

Đánh giá độ tinh sạch và hàm lượng của phycocyanin được tách từ *Arthrospira platensis* theo phổ hấp thụ quang học và điện di biến tính

Đậu Thị Nhung¹, Phạm Thị Lương Hằng¹, Trịnh Lê Phương^{2*}

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzyme và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 12/5/2017; ngày chuyển phản biện 22/5/2017; ngày nhận phản biện 15/6/2017; ngày chấp nhận đăng 19/6/2017

Tóm tắt:

Phycocyanin, một loại protein có màu xanh lam đặc trưng, được sử dụng như chất nhuộm an toàn trong thực phẩm và hóa mỹ phẩm; ngoài ra, nó có các hoạt tính sinh học có lợi nên còn được ứng dụng trong dược phẩm. Ở Việt Nam, phycocyanin được nghiên cứu tách chiết, tinh sạch chủ yếu từ nguồn tảo xoắn *Spirulina* (*Arthrospira platensis*), nhưng vẫn chưa có các nghiên cứu đánh giá độ tinh sạch cũng như hàm lượng của phycocyanin được tách chiết. Nghiên cứu này áp dụng phương pháp đo chỉ số hấp thụ quang học UV-Vis và điện di biến tính SDS-PAGE để đánh giá chất lượng phycocyanin. Kết quả cho thấy, tinh sạch phycocyanin từ tảo tươi theo 2 bước (tủa bằng ammonium sulfate rồi chạy sắc ký qua cột LH20) cho phycocyanin có độ tinh sạch A_{620}/A_{280} là 1,2, phù hợp cho ngành thực phẩm và hóa mỹ phẩm. Đánh giá hàm lượng phycocyanin trong sản phẩm tảo thương mại cho thấy, sản phẩm của hãng Vinataor trong nước có hàm lượng phycocyanin cao hơn một số sản phẩm thương mại nhập ngoại được đánh giá.

Từ khóa: *Arthrospira platensis*, phycocyanin, SDS-PAGE.

Chỉ số phân loại: 1.6

Tổng quan

Tảo xoắn *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) được dùng rộng rãi như một loại thực phẩm chức năng có nhiều lợi ích cho sức khỏe do có hàm lượng protein cao (50-60% tổng sinh khối khô, chứa đầy đủ các acid amin cần thiết cho cơ thể người và động vật nuôi) và các chất khoáng đa và vi lượng khác [1, 2]. Ngoài cách dùng trực tiếp, một số chất có trong tảo xoắn đã được nghiên cứu và tách chiết để ứng dụng trong những ngành công nghiệp khác nhau. Phycocyanin, một protein có màu xanh lam đặc trưng, được sử dụng như là chất màu tự nhiên an toàn trong các ngành công nghiệp thực phẩm, hóa mỹ phẩm [3]. Ngoài ra, nó còn có tác dụng chống viêm, chống oxy hóa, chống ung thư, ức chế phát triển các khối u nên phycocyanin là một chất tiềm năng để điều chế thuốc và thực phẩm chức năng giúp tăng cường sức khỏe con người [4-6]. Tính chất phát huỳnh quang của phycocyanin cũng được ứng dụng trong sản xuất các kit miễn dịch, làm marker huỳnh quang [3].

Phycocyanin có cấu trúc hình elip dẹt được cấu thành từ tiểu đơn vị α (kích thước 12.000-18.500 Da) và β (kích thước 14.000-20.000 Da) và ở dạng hexamer tự nhiên ($\alpha\beta$)₆. Tuy nhiên, nó có tồn tại dạng trimer ($\alpha\beta$)₃ và dimer (α

β)₂ [7]. Phycocyanin có bước sóng hấp thụ cực đại ở 620 nm, do đó chỉ số A_{620}/A_{280} được sử dụng để đánh giá độ tinh sạch của phycocyanin.

