



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
2-0002076

(51)⁷ **C07K 1/14, 14/195, 14/405**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00068

(22) 29.09.2016

(67) 1-2016-03661

(45) 26.08.2019 377

(43) 27.03.2017 348

(73) **VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC, VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG
NGHỆ VIỆT NAM (VN)**

18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) **Đặng Diễm Hồng (VN), Lê Thị Thơm (VN), Nguyễn Thị Nga (VN)**

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT PHYCOCYANIN TỪ SINH KHỐI TƯƠI VI KHUẨN
LAM SPIRULINA PLATENSIS**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất phycocyanin từ sinh khối tươi vi khuẩn lam *Spirulina platensis* gồm các bước: (i) tách chiết phycocyanin thô từ sinh khối tươi vi khuẩn lam *Spirulina platensis*; (ii) tinh sạch phycocyanin thô bằng chitosan và cacbon hoạt tính; (iii) tinh sạch phycocyanin bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (iv) thẩm tích; và (v) sấy đông khô.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất phycocyanin từ sinh khối tươi vi khuẩn lam *Spirulina platensis*.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Tế bào *Spirulina platensis* là một loài vi khuẩn lam đa bào, dạng sợi, sinh vật nhân sơ có khả năng quang hợp thải oxygen, được sử dụng phổ biến rộng rãi nhất trên thế giới. Ở nhiều quốc gia châu Phi, nó được thu hoạch dễ dàng từ các hồ nước tự nhiên, sấy khô và sử dụng làm thực phẩm cho con người như một nguồn protein quan trọng. *S. platensis* khá phổ biến trong ngành công nghiệp thực phẩm sức khỏe con người ở nhiều nước châu Á nói chung và ở Việt Nam nói riêng. *S. platensis* là sản phẩm tự nhiên giàu dinh dưỡng vì có chứa hàm lượng protein cao, thành phần axit amin cần thiết cho cơ thể con người như lysin, leuxin, taurin, v.v., axit gama-linolenic (GLA), chất xơ, vitamin nhóm B, canxi, phospho, sắt, các sắc tố như beta-caroten, xanthophyl, chlorophyl, phycocyanin, các chất khoáng đa và vi lượng và các chất có hoạt tính sinh học khác (Ku *et al.*, 2013).

Spirulina platensis đã được chứng minh là có một số tính chất dược liệu (Belay *et al.*, 1993; Gantar và Svircev, 2008), chủ yếu là của phycocyanin như: khả năng chống ôxi hóa cao, tăng cường miễn dịch và chống ung thư (Kumar *et al.*, 2014; Sasson, 1991; Miranda *et al.*, 1998). Belay và đồng tác giả (1993) đã chứng minh rằng sắc tố màu lam này từ vi khuẩn lam *Spirulina* này đã làm tăng đáng kể tỷ lệ sống sót của chuột đã được tiêm các tế bào ung thư gan, sự kích thích hệ thống miễn dịch của phycocyanin là một cơ chế ức chế sự tăng trưởng của tế bào khối u. Trong thực tế, một số tác giả đã mô tả cơ chế hoạt động của phycocyanin là cảm ứng cơ chế gây chết tế bào ung thư (Reddy *et al.*, 2003; Bobbili *et al.*, 2003). Phycocyanin có khả năng ngăn chặn phản ứng viêm dị ứng của động vật ở các mô hình khác nhau. Sắc tố này làm giảm tình trạng viêm ruột non của chuột bằng cách ức chế kháng thể IgE đặc hiệu kháng nguyên (Nemoto-Kawamura *et al.*, 2004), ngăn ngừa tổn thương đại tràng trong viêm đại tràng do axit axetic ở chuột (Gonzales *et al.*, 1999), và ức chế sự gây phù nề

tai chuột bằng cách giảm PGE2 (nồng độ prostaglandin E2) (Romay *et al.*, 1998). Ramirez *et al.*, (2002), cho rằng sự ức chế phản ứng viêm dị ứng của phycocyanin qua các tế bào trung gian, bằng cách ức chế giải phóng histamin từ dưỡng bào. Hiệu quả làm giảm cholesterol máu của *Spirulina platensis* được cho là do phycocyanin trong tế bào. Phycocyanin ảnh hưởng tới cả sự ức chế hấp thụ cholesterol và tái hấp thu axit mật trong ruột (Nagaoka *et al.*, 2005). Bên cạnh tiềm năng sử dụng cho mục đích điều trị, phycocyanin đang được sử dụng như một chất đánh dấu huỳnh quang trong nghiên cứu sinh y học (Glazer, 1994, Antelo *et al.*, 2008). Ngoài ra, phycocyanin đã được sử dụng rộng rãi làm dinh dưỡng và thuốc nhuộm tự nhiên. Phycocyanin được sử dụng làm màu thực phẩm an toàn (trong kẹo cao su, các sản phẩm bơ sữa, v.v.), trong mỹ phẩm như son môi, kẻ mắt tại Nhật Bản, Trung Quốc, Thái Lan (Eriksen, 2008; Kumar *et al.*, 2014). Phycocyanin là sắc tố màu lam tự nhiên quan trọng nhất được sử dụng trong thực phẩm và công nghệ sinh học do màu sắc, khả năng phát huỳnh quang và đặc tính chống oxy hóa của chúng.

