

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ MELANIN CỦA PHYCOCYANIN CHIẾT XUẤT TỪ TẢO *Arthrospira platensis*

Lại Đình Biên¹, Phạm Ngọc Tâm Khuê¹, Bùi Ngọc Cẩm Giang², Trần Thị Mai Chinh¹,
Lê Trần Trâm Anh¹, Nguyễn Thành Luân¹, Trang Hoàng Ngọc Ngân², Tô Minh Quân^{2,*}

¹Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh

*Email: tomquan@hcmus.edu.vn

Ngày nhận bài: 10/12/2024; Ngày nhận bài sửa: 06/02/2025; Ngày chấp nhận đăng: 03/03/2025

TÓM TẮT

Phycocyanin (CPC) là một protein có hoạt tính chống oxy hóa mạnh được chiết xuất từ tảo *Arthrospira platensis*. Nghiên cứu này đã tách chiết CPC theo tiêu chuẩn mỹ phẩm và đánh giá hiệu quả ức chế melanin của CPC trong điều kiện *in vitro*. Vách tế bào tảo được phá bằng phương pháp đông lạnh- rã đông trong dung dịch CaCl₂ 0,1% hoặc 1%, sau đó CPC được tinh sạch bằng phương pháp tủa muối ammonium sulfate (AS) để thu CPC theo chuẩn mỹ phẩm. Độ tinh tế bào của CPC được đánh giá trên dòng tế bào L-929 thông qua phương pháp đo MTT để ghi nhận giá trị IC₅₀ gây độc tế bào. Hiệu quả ức chế melanin được đánh giá trên dòng tế bào B16F10. Tế bào B16F10 được nuôi trong môi trường chứa CPC nồng độ 1-10 µg/mL trong 48 giờ. Nồng độ melanin được đánh giá bằng tỉ lệ OD₄₂₀/mg protein. Kết quả cho thấy quy trình tách chiết CPC tối ưu là kết hợp chu kỳ đông lạnh – rã đông trong CaCl₂ 1% và tinh sạch bằng AS lần 1 20%, lần 2 30%, độ tinh sạch thu được là 2,411 ± 0,090, nồng độ 3,84 ± 0,07 mg/mL. CPC không gây độc tế bào, giá trị IC₅₀ là 1405 ± 16 µg/mL. Kết quả thử nghiệm cho thấy CPC có khả năng ức chế sự hình thành melanin rõ rệt ở nồng độ 5 µg/mL, nồng độ melanin giảm từ 0,086 ± 0,012 xuống 0,022 ± 0,002. Kết luận: thu được CPC chuẩn mỹ phẩm và CPC ức chế sự hình thành melanin tốt nhất ở nồng độ 5 µg/mL.

Từ khóa: *Arthrospira platensis*, phycocyanin, melanin, B16F10, độc tính.

1. MỞ ĐẦU

Melanin là hắc tố đóng vai trò quan trọng trong việc tạo màu da, tóc và mắt của mỗi người [1]. Được sản xuất bởi các tế bào melanocyte, melanin đóng vai trò bảo vệ da khỏi tác hại của tia cực tím, gốc tự do [2, 3]. Quá trình tổng hợp melanin diễn ra tương đối phức tạp. Đầu tiên, tyrosine được chuyển đổi thành L-DOPA [4] dưới tác động của enzyme tyrosinase [5], sau đó L-DOPA bị oxy hoá thành DOPA quinone [6]. Tuy nhiên, sự sản xuất melanin quá mức có thể dẫn đến các vấn đề về da như tàn nhang [4], nám, đen da [7]. Vì vậy, nhiều loại sản phẩm ức chế melanin đã và đang rất được quan tâm.

Một trong các hướng nghiên cứu ức chế melanin chính là sử dụng các chất chống oxy hoá có nguồn gốc tự nhiên [8]. Trong đó, phycocyanin (CPC) là một sắc tố xanh lam được chiết xuất từ các loài tảo đang được quan tâm trong lĩnh vực làm đẹp tự nhiên [9, 10]. Tảo *Arthrospira platensis* (tên thông thường là tảo xoắn spirulina) là nguồn thu nhận phycocyanin chủ yếu trong tự nhiên [11, 12]. Trong tế bào tảo, CPC có khả năng hấp thụ ánh sáng và vận chuyển năng lượng tới trung tâm quang hợp. Ngoài ra, CPC là chất có khả năng trung hoà các chất tự do, giảm hiện tượng viêm [13]. Các nghiên cứu trên tế bào động vật cho thấy CPC có khả năng ức chế hoạt động của enzyme tyrosinase [14, 15], từ đó ức chế sự hình thành melanin từ tyrosine trong tế bào [16, 17]. Mặc dù các nghiên cứu về tác dụng làm trắng da của phycocyanin trên mô hình động vật vẫn còn hạn chế nhưng bằng chứng khoa học ban đầu cho thấy đây là một thành phần tự nhiên đầy tiềm năng trong ngành công nghiệp mỹ phẩm. Ở Việt Nam, nhiều nghiên cứu tách chiết CPC từ tảo *Arthrospira platensis* tuy nhiên nghiên cứu về khả năng ức chế melanin của CPC vẫn chưa được công bố. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi sẽ tiến hành tách chiết CPC từ tảo *Arthrospira platensis* đạt chuẩn mỹ phẩm (độ tinh sạch lớn hơn 1,5 [18]) và

khảo sát hiệu quả ức chế melanin của CPC này trên dòng tế bào melanoma B16F10. Từ đó tạo bước đệm cho những nghiên cứu về các sản phẩm dưỡng trắng da của Phycocyanin trong tương lai.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1.1. Tách chiết – tinh sạch phycocyanin từ tảo *Arthrospira platensis*

Tảo *Arthrospira platensis* được cung cấp bởi bộ môn Sinh lý học và Công nghệ Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. HCM.

Quy trình tách chiết Phycocyanin từ tảo Arthrospira platensis:

Bước 1: Phá vách tế bào tảo. Phá vách tế bào để giải phóng CPC vào môi trường. Phá vách được tiến hành bằng kết hợp đông lạnh-rã đông và CaCl_2 . Trong quá trình đông lạnh, dịch tế bào sẽ đông lại, hình thành tinh thể băng, gia tăng thể tích tế bào, sau đó tế bào co lại trong quá trình rã đông. Hiện tượng này làm vỡ vách tế bào [19]. Đồng thời, CaCl_2 liên kết vách tế bào, hỗ trợ quá trình tách chiết CPC và đóng vai trò là tách keo tụ, giúp làm tủa thành phần tạp sau ly tâm. Nồng độ CaCl_2 thường được sử dụng là 1% [20]. Trong nghiên cứu này, 2 nồng độ CaCl_2 được thử nghiệm là 0,1 và 1%.

