

NGHIÊN CỨU TÁCH CHIẾT VÀ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐẶC TÍNH CỦA DỊCH CHIẾT TỪ TẢO *SPIRULINA*

HOÀNG VĂN TUẤN, PHẠM HƯƠNG SON

Trung tâm Sinh học thực nghiệm, Viện Ứng dụng công nghệ

PHẠM THU THỦY

Viện Công nghệ sinh học và Thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội

Tảo *Spirulina* (*Arthrospira*) thuộc chi *Spirulina*, họ Oscillatoriaceae, bộ Oscillatoriales (Nostocales), lớp Cyanophyceae (Cyanobacteria: vi khuẩn lam), ngành Cyanophyta (Cyanochloronta), có dạng hình xoắn lò xo với 5-7 vòng xoắn đều nhau, sợi không phân nhánh. *Spirulina* có giá trị dinh dưỡng rất cao nhờ nguồn cung cấp protein dồi dào và hàm lượng cân bằng của nhiều thành phần có hoạt tính sinh học cao như phycocyanin, chlorophyll, beta-caroten, axit gama-linolenic, axit alpha-linolenic...

Dịch chiết tảo *Spirulina* chứa nhiều thành phần chức năng hòa tan, nó đã được chứng minh là có khả năng kìm hãm sự phát triển của tế bào MCF-7, một dạng tế bào gây ung thư vú ở người [6]. Nghiên cứu của tác giả Kumari và nk. (2010) [5] đã cho thấy, dịch chiết *Spirulina* có khả năng ổn định hàm lượng đường trong máu của chuột bị tiểu đường, chỉ số cholesterol HDL cũng giảm đáng kể. Hoạt tính chống oxy hóa và kháng vi sinh vật của dịch chiết *Spirulina* cũng đã được rất nhiều nghiên cứu đề cập đến, đặc biệt nó có khả năng kháng được nhiều chủng vi sinh vật gây bệnh như *Salmonella*, *Escherichia coli*...[7].

Trong thành phần dịch chiết tảo *Spirulina*, chiếm số lượng nhiều nhất phải kể đến phycocyanin, một dạng chất màu chủ yếu có trong tảo *Spirulina*. Phycocyanin được biết đến với khả năng bắt giữ các gốc tự do, một đặc tính quan trọng trong điều trị một số bệnh như viêm nhiễm, ung thư, chống oxy hóa... Vì vậy, phycocyanin đã trở thành đối tượng nghiên cứu và ứng dụng khá phổ biến trong các lĩnh vực như y học, dược phẩm và sản xuất thực phẩm [10].

Mục đích của nghiên cứu nhằm đưa ra một phương pháp tách chiết đơn giản để thu dịch chiết chứa các thành phần hòa tan có hoạt tính sinh học cao từ tảo *Spirulina*, kiểm tra xác định một số đặc tính chức năng của dịch chiết từ đó làm cơ sở cho quá trình ứng dụng dịch chiết *Spirulina* trong sản xuất nước uống chức năng.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Bột tảo *Spirulina platensis* do Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện ứng dụng Công nghệ cung cấp.

Các hóa chất tinh khiết sử dụng cho nghiên cứu có nguồn gốc từ Anh, Mỹ, Đức, Trung Quốc.

2. Phương pháp

a. Phương pháp tách chiết

Sinh khối tảo *Spirulina* được phá vỡ tế bào trong các dung môi khác nhau gồm: Nước, ethanol, methanol, hexane. Quá trình phá vỡ tế bào được thực hiện qua 2 phương pháp: Ngâm, lạnh đông và nhả lạnh đông. Phương pháp ngâm được thực hiện trong thời gian từ 2 - 18 giờ ở nhiệt độ phòng. Phương pháp lạnh đông và nhả lạnh đông được tiến hành ở -20°C trong thời gian lạnh đông (giờ) ở 1, 2, 3, 4 và chu kỳ nhả lạnh đông (lần) ở 1, 2, 3, 4, 5. Hỗn hợp sau khi phá vỡ tế bào được ly tâm, lọc hút chân không thu dịch chiết chứa các thành phần chức năng hòa tan trong tảo *Spirulina*.