Hiện nay, có một số phương pháp tách chiết (chưa tinh sạch) phycocyanin như: tách chiết bằng axit vô cơ hay axit hữu cơ (Sarada *et al.*, 1999; Bermejo *et al.*, 2006), phương pháp sốc nhiệt (đóng băng và tan băng) (Bermejo *et al.*, 2006), xử lý bằng enzyme (Bermejo *et al.*, 2006; Stewart and Farmer, 1984), tách chiết bằng phương pháp dùng n-hexan trong áp suất cao (Seo *et al.*, 2013). Phương pháp tách chiết bằng axit có nhược điểm là có thể dẫn đến thủy phân một phần phycocyanin và dịch chiết phycocyanin thu được bị nhiễm nhiều chlorophyll do sự tan rã tế bào và còn có lẫn các bào quan khác (Sarada *et al.*, 1999). Phương pháp xử lý bằng enzyme và phương pháp dùng n-hexan trong áp suất cao không thích hợp với quy mô lớn vì giá thành tương đối cao. Trong khi đó, phương pháp sốc nhiệt được xem là hiệu quả nhất vì hàm lượng phycocyanin thu được là cao nhất. Phương pháp này có một số ưu điểm lớn như đơn giản, dễ thực hiện, không phụ thuộc vào khối lượng sinh khối ban đầu và không làm ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm phycocyanin, cũng như không đòi hỏi trang thiết bị nhiều và giảm thời gian phá màng tế bào để thu phycocyanin.

Hầu hết việc sản xuất phycocyanin từ sinh khối vi khuẩn lam *Spirulina platensis* trên thế giới, trong đó có Việt Nam đều sử dụng quy trình phức tạp, trải qua bước sắc ký đất liền, chiết phycocyanin từ sinh khối tảo tươi hoặc khô không bị tạp nhiễm, đạt tiêu chuẩn làm thực phẩm chức năng (Đặng Xuyên Như *et al.*, 1994 ;

Kamble *et al.*, 2013). Quy trình của Đặng Xuyên Như và các đồng tác giả bao gồm các bước: (i) sinh khối tảo khô được làm trương nước, sau đó đóng băng, dùng máy nén tế bào để phá vỡ tế bào và làm tan băng, ly tâm thu dịch chứa phycocyanin, (ii) bổ sung $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hòa 30% để loại cặn, (iii) kết tủa phycocyanin bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hòa 60%, (iv) thẩm tích, (v) sắc ký trên cột Sepadex G-50, và (vi) đông khô. Quy trình này khá phức tạp, tốn kém, cần nhân viên có kỹ thuật cao mà tỉ lệ phycocyanin thu được thấp (khoảng 8% sinh khối khô). Quy trình của Kamble và đồng tác giả (2013) bao gồm các bước: (i) sinh khối tảo khô ngâm trong nước lạnh 24 giờ, sau đó được chiếu xạ ở 40 kHz, ly tâm thu dịch, (ii) tinh sạch bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hòa 25%, (iii) tinh sạch bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hòa 50%, (iv) thẩm tích, (v) sắc ký trên cột Sepadex G-50. Quy trình này cũng có nhược điểm tương tự, độ tinh sạch A620/A280 chỉ đạt $2,317 \pm 0,08$ là thấp so với một số hãng thương mại như Sigma ($\text{A620nm}/\text{A280nm} \geq 3,5$), Proenzyme ($\text{A620nm}/\text{A280nm} \geq 4,0$).

Do đó, vẫn có nhu cầu tìm kiếm một quy trình sản xuất phycocyanin từ sinh khối tươi vi khuẩn lam *Spirulina platensis* khá nhằm khắc phục được các nhược điểm nêu trên.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất phycocyanin từ sinh khối tươi vi khuẩn lam *Spirulina platensis*. Đây là quy trình đơn giản, có hiệu quả tách chiết cao, dễ thực hiện, có thể thực hiện được trên quy mô lớn, không ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm phycocyanin và giảm giá thành sản phẩm.

