

# TÁCH CHIẾT PHYCOCYANIN TỪ *Spirulina platensis* BẰNG ENZYME LYOZYME VÀ THỰC HIỆN BỔ SUNG PHYCOCYANIN VÀO KẸO DẸO

Huỳnh Phan Phương Trang\*, Đỗ Thị Hiền

Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

\*Email: tranghpp@huit.edu.vn

Ngày nhận bài: 26/6/2023; Ngày chấp nhận đăng: 23/8/2023

## TÓM TẮT

Ngày nay, thực phẩm có chứa các chất chống oxy hóa tự nhiên được người tiêu dùng quan tâm vì có nhiều lợi ích về sức khỏe. Bổ sung chất chống oxy hóa vào thực phẩm làm tăng giá trị và đa dạng hóa thực phẩm là một hướng nghiên cứu phù hợp nhu cầu thị trường. Phycocyanin từ *Spirulina platensis* là chất tạo màu đẹp thay thế chất màu nhân tạo độc tính cao gây ung thư trong thực phẩm. Nghiên cứu này đã khảo sát quá trình tách chiết phycocyanin từ *Spirulina platensis* bằng enzyme lysozyme, vi gói phycocyanin bằng phương pháp sấy phun và bổ sung bột phycocyanin vào kẹo dẻo. Kết quả cho thấy thông số thích hợp để tách chiết phycocyanin: nồng độ enzyme 0,011 mg/mL, thời gian ủ 3 giờ, tỷ lệ sinh khối tảo: enzyme (1:3 w/v), vật liệu tường thích hợp cho quá trình sấy phun phycocyanin là hỗn hợp maltodextrin: gum arabic (1:1), kẹo dẻo có bổ sung phycocyanin đạt hàm lượng phycocyanin là 1,002 mg/g kẹo và kẹo được đánh giá cảm quan tốt theo TCVN 3215-79.

*Từ khóa:* Phycocyanin, enzyme lysozyme, *Spirulina platensis*, tách chiết, kẹo dẻo.

## 1. MỞ ĐẦU

*Spirulina platensis* là một loại vi khuẩn lam - tảo lam, đa bào, hình sợi [1]. Tảo này thường gặp trong môi trường nước. Sinh khối tảo chứa 60% protein với đầy đủ các amino acid thiết yếu, giàu các vitamin nhất là vitamin nhóm B, chứa các chất khoáng như Fe, Mg, Zn, Ca, các chất chống oxy hóa, acid béo thiết yếu như gamma linolenic acid. Tại Việt Nam, tảo này được nuôi trồng đầu tiên ở vùng suối khoáng Vĩnh Hảo (Bình Thuận) và sau đó phát triển ra các nơi khác. Hiện nay *Spirulina* được bổ sung vào thực phẩm như yoghurt, nước uống, bột dinh dưỡng, thuốc dạng viên nén, mỹ phẩm như mặt nạ [2]. Phycocyanin là một trong các thành phần protein chính được tìm thấy trong *Spirulina platensis* với nhiều tác dụng có lợi cho sức khỏe như chống ung thư, chống oxy hóa, kháng virus và chống viêm. Ngoài ra, phycocyanin còn được sử dụng làm chất tạo màu, chất chống oxy hóa tự nhiên tốt, an toàn cho thực phẩm [3]. Để tách chiết phycocyanin cần phải phá vỡ tế bào tảo. Các phương pháp được sử dụng để phá vỡ tế bào tảo như enzyme, siêu âm, đồng hóa cơ học, làm lạnh và rã đông. Phương pháp sử dụng enzyme thường cho phycocyanin thu nhận có hệ số tinh sạch cao hơn. Enzyme lysozyme có khả năng ly giải liên kết glycoside của các hợp chất N-acetylmuramic acid và N-acetyl-D-glucosamine cấu tạo nên vách tế bào *Spirulina platensis* [4]. Tuy nhiên, ứng dụng của phycocyanin trong thực phẩm còn hạn chế do khả năng ổn định kém, nhạy cảm với ánh sáng, pH thấp, nhiệt độ cao. Do đó đã có một số nghiên cứu thực hiện công nghệ vi bao để bảo vệ hoạt tính sinh học của phycocyanin trước tác động môi trường. Có nhiều phương pháp vi bao các chất có hoạt tính sinh học như sấy phun, sấy thăng hoa, sấy tầng sôi, ép đùn, ngưng tụ. Tuy nhiên phương pháp sấy phun thích hợp hơn do chi phí thấp, hiệu quả và sản phẩm sau sấy phun ở dạng bột với độ ẩm thấp giúp tăng thời gian bảo quản cũng như thuận tiện cho việc bổ sung vào thực phẩm. Phycocyanin được vi gói bằng phương pháp sấy phun với các vật liệu khác nhau như: hỗn hợp maltodextrin matodextrin và carrageenan [5], alginate calcium [6], chitosan [7]. Việc bổ sung phycocyanin vào thực phẩm cũng bắt đầu được quan tâm trong những năm gần đây, Gouraji và cộng sự (2018) đã bổ sung phycocyanin vào sữa chua làm tăng giá trị cảm quan sản phẩm và làm giảm sự có mặt của các vi khuẩn có hại trong sữa chua như *Salmonella* sp., *Coliform* sp., *Escherichia coli* [8]. Kẹo dẻo thường được tạo nên từ đường, nước, gelatin, hương liệu, syrup ngô, chất tạo màu, đôi khi được bổ sung thêm nước ép trái cây và acid citric. Thông thường các nhà sản xuất ru

tiền sử sụng chất tạo màu nhân tạo vì có độ bền màu cao, màu sắc rực rỡ hơn các chất tạo màu tự nhiên. Tuy nhiên việc đánh giá sự an toàn của các chất tạo màu nhân tạo là rất khó khăn.