b. Phương pháp xác định hiệu quả tách chiết

Hiệu quả tách chiết được đánh giá dựa trên khả năng chống oxy hóa (%SC) qua phản ứng

bao vây gốc tự do (DPPH) và hàm lượng phycocyanin (PC) có trong dịch chiết. PC được tính theo công thức sau [9]:

$$PC = \frac{[A_{620} - 0,474(A_{652})]}{5,34}$$

Trong đó: PC là hàm lượng phycocyanin có trong dịch chiết (mg/ml); A_{620} là độ hấp thụ màu của mẫu ở bước sóng 620 nm; A_{652} là độ hấp thụ màu của mẫu ở bước sóng 625 nm.

c. Phương pháp xác định hoạt tính

Xác định hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định: Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định được thực hiện trên các phiến vi lượng 96 giếng (96-well microtiter plate) theo phương pháp của Vander Bergher và Vlietlinck (1991) [12]. Các chủng vi sinh vật kiểm định sử dụng gồm: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 27212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12222), *Aspergillus niger* (439), *Fusarium oxysporum* (M42), *Candida albicans* (ATCC 7754) và *Saccharomyces cerevisiae* (SH 20).

Xác định hoạt tính chống oxy hóa: Hoạt tính chống oxy hóa của mẫu được xác định thông qua phản ứng bao vây gốc tự do (DPPH). Phản ứng được tiến hành theo phương pháp của Shela và cộng sự (2003) [11]. Dựa trên nguyên tắc 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) có khả năng tạo ra các gốc tự do bên trong dung dịch EtOH bão hòa. Khi cho các chất thử nghiệm vào

hỗn hợp này, nếu chất có khả năng làm trung hoà hoặc bao vây các gốc tự do sẽ làm giảm cường độ hấp thụ ánh sáng của các gốc tự do DPPH. Hoạt tính chống oxy hoá được đánh giá thông qua giá trị hấp thụ ánh sáng của dịch thí nghiệm so với đối chứng khi đọc trên máy Elisa ở bước sóng 515 nm.

Các mẫu có biểu hiện hoạt tính ($SC \geq 50\%$) sẽ được thử nghiệm để tìm giá trị SC_{50} . Giá trị SC_{50} được xác định thông qua nồng độ chất thử và % hoạt động của chất thử mà ở đó 50% các gốc tự do tạo bởi DPPH được trung hòa bởi chất thử.

d. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu phân tích được xử lý thống kê trên phần mềm OriginPro 8.5, các giá trị được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (mean \pm StDev).

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Ảnh hưởng của các dung môi khác nhau đến tính chất của dịch chiết

Ảnh hưởng của các dung môi khác nhau đến hiệu quả tách thu dịch chiết chứa các thành phần hòa tan trong tảo *Spirulina* đã được nghiên cứu. Kết quả phân tích hàm lượng phycocyanin và thuộc tính chức năng của dịch chiết thông qua khả năng bắt gốc tự do của dịch chiết được trình bày trong bảng 1 và hình 1.

Bảng 1

Ảnh hưởng của các loại dung môi và tỷ lệ sinh khối đến thuộc tính của dịch chiết

Loại dung môi	Tỷ lệ sinh khối (g/100 ml)	PC (mg/ml)	SC (%)	StDev
Nước	7	1,40	32	0,10
Etanol	5	2,33	44	0,15
Hexan	6	1,93	35	0,05
Metanol	4	2,03	43	0,11