Quy trình sản xuất phycocyanin từ sinh khối tươi vi khuẩn lam *Spirulina platensis* bao gồm các bước: (i) tách chiết phycocyanin thô từ sinh khối tươi vi khuẩn lam *Spirulina platensis*; (ii) tinh sạch phycocyanin thô bằng chitosan và cacbon hoạt tính, (iii) tinh sạch phycocyanin bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (iv) thẩm tích, và (v) sấy đông khô.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sinh khối tươi vi khuẩn lam *Spirulina platensis* được sử dụng trong giải pháp hữu ích này do phòng Công nghệ tảo - Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

Quy trình sản xuất phycocyanin từ sinh khối tươi vi khuẩn lam *Spirulina platensis* bao gồm các bước sau:

(i) Tách chiết phycocyanin thô từ sinh khối tươi vi khuẩn lam *Spirulina platensis*

Phycocyanin là sắc tố phụ của vi khuẩn lam *S. platensis*. Để chiết được phycocyanin cần phá vỡ màng tế bào bằng phương pháp sốc nhiệt (Zhang and Chen, 1999; Soni *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2007). Phycocyanin thô được tách chiết từ sinh khối tươi vi khuẩn lam *S. platensis* với đệm phosphat kali 0,01 M, pH = 7,0 theo tỉ lệ 2: 1 (khối lượng: thể tích) (trong đó, đệm phosphat kali có chứa 0,107 % K_2HPO_4 và 0,052 % KH_2PO_4). Màng tế bào tảo được phá vỡ bằng phương pháp sốc nhiệt (thay đổi đột ngột nhiệt độ của dung dịch) bằng cách cho dung dịch đông lạnh hoàn toàn ở nhiệt độ $-20^{\circ}C$ trong thời gian 8-10 giờ, sau đó làm tan băng hoàn toàn ở nhiệt độ phòng trong thời gian 3-4 giờ, quá trình đông lạnh - tan băng được lặp lại 3 lần liên tiếp. Kết quả thu được dịch huyền phù gồm các mảnh vỡ tế bào và các thành phần cấu trúc của chúng. Ly tâm hỗn hợp ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 25 phút ở $4^{\circ}C$ để thu dịch nổi có chứa phycocyanin, hỗn hợp các protein tan trong nước và một số sắc tố khác. Phần bã sinh khối tiếp tục được tách chiết với đệm phosphat kali 0,01 M, pH = 7,0 theo tỉ lệ 2 : 1 (khối lượng: thể tích). Quá trình đông lạnh - tan băng nêu trên được lặp lại tiếp thêm 2 lần nữa, sau đó ly tâm hỗn hợp như lần đầu để thu phần dịch nổi lần thứ hai. Thực nghiệm cho thấy quá trình đông lạnh - tan băng được lặp lại 5 lần liên tiếp đã tách chiết gần như hết phycocyanin từ sinh khối vi khuẩn lam *S. platensis* (được thể hiện bằng dịch nổi đến lần thứ ba thì không còn thu được dịch màu lam là màu đặc trưng của sắc tố phycocyanin nữa). Toàn bộ phần dịch nổi thu được sau 2 lần ly tâm ở $4^{\circ}C$ được trộn lẫn với nhau để thu được hỗn dịch phycocyanin còn có chứa hỗn hợp protein tan trong nước và một số sắc tố khác, hỗn dịch này được cho vào ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 25 phút, ở $4^{\circ}C$, lặp lại 2-3 lần để loại bỏ hoàn toàn cặn.

(ii) Tinh sạch phycocyanin thô bằng chitosan và cacbon hoạt tính

Phần dịch nổi chứa phycocyanin thô nêu trên được tinh sạch bằng chitosan và cacbon hoạt tính. Lượng chitosan và cacbon hoạt tính được bổ sung vào phần dịch nổi sao cho nồng độ chitosan cuối cùng là 0,001 % (khối lượng : thể tích) (tương đương 0,01 g/L) và nồng độ cacbon hoạt tính cuối cùng là 1% (khối lượng : thể tích) (tương đương 1 g/100 mL). Sau khi bổ sung chitosan, khuấy đều hỗn hợp bằng khuấy tử trong vòng 2 phút. Tiếp theo bổ sung cacbon hoạt tính và dung dịch được làm đồng đều

bằng khuấy từ trong 15 phút. Sau đó, tiến hành ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút thu được phần dịch nổi. Tiếp theo, tiến hành tiếp tục ly tâm lặp lại 2 lần nữa để loại bỏ hết cặn. Đo thể tích phần dịch nổi thu được sau ly tâm.