Nhận thấy hướng nghiên cứu tách chiết và bổ sung phycocyanin từ *Spirulina platensis* tạo màu an toàn cho thực phẩm làm tăng giá trị cảm quan, cũng như tạo tính chống oxy hóa góp phần đa dạng hóa dòng sản phẩm thực phẩm tốt cho sức khỏe là một hướng nghiên cứu mới, do đó đề tài “Tách chiết phycocyanin từ *Spirulina platensis* bằng enzyme lysozyme và thực hiện bổ sung phycocyanin vào kẹo dẻo” đã được tiến hành.

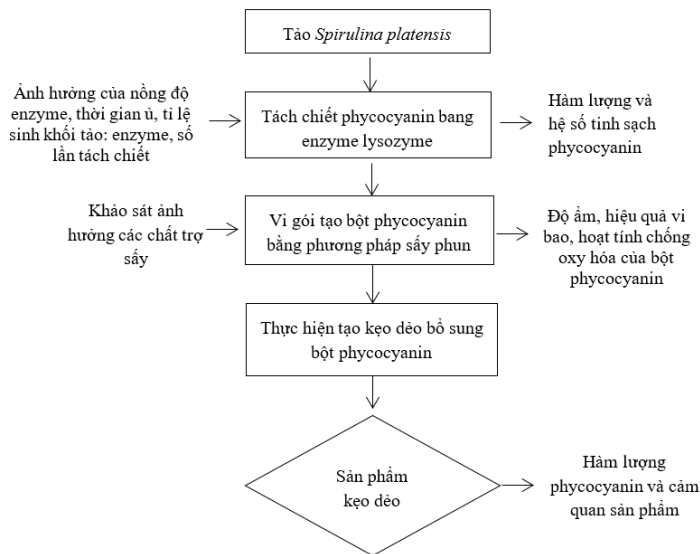
## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Tảo giống *Spirulina platensis* được cung cấp từ Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản II (116 Nguyễn Đình Chiểu, phường Đa Kao, quận 1, TPHCM). Tảo được nhân giống và nuôi trong môi trường thích hợp từ 7-15 ngày, sinh khối tảo được lọc qua màng lọc có kích thước lỗ 30  $\mu\text{m}$ , rửa sinh khối tảo bằng nước cất đến khi đạt pH 7,0. Sinh khối tảo tươi có độ ẩm 78% (w/w) và được bảo quản ở  $-30^\circ\text{C}$ .

Môi trường nuôi tảo:  $\text{NaHCO}_3$  (8 g/L)  $\text{NaCl}$  (5 g/L)  $\text{KNO}_3$  (2 g/L)  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (0,08 g/L)  $\text{CaCl}_2$  (0,02 g/L) Ure (0,36 g/L)  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (1 g/L)  $\text{MgSO}_4$  (0,16 g/L)  $\text{FeSO}_4$  (0,005 g/L), pH 9,5 [2]. Enzyme lysozyme: hãng Biobasic (Canada), hoạt tính  $\geq 20.000$  U/mg, pH hoạt động từ 6,0-9,0.

### 2.2. Phương pháp



Hình 1. Quy trình thí nghiệm tạo kẹo dẻo bổ sung phycocyanin

#### 2.2.1. Khảo sát quá trình tách chiết phycocyanin bằng enzyme lysozyme

**Khảo sát nồng độ enzyme:** Enzyme lysozyme được pha loãng bằng dung dịch đệm phosphate pH 7,0 thành các nồng độ lần lượt là 0; 0,001; 0,003; 0,005; 0,007; 0,009; 0,011; 0,013; 0,015 mg/mL. Bổ sung sinh khối tảo vào dung dịch enzyme theo tỉ lệ 1: 2 (w/v), vortex trong 3 phút cho hỗn hợp đồng nhất rồi ủ 4 giờ ở  $37^\circ\text{C}$ , sau đó đem ủ ở  $-30^\circ\text{C}$  trong 24 giờ để tăng thêm hiệu quả phá vỡ tế bào tảo, rã đông ở nhiệt độ phòng và tiến hành ly tâm lạnh 11000 vòng/phút trong 10 phút ở  $4^\circ\text{C}$  thu dịch nổi đo quang phổ ở các bước sóng 280, 615 và 652 nm.

**Khảo sát thời gian ủ enzyme:** Sử dụng enzyme có nồng độ thích hợp từ thí nghiệm trên, bổ sung sinh khối tảo vào dung dịch enzyme theo tỷ lệ 1: 2 (w/v) và vortex trong 3 phút, ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong các khoảng thời gian khác nhau 0, 1, 2, 3, 4, 5 giờ, sau đó đem ủ ở  $-30^\circ\text{C}$  trong 24 giờ và thực hiện các thao tác như thí nghiệm trên

*Khảo sát tỷ lệ sinh khối tảo và enzyme:* Sử dụng enzyme có nồng độ thích hợp từ thí nghiệm trên, bổ sung sinh khối tảo vào dung dịch enzyme theo các tỷ lệ lần lượt là 1: 1, 1: 2, 1: 3, 1: 4, 1: 5 (w/v) và vortex trong 3 phút, ủ ở 37 °C trong thời gian thích hợp từ thí nghiệm trên sau đó đem ủ ở -30 °C trong 24 giờ và thực hiện các thao tác như thí nghiệm trên.

*Khảo sát số lần tách chiết:* Tách chiết phycocyanin từ tảo bằng enzyme lysozyme với nồng độ enzyme, thời gian ủ enzyme, tỷ lệ sinh khối tảo và enzyme thích hợp từ các thí nghiệm trên. Tiếp tục sử dụng lại tảo đã tách chiết và bổ sung enzyme rồi lặp lại các thao tác trước cho lần thực hiện thứ 2, 3, 4, 5.

Chỉ tiêu theo dõi của thí nghiệm: hàm lượng và hệ số tinh sạch của phycocyanin thu nhận.

