucoside from Spirulina platensis under ultraviolet ray*, Dyes and pigments, 56 (2003), 203-207.