

# ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ LÊN QUÁ TRÌNH TÁCH CHIẾT CHLOROPHYLL TỪ RONG MÚT (*Porphyra sp.*) EFFECT OF VARIOUS FACTORS ON CHLOROPHYLL EXTRACTION FROM (*Porphyra sp.*)

Nguyễn Thùy Linh<sup>(1\*)</sup> và Lê Phạm Công Hoang<sup>(1)</sup>  
<sup>(1)</sup>Khoa Thủy Sản Trường ĐH Nông Lâm, Tp. Hồ Chí Minh  
<sup>(\*)</sup>Email: linhnguyenthuy@yahoo.com

## ABSTRACT

Chlorophyll is a natural pigment and a food colorant (E140). This pigment is added in some drinking water, beverage or cooking oil to reach some advantage in sensory value. Furthermore, chlorophyll gives us various health benefits. The difference between chlorophyll and hemoglobin is a magnesium ion at the center of chlorine ring (instead of iron ion). Some previous stated that chlorophyll supports liver detoxication, prevents cancer, enhances the ability of immunity system, and controls our blood pressure... Moreover, there are many previous studies on chlorophyll extraction and isolation from natural sources. In our current study, our objective was effect of solvents, extraction time, and MgCO<sub>3</sub> adding on chlorophyll concentration in extracted solution from *Porphyra. sp.* Total chlorophyll concentration was around 35 µg/l, in which the ratio of chlorophyll a was around 60 % in the condition of 80% acetone solvent, 500 mg MgCO<sub>3</sub>, and 24 h of extraction.

## TÓM TẮT

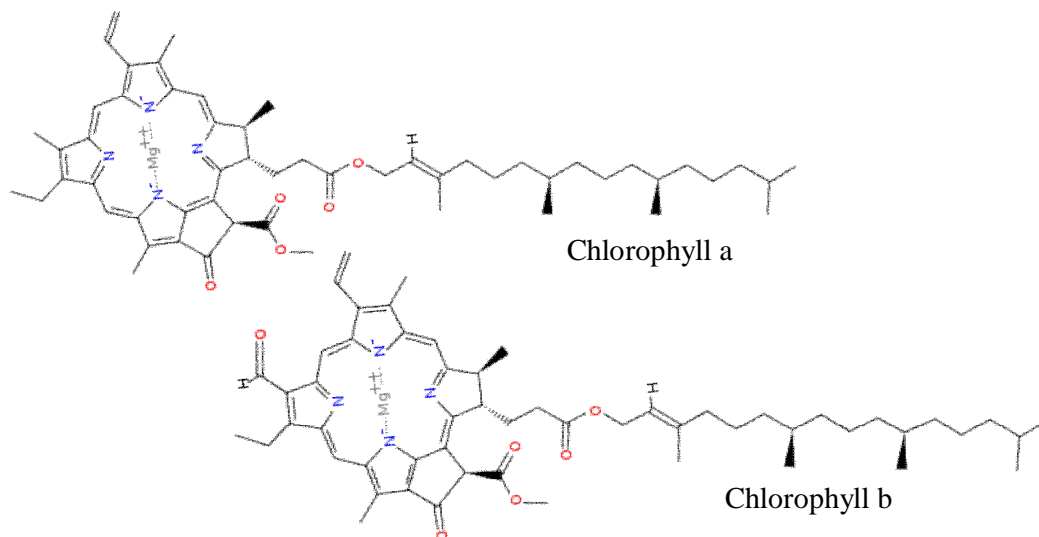
Chlorophyll là một sắc tố tự nhiên và cũng là một chất màu thực phẩm (E140). Chlorophyll được sử dụng để bổ sung trong một số nước giải khát hoặc dầu thực vật để tăng giá trị cảm quan. Ngoài ra chlorophyll cũng có 1 số lợi ích cho sức khỏe của con người. Chlorophyll chỉ khác với hemoglobin trong máu người ở nhân Mg<sup>2+</sup> trong vòng chlorin (thay vì Fe<sup>2+</sup>). Một số nghiên cứu cho thấy chlorophyll có tác dụng tẩy độc ở gan, chống ung thư, tăng cường hệ miễn dịch, điều hòa huyết áp... Có rất nhiều nghiên cứu khảo sát và đánh giá về các phương pháp tách chiết chlorophyll từ nhiều nguồn khác nhau trong tự nhiên. Trong khuôn khổ nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá các yếu tố về dung môi, thời gian ủ và sự bổ sung MgCO<sub>3</sub> lên sự thu nhận chlorophyll ở rong mút (*Porphyra. sp.*). Lượng chlorophyll tổng số thu nhận được là khoảng 35 µg/l với tỉ lệ chlorophyll a là khoảng 60% với dung môi sử dụng là acetone 80% có bổ sung 500 mg MgCO<sub>3</sub> và thời gian ủ dịch rong trong dung môi là 24 giờ.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Chlorophyll là sắc tố quan trọng chỉ có ở sinh vật tự dưỡng (autotrophic) hoặc thực vật phù du (phytoplankton) như tảo... Lượng chlorophyll có trong tế bào phụ thuộc vào lượng sinh khối (Norbert Wasmund, 2006). Từ “chlorophyll” bắt nguồn từ tiếng Hy Lạp: “chloros” có nghĩa là màu xanh và “phyllon” có nghĩa là lá. Chlorophyll là một phân tử sinh học rất quan trọng, quyết định đến quá trình quang hợp của cây. Giúp cây tổng hợp năng lượng từ ánh sáng. Chlorophyll hấp thụ mạnh ánh sáng màu xanh dương nhưng lại hấp thụ kém ánh sáng màu lục trong dải quang phổ của ánh sáng.