Thao tác: Sinh khối tảo tươi được pha trong CaCl_2 0,1% hoặc 1% với tỷ lệ 10 g/40 mL (w/v) [9, 22]. Dịch tảo được đông lạnh ở $-20\text{ }^\circ\text{C}$ và rã đông trong 24 giờ. Sinh khối tảo được ly tâm với tốc độ 10000 rpm ở $4\text{ }^\circ\text{C}$ trong 10 phút [22], dịch phycocyanin màu xanh được thu lại ở mức tối đa (khoảng 35 mL). Cặn tảo được tiếp tục hoà trong 40 mL CaCl_2 0,1% hoặc 1%, lặp lại bước đông lạnh – rã đông để thu dịch 2 lần [21].

Bước 2: Tinh sạch phycocyanin bằng ammonium sulfate (AS). AS là chất tủa protein thường được sử dụng trong phòng thí nghiệm và ở quy mô công nghiệp. Các protein khác nhau sẽ kết tủa ở nồng độ AS khác nhau. Thao tác tủa CPC bước này được tiến hành theo quy trình Moraes & Kalil [23] với 2 lần tủa AS (lần 1 20%, lần 2 30%). Lần 1 để loại bỏ thành phần tạp kết tủa ở nồng độ AS thấp, lần 2 để tủa CPC.

+ Lần 1: bổ sung AS dạng muối để đạt nồng độ 15% hoặc 20% của 40 mL dịch chiết ở $4\text{ }^\circ\text{C}$ qua đêm, tránh sáng bằng giấy bạc. Sau đó dịch được ly tâm 10000 rpm ở $4\text{ }^\circ\text{C}$ trong 20 phút để loại bỏ cặn, thu dịch nổi để tiến hành ly tâm lần 2 (khoảng 35 mL).

+ Lần 2: bổ sung thêm AS vào dịch nổi thu được ở lần 1, nồng độ AS thêm là 20 - 35% tùy theo thí nghiệm để tủa phycocyanin bằng cách ly tâm 10000 rpm ở $4\text{ }^\circ\text{C}$ trong 20 phút, tránh sáng bằng giấy bạc.

Cặn phycocyanin thu được tiếp tục được hòa bằng đệm natri phosphate 0,01M và thẩm tách ở $4\text{ }^\circ\text{C}$ qua đêm (khoảng 14 giờ) trong đệm natri phosphate 0,01M. Do khối lượng của CPC nằm trong khoảng 30-131 kDa (tùy thuộc vào mức độ liên kết giữa các phân tử) [24] nên màng thẩm tách sử dụng là loại dùng để loại bỏ khối lượng 11-14 kDa. Trong quá trình thẩm tách, đệm được thay 3 lần.

Các thí nghiệm nồng độ AS bao gồm: 15-20, 15-25, 15-30, 20-25, 20-30, 20-35, trong đó số đầu tiên thể hiện nồng độ AS lần 1 và số thứ 2 thể hiện nồng độ AS thêm lần 2. Sau thẩm tách, hàm lượng CPC và độ tinh sạch EP được tính theo công thức sau:

Hàm lượng phycocyanin [24]:

$$CPC = \frac{(OD_{620} - 0,474 \times (OD_{650}))}{5,34} \times d$$

Độ tinh sạch [24]: $EP = \frac{OD_{620}}{OD_{280}}$

Với d: Độ pha loãng, OD_{620} , OD_{650} , OD_{280} là giá trị hấp thụ ở bước sóng 620, 650, 280 nm. Bước sóng 620 nm, 650 nm, 280 nm được đo bằng máy đọc đĩa 96 giếng Multiskhan SkyHigh (ThermoScientific), thể tích mỗi giếng là 200 μL /giếng. Đối chứng trắng: giếng bổ sung natri phosphate 0,01M.

2.1.2. Đánh giá độc tính của phycocyanin tách chiết trên tế bào bằng phương pháp sử dụng MTT

Tế bào nguyên bào sợi L-929 là một trong những dòng thường được sử dụng để đánh giá độc tính tế bào đối với vật liệu sinh học hoặc dịch chiết. Thí nghiệm độc tính tế bào cần xác định giá trị IC_{50} .

Giá trị IC₅₀ của CPC đối với dòng tế bào bình thường thường cao hơn 1 mg/mL [25] nên khoảng nghiên cứu được chia thành 100; 500; 1000; 1500; 2000 µg/mL.

Tế bào nguyên bào sợi L-929 [26] được nuôi trong môi trường nuôi cấy (MTNC) bao gồm DMEM/F12, 10% FBS và 1% kháng sinh ở 37 °C, 5% CO₂. Thí nghiệm đánh giá độc tính CPC được chia thành các nhóm thí nghiệm như sau, thí nghiệm được lặp lại 5 lần, mỗi lần 3 giếng.

Nhóm đối chứng

Đối chứng âm (ĐC âm): tế bào L-929 nuôi trong MTNC.

Đối chứng dương (ĐC dương): tế bào nuôi trong MTNC bổ sung 10% DMSO (gây chết tế bào khoảng 80-90%).

Nhóm thí nghiệm (TN): Môi trường nuôi cấy L-929 bổ sung CPC (100; 500; 1000; 1500; 2000 µg/mL).

Thao tác: Tế bào L-929 [27] được cấy ra đĩa 96 giếng với mật độ 1×10^4 tế bào/mL, bổ sung môi trường DMEM/F12 + 10% FBS + 1% kháng sinh và ủ ở 37 °C, 5% CO₂. Sau 24 giờ, môi trường cũ được loại bỏ, bổ sung môi trường mới theo bố trí thí nghiệm bên trên. Sau 48 giờ, tiến hành đánh giá MTT. Phương pháp MTT như sau: hút bỏ môi trường cũ, bổ sung môi trường DMEM chứa 0,5 mg/mL, ủ 3 tiếng ở 37 °C, 5% CO₂. Sau 3 giờ, dung môi DMSO được sử dụng để hoà tan tinh thể formazan và đem đo OD ở bước sóng 590 nm (OD₅₉₀) [28].