### 2.2.2. Vi gói tạo bột phycocyanin bằng phương pháp sấy phun và thực hiện tạo kẹo dẻo bổ sung bột phycocyanin

*Sấy phun tạo bột phycocyanin:* Khảo sát ảnh hưởng của các vật liệu tường khác nhau đến quá trình vi gói phycocyanin

Phycocyanin được tách chiết theo các thông số thích hợp từ kết quả thí nghiệm trước, lấy 10 mL dịch phycocyanin thêm 40 mL nước cất và bổ sung 10 g vật liệu vi bao lần lượt là gum arabic (Ấn Độ), maltodextrin (DE = 19, Ấn Độ), hỗn hợp maltodextrin: gum arabic (1: 1), đo brix hỗn hợp đạt khoảng 15 °Bx. Tiếp theo, đem hỗn hợp đi đồng hóa bằng máy đồng hóa huyền phù ở 6000 vòng/phút, trong 5 phút. Sau đó sấy phun ở 140 °C, áp suất 1 bar, nhiệt độ đầu ra 73-80 °C, tốc độ nhập liệu 240 mL/h. Sau khi sấy phun, mẫu bột được gửi đi chụp SEM để quan sát hình thái các hạt sau vi gói, đồng thời bột được hút chân không và bảo quản trong điều kiện tránh ánh sáng ở nhiệt độ 4 °C. Chỉ tiêu theo dõi của thí nghiệm là độ ẩm, độ hoà tan, hiệu quả vi bao, hàm lượng phycocyanin và hoạt tính chống oxy hóa của bột phycocyanin thu nhận.

*Thực hiện tạo kẹo dẻo bổ sung bột phycocyanin:* Cân 15 g bột chanh (Naita, Apis) hòa tan vào 30 mL nước, bổ sung thêm 32 g gelatin (Thổ Nhĩ Kỳ) được hỗn hợp 1. Cân 17 g bột phycocyanin và hòa tan trong 20 mL nước. Cân 50 g đường và bổ sung 30 mL nước, thêm 50 mL syrup vải đun nóng ở lửa vừa sau đó cho hỗn hợp 1 vào, khuấy đến khi tan hết gelatin. Khi gelatin đã tan hết, để hỗn hợp nguội đến tầm 40-50 °C rồi cho dịch phycocyanin đã hòa tan vào khuấy đều, đổ hỗn hợp vào khuôn tạo hình rồi để lạnh ở 4 °C. Sản phẩm kẹo được kiểm tra hàm lượng phycocyanin và đánh giá cảm quan bằng phương pháp cho điểm theo TCVN 3215-79.

### 2.2.3. Các phương pháp phân tích

$$\text{Cách xác định hàm lượng phycocyanin [9]: (PC) (mg/mL) = \frac{[A_{615} - 0,474 (A_{652})]}{5,34}$$

Trong đó: PC là hàm lượng phycocyanin (mg/mL).

A615 là độ hấp thụ quang phổ của PC ở bước sóng 615 nm.

A652 là độ phát thải huỳnh quang của PC ở bước sóng 652 nm.

$$\text{Hệ số tinh sạch phycocyanin EP} = \frac{A_{615}}{A_{280}}$$

A280 là độ hấp thụ quang phổ của tổng protein ở bước sóng 280 nm.

$$\text{Xác định hiệu suất bao gói (HSBG) [9]: HSBG(\%) = \frac{TP-SP}{TP} \times 100$$

Trong đó TP là tổng lượng phycocyanin, SP là lượng phycocyanin chưa được vi bao.

Hàm lượng phycocyanin chưa được vi bao (SP) được xác định như sau [9]: cân 1 g bột phycocyanin sau sấy phun ở 140 °C, áp suất 1 bar, nhiệt độ đầu ra 73-80 °C, tốc độ nhập liệu 240 mL/h, thêm vào 40 mL dung dịch etanol và nước (với tỷ lệ ethanol và nước là 1: 1 v/v), vortex trong 1 phút, dung dịch được ly tâm lạnh ở tốc độ 4500 vòng/phút trong 15 phút rồi tiến hành lọc qua giấy lọc 0,45 µm, thu dịch đem đo quang ở bước sóng 615 nm, 652 nm, 280 nm.

Tổng hàm lượng phycocyanin (TP) trong bột sau sấy được xác định như sau [9]: 1,5 g bột được thêm vào 60 mL nước và đem đồng hoá ở 11000 vòng/phút trong 15 phút. Dung dịch được ly tâm lạnh ở tốc độ 4500 vòng/phút trong 15 phút rồi tiến hành lọc qua giấy lọc 0,45 µm, thu dịch đem đi đo quang ở bước sóng 615 nm, 652 nm, 280 nm.

$$\text{Hàm lượng phycocyanin có trong 1 g bột} = \frac{\text{Phycocyanin tổng số} \times \text{Thể tích dung môi (60 mL)}}{\text{Khối lượng bột mang đi xác định TP(1,5 g)}}$$

*Phương pháp bắt gốc tự do DPPH để xác định khả năng chống oxy hóa:* [10] lấy 1 mL dịch phycocyanin với 9 mL methanol 99,9% cho vào ống nghiệm 1, sau đó hút 1mL dịch từ ống nghiệm 1 với 3 mL DPPH định mức lên 10 mL bằng methanol, để yên 30 phút trong tối sau đó đem đi đo OD ở bước sóng 517 nm. Phần trăm (%) khử gốc tự do của mẫu được tính theo công thức:

$$I(\%) = 100 \times \frac{A_0 - A_1}{A_0}$$

Trong đó: I (%): % khử gốc tự do của mẫu ở bước sóng 517 nm; A<sub>0</sub>: Độ hấp thụ của DPPH (mẫu DPPH được pha ở nồng độ 40 µg/mL bằng methanol); A<sub>1</sub>: Độ hấp thụ của mẫu khảo sát; mẫu trắng là dung dịch methanol.