Chlorophyll là một sắc tố chlorin. Các sắc tố chlorin được tạo thành thông qua con đường trao đổi chất và có cấu trúc khá giống như các sắc tố porphyrin khác (ví dụ như heme). Tại trung tâm của vòng chlorin là một ion Mg<sup>2+</sup> (Duble, 2010). Cấu trúc tổng quát của chlorophyll được Hans Fischer tìm ra vào năm 1940 và đến năm 1960 cấu trúc lập thể của

chlorophyll a đã được làm sáng tỏ hoàn toàn. Sự khác nhau giữa chlorophyll a và chlorophyll b là tại vị trí C7 ở chlorophyll a là nhóm  $-CH_3$  còn ở chlorophyll b là nhóm  $-CHO$  (Woodward RB, 1960).



**Hình 1:** Cấu tạo hóa học của Chlorophyll (Nguồn Wikipedia.org)

Rong *Porphyra sp.* có khoảng 70 loài (Brodie & Irvine, 2003), sống ở vùng bãi triều giữa vùng triều trên và vùng sóng lớn ở vùng nước lạnh ở vùng ôn đới. Ở Đông Nam Á, nó được sử dụng để sản xuất một số loại thực phẩm (Kain, 1991). Trong rong *Porphyra sp.*, chlorophyll a chiếm khoảng 0,58 – 1,96 mg/g trọng lượng tươi; chlorophyll b chiếm khoảng 0,23 – 0,63 mg/g trọng lượng tươi; và tổng chlorophyll chiếm khoảng 0,82 mg/g trọng lượng tươi (J.I., R.N. Kumar, Bora, Amb, & S.Chakraborty, 2009).

Có rất nhiều phương pháp tách chiết chlorophyll đã được công bố. Một số tác giả (Karsten, Schumann, Haubner, & Klausch, 2005) đã dùng acetone 90% để ly trích chlorophyll trên tảo. Các tác giả này đã dùng hạt micro-bead trong qua trình đồng hóa để tăng khả năng phá vách tế bào lên gấp 3 lần các phương pháp khác. Hiệu suất thu hồi chlorophyll trong nghiên cứu này đạt 39 – 85%. Trong một nghiên cứu khác (Ronen & Galun, 1984), các tác giả đã dùng dimethyl sulfoxide (DMSO) để tách chiết chlorophyll từ địa y (*Ramalina duriaei*). Ronen và các cộng sự cũng sử dụng acetone 90% có bổ sung  $MgCO_3$  để tách chlorophyll ở nhiệt độ lạnh và ánh sáng mờ. Bên cạnh đó, các nhà nghiên cứu Nhật bản (Irijama, Shiraki, & Yoshiura, 2011) cũng tiến hành nghiên cứu tách chiết chlorophyll từ rau chân vịt (spinach) bằng acetone, methanol trong điều kiện lạnh và tối.

