

## **BUỚC ĐẦU THU NHẬN R-PHYCOERYTHRIN TỪ RONG NƯỚC LỘ *CHEATOMORPHA* SP. ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG**

**Hoàng Thị Ngọc Nhon, Lê Thị Hồng Ánh\***

*Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM,  
140 Lê Trọng Tấn, phường Tây Thạnh, quận Tân Phú, Tp. Hồ Chí Minh*

\*Email: [lethihonganh@gmail.com](mailto:lethihonganh@gmail.com)

Đến Tòa soạn: 15/6/2016; Chấp nhận đăng: 28/10/2016

### **TÓM TẮT**

R-phycoerythrin (R-PE) là một chất màu huỳnh quang đỏ thuộc họ phycobiliprotein, có rất nhiều ứng dụng quan trọng trong các ngành công nghiệp thực phẩm, chẩn đoán miễn dịch, mỹ phẩm, đánh dấu protein và tế bào, phân tích, trị liệu. Đây là sắc tố có mặt chủ yếu trong các loại tảo đỏ, cũng có thể tìm thấy trong một số loại tảo lục. Với mục đích bước đầu thu nhận R-PE từ rong *Cheatomorpha* sp. ở khu vực đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), nghiên cứu này đã thực hiện quá trình trích li R-PE với sự xúc tác của enzyme cellulase (nồng độ enzyme 125 UI/g, nồng độ cơ chất 10 %) trong thời gian 3 giờ, nhiệt độ phòng. Tiến hành tủa với các dung môi hữu cơ như cồn, giấm gạo, acetone, acid acetic ở các nồng độ và tỉ lệ khác nhau. Tác nhân tủa là acid acetic 50 % cho kết quả về lượng và độ tinh khiết của chế phẩm R-PE là cao nhất, tiếp theo là  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  60 %.

*Từ khóa:* acetone, ammonium sulfate, cồn, *Chaetomorpha* sp., cellulase, giấm, R-phycoerythrin.

### **1. MỞ ĐẦU**

Sắc tố trong tảo có giá trị thương mại lớn, được sử dụng nhiều trong thực phẩm chức năng, mỹ phẩm, dược phẩm vì những lợi ích cho sức khỏe của chúng [1]. Trong đó, đáng chú ý là nhóm phycobiliprotein như phycoerythrin, allophycoerythrin... R-phycoerythrin (R-PE) có khối lượng phân tử khoảng 240.000 Da, bao gồm 6 đơn vị  $\alpha$  (20 kDa), 6 đơn vị  $\beta$  (20 kDa) và 1 đơn vị  $\gamma$  (khoảng 30 kDa) [2]. Quang phổ hấp thụ R-PE thể hiện ở ba đỉnh, đỉnh cao nhất là 565 nm [3]. Phycoerythrin là một chất màu quan trọng trong công nghệ sinh học, công nghệ thực phẩm, chẩn đoán miễn dịch, trị liệu, mỹ phẩm, đánh dấu tế bào trong quá trình phân tích [4]. Do đặc tính quang học của nó, phycoerythrin được sử dụng rộng rãi trong kỹ thuật sinh hóa và chẩn đoán lâm sàng [5, 6]. Gần đây, khả năng chống ung thư của R-PE và ba tiểu đơn vị  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  đã được tìm thấy khi thử nghiệm trên mô hình tế bào (các tế bào khối u của chuột, các tế bào ung thư biểu mô gan của người). R-PE có tác dụng làm tắc các mạch máu của khối u với sự cảm ứng của tế bào chết được lập trình dường như là cơ chế chủ yếu của các tiểu đơn vị R-PE [6].

R-PE là sắc tố màu đỏ có nhiều trong các loại tảo biển đỏ. Tuy nhiên, chúng cũng có thể được tìm thấy trong các loại vi tảo và tảo lục lớn. Theo khảo sát ban đầu, rong mền *Cheatomorpha* sp. mọc phổ biến ở các hồ nuôi tôm quảng canh thuộc ĐBSCL cũng có chứa một hàm lượng đáng kể R-PE. Tuy vậy, nguồn lợi tiềm năng này hiện chưa được sử dụng hợp lý và còn lãng phí. Mặt khác, nếu có thể thu nhận các chế phẩm R-PE để ứng dụng vào các lĩnh vực khác nhau sẽ góp phần nâng cao giá trị nguồn sinh khối này cũng như có ý nghĩa khoa học và thực tiễn sâu sắc. Hiện nay, ở Việt Nam chưa tìm thấy công trình nghiên cứu nào thu nhận chế phẩm R-PE trong các đối tượng rong nói chung và rong nước lợ *Cheatomorpha* sp. nói riêng.

## 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên vật liệu

Rong mền *Cheatomorpha* sp. được thu nhận ở các ao nuôi tôm quảng canh tại huyện Hòa Bình, tỉnh Bạc Liêu; rửa loại bỏ các tạp chất, bảo quản ở -18 °C để dùng cho tất cả các thí nghiệm.