(iii) Tinh sạch phycocyanin bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Sau khi thu được phần dịch nổi chứa phycocyanin đã tinh sạch bằng chitosan và cacbon hoạt tính, phycocyanin trong phần dịch này được kết tủa bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nồng độ 50% bão hòa ở nhiệt độ 4°C (trong đó: khối lượng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hòa 50% ở nhiệt độ 4°C là 301,8 g/L). Các thử nghiệm kết tủa phycocyanin trong phần dịch nổi chứa phycocyanin bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ có nồng độ 20, 30, 40, 50, 60 và 70 % bão hòa đã được tiến hành và xác định hàm lượng phycocyanin tương ứng, cho thấy tại nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50% bão hòa thu được hàm lượng phycocyanin cao nhất.

Quá trình bổ sung $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ vào dung dịch chứa phycocyanin thu được ở bước (ii) nêu trên để tạo ra kết tủa phycocyanin được tiến hành từ từ trên máy khuấy từ, ở nhiệt độ 4°C . Sau khi cho hết lượng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, tiếp tục khuấy từ trong thời gian 15 phút để cho $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tan hoàn toàn, rồi ủ qua đêm ở 4°C để cho quá trình tủa xảy ra hoàn toàn. Sau đó, tiến hành ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/ phút trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C , thu kết tủa. Phần kết tủa được hòa tan trong đệm phosphat kali 0,01 M, pH = 7 sao cho lượng thể tích thu được sau khi hòa tan bằng lượng thể tích thu được sau khi tinh sạch bằng chitosan và cacbon hoạt tính.

(iv) Thẩm tích

Dung dịch phycocyanin thu được ở bước (iii) nêu trên được tiến hành thẩm tích để loại các muối có khối lượng phân tử thấp có trong dung dịch phycocyanin thu được. Quá trình thẩm tích được tiến hành như sau: kẹp chặt 1 đầu túi thẩm tích (túi thẩm tích có kích thước lỗ cho các phân tử kích thước nhỏ hơn 30 kDa đi qua), đổ V mL dịch chứa phycocyanin vào túi (chú ý dung dịch phycocyanin không được chiếm quá 2/3 thể tích túi), kẹp chặt nốt đầu túi còn lại. Tiến hành thẩm tích 3 lần liên tiếp như sau:

+ Lần 1: thẩm tích với $50 \times V$ đệm phosphat kali 0,01 M, pH = 7,0 ở nhiệt độ 4°C , trong thời gian 2 giờ

+ Lần 2: thẩm tích với $50 \times V$ nước cất ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 2 giờ.

+ Lần 3: thẩm tích với $50 \times V$ nước cất ở nhiệt độ 4°C qua đêm.

Trong đó V là thể tích dung dịch phycocyanin được đổ vào túi thẩm tích.

Sau 3 lần thẩm tích liên tiếp nêu trên, dung dịch chứa phycocyanin khá tinh khiết thu được (A_{620nm}/A_{280nm} đạt giá trị $3,53 \pm 0,43$). Dung dịch này sau đó được đem đông khô để thu được bột phycocyanin.

(v) Sấy đông khô

Dung dịch thu được sau khi thẩm tích được đem đông khô bằng cách trước tiên cho dung dịch đông đặc lại ở nhiệt độ -80°C trước khi cho vào máy đông khô (loại máy hay sử dụng là Virtis Sentry 5L, Mỹ) nhằm loại nước hoàn toàn để thu được bột phycocyanin. Thời gian đông khô 44 giờ, ở nhiệt độ -45°C đến -40°C , áp suất chân không từ 0,01 đến 0,1 Pa. Sau đông khô, bột phycocyanin được bảo quản ở nhiệt độ 4°C .

Phương pháp xác định các thông số của quy trình

1. Xác định hàm lượng phycocyanin tinh khiết trong từng bước sản xuất

- Khối lượng phycocyanin trong sinh khối vi khuẩn lam tươi được tính bằng công thức sau (Dương Trọng Hiền, 2000):

$$m = \frac{OD_{620} \times V_0}{7 \times m_1} \quad (\text{mg/g sinh khối tươi})$$

Trong đó: V_0 : thể tích dung dịch phycocyanin cần xác định hàm lượng phycocyanin

7: Hệ số tắt của phycocyanin

m_1 : khối lượng vi khuẩn lam tươi (g)

$OD_{620\text{ nm}}$: là mật độ quang hấp thụ tại bước sóng 620 nm của dung dịch

phycocyanin cần xác định hàm lượng.