*Phương pháp cảm quan* [11]: Đánh giá cảm quan bằng phương pháp cho điểm theo TCVN 3215-79. Sử dụng thang điểm 20 xây dựng trên một thang thông nhất 6 bậc 5 điểm (từ 0 đến 5). Hội đồng đánh giá cảm quan gồm 7 thành viên (các thành viên được thử một vài loại kẹo dẻo để nhận biết màu sắc, mùi, vị). Sau đó từng thành viên hội đồng tiến hành kiểm tra từng chỉ tiêu riêng theo bảng điểm tiêu chuẩn cùng với sản phẩm kẹo dẻo bổ sung phycocyanin được kiểm tra và dùng số nguyên để cho điểm từ 0 đến 5. Tính điểm trung bình của các thành viên hội đồng đối với từng chỉ tiêu cảm quan, lấy chính xác đến 1 chữ số thập phân sau dấu phẩy. Sau đó đem nhân với hệ số quan trọng tương ứng của chỉ tiêu đó. Đối với kẹo dẻo bổ sung phycocyanin, hệ số quan trọng của các chỉ tiêu tương ứng lần lượt là (màu sắc: 2, mùi: 0,8 và vị 1,2), do việc bổ sung phycocyanin vào kẹo nhằm tạo màu xanh đặc trưng cho sản phẩm nên hệ số quan trọng của màu sắc đối với sản phẩm này cao hơn 2 yếu tố còn lại. Tính tổng số điểm có trọng lượng của tất cả các chỉ tiêu cảm quan được số điểm chung.

*Xác định độ ẩm:* Độ ẩm của bột phycocyanin sau sấy phun được xác định bằng cân sấy ẩm hồng ngoại.

*Phương pháp xử lý số liệu:* Tất cả thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần, số liệu thí nghiệm xử lý bằng excel và phần mềm thống kê Statgraphics Centurion XV, sự khác biệt và chọn các thông số phù hợp dựa trên kết quả phân tích Anova 1 biến. Kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± sai số.

### 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

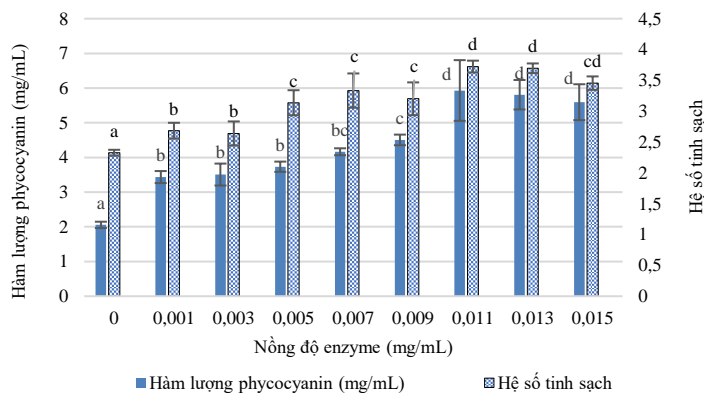
#### 3.1. Khảo sát quá trình tách chiết phycocyanin bằng enzyme lysozyme

##### 3.1.1. Khảo sát nồng độ enzyme

Sinh khối tảo được bổ sung enzyme lysozyme có nồng độ thay đổi từ 0 đến 0,015 mg/mL theo tỷ lệ 1:2 (w/v) để tiến hành tách chiết phycocyanin. Kết quả thu nhận được thể hiện qua Hình 2. Nhận thấy hàm lượng phycocyanin tách chiết tăng dần khi nồng độ enzyme tăng dần và đạt cao nhất (5,930 mg/mL) khi nồng độ enzyme là 0,011 mg/mL. Tuy nhiên khi nồng độ enzyme là 0,013 và 0,015 mg/mL thì hàm lượng phycocyanin thu nhận không có sự khác biệt về mặt thống kê so với lúc sử dụng enzyme có nồng độ 0,011 mg/mL. Enzyme lysozyme phá vỡ liên kết glycoside của peptidoglycan là thành phần cấu tạo nên vách tế bào *Spirulina platensis* [12]. Trong thí nghiệm, sau khi ủ với enzyme, tảo còn được làm lạnh ở -30 °C trong 24 giờ rồi rửa đông ở nhiệt độ phòng nhằm biến tính màng tế bào giúp tăng cường hiệu quả phá vỡ tế bào giải phóng phycocyanin có trong tế bào chất [13]. Do đó khi nồng độ enzyme tăng thì tế bào *Spirulina platensis* bị phá vỡ dễ dàng hơn làm tăng hàm lượng phycocyanin thu nhận, tuy nhiên enzyme tăng đến nồng độ nhất định có thể xảy ra hiện tượng bão hòa về mặt cơ chất dẫn đến không làm tăng hàm lượng phycocyanin tách chiết. Hệ số tinh sạch phycocyanin cũng có chiều hướng tăng tương tự hàm lượng phycocyanin thu nhận và ở tất cả các nghiệm thức hệ số tinh sạch phycocyanin đều nằm trong khoảng từ 0,7 - 4 đạt yêu cầu của phycocyanin dùng cho thực phẩm [14].

So sánh với các nghiên cứu khác, tác giả Tavanandi và cộng sự (2019) đã tách chiết phycocyanin bằng enzyme lysozyme có nồng độ thay đổi từ 0-1,2 %, kết quả cho thấy hàm lượng và hệ số tinh sạch của phycocyanin tăng dần khi nồng độ enzyme tăng dần và đạt cao nhất khi nồng độ enzyme là 1 % với hàm lượng phycocyanin là 82,07 mg/g sinh khối tảo khô và hệ số tinh sạch đạt 1,09 [4]. Tác giả Devi và cộng sự (2020) cũng cho biết khi sử dụng enzyme lysozyme ở các nồng độ 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; và 1 mg/mL để tách chiết phycocyanin thì hàm lượng phycocyanin và hệ số tinh sạch tăng dần khi nồng độ tăng lên từ 0,2 đến 0,6 mg/mL và hàm lượng phycocyanin không tăng nữa khi tăng nồng độ enzyme từ 0,6 đến 1 mg/mL, hàm lượng phycocyanin cao nhất đạt 33,85 mg/g sinh khối tảo khô và hệ số tinh sạch đạt 0,73 [15]. Theo kết quả từ các thí nghiệm cho thấy nồng độ enzyme là 0,011 mg/mL thì hàm lượng phycocyanin cao nhất đạt 5,930