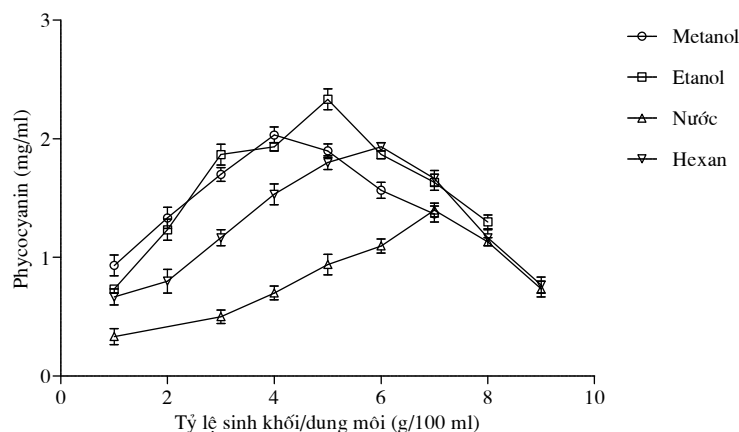
Kết quả phân tích chỉ ra rằng, sử dụng dung môi là etanol cho hiệu quả tách chiết cao nhất, hàm lượng PC đạt 2,33 mg/ml. Tiếp theo là metanol (2,03 mg/ml), hexan (1,93 mg/ml), thấp nhất là nước (1,4 mg/ml) (hình 1). Tuy nhiên, số liệu trong bảng 1 cho thấy, khi sử dụng dung môi là metanol, ở hàm lượng sinh khối ít hơn cho hiệu quả chống oxy hóa của dịch chiết tương đương với etanol, lần lượt là SC 43%,

44%. Trong nghiên cứu của tác giả Cho và nnk. (1999) [4] cũng cho thấy, khả năng chống oxy hóa của dịch chiết sử dụng dung môi là metanol cao hơn so với dung môi là nước. Điều này cũng được chỉ ra trong nghiên cứu của Mala và nnk.(2009) [7], trong đó acetone là dung môi được tác giả lựa chọn.

Tuy nhiên, do mục đích sử dụng dịch chiết *Spirulina* cho sản xuất đồ uống và khai thác giá

trị của phycocyanin có trong dịch chiết, trong nghiên cứu này ethanol (5 g *Spirulina*/100 ml etanol) được lựa chọn là dung môi tách chiết thu dịch chiết chứa các thành phần chức năng từ tảo

Spirulina do tính an toàn trong thực phẩm. Sử dụng ethanol là dung môi tách chiết cũng được lựa chọn trong nghiên cứu của Herrero và nnk. (2005) [8].

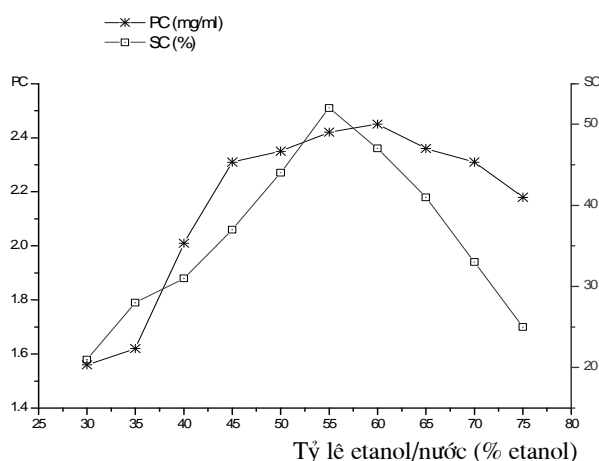


Hình 1. Hàm lượng phycocyanin có trong dịch chiết từ tảo *Spirulina* ở các dung môi và tỷ lệ sinh khối khác nhau

2. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến tính chất của dịch chiết

Sử dụng ethanol ở các dải nồng độ khác nhau từ 30 - 75% nhằm nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến khả năng phá vỡ tế bào tảo

Spirulina. Kết quả cho thấy, sử dụng dung môi ethanol 55% cho hiệu quả phá vỡ tế bào cao nhất, biểu thị ở hàm lượng PC đạt 2,42 mg/ml, khả năng bắt gốc tự do của dịch chiết đạt SC là 52%. ở nồng độ ethanol 60%, hàm lượng PC được giải phóng nhiều hơn (2,45 mg/ml) (hình 2).



Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ ethanol/nước đến tính chất của dịch chiết từ tảo *Spirulina*

3. Ảnh hưởng của phương pháp phá vỡ tế bào đến tính chất của dịch chiết

Sinh khối tảo *Spirulina* được phá vỡ tế bào trong dung môi là ethanol 55% sử dụng 2 phương pháp khác nhau là ngâm, lạnh đông và nhả lạnh đông. Do đặc trưng của phycocyanin là bền ở nhiệt độ phòng [3] nên ảnh hưởng của nhiệt độ

quá trình ngâm không được xem xét trong nghiên cứu này. Dịch sau phá vỡ tế bào được ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/10 phút, lọc hút chân không và cô chân không để loại dung môi thu dịch chiết chứa các thành phần hòa tan trong tảo *Spirulina*.

Kết quả từ bảng 2 và hình 3 cho thấy, phá vỡ

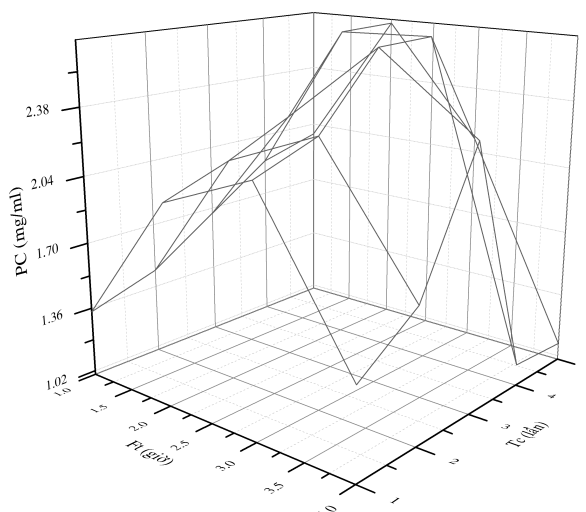
tế bào theo phương pháp lạnh đông và nhả lạnh đông với thời gian lạnh đông (Ft) là 2 giờ, chu kỳ nhả lạnh đông (Tc) là 4 lần cho hiệu quả tách chiết cao hơn và rút ngắn được thời gian so với phương pháp ngâm thông thường ít hơn 6 giờ. Hàm lượng phycocyanin và khả năng bắt gốc tự do của dịch chiết *Spirulina* được xác định lần lượt là 2,67 mg/ml, 65%. Chu kỳ nhả lạnh đông được đưa ra trong nghiên cứu của Li và nkk.

(2005) [2] là 6 lần. Trong nghiên cứu của tác giả Rachen và nkk. (2009) [9] nhằm nghiên cứu khả năng ổn định của phycocyanin ở khoảng nhiệt độ và pH khác nhau, phương pháp lạnh đông và nhả lạnh đông cũng được đề cập đến. Khả năng chống oxy hóa thông qua phản ứng bao vây gốc tự do của dịch chiết *Spirulina* được đưa ra trong nghiên cứu của Herrero và nkk. (2004) [8] là 66,8%.

Bảng 2

Ảnh hưởng của phương pháp phá vỡ tế bào đến tính chất của dịch chiết

Phương pháp phá vỡ tế bào	Thời gian (giờ)	PC (mg/ml)	SC (%)	StDev
Ngâm	14	2,46	51	0,12
Lạnh đông và nhả lạnh đông	8	2,67	65	0,09



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian lạnh đông và chu kỳ nhả lạnh đông đến hàm lượng PC có trong dịch chiết (Ft. Thời gian lạnh đông; Tc. Chu kỳ nhả lạnh đông)

4. Xác định một số hoạt tính của dịch chiết từ tảo *Spirulina*

Bảng 3

Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của dịch chiết từ tảo *Spirulina*