Trong khuôn khổ nghiên cứu của chúng tôi, một số dung môi khác nhau và các điều kiện tách chiết khác nhau được đưa vào thử nghiệm. Thông qua kết quả thực nghiệm, ảnh hưởng của điều kiện tách chiết khác nhau sẽ được đánh giá và so sánh từ đó rút ra điều kiện phù hợp nhất được sử dụng để tách chiết chlorophyll từ rong mứt *Porphyra.sp.*

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Các thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm khoa Thủy Sản, Đại học Nông Lâm, TP.HCM

### Vật liệu và hóa chất

Rong mứt (*Porphyra.sp*) dạng thương phẩm khô được mua tại chợ Bình Tây, TP.HCM. Các dung môi tách chiết (Ethanol, Methanol, Aceton) và  $MgCO_3$  ở dạng hóa chất phân tích thương phẩm được sử dụng trong nghiên cứu này.

### Phương pháp tách chiết chlorophyll

3g rong khô được ngâm với 1000 ml nước cất (D.W) để loại bỏ sắc tố phycoerythrin và các tạp chất tan trong nước khác. Sau mỗi 1 giờ, rong được vớt ra và cho vào 1000 ml D.W mới. Công đoạn này được tiến hành 3 lần liên tiếp nhau. Sau đó, rong được vớt ra và để ráo nước hoàn toàn. Rong được cho vào máy xay cùng với một lượng D.W xác định (nhiệt độ 4 – 10°C) và được xay trong 5 phút.  $CaCO_3$  được bổ sung trước khi xay với lượng xác định (250 – 750 mg). Sau đó, dịch xay được đổ ra 1 cốc thủy tinh và được bổ sung dung môi (acetone, methanol, ethanol) sao cho nồng độ dung môi sau cùng đạt tỉ lệ phần trăm xác định (70 – 90%) theo từng thí nghiệm và thể tích cuối cùng đạt 100 ml. Cốc thủy tinh được bọc kín và được giữ trong điều kiện tối ở nhiệt độ 4°C và thời gian thích hợp (16 – 24 giờ) với từng thí nghiệm. Sau đó, mẫu được ly tâm 6000 rpm trong 10 phút. Dịch nổi được thu hồi để sử dụng cho các bước thí nghiệm sau.

### Phương pháp xác định nồng độ Chlorophyll

Đối với dung môi acetone, mẫu được đo độ hấp thụ ở các bước sóng 664 và 646 nm (Robert J. Porra, 2006). Mẫu trắng (blank) là mẫu chỉ chứa dung môi nồng độ tương ứng. Nồng độ chlorophyll a (Chl-a) và nồng độ chlorophyll b (Chl-b) được tính theo công thức:

$$[\text{Chl-a}] = 0,0127 \times A_{664} - 0,00269 \times A_{646}$$

$$[\text{Chl-b}] = 0,0229 \times A_{646} - 0,00468 \times A_{664}$$

Đối với dung môi methanol và ethanol, mẫu được đo độ hấp thụ ở bước sóng 665 và 652 nm (Zapata, Garrido, & Jeffrey, 2006). Mẫu trắng (blank) là mẫu chỉ chứa dung môi nồng độ tương ứng. Nồng độ chlorophyll a (Chl-a) và nồng độ chlorophyll b (Chl-b) được tính theo công thức:

$$[\text{Chl-a}] = 16,29 \times A_{665} - 8,54 \times A_{652}$$

$$[\text{Chl-b}] = 30,66 \times A_{652} - 13,58 \times A_{665}$$

$$[\text{Chl-ab}] = 22,12 \times A_{652} + 2,71 \times A_{665}$$

### Phương pháp thống kê số liệu

Tất cả các số liệu được trình bày dưới dạng trung bình hoặc trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn ( $n = 9$ ). Phần mềm thống kê SPSS version 17.0 và Duncan's multiple range test được sử dụng để tính toán sự khác biệt giữa các mẫu.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Ảnh hưởng của loại và tỉ lệ dung môi lên lượng và tỉ lệ chlorophyll thu nhận được sau qua trình tách chiết

