

NGHIÊN CỨU THU NHẬN BỘT MÀU CHLOROPHYLL TỪ RONG NƯỚC LOẠI *CHEATOMORPHA* SP. ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Lê Thị Hồng Ánh, Hoàng Thị Ngọc Nhon, Nguyễn Minh Kiên, Trần Trung Kiên

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

Ngày gửi bài: 05/10/2016

Ngày chấp nhận đăng: 14/11/2016

TÓM TẮT

Chlorophyll là một sắc tố màu tự nhiên đóng vai trò quan trọng trong quá trình quang hợp, rất cần thiết cho sự sinh tồn của hầu hết các thực vật, tảo và vi khuẩn cyanobacteria. Chlorophyll không những được sử dụng phổ biến trong công nghiệp thực phẩm như là một loại phụ gia trong sản xuất thực phẩm (E140) mà còn được dùng rộng rãi trong mỹ phẩm, dược phẩm bởi chúng có rất nhiều tác dụng cho cơ thể người. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng nguyên liệu rong mền *Cheatomorpha* sp. được thu nhận ở khu vực đồng bằng Sông Cửu Long (huyện Đông Hải, tỉnh Bạc Liêu) để thực hiện quá trình trích ly chlorophyll, tiến hành cô đặc dịch trích ly bằng phương pháp cô quay chân không và sấy phun để thu được bột màu xanh chlorophyll. Nguyên liệu dạng rong tươi trích ly với dung môi ethanol 80%, tỉ lệ nguyên liệu/ethanol là 1/15 (w/v), thời gian trích ly 24 giờ trong điều kiện tối, sử dụng $MgCO_3$ 0,5% so với nguyên liệu để giúp tăng khả năng trích ly. Kết quả thu được dịch trích ly có lượng chlorophyll 34,03mg/l. Tiến hành cô đặc mẫu bằng cô quay chân không ở nhiệt độ 48°C, thu được dịch trích ly có nồng độ chất khô 12%, bổ sung maltodextrin đến 13,5%. Sấy phun thu được chế phẩm bột màu xanh chlorophyll mịn, độ ẩm 5,4%, tan tốt trong nước có thể ứng dụng trong sản xuất thực phẩm, hiệu suất thu hồi chlorophyll là 62,96%.

Từ khóa: *Cheatomorpha* sp., chlorophyll.

THE RESEARCH ON CHLOROPHYLL POWDER FROM ALGAE *CHAETOMORPHA* SP. IN MEKONG DELTA

ABSTRACT

Chlorophyll is a natural pigment, it plays a key role in photosynthesis and it is very essential for surviving of most of plants, algae and cyanobacteria. Chlorophyll is used widely not only in food technology as a food addition agent (E140) but also in cosmetic, in pharmaceutical industry because of their benefits for humans. In this study, we chose algae material *Cheatomorpha* sp. derived from Mekong Delta to carry out the chlorophyll extraction, then using vacuum evaporator to enhance the content of chlorophyll before spray drying to obtain chlorophyll powder. The extraction stage used fresh algae and in the conditions of solvent extraction with ethanol 80%, the ratio of algae material/ethanol 1/15, in the time of 24 hours in the dark, adding $MgCO_3$ 0,5% compared with materials to help increase extraction capabilities. Results showed that there was 34,03mg/l chlorophyll in extraction solution. The concentrated samples was increased the dry matter concentration from 12%, to 13,5% by adding maltodextrin. After spray drying, the chlorophyll powder was soluble, moisture 5,4%, can be applied in food production. The recovery yield of chlorophyll was 62,96%.

Keyword: *Cheatomorpha* sp., chlorophyll.

1. MỞ ĐẦU

Chlorophyll là chất có hoạt tính hoá học cao, vừa có tính acid, vừa có tính kiềm, có tính chất lý học quan trọng trong thực hiện chức năng quang hợp. Giữa nhân chlorophyll có nguyên tử Mg tạo nên cấu trúc dạng heme gần giống với hemoglobin ở máu người, cũng gồm 4 nhóm heme gắn với một nguyên tố kim loại [1], [2]. Màu xanh có trong lục lạp do chlorophyll a và chlorophyll b với tỉ lệ 3/1. Trong đó chlorophyll a: có màu từ xanh da trời đến xanh lá cây, hấp phụ bước sóng 660-665nm và chlorophyll b có màu từ vàng đến xanh lá cây, hấp phụ bước sóng 642-652nm [3]. Chlorophyll a và b khác nhau ở vị trí C3, loại a chứa nhóm methyl $-CH_3$, loại b chứa nhóm formyl $-CHO$ [2], [4].