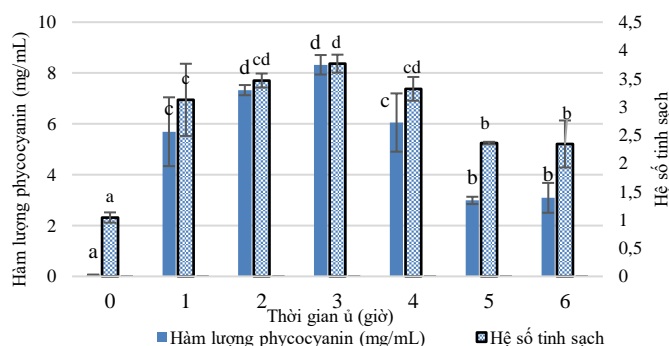
mg/mL và hệ số tinh sạch cao nhất đạt 3,723. Kết quả thí nghiệm có sự khác biệt so với 2 nghiên cứu trên có thể do nghiên cứu này được thực hiện trên sinh khối tảo tươi với độ ẩm 78% (w/w) và enzyme sử dụng có nồng độ thấp hơn, tuy nhiên khi xét về hệ số tinh sạch của phycocyanin thu nhận thì kết quả cho thấy việc tách chiết phycocyanin của nghiên cứu ít giải phóng các protein tạp hơn.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme lysozyme đến quá trình tách chiết phycocyanin (a, b, c, d là các chữ cái thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%)

### 3.1.2. Khảo sát thời gian ủ enzyme

Sinh khối tảo được bổ sung enzyme lysozyme có nồng độ 0,011 mg/mL theo tỷ lệ 1:2 (w/v) và được ủ ở các khoảng thời gian khác nhau để tiến hành tách chiết phycocyanin. Kết quả thu nhận được thể hiện qua Hình 3.

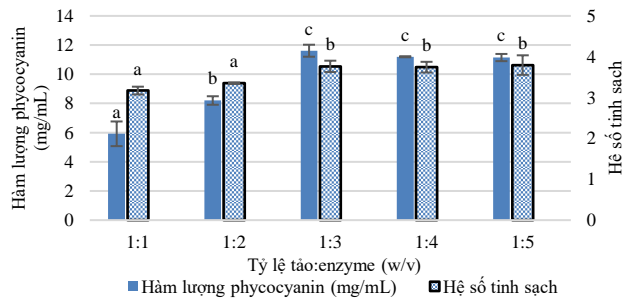


Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian ủ enzyme đến quá trình tách chiết phycocyanin (a, b, c, d là các chữ cái thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%)

Kết quả thí nghiệm cho thấy hàm lượng phycocyanin tăng khi thời gian ủ enzyme tăng từ 0 đến 3 giờ và bắt đầu giảm khi thời gian ủ là 4 đến 6 giờ. Hàm lượng phycocyanin đạt cao nhất (8,324 mg/mL) ở thời gian ủ là 3 giờ. Ở các nghiệm thức hệ số tinh sạch phycocyanin không có sự khác biệt đáng kể và đều đạt yêu cầu của phycocyanin dùng cho thực phẩm. Thời gian ủ là điều kiện cần thiết để enzyme tiếp xúc cơ chất và phân giải liên kết glycoside của peptidoglycan trong vách tế bào *Spirulina platensis*, do đó thời gian ủ càng tăng thì khả năng phá vỡ tế bào cũng tăng theo. Tuy nhiên nếu kéo dài thời gian ủ thì một phần lượng phycocyanin thoát ra có thể bị ảnh hưởng bởi điều kiện môi trường làm suy giảm hàm lượng phycocyanin thu nhận. Theo nghiên cứu của tác giả Devi và cộng sự (2020) khi khảo sát sự gia tăng hàm lượng phycocyanin tách chiết bằng enzyme với các khoảng thời gian ủ lần lượt là 2, 4, 8 và 24 giờ ở  $35 \pm 2$  °C, nhận thấy hàm lượng phycocyanin tăng khi tăng thời gian ủ với enzyme từ 2 đến 8 giờ và hàm lượng phycocyanin giảm khi tiếp tục tăng thêm thời gian ủ, hàm lượng phycocyanin cao nhất đạt 36,54 mg/g sinh khối tảo khô và hệ số tinh sạch cao nhất đạt 1,4 khi thời gian ủ là 8 giờ [15]. Kết quả từ các thí nghiệm cho thấy thời gian ủ 3 giờ thì hàm lượng phycocyanin cao nhất đạt 8,324 mg/mL và hệ số tinh sạch cao nhất đạt 3,765. Nhận thấy hàm lượng phycocyanin thu nhận có sự khác biệt so với nghiên cứu của Devi và cộng sự (2020) nhưng với thời gian ủ ngắn hơn và hệ số tinh sạch của phycocyanin thu nhận cao hơn cho thấy việc tách chiết phycocyanin của nghiên cứu ít giải phóng các protein tạp.