- Từ m_1 (g) sinh khối vi khuẩn lam tươi, tính ra được sinh khối vi khuẩn lam khô là $m_2 = 1/6 m_1$, từ đó tính được hàm lượng phycocyanin trong sinh khối vi khuẩn lam khô là:

$$m_k = 6 m \quad (\text{mg/g sinh khối khô})$$

Trong đó m : hàm lượng phycocyanin trong 1 g sinh khối vi khuẩn lam tươi

m_k : hàm lượng phycocyanin trong 1 g sinh khối vi khuẩn lam khô

2. Xác định hàm lượng phycocyanin sau quy trình sản xuất so với sinh khối ban đầu

Hàm lượng phycocyanin sau quy trình sản xuất so với sinh khối ban đầu được tính theo công thức

$$M(\%) = \frac{m}{m_0} \times 100$$

Trong đó: M (%): Hàm lượng phycocyanin trong 1 g sinh khối khô

m_0 (g): khối lượng sinh khối khô tương ứng với lượng sinh khối tươi ban đầu sử dụng để tách chiết

m (g): Khối lượng phycocyanin sau quá trình tinh sạch, kết tủa, thẩm tích và sấy đông khô.

Với công thức tính như trên, hàm lượng phycocyanin thu được sau khi áp dụng quy trình sản xuất phycocyanin theo giải pháp hữu ích là khoảng 10,4% đến 15,0% sinh khối khô.

3. Xác định độ tinh sạch của phycocyanin trong mỗi bước của quy trình sản xuất

Sau khi kết thúc mỗi bước của quy sản xuất, độ tinh sạch của phycocyanin được đánh giá bằng cách tính tỉ số A620/A280 (Kamble *et al.*, 2013)

Trong đó A620 là giá trị mật độ quang hấp thụ tại bước sóng 620 nm của phycocyanin

A280 là giá trị mật độ quang hấp thụ tại bước sóng 280 nm của protein lẫn trong sản phẩm.

Với cách tính như trên, độ tinh sạch của sản phẩm bột đông khô phycocyanin thu được sau quy trình theo giải pháp hữu ích đạt giá trị $3,53 \pm 0,43$.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Quy trình sản xuất phycocyanin từ sinh khối tươi vi khuẩn lam *Spirulina platensis*

i) Tách chiết phycocyanin thô từ sinh khối tươi vi khuẩn lam *Spirulina platensis*

Cân 200 gam sinh khối tươi vi khuẩn lam *S. platensis* cho vào bình tam giác và bổ sung thêm 100 mL đệm phosphat kali 0,01 M, pH= 7,0 (trong đó, đệm phosphat kali có chứa 0,107 % K_2HPO_4 và 0,052 % KH_2PO_4) vào bình đựng tảo tươi, lắc đều, dung dịch đông lạnh hoàn toàn trong tủ lạnh ở nhiệt độ -20°C trong thời gian 8-10 giờ,

sau đó làm tan băng hoàn toàn ở nhiệt độ phòng trong thời gian 3-4 giờ. Lặp lại quá trình đông lạnh - tan băng 3 lần. Cho mẫu vào ống ly tâm to, ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 25 phút, ở nhiệt độ 4 °C, thu lấy phần dịch nổi.

Hòa tan bã sinh khối với 100 mL đệm phosphat kali 0,01 M, pH = 7,0, tráng sạch bình chứa tảo và ống ly tâm, lắc đều sau đó tiếp tục thực hiện quá trình làm đông lạnh - tan băng 2 lần. Ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 25 phút, ở nhiệt độ 4 °C, thu lấy phần dịch nổi. Sử dụng 40 mL dịch đệm để tráng bình.

Trộn các phần dịch nổi thu được ở hai bước trên với nhau, cho vào ly tâm 3000 vòng/phút trong 25 phút, ở nhiệt độ 4 °C để loại bỏ cặn, bước này lặp lại 2 - 3 lần để loại bỏ hoàn toàn cặn. Thu dịch đưa thể tích lên $V_0 = 240$ mL (bằng đệm phosphat kali 0,01M, pH = 7,0). Pha loãng mẫu 80 lần, đo OD và xác định được hàm lượng phycocyanin thô thu được là 76,96 mg/g sinh khối khô.

ii) Tinh sạch phycocyanin thô bằng chitosan và cacbon hoạt tính

240 mL phần dịch nổi chứa phycocyanin thô thu được ở bước i) được bổ sung 0,0024 g chitosan để nồng độ chitosan cuối cùng là 0,01 g/L (0,001 %, khối lượng : thể tích)), khuấy đều dung dịch bằng khuấy từ trong 2 phút. Sau đó, tiếp tục bổ sung 2,4 g cacbon hoạt tính vào để nồng độ cuối cùng là 1g/ 100 mL (1%, khối lượng : thể tích); trộn đều hỗn hợp bằng khuấy từ trong 15 phút. Ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút, thu dịch nổi, ly tâm lặp lại 2 lần để loại bỏ hết cặn. Đo thể tích phần dịch nổi chứa phycocyanin thu được sau ly tâm là $V_1 = 220$ mL. Pha loãng mẫu 80 lần, đo OD 620nm và xác định được khối lượng phycocyanin thu được là 68,2 mg/g sinh khối khô.

iii) Tinh sạch phycocyanin bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Bổ sung 66,4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dạng bột vào 220 mL phần dịch nổi chứa phycocyanin thu được trong bước ii) để đạt nồng độ 50 % bão hòa, ở nhiệt độ 4 °C.