Mặc dù các chất màu tổng hợp có sự bền màu và tiện dụng hơn trong quá trình sử dụng cũng như bảo quản, luật pháp hiện nay chỉ cho phép những chất màu có trong danh mục mới được bổ sung vào sản phẩm thực phẩm vì lý do an toàn cho sức khỏe. Vì những lý do này, các sắc tố màu tự nhiên hiện nay rất được quan tâm, một trong số đó là chlorophyll. Trong thực phẩm, chlorophyll được sử dụng như phụ gia tạo màu (E140) cho một số sản phẩm như kẹo, nước sốt, gia vị, pho mát, nước giải khát... yêu cầu về chất màu tự nhiên này để thay thế cho chất màu nhân tạo ngày một tăng [5].

Trong y học, chlorophyll được sử dụng với mục đích chữa bệnh như: ngăn ngừa và điều trị ung thư, giải độc gan, kích thích hệ thống miễn dịch, kháng viêm và da phát ban, thanh lọc máu và độc tố trong cơ thể, làm sạch ruột, chữa lành vết thương...[6]. Chúng hình thành cấu trúc phức hợp với một số chất gây ung thư như: aflatoxin B1 trong một số loại gia vị và thảo mộc [7], [8], heterocyclic amine trong thịt nấu chín [9] hoặc polycyclic aromatic hydrocarbon trong thuốc lá [10] hay các chất gây ung thư trong các mô nhạy cảm... sau đó những phức hợp này được hấp thụ và tiêu hóa. Chlorophyll có thể ức chế sự tích lũy canxi oxalat dihydrate (còn gọi là sỏi thận) [11]. Chlorophyll và các dẫn xuất của nó thường được sử dụng phổ biến trong các sản phẩm dược phẩm, chúng làm tăng nhanh khả năng chữa lành vết thương đến hơn 25% trong một số nghiên cứu, vì chlorophyll thúc đẩy sự hình thành mô tế bào, ngăn ngừa sự xâm nhập của vi sinh vật [12], [13], [14]. Việc sử dụng thuốc mỡ có chlorophyll cũng có tác dụng làm giảm đau sau vài ngày cũng như cải thiện đáng kể diện mạo của các mô bị tổn thương, sự chảy mủ hay mùi từ các vết lở loét sau vài ngày xử lý với chlorophyll [15]. Tương tự, chlorophyll cũng là hợp chất quan trọng trong điều trị hậu phẫu thuật trực tràng [14]. Chlorophyll a và các dẫn xuất của nó như pheophorbide b và pheophytin b hiện diện trong thực phẩm đóng vai trò quan trọng trong phòng chống ung thư bởi hoạt tính kháng oxy hóa và chống đột biến hay bẫy các tác nhân gây đột biến [16], [6].

Hiện nay, nguồn sinh khối rong mền *Cheatomorpha* sp. ở khu vực đồng bằng Sông Cửu Long của nước ta còn đang bị bỏ phí hay chưa được sử dụng hiệu quả, chỉ một lượng nhỏ trong số đó được sử dụng để làm phân bón. Vào mùa mưa, một lượng lớn rong được bà con nông dân vớt ra khỏi ao và để thành đống thối rữa trên bờ, vừa lãng phí vừa gây ô nhiễm môi trường. Mặt khác, theo khảo sát ban đầu thì loại rong lục này chứa lượng chlorophyll cao. Vì vậy, việc nghiên cứu tận dụng nguồn sinh khối rong dồi dào này để sản xuất bột màu xanh chlorophyll tự nhiên để thay cho màu thực phẩm nhập ngoại hay màu tổng hợp là vấn đề thực sự cần thiết, có ý nghĩa khoa học, có giá trị kinh tế, thực tiễn và tính xã hội sâu sắc.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Rong mền *Cheatomorpha* sp. được thu nhận ở các ao nuôi tôm quảng canh tại xã An Trạch, huyện Đông Hải, tỉnh Bạc Liêu. Tại phòng thí nghiệm, rong tươi được rửa để loại bỏ các tạp chất, đóng gói trong túi nilon tối màu tránh ánh sáng và bảo quản ở nhiệt độ (-5°C). Một phần rong tươi được rửa để loại bỏ các tạp chất, sau đó sấy ở nhiệt độ 50°C tới độ ẩm 9 - 10%, xay nhỏ với lưới 80 mesh và sấy trong tủ sấy ở nhiệt độ 50 - 60°C đến độ ẩm 4%.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Khảo sát dạng nguyên liệu đưa vào trích ly