Theo bảng 1, nồng độ Chl-a, Chl-b và Chl-ab tăng cùng với việc tăng nồng độ methanol và đạt giá trị cao nhất ở 90% methanol (10.7, 13.2 và 23.8, tương ứng). Tuy nhiên, tỉ lệ Chl-a và Chl-b trong dung dịch có sự khác biệt. Ở nồng độ methanol 70 – 80%, tỉ lệ Chl-a chiếm khoảng 40%; trong khi đó, ở nồng độ methanol 90%, Chl-a chiếm tỉ lệ khoảng 45%. Như vậy, Chl-b luôn chiếm tỉ lệ cao hơn trong dung dịch.

Đối với dung môi ethanol, nồng độ Chl-a tăng tỉ lệ thuận với việc tăng nồng độ của dung môi. Tuy nhiên, nồng độ Chl-b và Chl-ab chỉ tỉ lệ thuận với việc tăng nồng độ dung môi trong khoảng 70 – 80%; khi dung môi tăng cao hơn và đạt 90% thì nồng độ Chl-b và Ch-ab có chiều hướng giảm. So mới dung môi methanol, khi dùng dung môi ethanol, nồng độ Chl-a luôn đạt giá trị cao hơn và chiếm tỉ lệ khoảng 71 – 88% tổng lượng chlorophyll có trong dung

dịch. Tuy nhiên, Chl-ab thu được từ dung môi ethanol lại nhỏ hơn so với lượng Chl-ab thu được từ dung môi methanol.

**Bảng 1:** Ảnh hưởng của dung môi và nồng độ dung môi lên lượng Chlorophyll thu nhận sau khi tách chiết

Dung môi	Nồng độ (%)	Chl-a <sup>1)</sup>	Chl-b <sup>1)</sup>	Chl-ab <sup>1)</sup>	Tỉ lệ Chl-a (%)
Methanol	70	8.3 ± 0.1 <sup>h 2)</sup>	12.2 ± 0.2 <sup>b</sup>	20.5 ± 0.2 <sup>e</sup>	40.49 <sup>h</sup>
	80	8.9 ± 0.4 <sup>g</sup>	12.9 ± 0.7 <sup>a</sup>	21.9 ± 0.8 <sup>d</sup>	40.63 <sup>h</sup>
	90	10.7 ± 0.2 <sup>f</sup>	13.2 ± 0.5 <sup>a</sup>	23.8 ± 0.4 <sup>c</sup>	44.96 <sup>f</sup>
Ethanol	70	12.6 ± 0.7 <sup>e</sup>	4.3 ± 1.5 <sup>g</sup>	16.9 ± 1.2 <sup>f</sup>	74.56 <sup>b</sup>
	80	13.7 ± 0.5 <sup>c</sup>	5.4 ± 0.8 <sup>f</sup>	19.1 ± 1.1 <sup>f</sup>	71.72 <sup>c</sup>
	90	14.5 ± 0.6 <sup>b</sup>	1.9 ± 0.5 <sup>h</sup>	16.4 ± 0.6 <sup>f</sup>	88.41 <sup>a</sup>
Aceton	70	13.4 ± 0.6 <sup>d</sup>	10.3 ± 1.7 <sup>d</sup>	23.7 ± 2.0 <sup>c</sup>	56.54 <sup>f</sup>
	80	18.0 ± 0.9 <sup>a</sup>	10.9 ± 0.6 <sup>c</sup>	28.9 ± 1.4 <sup>a</sup>	62.28 <sup>e</sup>
	90	17.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	9.7 ± 0.4 <sup>e</sup>	27.6 ± 0.6 <sup>b</sup>	64.85 <sup>d</sup>

<sup>1)</sup> Chl-a, Chl-b, Chl-ab: nồng độ (µg/l, trung bình ± độ lệch chuẩn, n = 9) chlorophyll a, chlorophyll b, và chlorophyll tổng số trong 3 g mẫu rong thí nghiệm được tách chiết ở 4 °C trong 24 giờ