Đặt bình chứa 220 mL phần dịch nổi chứa phycocyanin thu được trong bước ii) lên máy khuấy từ được đặt trên khay đá (nhiệt độ 4 °C), khuấy ở tốc độ trung bình. Cho từ từ từng ít một $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dạng bột vào phần dịch đang khuấy này (dùng ngón tay gõ vào thìa để $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ rơi xuống từng ít một, không được cho nhiều một lúc vì nó ảnh hưởng đến sự kết tủa của protein). Sau khi cho hết lượng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, tiếp tục

khuấy từ 15 phút rồi ủ qua đêm ở nhiệt độ 4 °C để cho quá trình rửa xảy ra hoàn toàn. Ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/ phút trong 30 phút ở nhiệt độ 4 °C, thu kết tủa. Phần kết tủa được hòa vào đệm phosphat kali 0,01 M, pH 7 vừa đủ $V_1 = 220$ mL. Pha loãng mẫu 80 lần, đo OD620nm và xác định được hàm lượng phycocyanin thu được là 62,41 mg/g sinh khối khô.

iv) Thẩm tích

Dung dịch phycocyanin thu được ở bước (iii) nêu trên được tiến hành thẩm tích để loại các muối. Chia thể tích dung dịch $V_1 = 220$ mL ra thành các thể tích 50 mL cho mỗi lần thẩm tích. Tính chiều dài túi cần thiết với lượng dịch sao cho dịch chiếm không quá 2/3 thể tích túi. Kẹp chặt 1 đầu túi thẩm tích, đổ 50 mL dung dịch phycocyanin vào, kẹp chặt nốt đầu túi còn lại. Tiến hành thẩm tích 3 lần:

+ Lần 1: thẩm tích với 50×50 ml = 2500 mL đệm phosphat kali 0,01 M, pH = 7,0 ở 4 °C, trong 2 giờ.

+ Lần 2: thẩm tích với 50×50 mL = 2500 mL nước cất ở 4 °C, trong 2 giờ.

+ Lần 3: thẩm tích với 50×50 mL = 2500 mL nước cất ở 4 °C, qua đêm.

Chú ý: Trong quá trình thẩm tích cần khuấy từ nhẹ để tốc độ thẩm tích nhanh hơn, không được khuấy từ nhanh quá để tránh làm vỡ túi thẩm tích.

Sau khi thẩm tích xong, lấy phần dịch ra khỏi túi, đo lại thể tích phần dịch sau khi thẩm tích $V_2 = 220$ mL. Pha loãng mẫu 80 lần, đo OD620nm và xác định được hàm lượng phycocyanin thu được là 61,61 mg/g sinh khối khô, tương ứng 80 % so với dịch nổi thô.

v) Sấy đông khô

Dịch thu được sau khi thẩm tích, cho đông khô ở nhiệt độ -80 °C trước khi đưa vào máy đông khô (loại Virtis Sentry 5L, Mỹ). Quá trình đông khô thực hiện ở nhiệt độ -45 °C đến -40 °C, áp suất chân không từ 0,01 đến 0,1 Pa, trong khoảng 44 giờ. Kết quả thu được bột đông khô phycocyanin. Khối lượng bột đông khô phycocyanin thu được chiếm 10,4 % - 10,5 % sinh khối khô. Bảo quản bột đông khô phycocyanin ở 4 °C.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất phycocyanin theo giải pháp hữu ích tận dụng được tối đa sinh khối tảo lam tạp nhiễm (không đạt tiêu chuẩn làm thực phẩm chức năng). Quy trình có hiệu suất thu hồi phycocyanin cao - khoảng 10,4 % đến 15,0 % sinh khối khô. Kết quả này cao hơn nhiều so với kết quả công bố của Đặng Xuyên Như và đồng tác giả (1994) (chỉ đạt 8% sinh khối khô), cao hơn so với kết quả công bố của Seo và đồng tác giả (2013) (hàm lượng sau tách chiết đạt 10,2% sinh khối khô). Sản phẩm phycocyanin thu được có giá thành giảm nhờ quy trình sản xuất đơn giản, không sử dụng các dung môi, hóa chất độc hại và đắt tiền. Sản phẩm có độ tinh sạch cao (A_{620nm}/A_{280nm} đạt giá trị $3,53 \pm 0,43$) có thể được sử dụng trong dược phẩm, thực phẩm chức năng và trong các nghiên cứu y sinh học khác.

