

AVS rannsóknasjóður í sjávarútvegi

Lokaskýrsla til AVS-rannsóknasjóðs

Verkefni nr. 009-08

**Rannsóknir á lífvirkni og lífvirkum karóten-
efnum í sjávargróðri**

Steinþór Sigurðsson, SagaMedica

Ágrip, verkefni AVS 009-08

Fucoxanthin er karóten-efni sem er hluti af ljóstillífunarkerfi brúnþörunga. Það hefur fengið vaxandi athygli á síðustu árum vegna lífvirkni, bæði gegn krabbameini en eins sem vænlegt fæðubótarefni til megrunar. Í þessu verkefni voru kannaðir möguleikarnir á vinnslu fucoxanthins úr íslenskum brúnþörungum. Mest fucoxanthin var að finna á bólupangi (*Fucus vesiculosus*) og sagþangi (*F. serratus*), en minna í klóþangi (*Ascophyllum nodosum*) og þara. Samanburður á fersku hráefni og hráefni sem unnið hefur verið í Þörungaverksmiðjunni á Reykhólum bendir til þess að fucoxanthin rýrni ekki í ferlinu, og kemur því verkað hráefni þaðan vel til álita í framleiðslu. Þróuð var skilvirk hreinsunaraðferð til hreinsunar á miklu magni hráefnis með einföldum tækjabúnaði og án lífrænna leysa annarra en etanóls.

Abstract

Fucoxanthin is a carotenoid which is a part of the photosystem of brown algae. Interest in it has increased in recent years due to its bioactivity, both for its anticancer properties as well as for its potential as a dietary food supplement. The subject of the present work were the possibilities of processing fucoxanthin from Icelandic brown algae. Bladderwrack (*Fucus vesiculosus*) and toothed wrack (*F. serratus*) contained most fucoxanthin, whereas knotted wrack (*Ascophyllum nodosum*) and kelps contained less. Comparison between fresh material and material that had been processed by Thorverk at Reykhólar indicated that the drying process does not reduce the fucoxanthin-content, so their products can be used for producing fucoxanthin-containing products. An effective fucoxanthin-enriching process was developed that is suitable for processing large amounts of raw material with simple equipment and without the involvement of organic solvents beyond ethanol.

Efnisyfirlit

Inngangur	1
Aðferðir.....	2
Ljósmeiing á fersku hráefni:	2
Þunnlagsskilja:	2
Hreinsun með kísilsýrusúlu:	2
Vökvaskilja (HPLC):	2
Niðurstöður	4
Magn fucoxanthins í þangi og þara.....	4
Áhrif hita við þurrkun á fucoxanthin	7
Áhrif etanóls á leysni fucoxanthins.....	8
Tímakúrva útdráttar í 80% etanól með bakflæði	9
Felling með vatni	10
Hreinsunartilraunir	11
Tilraun A, meðhöndlað með kolum fyrir fellinguna	11
Tilraun B, meðhöndlað með kolum eftir fellinguna	14
Aðferð til hreinsunar fucoxanthins byggð á fyrirliggjandi rannsóknum	17
Umræða.....	18
Þakkir	19
Heimildir	20

Inngangur

Fucoxanthin er gul- appelsínugult karótenefti sem er hluti af ljóstillífunarkerfi brúnþörunga. Á síðustu árum hefur athygli beinst að efninu vegna margvíslegrar lífvirkni, á krabbamein (Sugawara *et al.*, 2006; Yoshiko og Hoyokum 2007; Kim *et al.*, 2010) og gegn offitu eða til megrunar (Maeda *et al.*, 2008; Woo *et al.*, 2010). Á síðustu árum hefur verið nokkuð framboð af fucoxanthin-afurðum á markaði sem fæðubótarefni, ýmist þang- eða þaramjöl í hylkjum eða meira hreinsað efni. Algengt magn fucoxanthins í dagskammti er á bilinu 1-5 mg. Á netinu er hægt að finna 5 mg skammt á allt niður í 25 krónur (miðað við að USD sé 120 krónur)

Helstu tegundir brúnþörunga við Ísland eru þarategundirnar beltisþari (*Laminaria saccharina*), stórþari (*Laminaria hyperborea*), hrossaþari (*Laminaria digitata*) og marinkjarni (*Alaria esculenta*) og þangtegundirnar bóluþang (*Fucus vesiculosus*), sagþang (*Fucus serratus*), klettaþang (*Fucus spiralis*), og klóþang (*Ascophyllum nodosum*).

Markmið þessa verkefnis var að kanna möguleikana á framleiðslu fucoxanthin-afurða úr íslensku hráefni og þróa vinnsluaðferðir til þess að vinna efnið úr miklu magni hráefnis með einföldum tækjakosti og án lífrænna leysa (annarra en etanóls) sem ásættanlegir eru í framleiðslu matvæla og fæðubótarefna.

Aðferðir

Ljósmeiing á fersku hráefni: Aðferð Seelys (Maeda *et al.*, 1972) var þróuð til þess að mæla litarefni (klórófýll a og c og fucoxanthin) í ferskum brúnþörungum. Hún byggir á því að DMSO rýfur vefi þörunganna, auk þess að leysa vel upp fucoxanthin. Klórófýll dragast hins vegar illa út í vatnsblandað DMSO, en vatnið úr ferska sýninu þynnir leysinn. Dregið er út úr fersku efni (þangi eða þara) í 4 ml DMSO fyrir hvert gramm efnis í 10 mínútur. Tekið eins mikið og næst af leysinum, og bætt á jafnmiklu magni af 85% DMSO í vatni. Sameinuð lausn er svo gleypnimæld við 665, 631, 582 og 480 nm, og magnið reiknað skv. jöfnu Seelys:

$$[\text{Fucoxanthin (mg/ml)}] = (A_{480} - 0,722 * (A_{631} + A_{582} - 0,297 A_{665}) - 0,049 A_{665}) / 130$$

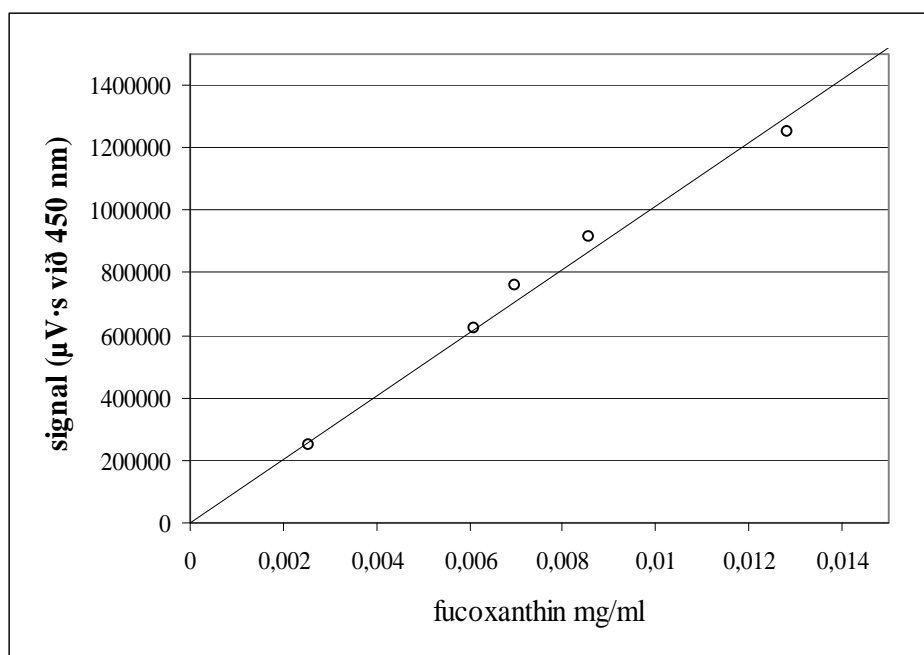
Þunnlagsskilja: Notaðar voru kísilsýruplötur úr álþynnum. Ferðafasinn asetón/petroleum eter, 3:7, reyndist best. Fucoxanthin hefur R_f -gildi upp á u.þ.b. 0,5, og er gult eða appelsínugult (rauðleitara eftir því sem magnið er meira í sýninu). Vegna hins sterka litar fucoxanthins er aðferðin mjög næm.