<sup>2)</sup> Các chữ khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt về mặt thống kê ở p < 0.05

Với dung môi acetone, nồng độ 80% của dung môi cho giá trị cực đại của cả Chl-a, Chl-b và Chl-ab. Tỉ lệ Chl-a đạt 56 – 64% tổng lượng chlorophyll trong dung dịch. Trong đó, Chl-a chiếm đa số với dung môi acetone 70%; trong khi đó Chl-b chiếm đa số với dung môi acetone 80 – 90%.

Như vậy, căn cứ theo kết quả thu nhận được, nồng độ chlorophyll a, chlorophyll và tổng chlorophyll cũng như tỉ lệ của chúng thay đổi theo loại dung môi và nồng độ dung môi sử dụng. Acetone là dung môi cho tổng lượng chlorophyll thu nhận được cao nhất với tỉ lệ Chl-a/Chl-b khá cân bằng. Ethanol là dung môi cho tổng lượng chlorophyll thu nhận được thấp nhất với Chl-a chiếm tỉ lệ cao. Theo một số nghiên cứu trước đây (Barrett & Jeffrey, 1964), enzyme chlorophyllase vẫn còn giữ một phần hoạt tính ở các nồng độ dung môi khác nhau làm cho chlorophyll bị chuyển sang các dạng đồng phân khác. Mặt khác, sự hoạt động của chlorophyll b reductase cũng tạo phản ứng chuyển chlorophyll b thành chlorophyll a. Có thể chính hoạt động của hai enzyme này trong quá trình tách chiết (giai đoạn ngâm, xay mẫu, lưu trữ trong các loại dung môi ở các nồng độ khác nhau) đã dẫn đến sự khác biệt về lượng và tỉ lệ chlorophyll thu nhận được. Các nghiên cứu về cấu tạo của chlorophyll cho thấy sự khác nhau giữa Chlorophyll a và Chlorophyll b là tại vị trí C7 ở Chlorophyll a là nhóm methyl (-CH<sub>3</sub>) còn ở Chlorophyll b là nhóm formyl (-CHO) (Woodward RB, 1960). Như đã biết, acetone có công thức phân tử là (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO; trong khi đó, methanol (CH<sub>3</sub>OH) và ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) là hai dung môi có chứa nhóm methyl, ethyl (-CH<sub>2</sub>) và nhóm hydroxyl (-OH) rất dễ dàng chuyển sang nhóm formyl. Mặt khác, khả năng hòa tan của chlorophyll khác nhau dựa trên loại và tỉ lệ dung môi khác nhau cũng dẫn đến sự khác biệt trong kết quả thí nghiệm (bảng 1).

#### Ảnh hưởng của thời gian ủ dịch rong trong dung môi lên lượng và tỉ lệ chlorophyll thu nhận được sau qua trình tách chiết

Căn cứ theo kết quả được trình bày ở bảng 2, chúng tôi nhận thấy có sự khác biệt về lượng Chl-a và Chl-b thu nhận được ở các thời ủ dịch rong trong dung môi, tuy nhiên, sự khác biệt là không quá lớn. Trong khoảng thời gian thử nghiệm, sự thay đổi về thời gian ủ hầu như không dẫn đến sự khác biệt về lượng Chl-ab thu nhận được (28.5 – 29.1 µg/l). Kết quả thực nghiệm cho thấy, với thời gian ủ là 20 giờ thì tỉ lệ Chl-a trong dung dịch là cao nhất (64.7%).

Mặc dù, qua thí nghiệm này, chúng tôi đã xác nhận được ảnh hưởng của thời gian ủ lên lượng Chlorophyll thu nhận, với sự khác biệt 4 giờ chưa đủ để theo dõi sự khác biệt trong kết quả thử nghiệm một cách rõ ràng nhất.