Cân 5g rong nguyên liệu vào cốc thủy tinh, bổ sung ethanol 90%, tỉ lệ cơ chất/dung môi là 1/10 (w/v), xay nhuyễn, đun cách thủy 10 phút. Sau đó, ủ trích ly ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ trong điều kiện tối, dung dịch thí nghiệm được ly tâm 6000 vòng trong 15 phút, thu phần dịch nổi để xác định lượng chlorophyll, từ đó chọn được dạng nguyên liệu thích hợp.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung môi

Cân 5g rong nguyên liệu vào cốc thủy tinh, bổ sung ethanol (99%, 90%, 80%, 70%), tỉ lệ cơ chất/dung môi là 1/10 (w/v), xay nhuyễn, đun cách thủy trong 10 phút. Sau đó ủ trích ly trong 12 giờ ở nhiệt độ phòng, trong điều kiện tối, dung dịch thí nghiệm được ly tâm 6000 vòng/phút trong 15 phút, thu phần dịch nổi để xác định lượng chlorophyll, từ đó chọn được nồng độ ethanol thích hợp.

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi trích ly

Cân 5g rong nguyên liệu vào cốc thủy tinh, bổ sung ethanol (nồng độ chọn được từ thí nghiệm 2.2.2), tỉ lệ cơ chất/dung môi là 1/10; 1/15; 1/20; 1/25 (w/v), xay nhuyễn, đun cách thủy 10 phút. Sau đó mẫu được ủ trích ly ở điều kiện tối, nhiệt độ phòng trong 12 giờ, dung dịch thí nghiệm được ly tâm 6000 vòng trong 15 phút để bỏ bã, thu phần dịch nổi để xác định lượng chlorophyll bằng phương pháp quang phổ, từ đó chọn được tỉ lệ ethanol thích hợp.

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian trích ly

Cân 5g rong nguyên liệu vào cốc thủy tinh, bổ sung ethanol (nồng độ chọn được từ thí nghiệm 2.2.2) theo tỉ lệ cơ chất/dung môi (chọn được từ thí nghiệm 2.2.3), xay nhuyễn, đun cách thủy 10 phút. Sau đó mẫu được ủ trích ly trong các khoảng thời gian khảo sát (6 giờ, 12 giờ, 18 giờ, 24 giờ, 30 giờ) ở nhiệt độ phòng, trong điều kiện tối dung dịch thí nghiệm được ly tâm 6000 vòng trong 15 phút, thu phần dịch nổi để xác định lượng chlorophyll, từ đó chọn được thời gian trích ly thích hợp.

2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của $MgCO_3$

Cân 5g rong nguyên liệu, bổ sung ethanol (nồng độ chọn được từ thí nghiệm 2.2.2) theo tỉ lệ cơ chất/dung môi (chọn được từ thí nghiệm 2.2.3), xay nhuyễn, đun cách thủy 10 phút, bổ sung $MgCO_3$ (0%; 0,1%; 0,5%; 1% so với rong). Sau đó mẫu được ủ trích ly ở nhiệt độ phòng, điều kiện tối, trong thời gian (chọn được từ thí nghiệm 2.2.4) dung dịch thí nghiệm được ly tâm, thu phần dịch nổi để xác định lượng chlorophyll, từ đó chọn được tỉ lệ $MgCO_3$ thích hợp.

Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại ba lần.

2.3. Phương pháp phân tích

Xác định lượng chlorophyll bằng phương pháp đo quang phổ

Nguyên tắc: Chlorophyll có phổ hấp thụ ánh sáng cực đại ở các bước sóng 645nm, 663nm, độ hấp thụ ở bước sóng này biểu thị cho cường độ của sắc tố hay lượng chlorophyll có trong dung dịch. Dựa vào tính chất này người ta đo các giá trị hấp thụ và định lượng chlorophyll [17].