Công thức tính tỷ lệ tế bào sống:

$$\% \text{ tế bào sống} = \frac{OD_{590} \text{ TN}}{OD_{590} \text{ ĐC âm}} \times 100$$

Trong đó: OD₅₉₀: Giá trị đo bước sóng 590 nm được đọc trên đĩa 96 giếng bằng máy Multiskan SkyHigh (ThermoScientific), thể tích mỗi giếng là 200 µl/giếng. Đối chứng trắng là giếng bổ sung DMSO.

Sử dụng phần mềm GraphPad Prism 9.0 để vẽ đường cong tỉ lệ sống tế bào và xác định giá trị IC₅₀ của CPC.

2.1.3. Đánh giá hiệu quả ức chế melanin

Dòng tế bào B16F10 là dòng melanoma được phân lập từ da chuột C57BL/6J. Tế bào B16F10 có khả năng tăng sinh và tổng hợp melanin tốt và thường được sử dụng làm mô hình tế bào để nghiên cứu về melanin [29].

Dòng tế bào B16F10 được tăng sinh trong DMEM + 10% FBS + 1% kháng sinh, 5% CO₂ và 37 °C (MTNC). Sau 24 giờ, MTNC cũ được thay bằng:

- MTNC mới chứa CPC nồng độ 1, 5, 10 µg/mL (nhóm thí nghiệm, TN) (5 giếng/nhóm).
- MTNC mới không chứa CPC (nhóm đối chứng, ĐC) (5 giếng/nhóm).

Sau 48 giờ nuôi cấy liên tục, tế bào được thu nhận bằng trypsin/EDTA 0,25% [14] và đánh giá hàm lượng melanin.

Công thức tính [30]:

Hàm lượng melanin = OD₄₂₀/mg protein

Trong đó: Bước sóng 420 nm là bước sóng hấp thụ lớn nhất của melanin, giá trị OD₄₂₀ của mẫu càng cao thì nồng độ melanin càng lớn; mg protein là khối lượng protein của mẫu tính theo miligram được xác định bằng phương pháp Bradford.

Thao tác đo OD₄₂₀: Bổ sung NaOH 2N vào eppendorf chứa cặn tế bào và ủ ở 80 °C trong 2 giờ. Ly tâm với tốc độ 10000 rpm trong 10 phút và thu dịch nổi, sau đó đo OD bước sóng 420 nm [31] bằng máy đo đĩa 96 giếng Multiskan SkyHigh (ThermoScientific), thể tích mỗi giếng là 200 µL/giếng. Đối chứng trắng là giếng chứa NaOH 2N.

Thao tác định lượng protein bằng phương pháp Bradford: Bổ sung Tris X100 1% vào eppendorf có chứa cặn tế bào, kết hợp với sóng siêu âm để ly trích protein trong 3 phút. Sau đó, dịch protein được ly tâm với tốc độ 10000 rpm trong 10 phút để thu dịch nổi [30]. Nồng độ protein được định lượng bằng phương pháp Bradford (Optiblot Bradford Reagent). Thao tác tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Abcam). Sử dụng BSA (Sigma) làm đường chuẩn để định lượng protein. Đường

chuẩn được xử lý bằng GraphPad Prism: $y = 0,0004x + 0,0037$ với $R^2 = 0,9911$ trong khoảng BSA 100 - 500 $\mu\text{g/mL}$.

Dựa vào giá trị OD_{590} của đường chuẩn và mẫu để tính hàm lượng protein mẫu.

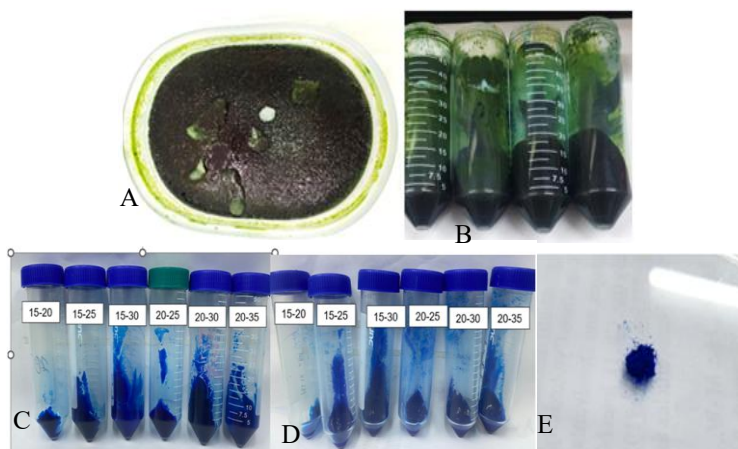
2.2. Phương pháp xử lý thống kê

Thí nghiệm được lặp lại 5 lần, mỗi lần lặp lại 3 giếng/mẫu và kết quả thu nhận được sau đó biểu thị dưới dạng trung bình \pm sai số chuẩn. Phân tích thống kê để so sánh các nhóm thí nghiệm được thực hiện với dữ liệu sử dụng t-test và one-way ANOVA và giá trị $p < 0,05$ có ý nghĩa thống kê.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách chiết phycocyanin từ tảo xoắn Spirulina

Kết quả tách chiết và tinh sạch CPC được thể hiện trong Hình 1, 2 và Bảng 1. Hình 1 thể hiện hình ảnh trong tất cả các bước trong quy trình: đông lạnh rồi đông trong dung dịch CaCl_2 , tủa CPC bằng AS lần 2 và đông khô CPC. Hình 2 thể hiện độ tinh sạch và nồng độ CPC thu nhận bằng nhiều quy trình tủa AS khác nhau. Bảng 1 thể hiện độ tinh sạch của CPC khi được phá vách trong 2 nồng độ CaCl_2 .