Hreinsun með kísilsýrusúlu: Þurrk bóluþang (ca. 40 g) malað, og ekstrakerað með soxhlet-aðferð fyrst með petroleum eter í 90 mínútur. Mælingar með þunnlagsskilju sýna að lítið sem ekkert fucoxanthin dregst út í leysinn, en mikið af klórófýll efnum. Að því búnu er dregið með díetýleter. Hér dregst út tæplega 1% af vigt plöntuefnisins. Hér er megnið af fucoxanthininu að finna. Sýnið er þurrkað við lofttæmi í hverfisvala og tekið upp í lítið rúmmál af asetóni og hreinsað frekar á kísilsýrusúlu sem jöfnuð hefur verið með petroleum eter. Nokkuð auðvelt reynist að hreinsa fucoxanthin frá öðrum efnum með því að skola lengi með 25% asetón í petroleum eter. Þegar ekki koma lengur önnur efni (en dálítið fucoxanthin kemur í endann) má skola fucoxanthin niður með 30% asetón í petroleum eter.

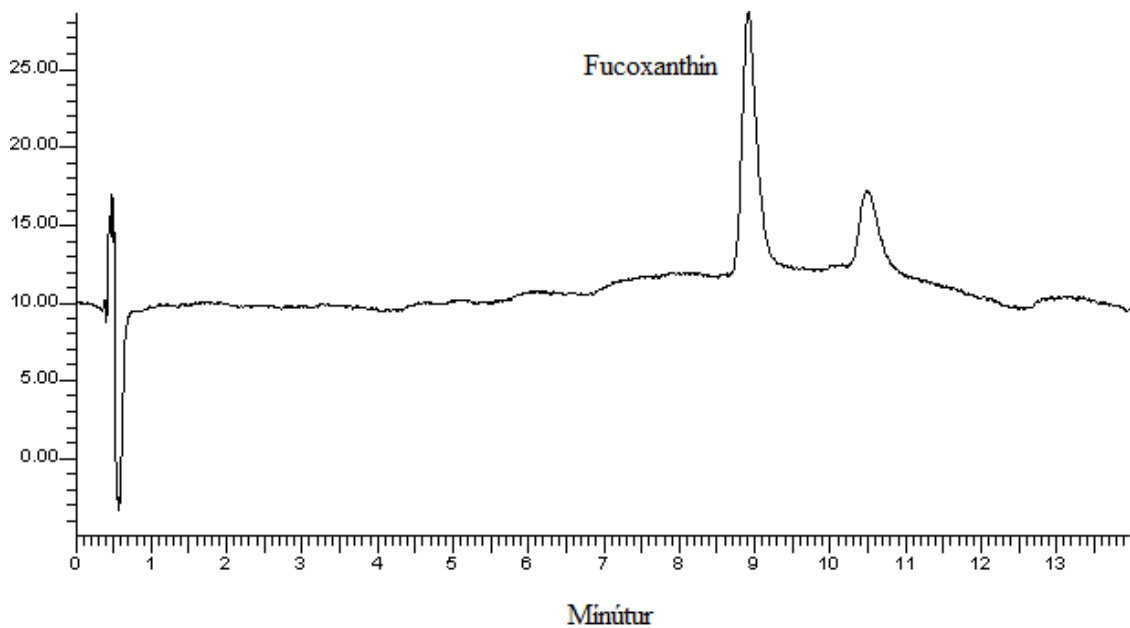
Vökvaskilja (HPLC): Notuð var Zorbax SB-C18 súla. Í upphafi var notuð keyrsla án stiguls með ferðafasann 0,5 M ammóníumasetatlausn / asetónítríl / metanól, 5:85:10, og lesið af við 450 nm. Við efnahagshrunið haustið 2008 varð hins vegar veruleg

verðhækkun á asetónítríl á heimsmarkaði og þróuð var aðferð þar sem ekki þarf asetónítríl. Þá var notaður stigull: 0,5 M ammóníumasetat / metanól 20:80 í eina mínútu, farið í hlutföllin 5:95 á 5 mínútum, og þeim hlutföllum haldið í 8 mínútur. Fucoxanthin-toppur kemur eftir u.þ.b. 9 mínútur.

Leitast var við að þynna sýni þannig að styrkurinn væri á bilinu 2-14 $\mu\text{g/ml}$, og magn reiknað út frá staðalkúrvu.



Myndin hér fyrr neðan sýnir krómatógramm af sýni sem ríkt er af fucoxanthini. Mælt er við 450 nm og fucoxanthin-toppurinn kemur á rúmlega 9 mínútum.



Niðurstöður

Magn fucoxanthins í þangi og þara

Magnmælingar voru framkvæmdar ýmist með aðferð Seelys (á fersku hráefni) eða með vökvaskilju. Þá var hráefnið þurrkað og dregið út í u.þ.b. 100-falt magn leysablöndunnar metanól/aseton 3:7 í nokkra daga og síðan mælt í vökvaskilju, og borið saman við staðalkúrvu.

Til þess að fá fullar heimtur með aðferð Seelys þarf að draga hvert sýni út í þrjár leysablöndur, en megnið af fucoxanthininu kemur út í fyrsta útdráttinn, og gefur þannig góða vísbendingu, og var hún notuð þannig í þessu verkefni. Vökvaskilja var hins vegar notuð til þess að fá nákvæmari niðurstöður.

Í fyrstu athugunum sýndi sig að þangsýni, sér í lagi Fucus-tegundirnar (bólþang, klettaþang og sagþang) innihéldu meira fucoxanthin en þari, og var athyglinni fyrst og fremst beint að þeim. Einnig kom í ljós þegar afurðir Þörungaverksmiðjunnar í Reykhólum voru skoðaðar, að mun meira fucoxanthin er að finna í þangafurðum (klóþang, ASCO) heldur en þaranum (stórþari og hrossaþari).

Vökvaskiljumælingar á bóluþangi eru sýndar í töflunni að neðan

	mg/g
Bóluþang tekið 10. febrúar 2010 við Gróttu	0,43
Bóluþang tekið 29. mars 2010 við Gróttu, stórgert	0,53
Bóluþang tekið 29. mars 2010 við Gróttu, smágert	0,45
Bóluþang, tekið 1. júní 2010 við Gróttu	0,29*
Bóluþang, tekið 27. ágúst 2010 við Gróttu	0,44
Bóluþang tekið 19. okt 2009 við Grindavík	0,25**
Bóluþang tekið 14. ágúst 2009 við Grindavík	0,18**

* 8 vikur liðu frá töku til údráttar

** Meira en hálf tveggja ár leið frá töku til údráttar

Magnið var nokkuð stöðugt við um 0,4 mg fucoxanthin í grammi af þurru þangi. Það virðist ljóst að fucoxanthin er ekki stöðugt í þurrkuðu þangi, því sýni sem geymd hafa verið í nokkra mánuði skera sig úr hvað magn varðar (sjá aftar). Í sumum heimildum er talað um allt að 4 mg/g í bóluþangi í Atlantshafi (Nygård og Ekelund, 2006), en annars staðar má sjá gildi líkari fyrirbyggjandi mælingum, í einni rannsókn mælast við 0,55-0,78 mg/g í bóluþangi tekið við Helgoland (Küppers og Kremers, 1978). Mest fucoxanthin mun vera að finna í þangi á vorin en minnst á haustin, en þessi munur virðist lítill.