- Công thức tính lượng chlorophyll như sau:

$$+ \text{Lượng Chlorophyll tổng} = 20,2(A_{645}) + 8,02(A_{663})$$

$$+ \text{ Lượng Chlorophyll a} = 12,7(A_{663}) - 2,69(A_{645})$$

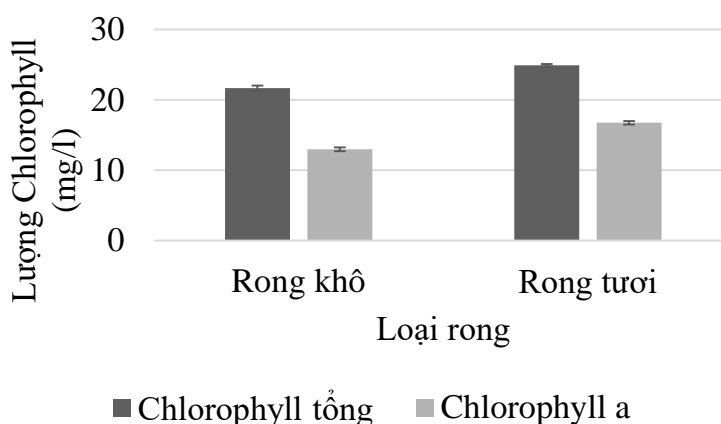
$$+ \text{ Lượng Chlorophyll b} = 22,9(A_{645}) - 4,68(A_{663})$$

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần, kết quả được trình bày bằng giá trị trung bình \pm SD. Sử dụng phần mềm SPSS 22.0 và Microsoft Excel 2010 để phân tích thống kê số liệu thí nghiệm và đánh giá sự khác biệt giữa các mẫu.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát dạng nguyên liệu

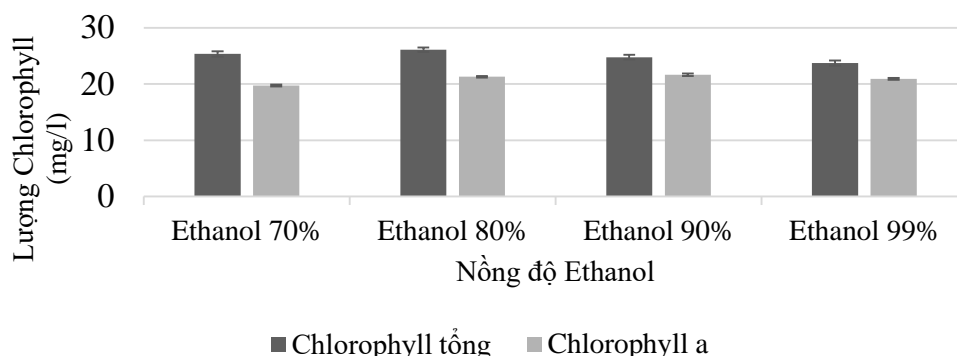


Hình 1. Ảnh hưởng của dạng nguyên liệu trích ly đến lượng chlorophyll thu được

Kết quả phân tích phương sai cho thấy có sự khác nhau về mặt thống kê ($p < 0,05$) về lượng chlorophyll giữa hai loại rong nguyên liệu. Từ kết quả hình 1 cho thấy, mặc dù dạng rong khô dễ bảo quản và tiện dụng hơn trong khi sử dụng nhưng dạng rong tươi sau khi trích lại cho lượng chlorophyll tổng cao hơn (24,88mg/l so với 21,64mg/l) cũng như lượng chlorophyll a cũng cao hơn (16,73g/ml so với 12,96g/ml) (hình 1), điều này có thể do chlorophyll là sắc tố màu dễ bị biến đổi dưới tác dụng nhiệt trong thời gian dài của quá trình sấy. Khi tế bào sống chlorophyll ở dạng phức chất với protein, khi tế bào chết protein biến tính, chlorophyll tách ra và dễ tham gia phản ứng hóa học.