Tài liệu tham khảo

- Antelo FS, Costa JAV, Kalil SJ (2008). Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochem Eng J.* 41: 43 – 47.
- Belay A, Ota Y, Miyakawa K, Shimamatsu H (1993). Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *J. Appl. Phycol.* 5: 235 – 241.
- Bermejo R, Felipe M A, Talavera E M and Alvarez-Pez JM (2006). Expanded Bed Adsorption Chromatography for Recovery of Phycocyanins from the Microalga *Spirulina platensis*. *Chromatographia.* 63 (1-2): 59 - 66.
- Bobbili VV, Mubarak PA, Kumari AAL, Reddana P, Khar A (2003). Phycocyanin-mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves down-regulation of Bcl-2 and generation of ROS. *Mol. Cancer Therap.* 2: 1165 – 1170.
- Eriksen N (2008). Production of phycocyanin – a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl Microbiol Biotechnol.* 80: 1 – 14.
- Gantar M, Svircev Z (2008). Microalgae and cyanobacteria: food for thought. *J. Phycol.* 44: 260 – 268.
- Glazer AN, Bryant DA (1975). Allo-phycocyanin B (kmax 671, 618 nm): a new cyanobacterial phycobiliprotein. *Arch Microbiol.* 104: 15 – 22.
- Gonzales R, Rodriguez, Romay C, Ancheta O, Gonzales A, Armesto J, Ramirez D, Merino N (1999). Antiinflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats. *Pharmacol. Res.* 39: 55 – 59.
- Dương Trọng Hiền (2000) Nghiên cứu một số chỉ tiêu sinh lý, hóa sinh của tảo *Spirulina platensis* dưới tác động của NaCl. Luận án tiến sĩ sinh học.
- Ku CS, Yang Y, Park Y, and Lee J (2013) Health benefits of blue-green algae: prevention of cardiovascular disease and nonalcoholic fatty liver disease. *J Med Food* 16(2): 103–111.
- Kumar D, Dhar DW, Pabbi S, Kumar N, Walia S (2014) Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (CCC540). *Indian J Plant Physi* 19(2): 184 –188.
- Miranda M, Cintra R, Banos S, Mamcini-Filho J (1998). Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Braz J Med Biol Res.* 31: 1075 – 1079.
- Nagaoka S, Shimizu K, Kaneko H, Shibayama F, Morikawa K, Kanamaru Y, Otsuka A, Hirahashi T, Kato T (2005). A novel protein C-phycocyanin plays a crucial

role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats. *J. Nutr.* 135: 2425 – 2430.

Nemoto-Kawamura C, Hirahashi T, Nagai T, Yamada H, Katoh T, Hayashi O (2004). Phycocyanin enhances secretory IgA antibody response and suppresses allergic IgE antibody response in mice immunized with antigen-entrapped biodegradable microparticles. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 50: 129–136.

Đặng Xuyên Như, Nguyễn Văn Anh, Phạm Anh Cường, Trần Văn Hanh, Lê Thế Trung, Nguyễn Bằng Quyền và các cộng sự (1994) Phycocyanin: tách chiết từ tảo lam *Spirulina platensis* và ứng dụng của nó. *Tạp chí Sinh học* 16(3): 58-64.

Reddy MC, Subhashini J, Mahipal SVK, Bhat VP, Reddy PS, Kiranmai G, Madyastha KM, Reddanna P (2003). C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304: 385 – 392.

Remirez D, Ledon N, Gonzales R (2002). Role of histamine in the inhibitory effects of phycocyanin in experimental models of allergic inflammatory response. *Mediators Inflamm.* 11: 81 – 85.

Romay C, Armesto J, Remirez D, Gonzalez R, Ledon N, Garcis I (1998). Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. *Inflamm. Res.* 47: 36 – 41.

Sarada R, Pillai MG and Ravishankar GA (1999). Phycocyanin from *Spirulina* sp.: Influence of Processing of Biomass on Phycocyanin Yield, Analysis of Efficacy of Extraction Methods and Stability Studies on Phycocyanin. *Process Biochemistry*. 34 (8): 795 - 801.

Sasson A (1991). Culture of Micro-algae: Achievements and production of *Spirulina* biomass: The maintenance of pure culture under outdoor conditions. *Biotech and Bioeng.* 25 (2): 341 – 351.