3.1.3. Khảo sát tỷ lệ sinh khối tảo và enzyme

Sinh khối tảo được bổ sung enzyme có nồng độ 0,011 mg/mL theo các tỷ lệ lần lượt là 1: 1, 1: 2, 1: 3, 1: 4, 1: 5 (w/v) và ủ trong 3 giờ để tách chiết phycocyanin. Kết quả thí nghiệm được thể hiện qua Hình 4. Nhận thấy tỷ lệ sinh khối tảo và enzyme có ảnh hưởng đến hàm lượng và hệ số tinh sạch của phycocyanin thu nhận. Khi tăng dần lượng enzyme bổ sung thì hàm lượng phycocyanin tăng theo, đạt cao nhất (11,613 mg/mL) ở tỷ lệ tảo và enzyme là 1: 3 (w/v). Nhưng nếu tiếp tục tăng lượng enzyme (tỷ lệ tảo và enzyme là 1: 4 và 1: 5 w/v) thì hàm lượng phycocyanin thu nhận không có sự khác biệt đáng kể so với tỉ lệ 1: 3. Điều này được giải thích do enzyme lysozyme có khả năng cắt liên kết glycoside phá vỡ vách tế bào tảo, khi lượng enzyme sử dụng tăng thì khả năng phá vỡ tế bào tăng làm lượng phycocyanin thoát ra cũng tăng theo. Nhưng nếu enzyme đạt trạng thái bão hòa về mặt cơ chất thì dù có tăng lượng enzyme cũng không làm tăng lượng phycocyanin thu nhận. Hàm lượng phycocyanin quyết định hệ số tinh sạch của phycocyanin do đó hệ số tinh sạch của phycocyanin thu nhận ở các tỷ lệ tảo và enzyme khác nhau có xu hướng thay đổi tương tự như hàm lượng phycocyanin. Ngoài ra, kết quả thí nghiệm cũng cho thấy phycocyanin thu nhận có hệ số tinh sạch khá cao (ở tỷ lệ tảo: enzyme là 1:3 w/v thì hệ số tinh sạch đạt 3,764) chứng tỏ việc sử dụng enzyme lysozyme để tách chiết phycocyanin không giải phóng nhiều protein tạp khác từ các bào quan của tế bào *Spirulina platensis*.

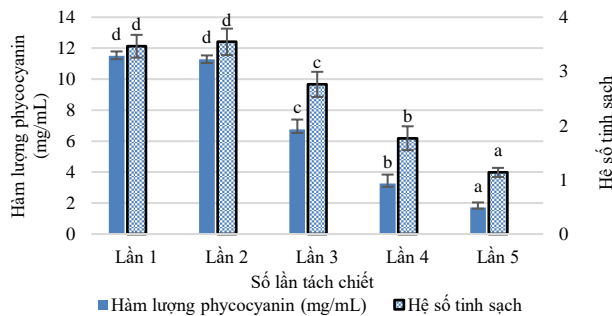


Hình 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ tảo:enzyme đến quá trình tách chiết phycocyanin (a, b là các chữ cái thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%)

Kết quả thí nghiệm cũng gần tương đồng với nghiên cứu của Devi và cộng sự (2020) đã khảo sát sự thay đổi hàm lượng và hệ số tinh sạch của phycocyanin khi tách chiết phycocyanin bằng enzyme lysozyme có hỗ trợ của sóng siêu âm, kết quả cho thấy hàm lượng phycocyanin thu nhận tăng dần khi tăng tỷ lệ tảo:enzyme từ 1:5 đến 1:15 (w/v), hàm lượng phycocyanin cao nhất 33,61 mg/g sinh khối tảo khô và hệ số tinh sạch cao nhất đạt 1,68 nhưng hàm lượng phycocyanin và hệ số tinh sạch lại giảm khi tỷ lệ tảo:enzyme tăng lên 1:20 (w/v) [15]. Kết quả của thí nghiệm thu được ở tỷ lệ tảo: enzyme là 1:3 (w/v) thì hàm lượng phycocyanin cao nhất đạt 11,613 mg/mL và hệ số tinh sạch cao nhất đạt 3,764. Nhận thấy việc tách chiết phycocyanin của nghiên cứu thu nhận phycocyanin có hệ số tinh sạch cao.

3.1.4. Khảo sát số lần tách chiết

Sinh khối tảo được bổ sung enzyme có nồng độ 0,011 mg/mL theo tỷ lệ 1: 3 (w/v) và ủ trong 3 giờ để tách chiết phycocyanin, sử dụng lại sinh khối tảo và tiếp tục bổ sung enzyme với các thao tác như cũ cho các lần tách chiết 2, 3, 4, 5. Kết quả thí nghiệm được thể hiện qua Hình 5.



Hình 5. Ảnh hưởng của số lần tách chiết đến quá trình tách chiết phycocyanin (a, b, c, d là các chữ cái thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%)

Từ kết quả thí nghiệm nhận thấy lần tách chiết 1 và 2 thu được hàm lượng và hệ số tinh sạch của phycocyanin gần bằng nhau và không có sự khác biệt về mặt thống kê. Tuy nhiên hàm lượng cũng như hệ số tinh sạch của phycocyanin bắt đầu giảm từ lần tách chiết thứ 3 về sau. Điều này có thể được giải thích rằng việc tách chiết lần 1 và lần 2 đã chiết rút tối đa lượng phycocyanin có trong sinh khối tảo. Do đó, một sinh khối tảo có thể được sử dụng để tách chiết phycocyanin 2 lần là tốt nhất.

### 3.2. Vi gói tạo bột phycocyanin bằng phương pháp sấy phun và thực hiện tạo kẹo dẻo bổ sung phycocyanin

#### 3.2.1. Sấy phun tạo bột phycocyanin

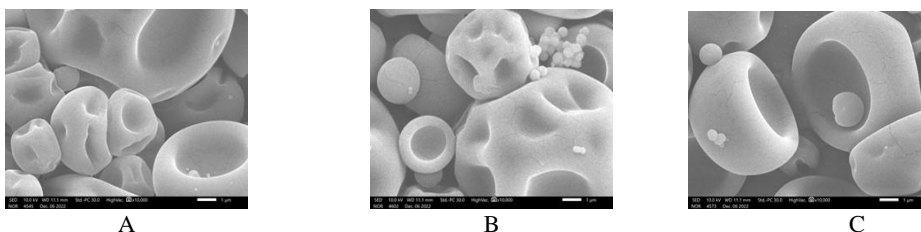
Sinh khối tảo được bổ sung enzyme nồng độ 0,011 mg/mL theo tỷ lệ 1:3 (w/v), ủ ở 37 °C trong 3 giờ, sau đó làm lạnh ở -30 °C trong 24 giờ, rã đông ở nhiệt độ phòng và tiến hành ly tâm lạnh thu nhận phycocyanin. Dịch phycocyanin được bổ sung chất mang và sấy phun ở điều kiện thích hợp để tạo bột phycocyanin. Kết quả thí nghiệm được thể hiện qua Bảng 1 và Hình 6.