Hình 1. Kết quả thu nhận CPC. A – tảo sau khi đông lạnh – rã đông; B – xác tảo sau khi ly tâm lần 1; C – CPC thu nhận bằng CaCl_2 1% sau khi tủa với AS lần 2; D – CPC thu nhận bằng CaCl_2 0,1% sau khi tủa với AS lần 2; E: CPC bột đông khô

Bảng 1. Kết quả độ tinh sạch EP của CPC sau các bước phá vách tế bào bằng CaCl_2 và tủa AS lần 1

	Phá vách	Tủa AS lần 1 15%	Tủa AS lần 1 20%
CaCl_2 1%	$0,91 \pm 0,11^a$	$1,25 \pm 0,13^a$	$1,47 \pm 0,19^a$
CaCl_2 0,1%	$0,62 \pm 0,16^b$	$1,07 \pm 0,09^b$	$1,13 \pm 0,07^b$

(^{a, b}: sự khác biệt về mặt thống kê trong cùng cột, $p < 0,05$, $n=5$, mỗi lần đo 3 lần)

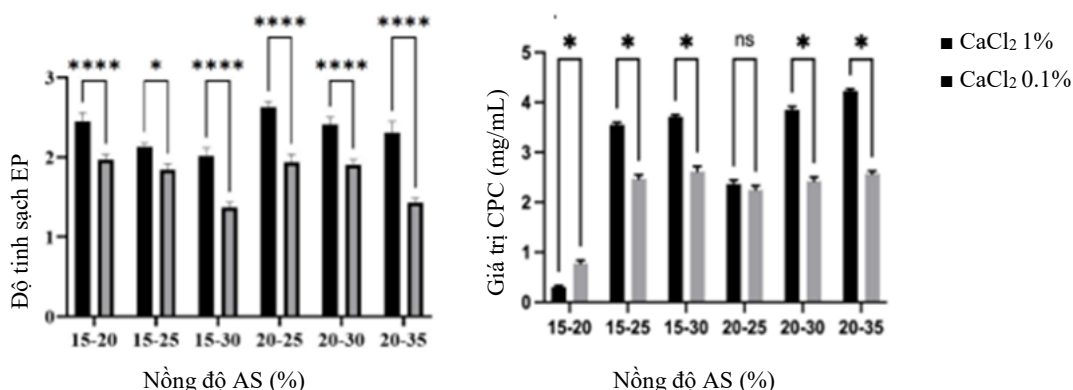
Quá trình tách chiết CPC bao gồm các bước: phá vách tế bào (sử dụng CaCl_2 0,1% hoặc 1%) để thu dịch CPC và bước tinh sạch CPC bằng AS. Nồng độ CaCl_2 phù hợp giúp thu được CPC với độ tinh sạch cao [32]. Sau khi phá vách tế bào bằng phương pháp đông lạnh – rã đông trong dung dịch CaCl_2 , kết quả ly tâm thu được dịch có màu xanh dương đậm (màu của CPC) và xác tảo lắng dưới đáy ống màu xanh lục. Xác tảo sau khi trải qua chu kỳ đông lạnh rã đông và ly tâm, màu xanh dương của CPC giảm dần theo chu kỳ đông lạnh rã đông. Sau 3 chu kỳ, dịch ly tâm chỉ còn màu xanh nhạt, hàm lượng CPC đo được không đáng kể nên tổng số chu kỳ đông lạnh-rã đông được xác định là 3. Sau đó, dịch ly tâm được trộn lại và đo OD để tính độ tinh sạch và nồng độ CPC. Kết quả thu được được thể hiện trong Hình 1 và Bảng 1.

Kết quả cho thấy khi phá vách tế bào bằng CaCl_2 1% cho hiệu quả tốt hơn so với nồng độ 0,1%: độ tinh sạch tốt hơn (khác biệt về mặt thống kê) và nồng độ CPC thu được bởi 2 dung dịch tương đương nhau (Bảng 1). Khi so sánh EP của dịch CPC cùng nồng độ AS lần 1, kết quả cho thấy dịch CPC thu

được do CaCl_2 1% có EP cao hơn so với 0,1%. Kết quả này có thể giải thích là do CaCl_2 có khả năng liên kết với vách tế bào tảo, làm thuận tiện quá trình tách chiết CPC. Đồng thời, CaCl_2 cũng là chất keo tụ nên có khả năng gây kết tủa thành phần protein [20]. Độ tinh sạch EP ở bước phá vách tương tự như kết quả Konstantinos Pispas và cộng sự [20] ($0,92 \pm 0,14$).

Tiếp theo, dịch CPC thu được tiếp tục tinh sạch bằng phương pháp AS. Khi ở nồng độ cao, AS cạnh tranh với protein để liên kết với phân tử nước. Điều này làm cho protein bị loại phân tử nước [33], protein trở nên ít hoà tan và kết tủa [34]. Đây là phương pháp tủa protein thường được sử dụng ở quy mô phòng thí nghiệm và công nghiệp. Nồng độ tối ưu để tủa phụ thuộc vào cấu trúc từng loại protein, nhiệt độ, pH [35]. Nồng độ AS tủa CPC thông thường nằm trong khoảng 50-65%. Tuy nhiên, trong dung dịch có nhiều tạp chất có nồng độ tủa AS thấp hơn CPC (sẽ tủa ở nồng độ AS thấp) và nhiều tạp chất có nồng độ tủa AS cao hơn CPC. Do đó, trong nghiên cứu này, AS được sử dụng theo 2 bước. Bước 1, AS được bổ sung vào ở nồng độ thấp (15-20%) để loại thành phần kết tủa ở nồng độ AS thấp. Bước 2, AS được bổ sung thêm để tăng nồng độ vào dịch CPC để tủa CPC, giúp phân tách CPC với các thành phần tạp nhiễm có nồng độ tủa AS cao. Đối với bước 1, ở nồng độ AS 15%, sau khi ly tâm thu được cặn tủa màu trắng, không có xuất hiện màu xanh dương CPC, trong khi với AS 20%, cặn ly tâm xuất hiện một ít mảng màu xanh. Kết quả EP cho thấy dịch sau ly tâm của AS 20% có EP cao hơn so với 15% (Bảng 1). Điều này là do EP 20% giúp tủa nhiều thành phần tạp hơn 15%, tuy nhiên ở nồng độ 20% bắt đầu xuất hiện cặn màu xanh CPC nên 20% là nồng độ tối đa để sử dụng cho bước AS lần 1.

Đối với CPC, độ tinh sạch thường được chia thành các nhóm sau: thực phẩm, mỹ phẩm, hoá chất và chất phân tích với giá trị EP lần lượt lớn hơn các mốc sau: 0,7, 1,5, 3,9, và 4,0. Do đó CPC trong nghiên cứu được tách chiết đạt chuẩn mỹ phẩm với $\text{EP} = 2,41 \pm 0,09$.