Ở Việt Nam, một số nhóm đã nghiên cứu tách chiết phycocyanin từ tảo xoắn *Spirulina*, tuy nhiên, hàm lượng và độ tinh sạch của phycocyanin mới được đánh giá sơ bộ và cũng không có chất chuẩn so sánh, làm giảm khả năng ứng dụng của các sản phẩm tách chiết. Do đó, nghiên cứu này có mục tiêu khảo sát một số phương pháp xác định định tính cũng như định lượng phycocyanin và áp dụng chúng để đánh giá hàm lượng của phycocyanin tách chiết trong các sản phẩm tảo thương mại.

Nguyên liệu và phương pháp

Nguyên liệu

Arthrospira platensis được nuôi tại Phòng Vi tảo, Trung tâm Khoa học sự sống, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội do Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội cung cấp.

Sản phẩm thương mại trong nước: *Spirulina* Vinataor (*Arthrospira platensis* tươi) của Công ty THHH công nghệ sinh học Vina Tảo spirulina, Việt Nam.

* Tác giả liên hệ: Tel: 0989777130; Email: violetph2009@gmail.com

Qualitative and quantitative assessment of phycocyanin extracted from *Spirulina* (*Arthrospira* sp.) through absorption spectroscopy and denaturation electrophoresis SDS-PAGE

Thi Nhung Dau¹, Thi Luong Hang Pham¹,
Le Phuong Trinh^{2*}

¹Faculty of Biology, VNU University of Science

²Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology (KLEPT), VNU University of Science

Received 12 May 2017; accepted 19 June 2017

Abstract:

The phycocyanin, a blue colour characterised protein, is widely used as a natural dye in food and cosmetic industries, and in pharmacy industry due to its beneficial bioactivities. In Vietnam, phycocyanin has been extracted and purified mainly from blue - green algae (*Arthrospira platensis*), but no studies have evaluated the purity as well as the amount of phycocyanin extracted. In this study, absorption spectroscopy at UV-Vis and denaturation electrophoresis SDS-PAGE were used to evaluate phycocyanin in crude extracts and purified samples. The obtained results showed that purifying phycocyanin from fresh biomass *A. platensis* in 2 steps (precipitated with ammonium sulfate following by LH20 column chromatography) gave the purity (expressed by $A_{620/280}$ of 1.2) which is suitable for applications in food and cosmetics. Evaluation of phycocyanin contents in commercial *Spirulina* products showed that a domestic product, namely Vinataor had a higher phycocyanin content than some imported commercial products.

Keywords: *Arthrospira platensis*, phycocyanin, SDS-PAGE.

Classification number: 1.6

Sản phẩm thương mại nhập ngoại: Viên nén tảo xoắn khô của hãng Japan Algae Co, Ltd, Nhật và GeoVitalis, Đức.

Nuôi thu sinh khối

Spirulina platensis được nuôi lắ thu sinh khối trong môi trường Zarrouk, ở nhiệt độ phòng, điều kiện chiếu sáng: Tối là 12/12 h. Sau 14 ngày, sinh khối tảo được thu hồi bằng ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút trong 20 phút

ở nhiệt độ phòng và rửa với nước cất 2 lần. Sau đó, sinh khối tươi được đông khô và bảo quản ở -20°C.

Tách chiết phycocyanin từ sinh khối tảo tươi

Phycocyanin được tách chiết từ sinh khối tảo theo phương pháp đông lạnh/rã đông. Đầu tiên, tảo tươi được hòa tan bằng đệm natri phosphate 0,1 M, pH 7 với tỷ lệ 1/25 (w/v), tương đương với 25 ml đệm hoà tan 1 g tảo. Sau đó, hỗn hợp được làm đông lạnh ở -20°C trong 24 h, rồi rã đông ở nhiệt độ phòng. Bước đông lạnh/rã đông được thực hiện hai lần. Hỗn hợp được ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C, dịch nổi có màu xanh lam chứa phycocyanin được thu lại.