3.2. Kết quả khảo sát nồng độ dung môi

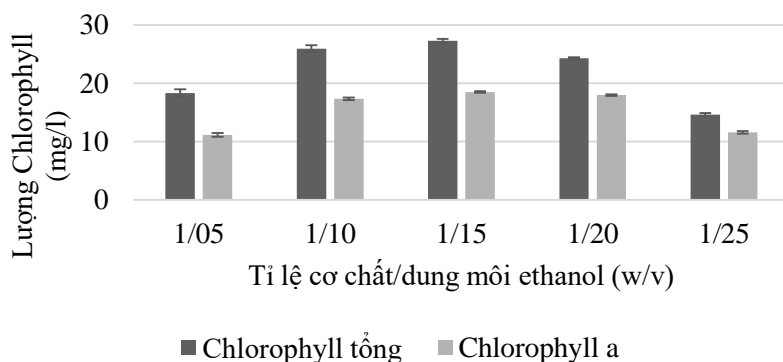
Từ kết quả hình 2 nhận thấy nồng độ ethanol ảnh hưởng lớn đến lượng chlorophyll, lượng các chất hòa tan đi kèm trong quá trình trích ly cũng như độ ổn định của dịch trích ly theo thời gian. Vì tính chất vật lý của chlorophyll là không tan trong nước, tan trong cồn, acetone, DMSO, nên lượng chlorophyll thu được càng cao khi tăng dần nồng độ dung môi ethanol, và đạt giá trị cao nhất ở nồng độ ethanol 80%. Kết quả này tương tự với công bố của Sartory (1984) [18], Kaczmar (năm 2004) trên đối tượng thực vật phù du. Theo một số nghiên cứu trước đây, enzyme chlorophyllase vẫn còn giữ hoạt tính ở các nồng độ dung môi khác nhau, làm cho chlorophyll bị chuyển thành các dạng đồng phân khác [19]. Do hoạt động của enzyme này trong quá trình trích ly (giai đoạn xay mẫu, ngâm chiết trong dung môi ethanol ở các nồng độ khác nhau) đã dẫn đến sự khác biệt về lượng chlorophyll thu được.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ cồn đến lượng chlorophyll trích ly

Dung môi methanol và acetone tỏ ra có hiệu quả hơn trong việc trích ly chlorophyll [20], [21], [22], [23]. Tuy nhiên, với mục đích trích ly thu nhận chlorophyll với lượng cao và sử dụng làm bột màu cho thực phẩm, cồn 80% được chọn làm dung môi để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo vì các lý do an toàn [24], [25], [26].

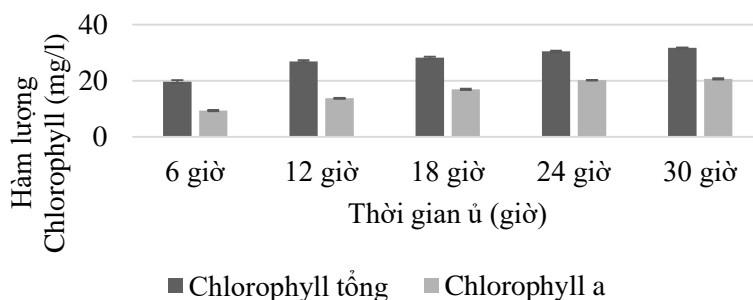
3.3. Kết quả khảo sát tỉ lệ dung môi



Hình 3. Ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi đến lượng chlorophyll trích ly

Từ kết quả hình 3, có thể thấy tỉ lệ dung môi ethanol 80% có ảnh hưởng đến lượng chlorophyll thu được. Khi tăng tỉ lệ cơ chất/dung môi thì lượng chlorophyll tổng tăng dần. Cụ thể, lượng chlorophyll tổng tăng từ 18,31mg/l (tỉ lệ 1/5) lên 25,97mg/l (tỉ lệ 1/10) và đạt đến 27,32mg/l (1/15). Tuy nhiên, lượng chlorophyll thu được giảm dần từ tỉ lệ 1/20 (24,32mg/l) và 1/25 (14,66mg/l). Quy luật này cũng tương tự với chlorophyll a thu được. Nguyên nhân của sự thay đổi trên là do với cùng một khối lượng nguyên liệu, khi tăng lượng dung môi sử dụng thì hiệu suất trích ly tăng do tăng sự chênh lệch gradient nồng độ của cấu tử cần trích ly giữa nguyên liệu và dung môi. Tuy nhiên, nếu sử dụng lượng dung môi quá lớn thì sẽ làm loãng dịch trích. Khi đó, nếu muốn thu nhận sản phẩm trích ly ta phải thực hiện quá trình cô đặc hay sử dụng các phương pháp để tách bớt dung môi. Vì thế, với mỗi quá trình trích ly, cần xác định tỉ lệ phù hợp giữa nguyên liệu và dung môi để thu được hiệu suất trích ly cao nhất và tiết kiệm chi phí. Như vậy, trong thí nghiệm này, chúng tôi chọn tỉ lệ dung môi/cơ chất là 1/15 (w/v) để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.4. Kết quả khảo sát thời gian ủ (trích ly)