Bảng 1. Ảnh hưởng của vật liệu vi bao đến độ ẩm, hiệu quả vi gói, hàm lượng phycocyanin và hoạt tính chống oxy hóa của bột phycocyanin

Vật liệu vi bao	Độ ẩm (%)	Hiệu suất bao gói (%)	Hàm lượng phycocyanin (mg/g)	I (%)
Gum arabic	9,386 ± 0,061c	74,891 ± 1,764a	8,982 ± 0,271a	52,884 ± 1,130a
Maltodextrin	6,473 ± 0,512a	85,257 ± 1,896b	9,623 ± 0,019a	72,844 ± 0,986b
Maltodextrin: gum arabic	8,230 ± 0,503b	88,746 ± 1,423c	12,275 ± 1,068b	75,378 ± 1,064c

(<sup>a, b, c</sup> là các chữ cái thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%)

Nhận thấy, chất trợ sấy có ảnh hưởng đến độ ẩm của bột phycocyanin, bột có độ ẩm càng thấp thì thời gian bảo quản của bột càng lâu, gum arabic có độ nhớt cao hơn maltodextrin do đó bột phycocyanin khi sử dụng vật liệu vi bao là gum arabic có độ ẩm cao hơn các vật liệu còn lại. Tuy nhiên, các mẫu bột phycocyanin đều có độ ẩm dưới 10% (w/w) đạt yêu cầu về độ ẩm của bột sau sấy. Ngoài ra, hàm lượng phycocyanin trong bột sau sấy với vật liệu vi gói là gum arabic hoặc maltodextrin thì thấp hơn khi sử dụng hỗn hợp maltodextrin: gum arabic. Điều này có thể được giải thích như sau: maltodextrin hòa tan tốt trong nước, độ nhớt thấp, khả năng tạo bột tốt còn gum arabic hòa tan tốt trong nước nhưng độ nhớt cao làm độ ẩm bột sau sấy cao. Mặc dù gum arabic có khả năng tạo màng bao tốt hơn maltodextrin nhưng khả năng chịu nhiệt trong quá trình sấy phun của gum arabic lại thấp hơn maltodextrin [9]. Do đó, khi sử dụng gum arabic hoặc maltodextrin để làm vật liệu bao gói đều không thể bảo vệ tốt hoạt tính của phycocyanin trước tác động nhiệt của quá trình sấy phun. Ngược lại, khi kết hợp maltodextrin và gum arabic sẽ tạo ra vật liệu vi bao có khả năng tạo màng bao tốt, chịu đựng nhiệt độ tốt và dễ dàng tạo bột nhờ sấy phun. Từ đó hỗn hợp maltodextrin và gum arabic (1: 1) là chất trợ sấy thích hợp dẫn đến hàm lượng phycocyanin trong bột sau sấy cao nhất (đạt 12,275 mg phycocyanin trong 1 g bột). Hàm lượng phycocyanin quyết định đến hiệu suất bao gói và hoạt tính chống oxy hóa của bột nên phycocyanin được sấy phun bởi vật liệu vi bao là hỗn hợp maltodextrin và gum arabic thì cho hiệu suất bao gói và hoạt tính chống oxy hóa cao hơn các vật liệu còn lại. Kết quả thí nghiệm cũng phù hợp với nhận định về tính chất của các chất trợ sấy maltodextrin và gum arabic của İler và cộng sự (2021) [9].



Hình 6. Hình chụp SEM của bột phycocyanin với các chất trợ sấy khác nhau ở kích thước 1 µm (A: maltodextrin, B: gum arabic, C: hỗn hợp maltodextrin: gum arabic)

Ngoài ra, từ hình ảnh chụp SEM có thể thấy hỗn hợp maltodextrin và gum arabic tạo được các hạt vi bao rời rạc hơn so với chất trợ sấy là gum arabic, đồng thời hỗn hợp maltodextrin và gum arabic tạo được các hạt vi bao có hình tròn, bề mặt hạt ít bị co rút hơn các vật liệu còn lại.

### 3.2.2. Thực hiện tạo kẹo dẻo bổ sung phycocyanin

Từ 15 g bột chanh, 32 g gelatin, 50 g đường, 50 mL syrup vải, 17 g bột phycocyanin (hàm lượng phycocyanin có trong 1 g bột phycocyanin là 12,275 mg) và 80 mL nước thu được 123 g kẹo dẻo. Xác định hàm lượng phycocyanin trong kẹo dẻo tương tự như cách xác định tổng hàm lượng phycocyanin trong bột sau sấy. Kết quả xác định hàm lượng phycocyanin trong kẹo thành phẩm được thể hiện qua Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả xác định hàm lượng phycocyanin trong kẹo dẻo

Hàm lượng phycocyanin có trong 1 g kẹo dẻo	1,002 mg	Hàm lượng phycocyanin có trong 1 g bột phycocyanin	12,275 mg
Hàm lượng phycocyanin có trong 123 g kẹo dẻo	123,246 mg	Hàm lượng phycocyanin có trong 17 g bột phycocyanin	208,675 mg

Như vậy từ hàm lượng phycocyanin ban đầu là 208,675 mg, qua quá trình tạo kẹo dẻo hàm lượng phycocyanin còn giữ lại được trong kẹo thành phẩm là 123,246 mg (đạt tỷ lệ 59,06%).

Sản phẩm kẹo được đánh giá cảm quan thị hiếu bằng phương pháp cho điểm theo TCVN 3215-79, kết quả được thể hiện qua Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả cho điểm của hội đồng đối với kẹo dẻo bổ sung phycocyanin

Chỉ tiêu chất lượng	Điểm của các thành viên							Tổng số điểm	Điểm trung bình	Hệ số quan trọng	Điểm có trọng lượng
	A	B	C	D	E	F	G				
Màu sắc	5	5	5	5	5	5	5	35	5	2,0	10
Mùi	5	5	3	5	4	4	4	30	4,2	0,8	3,36
Vị	5	5	4	4	4	4	5	31	4,4	1,2	5,28
Cộng										4,0	18,74

Dựa vào bảng kết quả trên nhận thấy sản phẩm kẹo dẻo bổ sung phycocyanin đạt số điểm chung là 18,74 nằm trong khoảng điểm từ 18,6-20,0 nên đạt mức chất lượng tốt [11].