Tinh sạch phycocyanin bằng tủa ammonium sulfate

Phycocyanin trong dịch màu xanh bước đầu được tinh sạch bằng tủa với ammonium sulfate bão hòa ở nồng độ 25%, rồi 50%. Đầu tiên, hỗn hợp được ủ với ammonium sulfate bão hòa ở nồng độ 25% trong 5 h ở 4°C, rồi được ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C. Phần dịch nổi thu lại và được ủ với ammonium sulfate bão hòa ở nồng độ 50% qua đêm ở 4°C. Tủa protein thu được sau khi ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C được rửa lại với natri acetate 0,1 M, pH 7. Dịch nổi được tiếp tục tủa lần hai bằng ammonium sulfate bão hòa với nồng độ 50%. Tủa màu xanh lam thu được sau khi ly tâm được hòa tan trong đệm natri phosphate 50 mM, pH 7 và bảo quản ở 4°C.

Tinh sạch phycocyanin bằng sắc ký cột LH20

Một lượng 10 g sephedex LH20 (amershambiosciences, Thụy Điển) với kích thước hạt là 18-111 µm được ngâm để trương nở trong nước cất khử trùng ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Hỗn hợp gel được cho lên cột và lắng từ từ, tránh tạo bọt khí trong khoảng 30 phút. Sau khi cột gel đã nhồi xong, một lượng mẫu chứa phycocyanin pha loãng với nước cất khử trùng được cho lên cột và chạy qua cột theo trọng lực. Phân đoạn chạy qua cột có màu xanh được thu lại.

Định tính và định lượng phycocyanin bằng đo hấp thụ quang học

Độ hấp thụ quang học của mẫu có chứa phycocyanin ở các bước sóng 280 nm, 620 nm và 652 nm được đo bằng máy Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Trong đó, 280 nm là bước sóng hấp thụ cực đại của các protein, 620 nm là bước sóng hấp thụ đặc trưng của phycocyanin, còn 652 nm là bước sóng hấp thụ đặc trưng của allophycocyanin. Nồng độ và độ tinh sạch phycocyanin trong mẫu được tính theo công thức [8]:

$$C-PC \text{ (mg/ml)} = 10 \cdot [A_{620} - 0,474 \times A_{652}] / 5,34$$

$$\text{Độ tinh sạch} = A_{620} / A_{280}$$

Trong đó A_{280} , A_{620} , A_{652} là số đo hấp thụ quang học ở các bước sóng 280 nm, 620 nm, 652 nm của mẫu có chiều dài 1 mm.

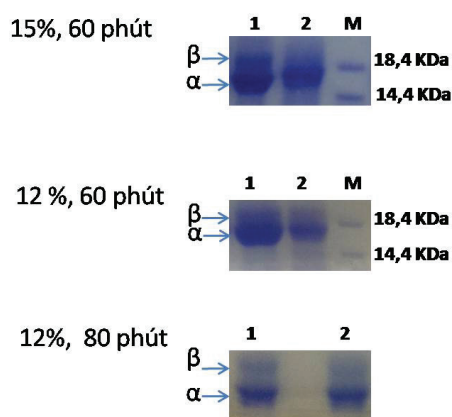
Điện di biến tính SDS-PAGE

Một lượng mẫu (50-100 µg protein) được trộn với đệm mẫu có chứa SDS và β-mercaptoethanol, biến tính ở 95°C trong 10 phút, rồi đặt lại ngay lên đá. Mẫu đã xử lý được điện di kiểm tra lên giếng của bản gel polyacrylamide, chuẩn bị với hỗn hợp acrylamide/bis acrylamide là 29:1 với phần gel cô là 4%, gel tách là 12%. Điện di chạy trong đệm tris-glycine, ở hiệu điện thế 120 V trong 1,5 đến 2 h. Băng protein được nhuộm bằng Coomassie Brilliant Blue (CBB) 0,25%.

Kết quả và thảo luận

Xác định kích thước của phycocyanin dựa trên điện di SDS-PAGE

Các nghiên cứu trước đây đã xác định protein phycocyanin được cấu thành từ hai tiểu phần α và β có khối lượng phân tử là 17,6 và 18,2 KDa, như vậy ở điều kiện biến tính, điện di cho hai băng protein của hai tiểu phần. Thử nghiệm với các bản gel polyacrylamide có tỷ lệ của gel tách là 12% hoặc 15% và điều kiện điện di khác nhau đã cho thấy sử dụng bản gel 12%, chạy ở hiệu điện thế 120 V trong 80 phút cho 2 băng protein của phycocyanin là rõ nét nhất (hình 1).