Hình 2. Kết quả tinh sạch C-PC sau khi tủa muối AS

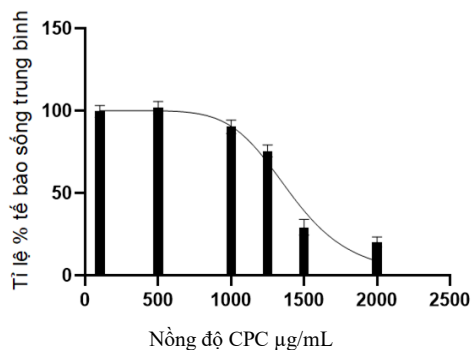
Trái: độ tinh sạch của CPC; Phải: nồng độ CPC

Để làm rõ hơn kết quả, dịch sau ly tâm AS lần 1 ở các thí nghiệm được bổ sung tiếp AS để kết tủa CPC. CPC kết tủa sau đó được thẩm tách để loại bỏ muối AS (hình 2). Kết quả thể hiện cho thấy độ tinh sạch EP tăng lên đáng kể sau khi bước tủa AS lần 2 và thẩm tách. Kết quả cho thấy trong cùng 1 thí nghiệm EP mẫu CaCl_2 1% cao hơn so với 0,1% (khác biệt về mặt thống kê, $p < 0,05$). Giá trị EP cao nhất ở các mẫu phá vách bằng CaCl_2 1% 15-20 ($2,45 \pm 0,11$), 20-25 ($2,52 \pm 0,10$), 20-30 ($2,41 \pm 0,09$) và 20-35 ($2,31 \pm 0,14$) (không khác biệt về thống kê), tuy nhiên khi so sánh nồng độ CPC ở các mẫu thì thấy rằng CPC trong mẫu 15-20 ($0,31 \pm 0,02$ mg/mL) và 20-25 ($2,37 \pm 0,08$ mg/mL) thấp hơn so với mẫu 20-30 ($3,95 \pm 0,07$ mg/mL) và 20-35 ($4,02 \pm 0,06$ mg/mL) ($p < 0,05$). Kết quả này cho thấy 20-30 và 20-35 cho kết quả tốt nhất trong thí nghiệm: độ tinh sạch cao nhất và nồng độ CPC thu được tốt nhất. Quy trình tủa AS được thực hiện dựa theo quy trình của Moraes & Kalil [23]. Tuy nhiên kết quả thu nhận được ở nồng độ 20-30 cao hơn so với kết quả của Caroline và cộng sự ($\text{EP}=1,5$ sau bước tủa và $\text{EP} = 2,1$ sau bước thẩm tách). Kết quả này có thể giải thích là do dịch CPC trong nghiên cứu này được phá vách bằng CaCl_2 , có độ tinh sạch EP ban đầu cao hơn so với tác giả và sinh khối sử dụng là sinh khối tươi so với sinh khối khô của tác giả.

3.2. Đánh giá độc tính của phycocyanin tách chiết trên tế bào L-929 bằng phương pháp sử dụng MTT

Giá trị IC_{50} là nồng độ CPC gây chết 50% tế bào sau 48 giờ nuôi cấy. Giá trị IC_{50} càng cao thì CPC càng an toàn đối với tế bào. Dựa theo Viện Ung thư Hoa kỳ (American National Cancer Institute,

NCI), dịch chiết được xem là độc khi IC₅₀ thấp hơn 20 µg/mL [37, 38, 39]. Dựa vào hình 3 cho thấy, khi thử nghiệm độc tính phycocyanin MTT trên tế bào L-929 thông qua tỷ lệ sống cho thấy CPC không có độc tính trong dãy nồng độ dưới 500 µg/mL, tỷ lệ tế bào sống luôn trên 100%. Tuy nhiên, khi nồng độ CPC vượt quá 1000 µg/mL, tỷ lệ sống của tế bào bắt đầu giảm dần, cho thấy dấu hiệu độc tính. Giá trị IC₅₀ đạt 1405 ± 16 µg/mL, dựa vào NCI cho thấy CPC được coi là không gây độc cho tế bào. Kết quả này cũng tương tự kết quả của Safira Chairani Dimarti và cộng sự (IC₅₀ = 1650 µg/mL) [39]. Điều này có ý nghĩa CPC có tính an toàn cao đối với mô hình động vật và khi sử dụng trên người.



Hình 3. Kết quả đánh giá độc tính CPC bằng MTT trên dòng tế bào L-929

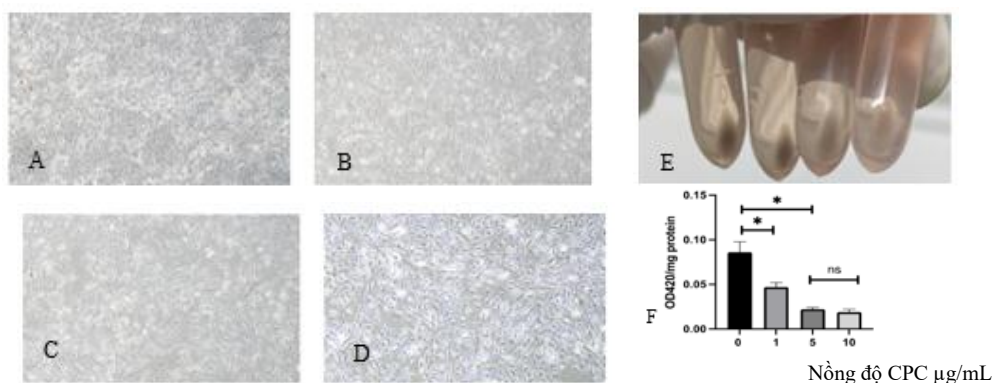
3.3. Đánh giá hiệu quả ức chế melanin

Kết quả đánh giá hiệu quả ức chế melanin được thể hiện trong Hình 4. Hình A-D là tế bào B16F10 nuôi trong môi trường chứa CPC nồng độ 0 (đối chứng), 1, 5, 10 µg/mL trong 2 ngày. Hình E là tế bào B16F10 sau khi ly tâm, tế bào lắng thành cụm dưới đáy eppendorf, màu đen của cụm tế bào giảm dần khi nồng độ CPC tăng dần. Hình F là kết quả đo hàm lượng melanin.