Þá gefa niðurstöðurnar til kynna að eldra þang (stórgerðara) er ríkara af fucoxanthin.

Sagþang er náskyld bóluþangi. Þar virtist breytileikinn heldur meiri, og greinilega meira fucoxanthin að vori en hausti. Ekki fannst marktækur munur á fíngerðasta og nýsprottnasta hluta þangsins að vori og eldri hlutum þess.

	mg/g
Sagþang tekið við Gróttu 29. mars 2010, fremst	0,52
Sagþang tekið við Gróttu 29. mars 2010, næst stöngli	0,54
Sagþang tekið við Gróttu 27. ágúst 2010	0,33

Klettaþang er einnig náskyld bóluþangi, og mjög líkt í útliti. Það sýnir svipað mynstur og sagþang, lítill munur eftir því hvort tekið er af smágerðum (ungum) eða stórgerðum (eldri) hluta að vori, en greinilega minna fucoxanthin að hausti en vori.

	mg/g
Klettaþang tekið við Gróttu 29. mars 2010, smágert	0,44
Klettaþang tekið við Gróttu 29. mars 2010, stórgert	0,47
Klettaþang, Gróttu 27.8.10	0,23

Klópang er eina þangtegundin sem tekin er í Þörungaverksmiðjunni á Reykhólum um þessar mundir. Fucoxanthin-magn í klópangi mælist heldur minna en í Fucus-tegundunum.

	mg/g
Klópang tekið við Gróttu 29. mars 2010, fíngerðast og fremst	0,26
Klópang tekið við Gróttu 29. mars 2010, stórgert	0,19
Klópang tekið við Gróttu 27. ágúst 2010	0,24
Klópang tekið við Reykhóla 31. ágúst 2010, ljóst og fíngert	0,16
Klópang tekið við Reykhóla 31. ágúst 2010, ljóst og gróft	0,14
Klópang tekið við Reykhóla 31. ágúst 2010, dökkt og fíngert	0,29
Klópang tekið við Reykhóla 31. ágúst 2010, dökkt og gróft	0,22

Magn fucoxanthins í klópangi virðist svipað um vor og haust. Hins vegar inniheldur það meira fucoxanthin eftir því sem það er fíngerðara (yngra) og dekkra.

Þarasýni sem mæld voru með aðferð Seelys sýndu iðulega talsvert minna fucoxanthin-magn en bólupang, og voru því minna skoðuð. Sýni af hrossaþara (*Laminaria digitata*) tekið á Reykhólum 31. ágúst 2010 mældist innihalda 0,18 mg/g. Sýni af beltisþara (*L. saccharina*) tekið í byrjun mars 2010 í Breiðafirði mældist innihalda svipað, eða 0,17 mg/g. Nokkur sýni voru mæld sem voru nokkurra mánaða gömul við útdrátt, en út frá reynslu með slík sýni er hægt að áætla að þau hafi þá tapað allt að helmingi upphaflegs fucoxanthins. Um 0,1 mg/g fannst í hrossaþaradufti frá Reykhólum og mun minna í stórþaradufti. Hrossaþarinn hafði verið tekinn á ýmsum tímum um hávetur. Hugsanlegt er að þarinn hafi tapað einhverju í framleiðslu og geymslu, en í þessu sambandi er vert að geta þess að klópang virðist halda sínu fucoxanthin-innihaldi í ferlinu, eins og síðar verður komið inn á.

Áhrif hita við þurrkun á fucoxanthin

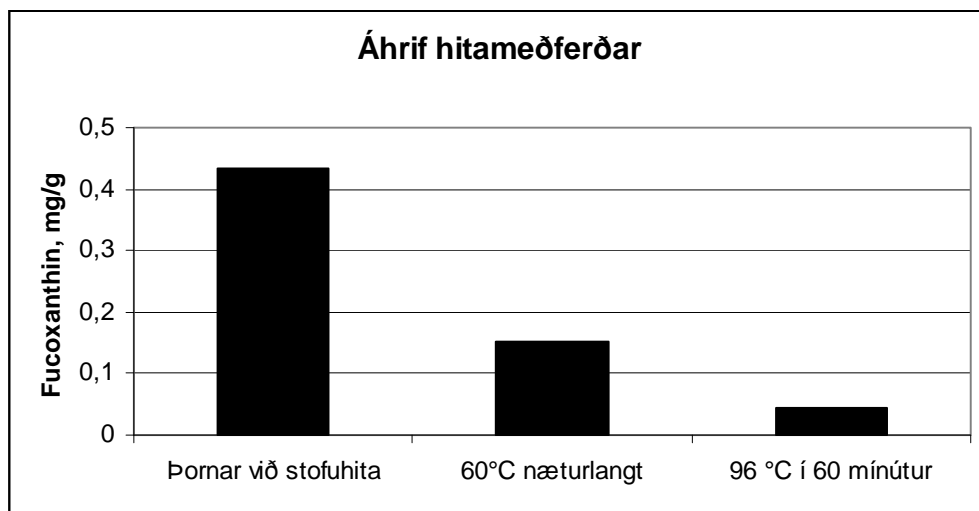
Þang og þari sem safnað er í stórum stíl og þurrkað hratt er eðli málsins samkvæmt hitað talsvert og því var reynt að meta áhrif hitunar á fucoxanthin-magn.

Fyrsta tilraun var gerð með bóluþangi sem tekið var í nóvember 2009. Hluti var þurrkaður í hitaskáp við 110 °C í 60 mínútur. Það var síðan malað og dregið út í 80% DMSO og ljósmælt í samræmi við mælingu Seelys, og borið saman við ómeðhöndlað ferskt þang.

Niðurstaðan gaf til kynna að ekki væri um neinn mun að ræða.

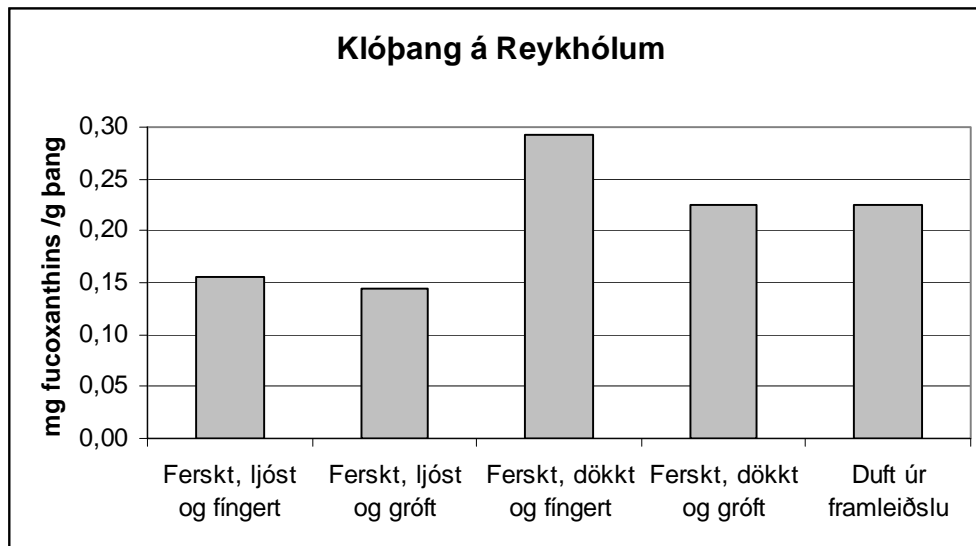
Tilraunin var endurtekin með öðru bóluþangssýni sem tekið var í febrúar 2010. Að þessu sinni var hluti sýnisins látinn þorna við stofuhita, annar næturlangt við 60 °C og sá þriðji við 96 °C í 60 mínútur, sýnin möluð og mæld í vökvaskilju.