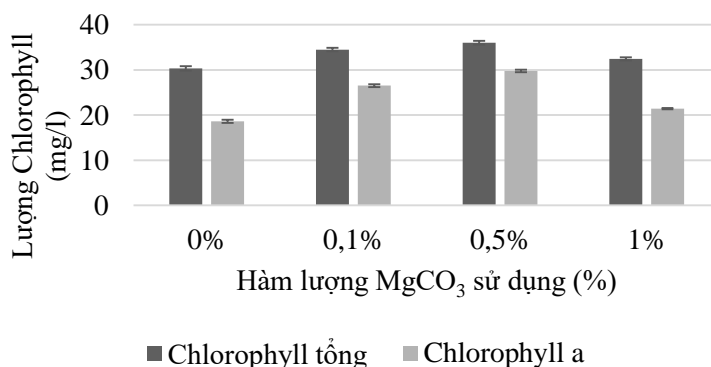
Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian ủ đến lượng chlorophyll trích ly

Kết quả hình 4 cho thấy thời gian trích ly ảnh hưởng có ý nghĩa đến lượng chlorophyll thu nhận được. Thời gian trích ly càng lâu thì lượng chlorophyll sẽ càng tăng, song thời gian chiết quá lâu sẽ không mang lại hiệu quả. Trong các khoảng thời gian thử nghiệm, lượng chlorophyll thu được cao nhất trong 24 giờ trích ly (20,50mg/l). Trên lý thuyết, khi kéo dài thời gian trích ly sẽ làm tăng thời gian tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi, do đó làm tăng quá trình khuếch tán của các phân tử chất trích từ trong nguyên liệu vào trong dung dịch và làm tăng hiệu suất trích ly. Tuy nhiên, quá trình trích ly sẽ chậm dần cho đến khi sự chênh lệch nồng độ của chất trích trong nguyên liệu và trong dung dịch đạt trạng thái cân bằng. Khi đó, việc kéo dài thời gian trích ly cũng sẽ không làm tăng được lượng chất trích được.

Trong thí nghiệm này, do sử dụng phương pháp ngâm chiết để trích ly nên trong thời gian ngắn sẽ không trích ly hầu hết chlorophyll có trong tế bào mẫu, nhưng trong thời gian trích ly dài thì lượng dung môi sẽ bay hơi một phần, đồng thời xảy ra sự chuyển hóa chlorophyll thành pheophytin và các đồng phân khác, dẫn đến thời gian càng lâu thì lượng chlorophyll thu được không tăng mà có xu hướng giảm. Với mục tiêu thu lượng chlorophyll cao nhất, thời gian trích ly 24 giờ được chọn là thời gian trích ly thích hợp nhất.

3.5. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của MgCO₃ đến lượng chlorophyll thu được

Từ hình 5 nhận thấy lượng MgCO₃ ảnh hưởng có ý nghĩa đến lượng chlorophyll thu nhận được. Việc bổ sung MgCO₃ có ảnh hưởng tích cực đến lượng chlorophyll trích được do nó giúp đảm bảo ion Mg²⁺ luôn có dư trong dịch trích ly, hạn chế trường hợp mất nhân Mg²⁺ trong cấu trúc hóa học của chlorophyll.