Ký hiệu mẫu	Chủng vi sinh vật kiểm định	Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC: $\mu\text{g/ml}$)
Sp-ex	<i>E. coli</i>	50
	<i>P. aeruginosa</i>	200
	<i>B. subtilis</i>	50
	<i>S. aureus</i>	100
	<i>A. niger</i>	200
	<i>F. oxysporum</i>	-
	<i>S. cerevisiae</i>	200
	<i>C. albicans</i>	-

Hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ tảo *Spirulina*

Kí hiệu mẫu	Nồng độ mẫu ($\mu\text{g/ml}$)	SC%	SC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	Kết quả
Đối chứng (+)	50	78,5 \pm 0,3	28,19	Dương tính
Đối chứng (-)	-	0,0 \pm 0,0	-	Âm tính
Sp-ex	100	65,68 \pm 0,1	20,18	Dương tính

Ghi chú: Sp-ex. Dịch chiết *Spirulina*; Đối chứng (+). Vitamin C; Đối chứng (-). DPPH.

Đã tiến hành kiểm tra xác định một số hoạt tính sinh học của dịch chiết từ tảo *Spirulina*, từ đó làm cơ sở cho nghiên cứu ứng dụng dịch chiết trong sản xuất nước uống chức năng. Kết quả kiểm tra hoạt tính kháng vi sinh vật và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ tảo *Spirulina* được trình bày trong bảng 3 và 4. Kết quả cho thấy, trong 8 chủng vi sinh vật kiểm định sử dụng chỉ có *F. oxysporum* và *C. albicans* là không biểu thị hoạt tính kháng, khả năng kháng mạnh nhất đối với *E. coli* và *B. subtilis*. Khả năng chống oxy hóa của dịch chiết đạt 65,68%, giá trị SC₅₀ là 20,18 $\mu\text{g/ml}$. Nghiên cứu của tác giả Mala và nnk. (2009) [7] cũng chỉ ra rằng, dịch chiết từ tảo *Spirulina* có khả năng kháng vi sinh vật cao, các chủng vi sinh vật được sử dụng trong nghiên cứu đều thể hiện kết quả kháng đó là *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* và *Staphylococcus aureus*.

III. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được phương pháp tách chiết đơn giản nhằm thu dịch chiết chứa các thành phần hòa tan từ tảo *Spirulina* với các điều kiện như sau: Tách chiết theo phương pháp lạnh đông và nhả lạnh đông với thời gian lạnh đông 2 giờ, chu kỳ nhả lạnh đông 4 lần, sử dụng dung môi là etanol 55%, tỷ lệ sinh khối sử dụng là 5 g/100 ml dung môi. Dịch chiết được tiến hành kiểm tra hoạt tính chống oxy hóa và kháng vi sinh vật kiểm định với kết quả: khả năng bắt giữ gốc tự do của dịch chiết đạt SC 65,68%, SC₅₀ 20,18 $\mu\text{g/ml}$; kháng được 6 chủng vi sinh vật kiểm định gồm *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *A. niger* và *S. cerevisiae*.

Dịch chiết từ tảo *Spirulina* có hoạt tính sinh học cao, thích hợp cho nghiên cứu sử dụng trong sản xuất nước uống chức năng bảo vệ sức khỏe con người. Năm 2005, tác giả Trần Bích Lam và