Niðurstöðurnar voru mjög frábrugðnar, og eru sýndar á súluritinu að neðan:



Skýringin á því að Seely-aðferðin gaf rangar niðurstöður, þ.e. sýndi fullt magn fucoxanthins eftir hitameðferð liggur væntanlega í því að í hitameðferðinni myndast niðurbrotsefni með ljósgleypni sem rugla ljósmælinguna á DMSO-útdrættinum.

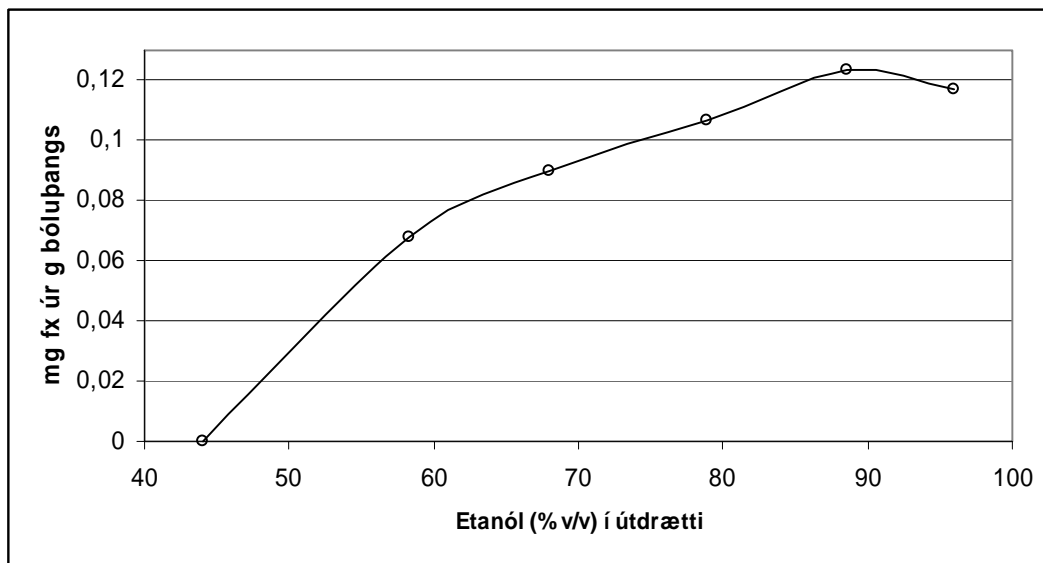
Hins vegar benda mælingar til þess að þurrkað og malað klóþang frá Þörungaverksmiðjunni á Reykhólum tapi litlu fucoxanthini í þurrkunarferlinu. Duft sem kom úr þurrkun 1. september hafði sambærilegt innihald og ferskt klóþang sem var á leið í vinnslu:



Eins og sést er fucoxanthin-magnið í duftinu svipað og í klóþanginu sem fer inn í ferlið.

Áhrif etanóls á leysni fucoxanthins

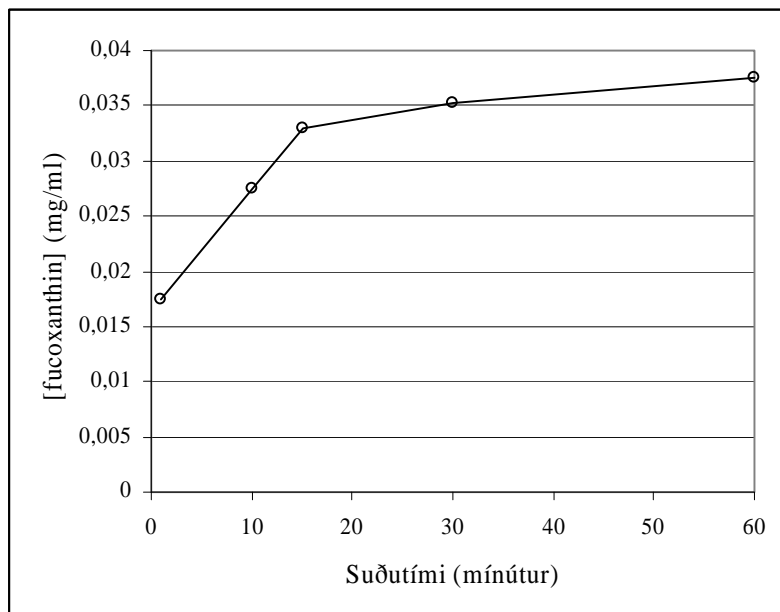
Áhrif styrks etanóls í vatni á leysni fucoxanthins voru könnuð með því að draga út úr möluðu bóluþangi, 10 ml fyrir hvert gramm þurrkaðs þangs, annars vegar með misjafnlega sterku etanóli í vatni, og hins vegar asetón/metanól, 7:3. Síðarnefnda leysablandan er notuð á rannsóknarstofum og talin henta sérlega vel til þess að draga út fucoxanthin. Hún er hins vegar af augljósum ástæðum óhentug í vinnslu afurða til manneldis. Með þessum leysi fengust 0,154 mg fucoxanthin úr grammi bóluþangs. Grafið að neðan sýnir magnið sem fékkst með vatnsetanól-blöndum í sömu einingum:



Grafið sýnir að ekkert fucoxanthin dregst út í 45% etanól. Optimum er í kringum 90% etanól - meira dregst út í það en í 96% etanól (spiritus fortis). Með 90% etanóli fást rúmlega 80% af því magni sem fæst í aseton/metanól, 7:3. Þess má geta, að eftir því sem etanólstyrkurinn eykst dregst út meira af öðrum litarefnum, s.s. klórófýllefnum (blaðgrænu).

Tímakúrva útdráttar í 80% etanól með bakflæði

Bóluþangsduft var soðið í 80% etanóli með bakflæði, og mælt magn fucoxanthins á ólíkum tímum. Niðurstöður eru sýndar á myndinni. Þar sést að verulega hefur hægt á útdrættinum eftir 30 mínútur, þótt magnið aukist á næstu 30 mínútum.