**Bảng 2:** Ảnh hưởng của thời gian ủ dịch rong trong dung môi lên lượng Chlorophyll thu nhận sau khi tách chiết

Thời gian (giờ)	Chl-a <sup>1)</sup>	Chl-b <sup>1)</sup>	Chl-ab <sup>1)</sup>	Tỉ lệ Chl-a (%)
16.0	17.0 ± 0.8 <sup>b2)</sup>	11.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	28.5 ± 1.0 <sup>a</sup>	59.6 <sup>c</sup>
20.0	18.5 ± 0.7 <sup>a</sup>	10.1 ± 1.0 <sup>c</sup>	28.6 ± 1.0 <sup>a</sup>	64.7 <sup>a</sup>
24.0	18.4 ± 0.9 <sup>a</sup>	10.7 ± 1.0 <sup>b</sup>	29.1 ± 1.7 <sup>a</sup>	63.2 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup> Chl-a, Chl-b, Chl-ab: nồng độ (µg/l, trung bình ± độ lệch chuẩn, n = 9) chlorophyll a, chlorophyll b, và chlorophyll tổng số trong 3 g mẫu rong thí nghiệm được tách chiết ở 4 °C với dung môi acetone nồng độ 80%

<sup>2)</sup> Các chữ khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt về mặt thống kê ở p < 0.05

### Ảnh hưởng của lượng MgCO<sub>3</sub> bổ sung lên lượng và tỉ lệ chlorophyll thu nhận được sau qua trình tách chiết

**Bảng 3:** Ảnh hưởng của lượng MgCO<sub>3</sub> bổ sung lên lượng Chlorophyll thu nhận sau khi tách chiết

Lượng MgCO <sub>3</sub> bổ sung (mg)	pH dịch	Chl-a <sup>1)</sup>	Chl-b <sup>1)</sup>	Chl-ab <sup>1)</sup>	Tỉ lệ Chl-a (%)
250	7.0	19.6 ± 0.8 <sup>b2)</sup>	12.0 ± 0.8 <sup>b</sup>	31.6 ± 1.2 <sup>b</sup>	62.1 <sup>b</sup>
500	7.5	21.0 ± 0.8 <sup>a</sup>	14.4 ± 1.3 <sup>a</sup>	35.3 ± 1.8 <sup>a</sup>	59.4 <sup>c</sup>
700	8.5	17.9 ± 1.0 <sup>c</sup>	8.7 ± 0.4 <sup>c</sup>	26.6 ± 1.3 <sup>c</sup>	67.4 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> Chl-a, Chl-b, Chl-ab: nồng độ (µg/l, trung bình ± độ lệch chuẩn, n = 9) chlorophyll a, chlorophyll b, và chlorophyll tổng số trong 3 g mẫu rong thí nghiệm được tách chiết ở 4 °C với dung môi acetone nồng độ 80% trong 24 giờ

<sup>2)</sup> Các chữ khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt về mặt thống kê ở p < 0.05

Kết quả thí nghiệm này được trình bày trong bảng 3. Rõ ràng, việc bổ sung MgCO<sub>3</sub> đã có ảnh hưởng tích cực lên lượng Chl-a, Chl-b và Chl-ab thu nhận được. Mẫu đối chứng ở đây là mẫu được thử nghiệm trong cùng điều kiện nhưng được bổ sung MgCO<sub>3</sub> với lượng 0.0 mg (bảng 2, thời gian ủ 24 giờ). Xét về lượng Chl-ab thu nhận được, mẫu đối chứng cho kết quả thấp hơn so với việc có bổ sung MgCO<sub>3</sub> với các nồng độ từ 250 – 500 mg (29.1 < 31.6 µg/l). Tuy nhiên, với mức bổ sung cao (700 mg) thì lượng Chl-a, Chl-b, và Chl-ab lại có sự giảm nhẹ so với mẫu không được bổ sung. Với lượng bổ sung 500 mg MgCO<sub>3</sub>, lượng Chl-a, Chl-b, và Chl-ab thu được cao nhất. Việc bổ sung ion Mg<sup>2+</sup> giúp đảm bảo ion này luôn có dư trong dung dịch, hạn chế trường hợp mất nhân Mg<sup>2+</sup> trong cấu trúc hóa học của chlorophyll.