Hình 1. Điện di biến tính trên gel polyacrylamid (SDS-PAGE) ở các điều kiện khác nhau của mẫu [Giếng 1: Mẫu tinh sạch sau khi rửa với ammonium sulfate; Giếng 2: Mẫu tinh sạch sau khi rửa với ammonium sulfate và chạy sắc ký cột LH20; M: Thang chuẩn protein (Thermo Scientific)].

Dựa vào trình tự của các tiểu phần α (162 axit amin, CAA70296) và β (172 axit amin, CAA70295), khối lượng phân tử được tính toán lý thuyết là 17,6 KDa và 18,2 KDa.

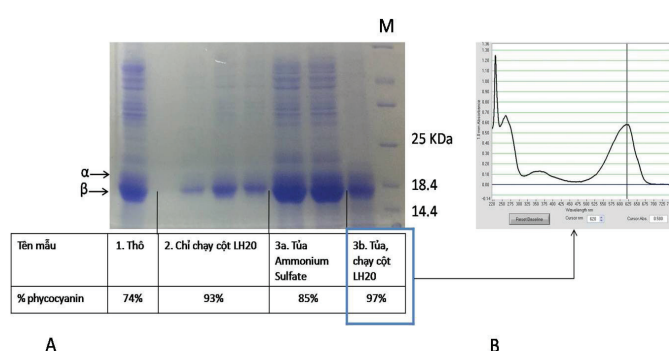
Trên thực nghiệm, khối lượng phân tử của hai tiểu phần có thể được tính toán dựa vào khoảng cách di chuyển tương đối (Rf) với thang chuẩn marker chạy cùng trên bản gel bằng phần mềm ImageJ. Theo đó, kích thước của 2 tiểu phần α và β được xác định tương đối là 19 KDa và 21 KDa trên bản gel 12% và 15,5 KDa, và 19 KDa ở bản gel 15%. Cũng đã có nhiều công bố (bảng 1) đưa ra những con số khác nhau về kích thước các tiểu phần α và β của loài *Arthrospira platensis* [6, 8-10]. Tuy nhiên, sự khác biệt giữa các kết quả nghiên cứu thực nghiệm cũng như tính toán lý thuyết là tương đối nhỏ, có thể giải thích là do điều kiện điện di và phương pháp phân tích hình ảnh khác nhau.

Bảng 1. Kích thước tiểu phần α và β của phycocyanin trong các công bố khác nhau.

Nghiên cứu	α	β	% gel tách
Tính toán lý thuyết	17,6	18,2	
Patel, et al. 2005 [8]	17,0	24,0	15,0
Kumar, et al. 2014 [9]	16,0	17,0	7,5
Kamble, et al. 2013 [6]	17,0	19,0	12,0
Song, et al. 2013 [10]	17,0	21,0	15,0
Trong nghiên cứu này	15,5	19,0	15,0
	19,0	21,0	12,0

Phương pháp tinh sạch phycocyanin

Trong nghiên cứu này, phycocyanin sau khi tách chiết theo phương pháp làm đông/rã đông từ sinh khối tảo xoắn được tinh sạch theo 2 bước chính: Rửa với ammonium sulfate bão hòa nồng độ 25%, 50%, rồi tinh sạch qua cột sắc ký lọc gel LH20. Mẫu tinh sạch thu được có màu xanh lam đặc trưng của phycocyanin và cho phổ hấp thụ UV-Vis với ba vùng hấp thụ cực đại là 230, 260 và 620 nm (hình 2B). Hai vùng đầu là đặc trưng cho các phân tử acid nucleic, còn bước sóng 620 nm đặc trưng của phycocyanin. Mật độ quang (độ hấp thụ) tại bước sóng 280, 620 và 652 nm được sử dụng để tính độ tinh sạch của mẫu và tỷ lệ thu hồi phycocyanin qua mỗi bước tinh sạch (bảng 2). Kết quả so sánh cho thấy, mẫu tinh sạch theo 2 bước có độ tinh sạch cao hơn so với mẫu chỉ tinh sạch 1 bước với cột sắc ký LH20 mà không rửa ammonium sulfate (A_{620}/A_{280} : 1,2 và 1,1, tương ứng). Tuy nhiên, quá trình rửa protein với ammonium sulfate có hiệu suất thu hồi phycocyanin thấp, khoảng 60%, trong khi tinh sạch qua cột LH20 là 80-90%.