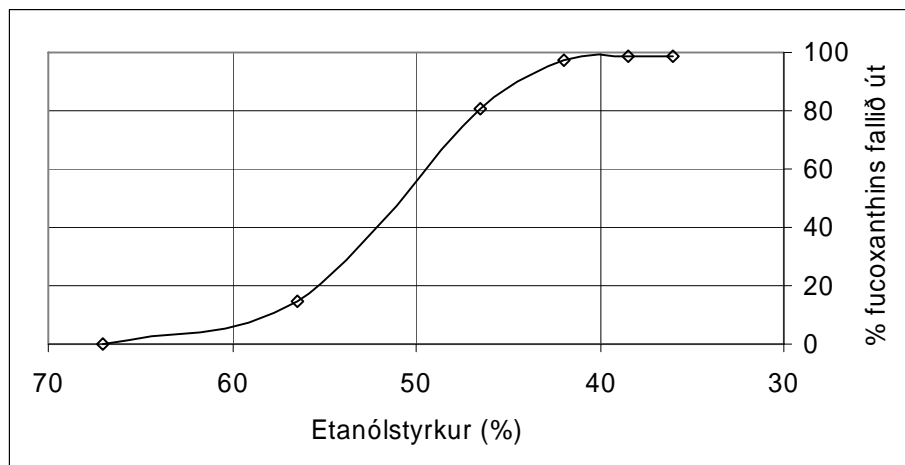
Hægt er að draga út úr hráefni í etanól-vatnslausnir við stofuhita með mjög einföldum tækjakosti. Það tekur hins vegar daga eða vikur. Tilraunin sýna að sama árangri má ná með því að hita lausnina að suðu í stuttan tíma. Hægt er að komast hjá því að nota flókinn búnað (kælingu til þess að ná fram bakflæði) með því að hita sýnið ekki alveg upp að suðumarki etanóls. Hægt er t.d. að nota hitaveituvatn í ytri kápu stáltanks, en það nær að hita sýnið upp í 65-70 °C eftir stöðum, en suðumark etanóls er um 78 °C.

Felling með vatni

Lítill eða engin leysni fucoxanthins í 40% etanóli í vatni vakti þá spurningu hvort hægt væri að fella fucoxanthinið út úr lausn með vatnsþynningu. Tilraunir á þessu gáfu góða raun. Byrjað var með extrakt sem gert var með 67% spíra.

Þynna þarf hægt, því ef vatninu er einfaldlega hellt út verður lausnin skýjuð, en hvorki er hægt að sía útfellinguna eða ná henni með skilvindu.

Fucoxanthin í spíralausn (67% eða hærra) var þynnt hægt með vatni (bætt við fimmtungi upphaflegs rúmmáls á klst., þ.e. fyrir eins lítra sýni væri bætt við 200 ml á klst.) og tekin sýni á meðan. Í tilrauninni sem grafið að neðan lýsir voru sýnin svo sett í skilvindu, og mælt fucoxanthin í floti og botnfalli með HPLC-mælingu.



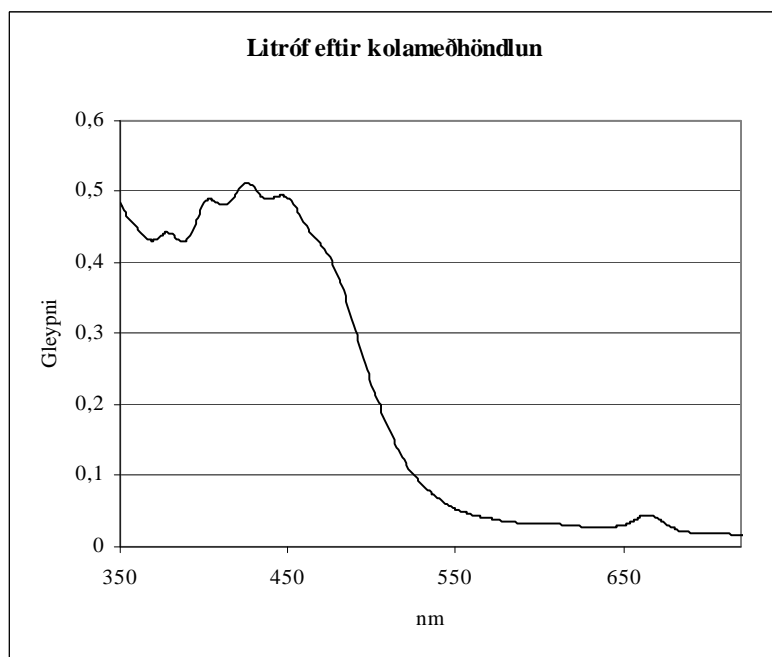
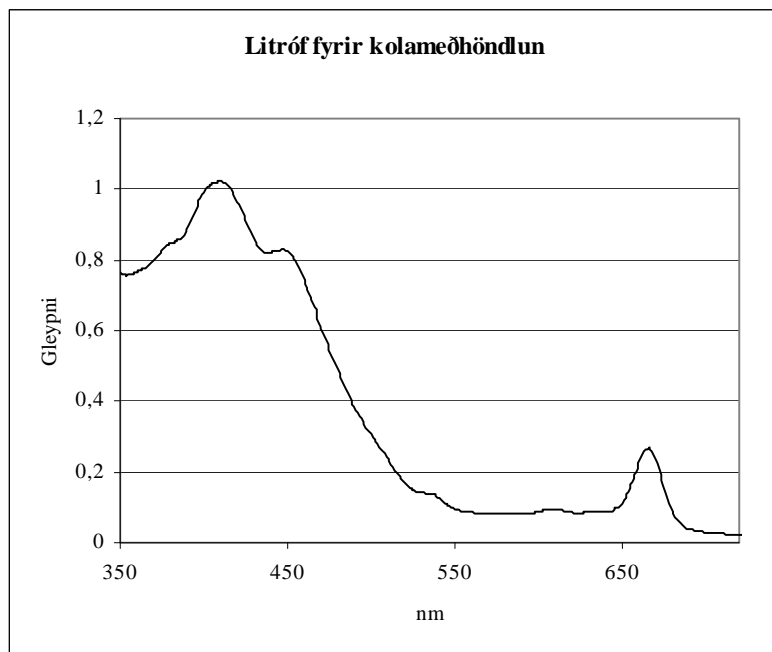
Grafið (sem er með "öfugan" x-ás) sýnir hlutfall útfallins fucoxanthins, þ.e. fucoxanthins í botnfalli, sem hlutfall af etanólstyrk. Á því sést að þegar búið er að þynna bólupangextrakt niður í 56,5% etanól er um 15% fucoxanthins fallið út. Þegar komið er niður í um 40% etanól er allt fucoxanthinið að finna í útfellingunni.

Hreinsunartilraunir

Að neðan er greint frá tveimur tilraunum þar sem niðurstöðurnar að ofan eru nýttar til hreinsunar. Að auki eru virknikol notuð til þess að fjarlægja klórófýll-efni.

Tilraun A, meðhöndlað með kolum fyrir fellingunni

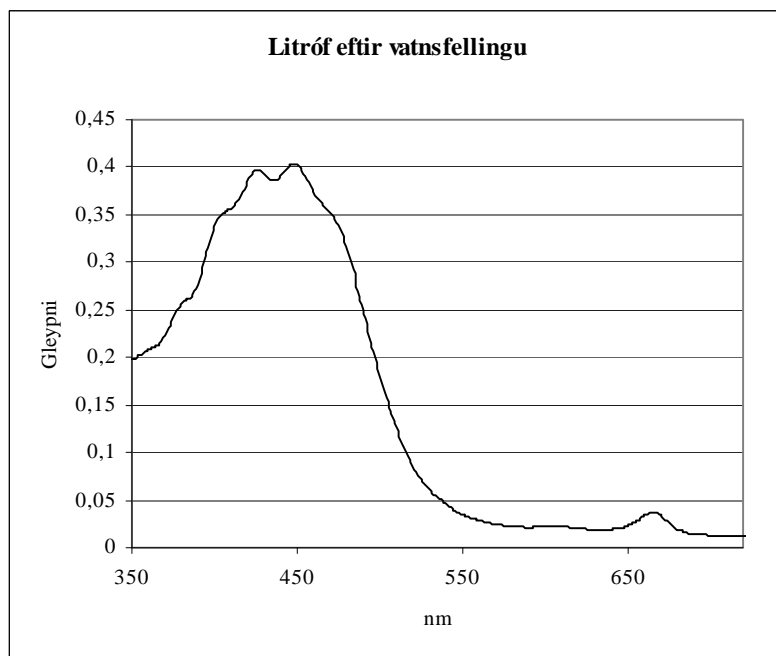
176 g af fínmöluðu klóþangsdufti frá Reykhólum var hitað í 735 ml af 77% spíra í hitaveituvatni í u.þ.b. 20 mínútur. Skv. mælingu á duftinu innihélt það 24,2 mg af fucoxanthin. Seyðið, sem reyndist innihalda 67 mg/g uppleystra efna eða 41,4 g í allt, var síað og tekinn hluti og bætt í það 6,3 mg af fíngerðum kolum í hvern ml. Kolin voru síuð frá, en engin þurrvigtarbreyting mældist. Hins vegar breyttist litrófið talsvert, því eftir kolameðhöndlunina hverfur mikið af græna litnum af völdum klórófýll (litrófstoppar við 410 og 665 nm) og fucoxanthin-toppurinn (450 nm) verður meira áberandi:



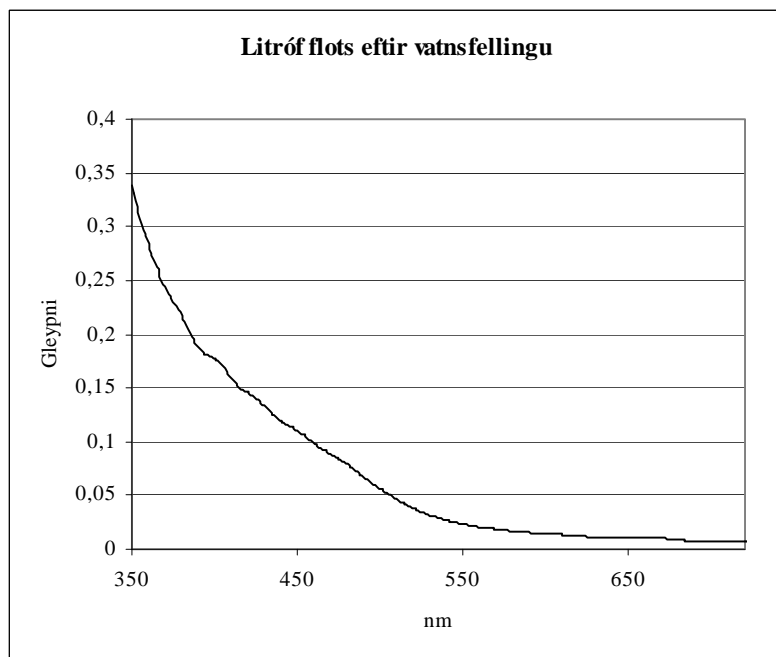
Mæling á sýninu eftir kolameðhöndlun sýndi að fucoxanthin-magnið var sem svarar 18,9 mg úr allri löguninni, eða um 78% af fucoxanthin í hráefninu.

Næst var vatn látið renna í sýnið þannig að þyntist niður í 37% etanól á 8 klst. og hrært á meðan. Að því loknu var útfellingunni leyft að setjast til, og hún síðan spunnin frá flotinu í 1 mínútu í eppendorf-skilvindu við 3000 rpm.

Þegar litróf af fellingunni er skoðað sést að gleypni við lægri bylgjulengdir (vinstra megin við toppinn) hefur minnkað:



Þessa gleypni er hins vegar að finna í flötinu, og jafnframt mótast ekki fyrir fucoxanthin-toppnum:



Þurrvigarmæling á fellingunni gefur til kynna að hún sé sem svarar 6,8 g úr allri suðunni, eða um sjöttungur. Vökvaskiljumæling sýnir að fucoxanthin-magnið er sem svarar 16,4 mg úr allri suðunni, eða 68% af fucoxanthininu úr hráefninu.

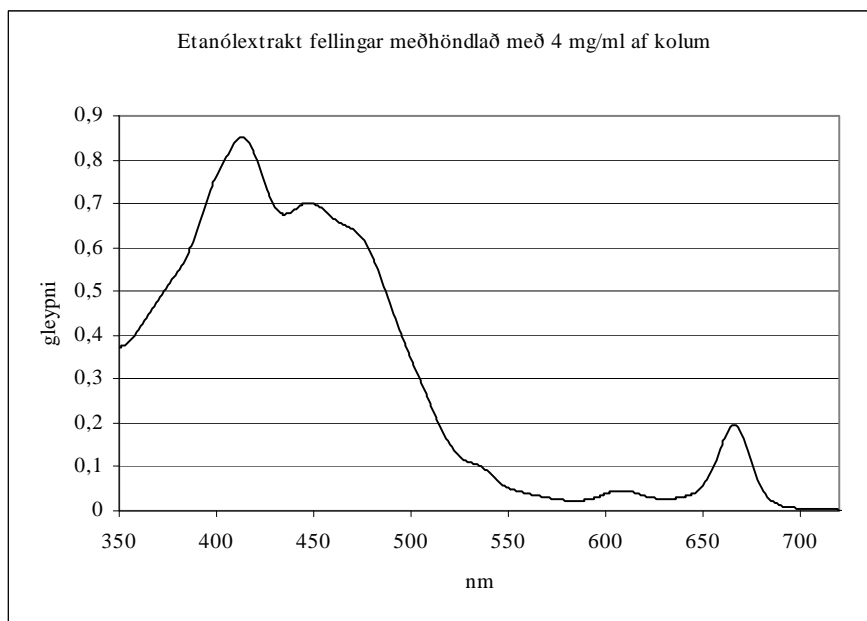
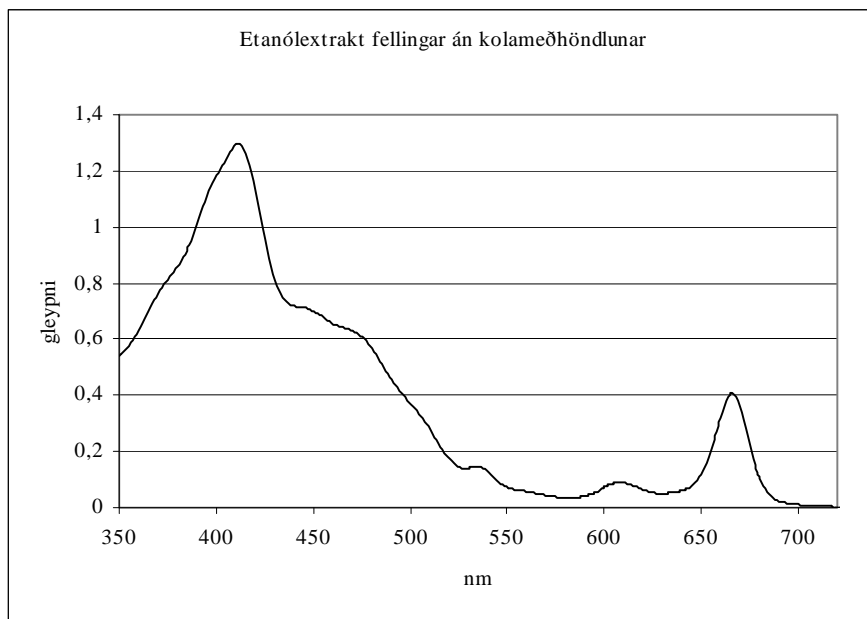
Skref	Sýni (g)	fucoxanthin (mg)	heimtur (%)	% fucoxanthin	Hreinsun
Ómeðhöndlað	176	24,2	100,0	0,014	1,0
Útdráttur og kol	67	18,9	78,1	0,028	2,1
Felling	6,8	16,4	67,8	0,241	17,5