Tế bào B16F10 là tế bào melanoma có khả năng tổng hợp melanin ổn định trong quá trình tăng sinh trong MTNC ở 37 °C, 5% CO₂ và thường được sử dụng làm nguồn tế bào trong nghiên cứu về sinh tổng hợp melanin [40, 41]. Tác giả Andrea T Borchers cho rằng, các hợp chất tự nhiên từ thực vật và các nguồn tự nhiên trong điều trị ung thư mang không độc hại cho tế bào thường, đây là hướng nghiên cứu đầy hứa hẹn [36]. Tác giả Li-Chen Wu và cộng sự đã chứng minh CPC làm gia tăng con đường tín hiệu ERK (extracellular signal-regulated protein kinases), ức chế con đường tín hiệu p38 MAPK (mitogen-activated protein kinases) và kích thích sự phân hủy MITF (microphthalmia-associated transcription factor), từ đó ức chế tổng hợp enzyme tyrosinase (enzyme có vai trò quan trọng trong quá trình tổng hợp melanin) [14], do đó lượng melanin giảm đi. Kết quả là CPC ức chế hoạt động của enzyme tyrosinase của tế bào B16F10 giảm 75,7% ở nồng độ 50 µg/mL.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng ức chế tổng hợp melanin của CPC chuẩn mỹ phẩm ở nồng độ thấp hơn 50 µg/mL để xác định nồng độ hiệu quả cho quá trình ức chế melanin. Trong quá trình khảo sát sơ bộ, kết quả quan sát dưới kính hiển vi hiệu quả ức chế quá trình tổng hợp melanin trong tế bào B16F10 của CPC gia tăng trong khoảng nồng độ 1-10 µg/mL và không thay đổi ở nồng độ cao hơn. Do đó trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành với nồng độ CPC 1, 5, 10 µg/mL.

Tế bào B16F10 được nuôi trong môi trường bổ sung CPC nồng độ 0 (đối chứng), 1, 5, 10 µg/mL. Kết quả quan sát tế bào trên đĩa nuôi cho thấy sự biểu hiện melanin giảm dần theo khi tăng dần nồng độ CPC từ 0 tới 10 µg/mL (Hình 4. A-D). Sau khi thu tế bào, cụm tế bào có màu đen giảm dần từ nồng độ từ 0-10 µg/mL (Hình 4.E), cụm màu nhạt nhất ở nồng độ 5 và 10 µg/mL.



Hình 4. Tế bào B16F10 sau khi nuôi cấy trong môi trường chứa phycocyanin. A: Nhóm đối chứng. B, C, D: xử lý CPC 1, 5, 10 µg/mL. E: cụm tế bào sau khi ly tâm, từ trái qua: tế bào B16F10 xử lý với CPC 0 (ĐC), 1, 5, 10 µg/mL

Bảng 2. Sự biểu hiện melanin tương đối thể hiện qua tỷ lệ OD 420/mg protein

CPC 0 µg/mL	CPC 1 µg/mL	CPC 5 µg/mL	CPC 10 µg/mL
0,086 ± 0,012 ^a	0,047 ± 0,005 ^b	0,022 ± 0,002 ^c	0,019 ± 0,003 ^c

(^{a, b, c, d}: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% trong cùng 1 cột, $p < 0,05$, $n = 5$, mỗi lần đo 3 lần)

Kết quả đánh giá nồng độ tương đối melanin cho thấy nồng độ melanin giảm dần khi tiếp xúc với CPC. Đối với tế bào nuôi trong nồng độ 1 µg/mL, lượng melanin giảm gần 46% so với melanin tế bào trong môi trường không có CPC (0,086 ± 0,012 vs 0,047 ± 0,005). Khi CPC tăng từ 1 tới 5 µg/mL, lượng melanin giảm dần ($p < 0,05$) và duy trì ở khi tăng nồng độ CPC 5 tới 10 µg/mL (Bảng 2, Hình 4). Kết quả này cho thấy lượng melanin tổng trong B16F10 giảm sau 2 ngày nuôi cấy, trong đó, CPC nồng độ 1 µg/mL bắt đầu thể hiện hiệu quả ức chế melanin, hiệu quả này gia tăng khi nồng độ CPC tăng lên 5 µg/mL và không đổi ở nồng độ 10 µg/mL. Kết quả này cho thấy CPC 5 µg/mL là nồng độ tối ưu sử dụng trong nghiên cứu này.

4. KẾT LUẬN

Dựa trên các kết quả thu được, nghiên cứu đưa ra các kết luận như sau:

- Tách chiết được phycocyanin từ tảo *Arthrospira platensis* với độ tinh sạch đạt chuẩn mỹ phẩm (EP = 2,4) bằng cách sử dụng CaCl₂ 1% hỗ trợ quá trình phá vách tế bào và nồng độ ammonium sulfate 20% lần 1 và 30% lần 2 để tủa phycocyanin.
- CPC có tính an toàn cao và ức chế sự hình thành melanin trên tế bào B16F10 ở nồng độ tối ưu 5 µg/mL, lượng melanin giảm rõ rệt còn 1/4 so với mẫu đối chứng.

Kết quả này cho thấy phycocyanin là protein có tính an toàn cao và có tiềm năng sử dụng làm trắng da trong lĩnh vực mỹ phẩm.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này do Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh bảo trợ và cấp kinh phí theo Hợp đồng số 28/HĐ-DCT ngày 09 tháng 01 năm 2024.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] V. J. Hearing, "Determination of melanin synthetic pathways," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 131, no. 3, pp. E8–E11, 2011, doi: <https://doi.org/10.1038/skinbio.2011.4>.
- [2] K. A. Cayce, A. J. McMichael, and S. R. Feldman, "Hyperpigmentation: An overview of the common afflictions," *Journal of Dermatology Nursing*, vol. 16, no. 5, p. 401, 2004.
- [3] R. M. Slominski, T. Sarna, P. M. Płonka, C. Raman, A. A. Brożyna, and A. T. Slominski, "Melanoma, melanin, and melanogenesis: The yin and yang relationship," *Frontiers in Oncology*, vol. 12, pp. 1–18, 2022, doi: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.842496>.