Hình 5. Ảnh hưởng của MgCO₃ đến lượng chlorophyll trích ly

Trong thí nghiệm này, khi tăng lượng $MgCO_3$ bổ sung vào dung dịch trích ly thì lượng chlorophyll thu được tăng dần và đạt giá trị cao nhất khi lượng $MgCO_3$ là 0,5% so với khối lượng mẫu, nhưng khi tăng lượng $MgCO_3$ thêm nữa thì lượng chlorophyll thu được có sự giảm nhẹ. Nguyên nhân của sự khác biệt này là do chlorophyll khi bị acid hóa sẽ tạo thành pheophytins, trong khi đó, ở pH kiềm, vòng isocyclic của chlorophyll sẽ bị mở ra và tạo thành rhodochlorin [27]. Như vậy, lượng $MgCO_3$ 0,5% so với khối lượng mẫu được chọn để tăng khả năng trích ly chlorophyll.

3.6. Sấy phun dịch trích ly chlorophyll

Sau khi có được các thông số của quá trình trích ly, tiến hành thí nghiệm với 500g rong tươi xay nghiền mịn, bổ sung ethanol 80%, tỉ lệ rong/ethanol là 1/15 (w/v), đun cách thủy 10 phút, ủ trích ly trong điều kiện tối 24 giờ. Sau trích ly tiến hành cô quay chân không ở $48^{\circ}C$, nồng độ chất khô 12%, bổ sung maltodextrin đến 13,5%, đem sấy phun ở $90^{\circ}C$, thu được sản phẩm chlorophyll dạng bột mịn. Hiệu suất thu hồi ở mức tương đối cao (62,92%), do chlorophyll là chất màu dễ bị biến đổi trong quá trình bảo quản cũng như xử lý nhiệt nguyên liệu.

Sản phẩm sau sấy phun có dạng bột mịn có độ ẩm 5,4%, tan tốt trong nước nên rất dễ để ứng dụng trong sản xuất các sản phẩm thực phẩm. Như vậy, việc thử nghiệm thành công thu nhận bột màu xanh chlorophyll từ rong sẽ mở ra hướng sản xuất chế phẩm này, sẽ góp phần hạn chế nhập khẩu chất màu tự nhiên này, nâng cao giá trị của rong cũng như xử lý được vấn đề môi trường thay vì bỏ lãng phí như hiện nay.

4. KẾT LUẬN

Dung môi trích ly thích hợp để thu nhận chlorophyll từ rong *Cheatomorpha* sp. là ethanol 80% xét về phương diện an toàn thực phẩm. Tỉ lệ cơ chất/dung môi thích hợp là 1/15 (w/v). Lượng $MgCO_3$ thích hợp bổ sung vào dung dịch trích là 0,5% so với khối lượng mẫu, trích ly trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Dịch sau trích ly được cô đặc bằng cô quay chân không đến nồng độ chất khô 12%, bổ sung maltodextrin đến 13,5% trước khi đem sấy phun. Chế phẩm chlorophyll thu được dạng bột, có độ ẩm 5,4% tan tốt trong nước với hiệu suất thu hồi chlorophyll đạt 62,96%. Kết quả của đề tài mở ra hướng mới cho việc sản xuất chất màu từ nguồn nguyên liệu rong biển dồi dào nhưng đang còn bị bỏ phí ở nước ta.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. A. Humphrey, (2004), "Chlorophyll as a color and functional ingredient," *Journal of food science*, vol. 69, pp. C422-C425.
- [2]. H. Scheer, (2004), "Chlorophylls and carotenoids," *Encyclopedia of Biological Chemistry*, pp. 430– 437.
- [3]. A. Humphrey, (1980), "Chlorophyll," *Food Chemistry*, vol. 5, pp. 57-67.
- [4]. C. Cubas, M. G. Lobo, and M. González, (2008), "Optimization of the extraction of chlorophylls in green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by N, N-dimethylformamide using response surface methodology," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 21, pp. 125-133.
- [5]. K. Spears, (1988), "Developments in food colourings: the natural alternatives," *Trends in Biotechnology*, vol. 6, pp. 283-288.