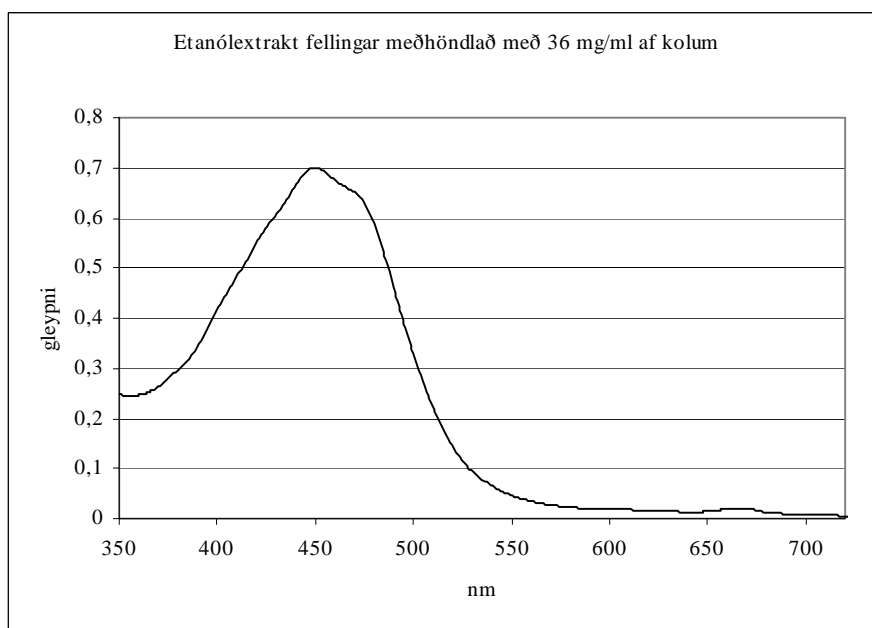
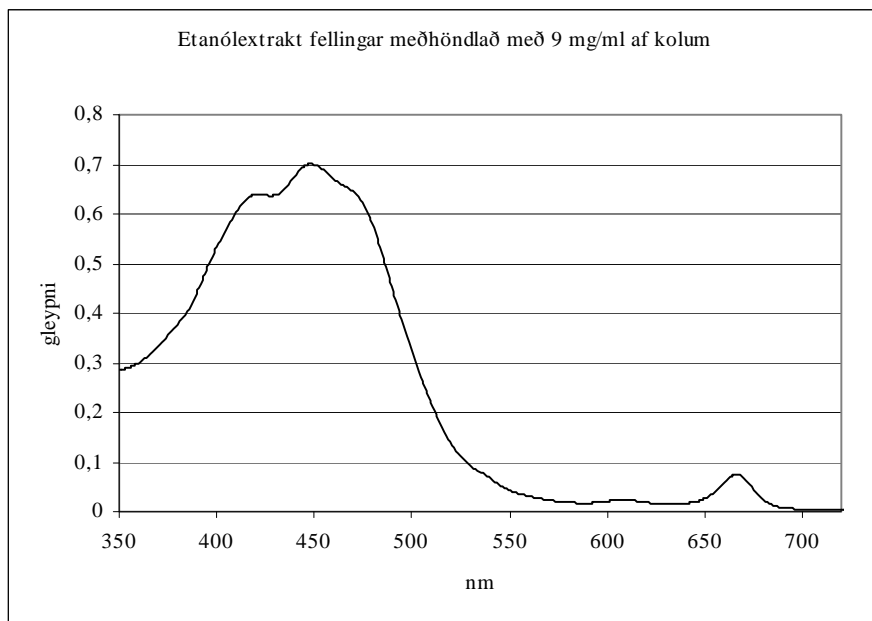
Tilraun B, meðhöndlað með kolum eftir fellingunni

217 g af af fínmöluðu klóþangsdufti frá Reykhólum var hitað í 982 ml af 80% spíra í hitaveituvatni í u.þ.b. 45 mínútur. Skv. mælingu á duftinu innihélt það 29,9 mg af fucoxanthin.

Seyðið, sem reyndist innihalda 46 mg/g uppleystra efna eða 37,8 g í allt, var síað og mælt. Heildar fucoxanthin-magnið mældist 24,8 mg eða 83%. Næst var vatn látið renna á hluta sýnisins þannig að það þynntist niður í 40,3% etanól á 48 klst. og hrært á meðan. Að því loknu var útfellingunni leyft að setjast til, og hún síðan spunnin frá flotinu í 1 mínútu í eppendorf-skilvindu við 3000 rpm. Fellingin var tekin upp í etanól og reyndist innihalda 20,5 mg af fucoxanthin eða 68,6% af magninu úr duftinu. Þurrefnismagnið var sem svaraði 1,53 g úr suðunni allri.

Sýnið var nú grænleitt. Prófað var að bæta mismiklu magni af kolum í lausnina, 4, 9 og 36 mg/ml, og litróf mælt. Litrófin sýna að eftir því sem kolamagnið er aukið minnkar klórófýll-liturinn (toppar við 410 og 665 nm) en fucoxanthin-toppurinn (450 nm) verður meira ríkjandi.





Fucoxanthin-mæling sýndi enga rýrnun upp að 9 mg/ml af kolum, en u.þ.b. 10% minnkun varð í efsta styrknum (36 mg/ml). Þurrefnismæling var gerð á miðstyrknum, og reyndist hún samsvara því að 1,12 g úr allri suðunni.

Taflan gefur yfirlit yfir hreinsunina:

Skref	Sýni (g)	fucoxanthin (mg)	heimtur (%)	% fucoxanthin	Hreinsun
Ómeðhöndlað	217	29,9	100,0	0,014	1,0
Útdráttur	37,8	24,8	82,9	0,066	4,8
Felling	1,53	20,5	68,6	1,340	97,2
Kol (9 mg/ml)	1,12	20,5	68,6	1,830	132,8

Fucoxanthin var hreinsað 133-falt úr hráefninu. Heimtur eru 68,6%, en þess ber að gæta að hér er ekki tekið tillit til þess vökva sem tapast í hratinu eftir útdrátt, en það ræðst af mjög mörgum þáttum; hlutfalli hráefnis og útdráttarvökva, tækjabúnaði o.s.frv.

Heimtur á fucoxanthin eru svipaðar í báðum tilraunum, en gríðarlegur munur á hreinsun. Helsti munurinn virðist koma fram strax í útdrættinum; ögn lægri spíraprósentu (77% í stað 80%) veldur því að mun fleiri efni dragast út, og þá væntanlega einkum efni sem falla út í fellingunni. Að auki gæti skipt miklu máli að í fyrri fellingunni var þynnt niður í 37% etanól en 40% etanól í þeirri síðari. Hugsanlegt er að sýnið innihaldi efni sem falla út í miklu magni á þessu bili. Loks má vera að hér skipti máli að í síðari fellingunni var þynnt á 2 sólarhringum en sex sinnum hraðar (á 8 klst.) í þeirri fyrri. Niðurstöðurnar sýna að lítil frávík geta haft afgerandi áhrif á hreinsunina.

Aðferð til hreinsunar fucoxanthins byggð á fyrirliggjandi rannsóknum

Þurrkað og malað hráefni er blandað saman við 80% etanól í stáltank með tvöfaldri kápu. Hlutföllin ráðast af magni fucoxanthins í hráefninu, en geta verið 3 til 10 lítrar vökva á móti kg af hráefni. Eftir því sem vökvinn er minni miðað við hráefni tapast hærra hlutfall með hrati, en hins vegar er ljóslega hægt að vinna meira hráefni í hverri lögun þegar vökvahlutfallið er lægra.