Seo YC, Choi SW, Park JH, Park JO, Jung KH and Lee HY (2013) Stable Isolation of Phycocyanin from *Spirulina platensis* Associated with High-Pressure Extraction Process. *Int J Mol Sci* 14: 1778-1787.

Silveira ST, Burket JFM, Costa JAV, Burket CAV, Kalil SJ (2007) Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Biores Technol.* 98: 1629–1634.

Soni B, Trivedi U and Madamwar D (2008). A Novel Method of Single Step Hydrophobic Interaction Chromatography for the Purification of Phycocyanin from *Phormidium fragile* and its Characterization for Antioxidant Property. *Bioresour Technol.* 99 (1): 188 - 194.

Kamble SP, Gaikar RB, Padalia RB and Shinde KD (2013). Extraction and purification of C-phycocyanin from dry *Spirulina* powder and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity. *J Appl Pharm Sci.* 3 (08): 149-153

Stewart DE and Farmer FH (1984). Extraction, Identification and Quantitation of Phycobiliproteins Pigments from Phototrophic Plankton. *Limnol Oceanogr.* 29 (2): 392 - 397.

Zhang YM, Chen F (1999) A simple method for efficient separation and purification of c-phycocyanin and allophycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biotechnol Tech* 13:601–603.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất phycocyanin từ sinh khối tươi vi khuẩn lam *Spirulina platensis* bao gồm các bước:

(i) Tách chiết phycocyanin thô từ sinh khối tươi vi khuẩn lam *Spirulina platensis*

tách chiết phycocyanin thô bằng phương pháp sốc nhiệt bằng cách bổ sung vào sinh khối tảo đệm phosphat kali 0,01 M, pH= 7,0 theo tỉ lệ 2: 1 (khối lượng: thể tích), dung dịch được đông lạnh ở - 20 °C trong thời gian 8-10 giờ, sau đó làm tan băng hoàn toàn ở nhiệt độ phòng trong thời gian 3-4 giờ, quá trình đông lạnh – tan băng được lặp lại 3 lần liên tiếp, sau đó ly tâm thu phần dịch nổi chứa phycocyanin; phần sinh khối thu được được bổ sung đệm phosphat kali 0,01 M, pH = 7,0 theo tỉ lệ 2: 1 (khối lượng: thể tích), làm đông lạnh - tan băng 2 lần, sau đó ly tâm hỗn hợp để thu được phần dịch nổi thứ hai; trộn các phần dịch nổi sau hai lần ly tâm, tiến hành ly tâm lại ở tốc độ 3000 vòng/ phút để loại bỏ hoàn toàn cặn;

(ii) Tinh sạch phycocyanin thô bằng chitosan và cacbon hoạt tính

phần dịch nổi chứa phycocyanin thô thu được ở bước (i) được bổ sung chitosan sao cho nồng độ chitosan cuối cùng là 0,001% (khối lượng: thể tích), sau đó bổ sung cacbon hoạt tính với nồng độ cuối cùng là 1% (khối lượng: thể tích), trộn đều hỗn hợp bằng khuấy từ 15 phút, tiến hành ly tâm 3 lần ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút để loại hết cặn thu được phần dịch nổi chứa phycocyanin;

(iii) Tinh sạch phycocyanin bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

bổ sung $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dạng bột vào phần dịch nổi chứa phycocyanin thu được ở bước (ii) để đạt được nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50 % bão hòa trong điều kiện có khuấy ở nhiệt độ 4 °C, tiếp tục khuấy từ trong 15 phút, rồi ủ qua đêm ở nhiệt độ 4 °C, ly tâm thu được phần kết tủa, sau đó hòa phần kết tủa này với đệm phosphat kali;

(iv) Thẩm tích

dung dịch chứa phycocyanin sau khi đã được tinh sạch ở bước (iii) được tiến hành thẩm tích loại muối 3 lần liên tiếp bao gồm:

+ lần 1: thẩm tích với 50 x V đệm phosphat 0,01 M, pH = 7,0 ở 4 °C, trong thời gian 2 giờ,

+ lần 2: thẩm tích với 50 x V nước cất ở 4 °C trong thời gian 2 giờ,

+ lần 3: thẩm tích với $50 \times V$ nước cất ở $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ qua đêm,

Trong đó V là mL dung dịch phycocyanin đã đổ vào túi thẩm tích; và

(v) Sấy đông khô

sấy đông khô phần dịch sau thẩm tích để thu được bột phycocyanin bằng máy đông khô trong khoảng 44 giờ, ở nhiệt độ $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, áp suất chân không từ 0,01 đến 0,1 Pa, sau đó bảo quản bột đông khô phycocyanin thu được ở nhiệt độ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.