Hình 2. Điện di biến tính protein các mẫu tinh sạch phycocyanin từ mẫu thô [A: Điện di SDS-PAGE của mẫu thô và các mẫu tinh sạch phycocyanin; M: Thang chuẩn protein (Thermo Scientific); B: Phổ hấp thụ UV-Vis của mẫu tinh sạch theo 2 bước gồm tủa ammonium sulfate và chạy cột sắc ký LH20)].

Bên cạnh đo quang phổ hấp thụ, hàm lượng và độ tinh sạch của mẫu thô và các sản phẩm tinh sạch còn tiến hành đánh giá bằng điện di biến tính SDS-PAGE. Ảnh điện di cho thấy, dịch chiết mẫu thô và các sản phẩm tinh sạch đều có xuất hiện băng protein đặc trưng của 2 tiểu phần α và β của phycocyanin (hình 2A). Tuy nhiên, băng của tiểu phần β không rõ nét ở các phân đoạn tinh sạch bằng cách chỉ chạy cột sắc ký LH20 mà không tủa bằng ammonium sulfate (hình 2A, mẫu 2). Và mẫu thu được sau khi tủa ammonium sulfate có nhiều băng phụ hơn so với mẫu tinh sạch sau khi chạy sắc ký LH20 (hình 2A, mẫu 3a).

Bảng 2. Độ tinh sạch và hiệu suất thu hồi phycocyanin.

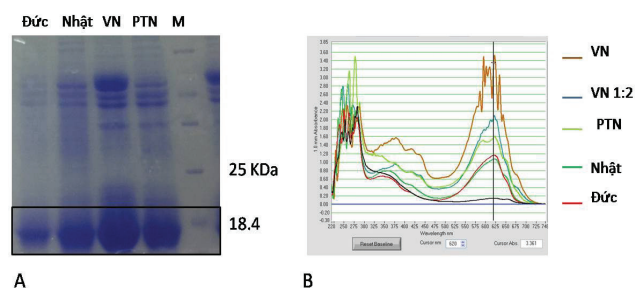
Tên mẫu	Độ tinh sạch A_{620}/A_{280}	Hiệu suất thu hồi (%)
1. Mẫu thô	1,06	100
2. Chỉ chạy cột LH20	1,12	> 80
3.a Tủa bằng ammonium sulfate	1,20	~60
3.b Tủa bằng ammonium sulfate rồi chạy qua cột LH20	1,20	>50

Sử dụng phần mềm phân tích hình ảnh ImageJ xác định được độ tinh sạch của các mẫu chứa phycocyanin dựa trên tỷ lệ % của 2 băng tiểu phần α và β trên tổng các băng protein của mẫu ở bản gel điện di biến tính. Kết quả cho thấy, mẫu được tinh sạch theo cách 2 bước (tủa ammonium sulfate rồi chạy cột sắc ký LH20) có độ tinh sạch cao nhất đạt 97% phycocyanin (hình 2A, mẫu 3b), so với cách tinh sạch chỉ chạy với cột sắc ký LH20, 93%. Kết quả thu được dựa trên bản gel phù hợp với kết quả tính toán theo phổ hấp thụ UV-Vis.