- [4] M. Istrate, B. Vlaicu, M. Poenaru, M. Hasbei-Popa, M. C. Salavat, and D. A. Ilescu, "Photoprotection role of melanin in the human retinal pigment epithelium: Imaging techniques for retinal melanin," *Romanian Journal of Ophthalmology*, vol. 64, no. 2, pp. 100–104, 2020, doi: <https://doi.org/10.22336/rjo.2020.20>.
- [5] T. Pillaiyar, M. Manickam, and V. Namasivayam, "Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors," *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 32, no. 1, pp. 403–425, 2017, doi: <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1256882>.
- [6] K. H. Wang, "Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 106, no. 3, pp. 353–359, 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.01.010>
- [7] M. M. de A. Alchorne, K. da C. Conceição, L. L. Barraza, and M. A. M. M. de Abreu, "Dermatology in black skin," *Anais Brasileiros de Dermatologia*, vol. 99, no. 3, pp. 327–341, 2024, <https://doi.org/10.1016/j.abd.2023.10.001>.
- [8] S. S. Kose and A. Oncel, "Design of melanogenesis regulatory peptides derived from phycocyanin of the microalgae *Spirulina platensis*," *Peptides*, vol. 152, Art. no. 170783, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2022.170783>
- [9] D. Pez Jaeschke, I. Rocha Teixeira, L. Damasceno Ferreira Marczak, and G. Domenechini Mercali, "Phycocyanin from *Spirulina*: A review of extraction methods and stability," *Food Research International*, vol. 143, Art. no. 110314, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110314>
- [10] M. G. De Moraes, D. Da Fontoura Prates, J. B. Moreira, J. H. Duarte, and J. A. V. Costa, "Phycocyanin from microalgae: Properties, extraction and purification, with some recent applications," *Industrial Biotechnology*, vol. 14, no. 1, pp. 30–37, 2018, doi: <https://doi.org/10.1089/ind.2017.0009>
- [11] B. R. Sadewo, N. Dewayanto, Rochmadi, A. S. Juniawan, and A. Budiman, "Optimization study of phycocyanin ultrasound-assisted extraction process from *Spirulina (Arthrospira platensis)* using different solvent," *Egyptian Journal of Chemistry*, vol. 67, no. 7, pp. 589–608, 2024. [Online]. Available: <https://www.nutrafoods.eu/index.php/nutra/article/download/72/66/138>
- [12] S. Braune, A. Krüger-Genge, S. Kammerer, F. Jung, and J.-H. Küpper, "Phycocyanin from *Arthrospira platensis* as potential anti-cancer drug: Review of in vitro and in vivo studies," *Life*, 2021, doi: <https://doi.org/10.3390/life11020091>.
- [13] Q. Liu, Y. Huang, R. Zhang, T. Cai, and Y. Cai, "Medical application of *Spirulina platensis* derived C-phycocyanin," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2016, 2016, doi: <https://doi.org/10.1155/2016/7803846>
- [14] L. C. Wu, Y. Y. Lin, S. Y. Yang, Y. T. Weng, and Y. T. Tsai, "Antimelanogenic effect of C-phycocyanin through modulation of tyrosinase expression by upregulation of ERK and downregulation of p38 MAPK signaling pathways," *Journal of Biomedical Science*, vol. 18, no. 1, Art. no. 74, 2011, doi: <https://doi.org/10.1186/1423-0127-18-74>.
- [15] A. R. Muruganandam, S. Venkatasubramanian, S. A. Jagmag, and V. Veerichetty, "Antityrosinase activity of phycocyanin and cream formulation for hyperpigmentation," *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, vol. 1291, no. 1, Art. no. 012039, 2023, doi: <https://doi.org/10.1088/1757-899x/1291/1/012039>.
- [16] J. F. Fabre, N. U. F. Niangoran, C. Gaignard, D. Buso, Z. Mouloungui, and R. Valentin, "Extraction, purification and stability of C-phycocyanin from *Arthrospira platensis*," *European Food Research and Technology*, vol. 248, no. 6, pp. 1583–1599, 2022, doi: <https://doi.org/10.1007/s00217-022-03987-z>.
- [17] E. G. Oliveira, G. S. Rosa, M. A. Moraes, and L. A. A. Pinto, "Phycocyanin content of *Spirulina platensis* dried in spouted bed and thin layer," *Journal of Food Process Engineering*, vol. 31, no. 1, pp. 34–50, 2008, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2007.00143.x>.
- [18] R. Fernandes *et al.*, "Exploring the benefits of phycocyanin: From *Spirulina* cultivation to its widespread applications," *Pharmaceuticals*, vol. 16, no. 4, 2023, doi: <https://doi.org/10.3390/ph16040592>

- [19] H. A. Tavanandi, R. Mittal, J. Chandrasekhar, and K. S. M. S. Raghavarao, "Simple and efficient method for extraction of C-phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*," *Algal Research*, vol. 31, pp. 239–251, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.008>
- [20] K. Pispas *et al.*, "Optimizing phycocyanin extraction from cyanobacterial biomass: A comparative study of freeze–thaw cycling with various solvents," *Marine Drugs*, vol. 22, no. 6, 2024, doi: <https://doi.org/10.3390/md22060246>
- [21] S. P. Kamble, R. B. Gaikar, R. B. Padalia, and K. D. Shinde, "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*, vol. 3, no. 8, pp. 149–153, 2013. [Online]. Available: https://japsonline.com/admin/php/uploads/1013_pdf.pdf
- [22] M. Izadi and M. Fazilati, "Extraction and purification of phycocyanin from *Spirulina platensis* and evaluating its antioxidant and anti-inflammatory activity," *Asian Journal of Green Chemistry*, vol. 2, no. 4, pp. 364–379, 2018, doi: <https://doi.org/10.22034/AJGC.2018.63597>
- [23] C. C. Moraes and S. J. Kalil, "Strategy for a protein purification design using C-phycocyanin extract," *Bioresource Technology*, vol. 100, no. 21, pp. 5312–5317, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.05.026>
- [24] A. Patel, S. Mishra, R. Pawar, and P. K. Ghosh, "Purification and characterization of C-phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat," *Protein Expression and Purification*, vol. 40, no. 2, pp. 248–255, 2005, doi: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.10.028>
- [25] N. T. Hamdan, B. A. A. A. Jwad, and S. A. Jasim, "Synergistic anticancer effects of phycocyanin and *Citrullus colocynthis* extract against WiDr, HCT-15 and HCT-116 colon cancer cell lines," *Gene Reports*, vol. 22, Art. no. 100972, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100972>
- [26] G. Liu, "Targeted antitumor mechanism of C-PC/CMC-CD55sp nanospheres in HeLa cervical cancer cells," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 11, Art. no. 906, 2020, doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00906>
- [27] C. C. Romay, R. Delgado, D. Ramirez, and R. Gonzalez, "Effects of phycocyanin extract on tumor necrosis factor- α and nitrite levels in serum of mice treated with endotoxin," *Arzneimittelforschung*, vol. 51, no. 9, pp. 733–736, 2001, doi: <https://doi.org/10.1055/s-0031-1300107>
- [28] I. Mitra, "Benzimidazole based Pt(II) complexes with better normal cell viability than cisplatin: Synthesis, substitution behavior, cytotoxicity, DNA binding and DFT study," *RSC Advances*, vol. 6, no. 80, pp. 76600–76613, 2016, doi: <https://doi.org/10.1039/c6ra17788c>
- [29] S. Chung, G. J. Lim, and J. Y. Lee, "Quantitative analysis of melanin content in a three-dimensional melanoma cell culture," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, pp. 1–9, 2019, doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37055-y>
- [30] R. M. Heriniaina, J. Dong, P. K. Kalavagunta, H. L. Wu, D. S. Yan, and J. Shang, "Effects of six compounds with different chemical structures on melanogenesis," *Chinese Journal of Natural Medicines*, vol. 16, no. 10, pp. 766–773, 2018, doi: [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(18\)30116-X](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(18)30116-X)
- [31] H. Cho, "Feruloylserotonin inhibits hydrogen peroxide-induced melanogenesis and apoptosis in B16F10 and SK-Mel-2 melanoma cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 491, no. 4, pp. 973–979, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.07.158>
- [32] J. Kuhnholz, T. Glockow, V. Siebecke, A. T. Le, L. D. Tran, and A. Noke, "Comparison of different methods for extraction of phycocyanin from the cyanobacterium *Arthrospira maxima* (*Spirulina*)," *Journal of Applied Phycology*, vol. 36, no. 4, pp. 1725–1735, 2024, doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-024-03224-y>
- [33] K. D. Athiyappan, W. Routray, and B. Paramasivan, "Phycocyanin from *Spirulina*: A comprehensive review on cultivation, extraction, purification, and its application in food and allied industries," *Food and Humanity*, vol. 2, no. 1, Art. no. 100235, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fooHum.2024.100235>
- [34] K. M. Minkova, A. A. Tchernov, M. I. Tchorbadjieva, S. T. Fournadjieva, R. E. Antova, and M. C.