Chúng tôi đã tiến hành kiểm tra pH dịch chlorophyll trước khi tiến hành đo độ hấp thụ, kết quả được ghi nhận ở bảng 3. Với mẫu đối chứng, pH dịch chlorophyll là 5.5. Theo những nghiên cứu trước đây (R. J. Porra, 2002), chlorophyll a và b khi bị acid hóa sẽ tạo thành phaeophytins a và b; trong khi đó, ở pH kiềm vòng isocyclic của chlorophyll a và b sẽ bị mở ra và tạo thành rhodochlorins a và b. Như vậy, việc kiểm soát pH của dịch chlorophyll trong quá trình tách chiết và lưu giữ là rất quan trọng và có ảnh hưởng rõ rệt lên kết quả nghiên cứu. Căn cứ theo bảng 2, pH 7.0 – 7.5 là phù hợp cho quá trình tách chiết chlorophyll.

### KẾT LUẬN

Thông qua các kết quả thu nhận được trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi nhận đã lựa chọn được acetone với nồng độ 80% là loại dung môi phù hợp cho qui trình tách chiết chlorophyll từ rong mứt (*Porphyra. sp*). Việc bổ sung Mg<sup>2+</sup> trong quá trình tách chiết là cần

thiết, tuy nhiên phải đảm bảo duy trì pH 7.0 – 7.5 trong dung dịch để tránh không làm cho chlorophyll bị chuyển thành các dạng đồng phân khác trong quá trình tách chiết. Các kết quả này là rất quan trọng và là những thông tin cơ bản giúp cho chúng tôi có thể tiếp tục khảo sát đánh giá các yếu tố khác trong quá trình tách chiết chlorophyll. Các nghiên cứu tiếp theo sẽ tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của thời gian ủ với các khoảng thời gian khác nhau, khảo sát việc sử dụng dung dịch đệm phù hợp để duy trì pH, cũng như khảo sát các phương pháp phá màng tế bào khác nhau để tăng hiệu suất tách chiết.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Barrett, J., & Jeffrey, S. W. (1964). Chlorophyllase and Formation of an Atypical Chlorophyllide in Marine Algae. *Plant Physiology*, 39(1), 44-47.
- Brodie, J. A., & Irvine, L. M. (2003). Seaweeds of the British Isles. *The Natural History Museum, 1. Part 3b*.
- Duble, R. L. (2010). Iron Chlorosis in Turfgrass. *Texas A&M University*.
- Irijama, K., Shiraki, M., & Yoshiura, M. (2011). An improved method for extraction, partial purification, separation and isolation of chlorophyll from spinach leaves. *Journal of Chromatography*, 2:2, 255-276.
- J.I., N. K., R.N. Kumar, Bora, A., Amb, M. K., & S.Chakraborty. (2009). An Evaluation of the Pigment Composition of Eighteen Marine macroalgae Collected from Okha Coast, Gulf of Kutch, India. *Our nature*, 7, 48-55.
- Kain, J. M. (1991). Cultivation of attached seaweeds. *Seaweed Resources in Europe: Uses and Potential*.
- Karsten, U., Schumann, R., Haubner, N., & Klausch, S. (2005). Chlorophyll extraction methods for the quantification of green microalgae colonizing building facades. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 55 (3), 213-222.
- Norbert Wasmund, I. T., Dirk Schories. (2006). Optimising the storage and extraction of chlorophyll samples. *Oceanologia*, 48 (1), 125-144.
- Porra, R. J. (2002). The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research*, 73 (1-3), 149-156.
- Porra, R. J. (2006). Spectrometric Assays for Plant, Algal and Bacterial Chlorophylls. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, 25, 95-107.
- Ronen, R., & Galun, M. (1984). Pigment Extraction from Lichens with Dimethylsulfoxide (DmsO) and Estimation of Chlorophyll Degradation. *Environmental and Experimental Botany*, 24 (3), 239-245.
- Woodward RB, A. W., Beaton JM. (1960). The total synthesis of chlorophyll. *Journal of the American Chemical Society*, 82 (14), 3800-3802.
- Zapata, M., Garrido, J. L., & Jeffrey, S. W. (2006). Chlorophyll c Pigment: Current Status. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, 25, 39-53.