Đánh giá hàm lượng của phycocyanin ở các sản phẩm tảo xoắn thương mại

Phycocyanin là chất có khả năng chống viêm, chống oxy hóa, do đó hàm lượng phycocyanin là một chỉ tiêu quan trọng trong các sản phẩm tảo xoắn thương mại. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã áp dụng phương pháp tách chiết làm đông/rã đông, phương pháp đo quang phổ hấp thụ và điện di SDS-PAGE để đánh giá hàm lượng phycocyanin trong 1 g sinh khối khô tảo xoắn thương mại Vinataor trong nước (được ký hiệu mẫu là VN) và ngoại nhập (có xuất xứ từ Đức và Nhật), và từ sinh khối tảo khô nuôi trong phòng thí nghiệm (PTN) (như đã nêu ở phần nguyên liệu). Trong đó, mẫu VN và PTN, sinh khối tảo tươi được làm khô theo phương pháp đông khô.

Theo bản gel, sản phẩm tách phycocyanin ở các sản phẩm tảo xoắn thương mại trong nước (VN) và ngoại nhập (Đức, Nhật) cũng cho 2 băng tương ứng với tiểu phần α và β của phycocyanin có kích thước tính toán khoảng 15,5 KDa và 19 KDa (hình 3A). Hàm lượng của phycocyanin trong mẫu tách có thể được phản ánh dựa trên độ sáng của các băng điện di α và β này. Theo tính toán của ImageJ, lượng phycocyanin trong 1 g tảo khô theo thứ tự giảm dần như sau: VN, PTN Nhật, Đức.



Hình 3. So sánh hàm lượng phycocyanin trong các sản phẩm tảo Spirulina thương mại [A: Điện di biến tính SDS-PAGE; B: Phổ hấp thụ UV-Vis; VN: Sản phẩm thương mại Vinataor trong nước; Đức, Nhật: Sản phẩm ngoại nhập từ Đức, Nhật; PTN: Mẫu phycocyanin tách từ sinh khối tảo nuôi trong phòng thí nghiệm; M: Thang chuẩn protein (Thermo Scientific)].

Dựa vào số đo phổ hấp thụ UV-Vis của các mẫu phycocyanin tách cho thấy, hàm lượng phycocyanin của sản phẩm thương mại Vinataor trong nước (VN) là cao nhất: 78,2 mg trong 1 g tảo xoắn khô, tức 7,8% sinh khối, sau đó đến sản phẩm thương mại nhập ngoại Japan Algae Co. Ltd (Nhật): 59,8 mg/g (tức 6%) và GeoVitalis (Đức): 41,4 mg/g (tức 4,1%). Hàm lượng phycocyanin của mẫu trong phòng thí nghiệm (PTN) thu được là 57,5 mg/g (tức 5,75%). Kết quả này là phù hợp với kết quả thu được từ điện di SDS-PAGE.

Phương pháp tách chiết có ảnh hưởng nhiều đến hàm lượng phycocyanin thu được, trong đó phương pháp đông lạnh/rã đông được sử dụng phổ biến nhất, vì quy trình đơn giản, không cần hoá chất trong tách chiết và ly giải được lượng phycocyanin nhiều nhất. Sarada và cộng sự (1999) đã sử dụng phương pháp này để tách chiết phycocyanin từ sinh khối khô thu được hàm lượng 19 mg/100 g (1,9% sinh khối) [11]. Nghiên cứu của Song và cộng sự (2013) sử dụng phương pháp nghiền ở áp suất cao cùng với xử lý enzyme lysozyme chỉ thu được 20-25 mg/g từ tảo khô (2-2,5% sinh khối) [10].

Ngoài ra, hàm lượng phycocyanin trong các sản phẩm thương mại phụ thuộc rất nhiều vào quá trình làm khô tảo xoắn. Một số công bố quốc tế đã báo cáo phương pháp làm khô có thể làm giảm 50% hàm lượng phycocyanin [11-13]. Nghiên cứu của Morist và cộng sự (2001) làm khô *A. platensis* theo phương pháp phun khô và đông khô thu được hàm lượng phycocyanin tương ứng là 1,4%, 4,0% [12]. Hoặc nghiên cứu của Oliveira và cộng sự (2008) xác định phycocyanin trong sinh khối tươi tự nhiên là 16%, sau làm khô chỉ còn là 10-12% tùy thuộc vào các phương pháp làm khô [13].