Þetta er nú hitað upp í um 65°C með hitaveituvatni og hitanum haldið í 45 mínútur. Hræra er látin ganga á meðan.

Að þessu loknu er hægt að halda beint áfram, eða bíða.

Vökvinn er pressaður úr afurðinni, og annað hvort dælt í gegnum síu eða í kónískan stáltank (þ.e. tank sem er eins og trekt í laginu að neðan) þar sem hratið sem eftir er í

vökvanum botnfellur yfir nótt. Það flýtir botnfellingu að kæla afurðina. Botnfallinu er hleypt undan með því að opna krana neðst á tankinum stuttlega.

Þegar vökvinn hefur verið síaður, eða botnfall skilið frá, er vökvi settur í tank með hræriverki og tekur a.m.k. tvisvar sinnum meira rúmmál en sem svarar afurðinni sem í hann er sett. Nú er sama rúmmál af vatni látið renna í hann á a.m.k. 8 klst. og hrært á meðan. Þessu er nú dælt í kónískan stáltank, og botnfall látið setjast til.

Botnfallinu (afurðinni) er hleypt undan, og síað. Það er svo tekið upp í etanól (þ.a. ljósgleypni við 450 nm sé af stærðargráðunni 1), og óuppleyst efni síuð frá. Í þetta er svo bætt fíngerðum virknikolum, u.þ.b. 10 g/l, og síað. Nú er hægt að þurrka upp etanólið í hverfisvala, eða fella það út með vatni með sama hætti og áður. Möguleiki er að bæta áður í það burðarefni til töflugerðar (sellúlósa eða kalsíumfosfati), og þá sest fucoxanthinið á það, og getur verið nánast tilbúið til töflusláttar.

Einnig er möguleiki að meðhöndla afurðina með kolum áður en fellt er út með vatni. Þetta væri sérlega hentugt ef til stendur að binda fucoxanthinið á burðarefni, því þá væri hægt að sleppa við seinni fellinguna. Hins vegar þyrfti talsvert meira af kolum.

Loks er hægt að sleppa kolameðhöndlun algerlega, en hún hefur fyrst og fremst sjónrænt gildi – afurðin breytist úr því að vera græn til brúnleit í að verða gul til appelsínugul.

Umræða

Þróuð hefur verið aðferð til þess að hreinsa fucoxanthin meira en hundraðfalt úr þurrkuðu þangi eða þara með tæplega 70% heimtum, með einföldum tækjabúnaði og án lífrænna leysa, annarra en etanóls. Aðferðin hentar til þess að vinna með mikið magn hráefnis. Fellingin, sem er síðast eða seint í aðferðinni, skilar markefninu, fucoxanthininu, “þurru”, þ.e. skilur það frá því mikla vökvarúmmáli sem óhjákvæmilega er í útdrætti, og sparar þannig þurrkun. Þurrkun er bæði orkufrek og vegna hitunar um lengri tíma er alltaf möguleiki á að hún skemmi afurðina.

Í síðari tilrauninni fengust 20 mg af hreinsuðu fucoxanthini úr 217 g af klóþangi – ef ekki er tekið tillit vökvataps vegna pressunar. Þetta svarar til þess að til þess að vinna einn 5 mg dagskammt af fucoxanthini þurfi meira en 50 g af þangi, eða að 100 kg af þangi (sem væri raunhæft magn í lotu) gefi minna en 2000 dagskammta. En hér ber að hafa í huga, að hráefnið, klóþang frá Reykhólum, innihélt 0,138 mg fucoxanthin/g, en allt að 0,25 mg/g mældust í öðrum lotum þaðan. Bólupang inniheldur enn meira fucoxanthin. Bólupang hefur verið unnið á Reykhólum, en ekki á síðustu árum, en miðað við fyrirbyggjandi niðurstöður myndi það henta mun betur til vinnslu fucoxanthins, og ætti lotan að skila þrisvar sinnum meiri afurð.

Athyglinni hefur einkum verið beint að aðgengilegu hráefni, þangi, sem er auðvelt að nálgast í fjöru, og afurðum Þörungaverksmiðjunnar. Þaramjöl hefur mælst mun rýrara en klóþangsmjöl, og samanburður á sýnum af þangi og þara hefur gefið til kynna að þarinn innihaldi talsvert minna fucoxanthin. Skv. heimildum er þó algengt fucoxanthin-magn þara (stórþara, beltisþara og hrossaþara) sambærilegt við bólupang (Küppers og Kremers, 1978), sérstaklega að vetri til þegar þari er tekinn á Reykhólum. Óljóst er hvort fucoxanthin sé þar einfaldlega í minna magni í fresku hráefni, eins og mælingar með aðferð Seelys hafa gefið til kynna, eða hvort það komi verr út úr þurrkun en klóþang, og verður það kannað nánar.

Niðurstaða:

Þróuð hefur verið skilvirk aðferð til þess vinna fucoxanthin úr brúnþörungum, hráefni sem er til í miklu magni við Ísland og tiltölulega lítið nýtt. Hins vegar er ljóst að ekki er hægt að keppa við þau verð sem fucoxanthin-töflur eru boðnar á, nema með því að skapa einhverja sérstöðu afurðar með ímynd eða vörubrún, t.d. ef vörur eru þróaðar þar sem fucoxanthin væri eitt margra efna í afurð.

Þakkir

SagaMedica þakkar AVS sjóði Landbúnaðar- og sjávarútvegsráðuneytis fyrir að styrkja þetta verkefni. Ennfremur þakkar SagaMedica Þörungaverksmiðjunni á Reykhólum fyrir samstarf, og Genís og Læknadeild HÍ afnot af mælitækjum.

Heimildir

Kim KN, Heo SJ, Kang SM, Ahn G, Jeon YJ (2010) *Fucoxanthin induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells through a ROS-mediated Bcl-xL pathway* Toxicol In Vitro **24**(6): 1648-1654

Küppers U og Kremer BP (1978) *Longitudinal Profiles of Carbon Dioxide Fixation Capacities in Marine Macroalgae*, Plant Physiol **62**: 49-53

Maeda H, Tsukui T, Sashima T, Hosokawa M, Miyashita K (2008) *Seaweed carotenoid, fucoxanthin, as a multi-functional nutrient* Asia Pac J Clin Nutr **17**(Suppl 1): 196-199.

Nygård CA og Ekelund GA (2006), *Photosynthesis and UV-B Tolerance of the Marine Alga Fucus vesiculosus at Different Sea Water Salinities*, J Applied Phycol **18**(3-5): 461-467

Seely GR, Duncan MJ, Vidaver WE (1972) *Preparative and analytical extraction of pigments from brown algae with dimethyl sulfoxide* Mar Biol **12**: 184-188

Sugawara T, Matsubara K, Akagi R, Mori M, Hirata T (2006) *Antiangiogenic activity of brown algae fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol* J Agric Food Chem **54**(26): 9805-9810

Yoshiko S, Hoyoku N (2007) *Fucoxanthin, a natural carotenoid, induces G1 arrest and GADD45 gene expression in human cancer cells* In Vivo **21**(2): 305-309

Woo MN, Jeon SM, Kim HJ, Lee MK, Shin SK, Shin YC, Park YB, Choi MS (2010) *Fucoxanthin supplementation improves plasma and hepatic lipid metabolism and blood glucose concentration in high-fat fed C57BL/6N mice* Chem Biol Interact **186**(3): 316-322