## 4. KẾT LUẬN

Đề tài đã thực tách chiết phycocyanin từ *Spirulina platensis* bằng enzyme lysozyme với hàm lượng phycocyanin cao nhất có thể tách chiết đạt 11,613 mg/mL, hệ số tinh sạch phycocyanin 3,764. Nghiên cứu đã sấy phun phycocyanin bằng hỗn hợp maltodextrin: gum tỷ lệ (1:1 w/w) để tạo bột phycocyanin và bổ sung bột phycocyanin vào kẹo dẻo tạo kẹo dẻo có chứa một hàm lượng phycocyanin nhất định và được đánh giá cảm quan tốt.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Soni R.A., Sudhakar K., Rana R.S. - Comparative study on the growth performance of *Spirulina platensis* on modifying culture media, Energy Reports **5** (2019) 327-336. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2019.02.009>
- Dương Thanh Liêm - Thực phẩm chức năng-sức khỏe bền vững, NXB Khoa học và kỹ thuật 427 TP.HCM, 2010.
- Manirafasha E., Murwanashyaka T., Ndikubwimana T., Yue Q., Zeng X., Lu Y., Jing K. - Ammonium chloride: a novel effective and inexpensive salt solution for phycocyanin extraction from *Arthrospira (Spirulina) platensis*, Journal of Applied Phycology **29** (3) (2017) 1261-1270. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0989-y>
- Tavanandi H.A., Raghavarao K.S.M.S. - Ultrasound-assisted enzymatic extraction of natural food colorant C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*, LWT-Food Science & Technology **118** (2019) 108802-108839. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108802>
- Purnamayati L., Dewi E.N., Kurniasih R.A. - Phycocyanin stability in microcapsules processed by spray drying method using different inlet temperature, IOP Conference Series: Earth and



- Environmental Science, Indonesia **116** (1) (2018) 012076. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/116/1/012076>
6. Pradeep H.N., Nayak C.A. - Enhanced stability of C-phycocyanin colorant by extrusion encapsulation, *Journal of Food Science and Technology* **56** (2019) 4526-4534. doi: 10.1007/s13197-019-03955-8
  7. Gustiningtyas A., Setyaningsih I., Hardiningtyas S.D., Susila A.A.R. - Improvement stability of phycocyanin from *Spirulina platensis* encapsulated by water soluble chitosan nanoparticles, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* **414** (1) (2020) 012005. <http://doi.org/10.1088/1755-1315/414/1/012005>
  8. Gouraji M.E., Zad S.S; Ghiaci M. - Phycocyanin-enriched yogurt and its antibacterial and physicochemical properties during 21 days of storage, *LWT- Food Science and Technology* **102** (2019) 230-236. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.057>
  9. İlter I., Koç M., Demirel Z., Dalay C.M., Ertekin K.F. - Improving the stability of phycocyanin by spray dried microencapsulation, *Journal of Food Processing and Preservation* **45** (7) (2021) 15646-15669. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15646>
  10. Williams, W.B., Cuvelier M.E., Berset C. - Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food science Technology* **28** (1) (1995) 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
  11. Hà Duyên Tư - Kỹ thuật phân tích cảm quan thực phẩm, NXB Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội (2009) 96-98.
  12. Nawaz N., Wen S., Wang F., Nawaz S., Raza J., Iftikhar M., Usman M. - Lysozyme and its application as antibacterial agent in food industry, *Molecules* **27** (19) (2022) 6305. <https://doi.org/10.3390/molecules27196305>
  13. Tavanandi A.H., Mittal R., Chandrasekhar J., Raghavarao K.S.M.S. - Simple and efficient method for extraction of C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*, *Algal Research* **31** (2018) 239-251. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.008>
  14. Lo H.M., Castillo G., Becerra O.A.M., Mojica L. - Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability, *Algal Research* **42** (2019) 101600-101611. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101600>
  15. Devi A.C., Tavanandi A.H., Govindaraju K.; Raghavarao K. S. M. S. - An effective method for extraction of high purity phycocyanins (C-PC and A-PC) from dry biomass of *Arthrospira maxima*, *Journal of Applied Phycology* **32** (2020) 1141-1151. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-02033-y>

## ABSTRACT

### EXTRACTING PHYCOCYANIN FROM *Spirulina platensis* WITH LYSOZYME ENZYME AND ADDING PHYCOCYANIN TO JELLY CANDY

Huynh Phan Phuong Trang\*, Do Thi Hien  
*Ho Chi Minh City University of Industry and Trade*  
\*Email: [tranghpp@huit.edu.vn](mailto:tranghpp@huit.edu.vn)

Nowadays, foods containing natural antioxidants interest consumers because of their many health benefits. Adding antioxidants to food increases the value and diversity of food, a research direction that fits the market demand. Phycocyanin from *Spirulina platensis* is a suitable colorant that replaces highly toxic, carcinogenic artificial colorants in food. This study investigated the process of extracting phycocyanin from *Spirulina platensis* by lysozyme enzyme, microencapsulation phycocyanin by spray drying method and adding phycocyanin powder to jelly. The results showed that the appropriate parameters for phycocyanin extraction: enzyme concentration 0.011 mg/mL, incubation time 3 hours, algae biomass: enzyme ratio (1:3 w/v), suitable wall for the spray drying process is a mixture of maltodextrin: gum arabic (1:1 w/w), jelly with phycocyanin added to achieve phycocyanin content of 1,002 mg/g, and the jelly is evaluated for good mark according to sensory analysis TCVN 3215-79.

**Keywords:** Phycocyanin, enzyme lysozyme, *Spirulina platensis*, extraction, jelly candy.