nnk. [1] cũng đã tiến hành nghiên cứu tách chiết thành phần chức năng từ tảo *Spirulina*. Tuy nhiên, nghiên cứu chỉ tập trung vào thu nhận phycocyanin, các thành phần khác không được đề cập tới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Trần Bích Lam, Nguyễn Thị Mỹ Phúc, Phạm Quang Sơn**, 2005: Nghiên cứu thu nhận phycocyanin từ tảo *Spirulina*. Science & Technology Development, 8(7): 70-74.
2. **Li B., Zhang X., Gao M., Chu X.**, 2005: Effects of CD59 on antitumoral activities of phycocyanin from *Spirulina platensis*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 59: 551-560.
3. **Francine S. Antelo, Jorge A. V. Costa, Kalil S. J.**, 2008: Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. Biochemical Engineering Journal, 41: 43-47.
4. **Cho J. Y, Jin H. J, Lim H. J, John N. C. Whyte, Hong Y. K.**, 1999: Growth activation of the microalga *Isochrysis galbana* by the aqueous extract of the seaweed *Monotroma nitidum*. Journal of Applied Phycology, 10: 561-567.
5. **Jalaja K. D., Praveen J. D.**, 2010: Ameliorative potential of aqueous cell extract of *Spirulina platensis* on diabetes associated metabolic alterations. The Bioscan, 5(3): 487-489.
6. **Ravi M., Lata De S., Azharuddin S., Paul S. F. D.**, 2010: The beneficial effects of *Spirulina* focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties. Nutrition and Dietary Supplements, 2: 73-83.
7. **Mala R., Sarojini M., Saravanababu S.**,

- Umadevi G.**, 2009: Screening for antimicrobial activity of crude extracts of *Spirulina platensis*. *Journal of Cell and Tissue Research*, 9(3): 1951-1955.
8. **Herrero M., Ibáñez E., Senorans J., Cifuentes A.**, 2004: Pressurezed liquid extracts from *Spirulina platensis* microalga determination of their antioxidant acitivity and preliminary analysis by micelar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1047: 195-203.
9. **Rachen D., Natapas Ph., Suwayd N.**, 2009: Phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* and extract stability under various pH and temperature. *As. J. Food Ag-Ind.*, 2(04): 819-826.
10. **Romay Ch., González R., Ledón N., Ramirez D., Rimbau V.**, 2003: C-Phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current Protein and Peptide Science*, 4: 207-216.
11. **Shela G., Olga M. B., Elena K., Antonin L., Nuria G. M, Ratiporn H., Yong-Seo P., Soon-Teck J., Simon T.**, 2003: Comparison of the contents of the main biochemical compounds and antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14(3): 154-159.
12. **Vanden Berghe D. A., Vlietinck A. J.**, 1991: *Methods in plant Biochemistry: Screening Methods for Antibacterial and Antiviral Agents from Higher Plants.* Academic Press, London. In: Dey, P. Mp. Harbone, J. B. (Eds) pp 47-69.

A STUDY ON EXTRACTION AND DETERMINATION OF SOME PROPERTIES OF *SPIRULINA* EXTRACTS

HOANG VAN TUAN, PHAM HUONG SON, PHAM THU THUY

SUMMARY

The purpose of this study is establish a simple method for obtaining extracts containing soluble bioactive from *Sprulina* algae. Determination of functional properties of extracts to give the basis to apply for the production of functional beverage. The cyanobacterium *Spirulina platensis* has been considered to be an important subject for biotechnological research due to its nutritional importance. *S. platensis* is a blue-green microalgae which can produce large quantities of high value products such as beta carotene, phycocyanin, chlorophyll, gama linolenic acid... In this study, various solvents for included methanol, ethanol, hexane and water were used to select extracted solvent obtaining aqueous extracts from *Spirulina* algae. The process of extraction was done by two methods: Soaking, freezing and thawing. The extracts were tested antioxidant activity by free radicals scavenging capacity and antimicrobial activity. The data indicated that using ethanol 55%, the rate of biomass/solvent is 5 g/100 ml. The freezing and thawing extraction method with freezing time (Ft) in 2 hours, thawing cycle in 4 times gave the highest result. Phycocyanin level in the extract reached 2.67 mg/ml, scavenging capacity (SC) reached 65,68%; SC₅₀ 20.18 µg/ml. The extract can against six tested microorganism including *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *A. niger* and *S. cerevisiae*.

Keywords: *Spirulina*, extracts, phycocyanin, Freezing, Thawing.

Ngày nhận bài: 17-5-2011