- [6]. M. G. Ferruzzi and J. Blakeslee, (2007), "Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives," *Nutrition Research*, vol. 27, pp. 1-12.
- [7]. P. Paranagama, K. Abeysekera, K. Abeywickrama, and L. Nugaliyadde, (2003), "Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.(lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 37, pp. 86-90.
- [8]. V. Breinholt, M. Schimerlik, R. Dashwood, and G. Bailey, (1995), "Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis against aflatoxin B1: complex formation with the carcinogen," *Chemical research in toxicology*, vol. 8, pp. 506-514.
- [9]. R. Dashwood, S. Yamane, and R. Larsen, (1996), "Study of the forces stabilizing complexes between chlorophylls and heterocyclic amine mutagens," *Environmental and molecular mutagenesis*, vol. 27, pp. 211-218.
- [10]. N. Tachino, D. Guo, W. M. Dashwood, S. Yamane, R. Larsen, and R. Dashwood, (1994), "Mechanisms of the in vitro antimutagenic action of chlorophyllin against benzo [a] pyrene: studies of enzyme inhibition, molecular complex formation and degradation of the ultimate carcinogen," *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 308, pp. 191-203.
- [11]. P. A. Egner, A. Muñoz, and T. W. Kensler, (2003), "Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin," *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 523, pp. 209-216.
- [12]. L. W. Smith and A. E. Livingston, (1945), "Wound healing: an experimental study of water soluble chlorophyll derivatives in conjunction with various antibacterial agents," *The American Journal of Surgery*, vol. 67, pp. 30-39.
- [13]. E. B. Carpenter, (1949), "Clinical experiences with chlorophyll preparations: with particular reference to chronic osteomyelitis and chronic ulcers," *The American Journal of Surgery*, vol. 77, pp. 167-171.
- [14]. B. Horwitz, (1951), "Role of chlorophyll in proctology," *The American Journal of Surgery*, vol. 81, pp. 81-84.
- [15]. J. B. Cady and W. S. Morgan, (1948), "Treatment of chronic ulcers with chlorophyll: review of a series of fifty cases," *The American Journal of Surgery*, vol. 75, pp. 562-569.
- [16]. U. M. Lanfer-Marquez, R. M. Barros, and P. Sinnecker, (2005), "Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives," *Food Research International*, vol. 38, pp. 885-891.
- [17]. N. B. Rajalakshmi.K, (2014), "Extraction and Estimation of Chlorophyll from Medicinal Plants, International Journal of Science and Research (IJSR)," *Index Copernicus Value: 6.14 , Impact Factor (2014): 5.611*,
- [18]. D. Sartory and J. Grobbelaar, (1984), "Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis," *Hydrobiologia*, vol. 114, pp. 177-187.

- [19]. J. Barrett and S. Jeffrey, (1964), "Chlorophyllase and formation of an atypical chlorophyllide in marine algae," *Plant physiology*, vol. 39, p. 44.
- [20]. J. D. Strickland and T. R. Parsons, (1972), "A practical handbook of seawater analysis,"
- [21]. K. H. Wiltshire, M. Boersma, A. Möller, and H. Buhtz, (2000), "Extraction of pigments and fatty acids from the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae)," *Aquatic Ecology*, vol. 34, pp. 119-126.
- [22]. K. Tada, H. Yamaguchi, and S. Montani, (2004), "Comparison of Chlorophyll a concentrations obtained with 90% acetone and N, N-dimethylformamide extraction in coastal seawater," *Journal of oceanography*, vol. 60, pp. 259-261.
- [23]. A. R. Grinham, T. J. Carruthers, P. L. Fisher, J. W. Udy, and W. C. Dennison, (2007), "Accurately measuring the abundance of benthic microalgae in spatially variable habitats," *Limnology and Oceanography: Methods*, vol. 5, pp. 119-125.
- [24]. S. E. Hagerthey, J. William Louda, and P. Mongkronsri, (2006), "EVALUATION OF PIGMENT EXTRACTION METHODS AND A RECOMMENDED PROTOCOL FOR PERIPHYTON CHLOROPHYLL a DETERMINATION AND CHEMOTAXONOMIC ASSESSMENT1," *Journal of phycology*, vol. 42, pp. 1125-1136.
- [25]. T. Cibic, O. Blasutto, K. Hancke, and G. Johnsen, (2007), "Microphytobenthic species composition, pigment concentration, and primary production in sublittoral sediments of the Trondheimsfjord (Norway) 1," *Journal of Phycology*, vol. 43, pp. 1126-1137.
- [26]. R. Devesa, A. Moldes, F. Díaz-Fierros, and M. Barral, (2007), "Extraction study of algal pigments in river bed sediments by applying factorial designs," *Talanta*, vol. 72, pp. 1546-1551.
- [27]. R. J. Porra, 2005, "The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b," in *Discoveries in Photosynthesis*, ed: Springer, pp. 633-640.