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả có thực hiện so sánh hàm lượng phycocyanin tách từ sinh khối khô và sinh khối tươi của sản phẩm thương mại Vinataor, và nhận thấy hàm lượng phycocyanin tách từ sinh khối khô mất đi một nửa so với từ sinh khối tươi (kết quả chi tiết không chỉ ra ở đây).

Kết luận

Nghiên cứu đã đánh giá độ tinh sạch, xác định hàm lượng phycocyanin trong các phân đoạn tinh sạch cũng như trong các sản phẩm thương mại bằng phương pháp điện di biến tính và đo phổ hấp thụ quang học UV-Vis. Tinh sạch theo 2 bước (đầu tiên là tủa với ammonium sulfate, rồi chạy cột LH20) cho mẫu có độ tinh sạch là 1,2, phù hợp với tiêu chuẩn sử dụng phycocyanin dùng cho các ngành nhuộm, thực phẩm. Trong các sản phẩm thương mại, sản phẩm Vinataor trong nước có hàm lượng phycocyanin là cao nhất, cao hơn cả sản phẩm ngoại nhập (của Nhật, Đức).

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ từ Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội thông qua Đề tài TN.16.26.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J.P. Dubacq, A.P. Phuc, J.C. Dillon (1995), "Nutritional Value of the Alga, *Spirulina*", *World Rev. Nutr. Diet*, **77**, pp.32-46.
- [2] P.D. Karkos, S.C. Leong, C.D. Karkos, N. Sivaji, D.A. Assimakopoulos (2011), "*Spirulina* in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2011**, pp.1-4.
- [3] M. Kuddus, P. Singh, G. Thomas and A. Al-Hazimi (2013), "Recent Developments in Production and Biotechnological Applications of C-Phycocyanin", *BioMed Research International*, **2013**, pp.1-9.
- [4] R. González, S. Rodríguez, C. Romay, O. Ancheta, A. González, J. Armesto, D. Ramirez, N. Merino (1999), "Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats", *Pharmacol Res.*, **39**(1), pp.55-59.
- [5] C. Romay, R. González, N. Ledón, D. Ramirez, V. Rimbau (2003), "C-phycocyanin: A biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects", *Curr. Protein Pept Sci.*, **4**(3), pp.207-216.
- [6] S.P. Kamble, R.B. Gaikar, R.B. Padalia and K.D. Shinde (2013), "Extraction and purification of C-phycocyanin from dry *Spirulina* powder and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **3**(08), pp.149-153.
- [7] R.G. Fisher, N.E. Woods, H.E. Fuchs and R.M. Sweet (1980), "Three-Dimensional Structures of C-Phycocyanin and B-Phycocerythrin at 5-Å Resolution", *The Journal of Biological Chemistry*, **255**(11), pp.5082-5089.
- [8] A. Patel, S. Mishra, R. Pawar, P.K. Ghosh (2005), "Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat", *Protein Expression and Purification*, **40**, pp.248-255.
- [9] D. Kumar, D.W. Dhar, S. Pabbi, N. Kumar, S. Walia (2014), "Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (CCC540)", *Indian J. Plant Physiol.*, **19**, pp.184-188.
- [10] W. Song, C. Zhao and S. Wang (2013), "A Large-Scale Preparation Method of High Purity C-Phycocyanin", *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, **3**(4), pp.294-297.
- [11] R.M.G.P. Sarada, M.G. Pillai, G.A. Ravishankar (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), pp.795-801.
- [12] A. Morist, J.L. Montesinos, J.A. Cusidó, F. Gòdia (2001), "Recovery and treatment of cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food", *Process Biochemistry*, **37**(5), pp.535-547.
- [13] E.G. Oliveira, G.S. Rosa, M.A. Moraes, L.A.A. Pinto (2008), "Phycocyanin content of *Spirulina platensis* dried in spouted bed and thin layer", *Journal of Food Process Engineering*, **31**, pp.34-50.