- Busheva, "Purification of C-phycoyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*," *Journal of Biotechnology*, vol. 102, no. 1, pp. 55–59, 2003, doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00004-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00004-X)
- [35] Y. M. Zhang and F. Chen, "A simple method for efficient separation and purification of C-phycoyanin and allophycoyanin from *Spirulina platensis*," *Biotechnology Techniques*, vol. 13, pp. 601–603, 1999, doi: <https://doi.org/10.1023/A:1008914405302>
- [36] A. T. Borchers, "Natural compounds in cancer therapy—Promising nontoxic antitumor agents from plants & other natural sources," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 75, no. 5, p. 955, 2002, doi: <https://doi.org/10.1093/ajcn/75.5.955a>
- [37] N. N. Zulkipli, "The cytotoxicity effect and identification of bioactive compounds of *Prismatomeris glabra* crude leaf extracts against breast cancer cells," *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, vol. 13, no. 1, 2024, doi: <https://doi.org/10.1186/s43088-024-00490-0>
- [38] R. I. Geran, N. H. Greenberg, and M. M. MacDonald, *Protocols for Screening Chemical Agents and Natural Products Against Animal Tumors and Other Biological Systems*, 1972, pp. 1–103.
- [39] S. C. Dimarti, N. Susilaningih, and R. Yuniati, "Phycocyanin from *Spirulina platensis* induces cytotoxicity and apoptosis in T47D cells," *Biosaintifika*, vol. 12, no. 1, pp. 28–34, 2020. [Online]. Available: <https://www.semanticscholar.org/reader/6252476a9f6f15a396c742daa968031d68c8b6d0>.
- [40] M. Akaberi, S. A. Emami, M. Vatani, and Z. Tayarani-Najaran, "Evaluation of antioxidant and anti-melanogenic activity of different extracts of aerial parts of *N. sintonensis* in murine melanoma B16F10 cells," *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 17, no. 1, pp. 225–235, 2018.
- [41] M. R. Choi, "Echinochrome A inhibits melanogenesis in B16F10 cells by downregulating CREB signaling," *Marine Drugs*, vol. 20, no. 9, pp. 1–12, 2022, doi: <https://doi.org/10.3390/md20090555>.

ABSTRACT

EVALUATION OF ANTI-MELANOGENIC ACTIVITY OF PHYCOCYANIN EXTRACTED FROM *Arthrospira platensis*

Lai Dinh Bien¹, Pham Ngoc Tam Khue¹, Bui Ngoc Cam Giang², Tran Thi Mai Chinh¹,
Le Tran Tram Anh¹, Nguyen Thanh Luan¹, Trang Hoang Ngoc Ngan², To Minh Quan^{2,*}

¹*Ho Chi Minh City University of Industry and Trade*

²*University Of Science, Vietnam National University of Ho Chi Minh City*

*Email: tomquan@hcmus.edu.vn

Phycocyanin (CPC) is a powerful antioxidant protein extracted from *Arthrospira platensis*. This study extracted cosmetics-grade CPC from *Arthrospira platensis* and determined its melanin-inhibitory effect *in vitro*. Cell walls were disrupted by the freezing–thawing cycles in 0.1% or 1% CaCl₂ solution, and then CPC was purified by ammonium sulfate to reach the cosmetic grade. *In vitro* cytotoxicity of CPC was evaluated in L-929 cells. The anti-melanogenic effect of CPC was performed in B16F10 cells. The B16F10 cells were cultured in the cell culture medium containing CPC at 1–10 µg/mL concentrations for 48 hours. Melanin content was determined by the ratio of OD₄₂₀/mg protein. The results showed the optimized extraction method was the combination of 3 freezing–thawing cycles in 1% CaCl₂ and two-step precipitation by ammonium sulfate (1st 20% and 2nd 30%) with the purity was 2.411 ± 0.090 and concentration was 3.84 ± 0.07 mg/mL. CPC is safe for L-929 cells, and IC₅₀ was 1405 ± 16 µg/mL. CPC inhibited melanin synthesis in B16F10 cells at 5 µg/mL, and the melanin content decreased from 0.086 ± 0.012 to 0.022 ± 0.002. Conclusion: obtained cosmetic-grade CPC, and the CPC reduced melanin content at 5 µg/mL.

Keywords: *Arthrospira platensis*, phycocyanin, melanin, B16F10, cytotoxicity.