Enzyme cellulase của Genecor – Mỹ, có hoạt lực 1.100 UI/ml.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Lựa chọn dung môi trích li [7, 8]

Rong tươi được nghiền mịn sơ bộ, cân 10 g rong/thí nghiệm. Khảo sát với 5 loại dung môi trích li (nước cất, đệm phosphat pH 7, đệm phosphate pH 7 0,1 M NaCl, đệm acetate pH 6, đệm acetate pH6 0,1 M NaCl). Tiến hành trích li R-PE ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (w/v), có sử dụng enzyme cellulase với nồng độ 100 UI/g, khuấy đều liên tục. Dung dịch sau trích li được li tâm, thu phần dịch nổi xác định lượng và độ tinh khiết R-PE.

#### 2.2.2. Trích li R-phycoerythrin từ rong nước lợ *Cheatomorpha* sp. bằng enzyme cellulase [9]

Rong nguyên liệu được cân vào cốc thủy tinh, thêm dung môi trích li (kết quả thí nghiệm 2.2.1). Thay đổi các thông số: nồng độ enzyme cellulase (50, 75, 100, 125, 150 UI/g); nồng độ nguyên liệu (5; 7,5; 10; 12,5; 15% w/v); thời gian xử lý enzyme là 2 giờ. Sau khi kết thúc quá trình, li tâm dung dịch thí nghiệm thu phần dịch nổi để xác định lượng và độ tinh khiết R-PE.

#### 2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến quá trình trích li R-PE [3, 7]

Cân 10g rong nguyên liệu/thí nghiệm, thêm enzyme cellulase với lượng thích hợp (kết quả thí nghiệm 2.2.2), trích li ở các nhiệt độ khác nhau: 4°C, nhiệt độ phòng, 50°C trong 2 giờ với tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (w/v). Sau khi tìm được nhiệt độ thích hợp, thực hiện thí nghiệm tương tự trong 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ, 8 giờ, 12 giờ để khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến trích li R-PE.

#### 2.2.4. Khảo sát kết tủa thu nhận R-PE bằng dung môi hữu cơ (cồn, giấm, acetone, acid acetic)

Khảo sát ảnh hưởng của các dung môi: cồn (50 %, 70 %, 96 %), acetone (50 %, 70 %, 96 %), acid acetic (30 %, 50 %, 70 %) và giấm gạo, kết tủa trong 2 giờ ở 4 °C. Dung dịch sau thí nghiệm được li tâm, để bay hơi dung môi ở nhiệt độ phòng 30 phút, thu phần kết tủa để xác định

lượng và độ tinh khiết của R-PE. Chọn 2 dung môi cho kết quả cao hơn tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi với các tỉ lệ: (1/0,1), (1/0,5), (1/1), (1/2), (1/3), (1/4), (1/5).

### 2.2.5. Kết tủa thu nhận R-phycoerythrin bằng muối ammonium sulfate [10, 11]

Thêm 10 ml dịch trích li vào ống li tâm, cho từ từ muối ammonium sulfate vào đến 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 % nồng độ muối bão hòa, kết tủa trong 2 giờ, ở 4 °C, tránh ánh sáng. Tiếp đó, li tâm thu kết tủa để xác định lượng và độ tinh khiết R-PE. Sau kết tủa, tiến hành thâm tích bằng màng cellophane 14 kDa nhằm tăng độ tinh khiết cho R-PE.

Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần.

## 2.3. Phương pháp phân tích

### Xác định R-phycoerythrin bằng phương pháp quang phổ

R-phycoerythrin có phổ hấp thu ánh sáng cực đại ở 565 nm, độ hấp thu ở bước sóng này biểu thị cho cường độ sắc tố phycoerythrin hay lượng phycoerythrin có trong dung dịch. Dựa vào tính chất này người ta đo các giá trị hấp thu và xác định lượng R-phycoerythrin;

Công thức tính [12]: R-PE =  $155,8 \cdot A_{498,5} - 40 \cdot A_{614} - 10,5 \cdot A_{651}$  (µg/ml)

Xác định độ tinh khiết R-phycoerythrin [13]:  $P = A_{565}/A_{280}$

trong đó  $A_{498,5}$ ,  $A_{614}$ ,  $A_{651}$ ,  $A_{565}$ ,  $A_{280}$  lần lượt là mật độ quang tại các bước sóng 498,5 nm, 614 nm, 651 nm, 565 nm, 280 nm.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Lựa chọn dung môi trích li

Việc lựa chọn được dung môi thích hợp để trích li phycobiliprotein là điều rất quan trọng vì chúng đảm bảo rằng protein không bị biến tính bởi sự thay đổi của pH [14]. Bảng 1 cho thấy trích li R-PE bằng đệm phosphate cho hiệu quả tốt hơn trong nước cất và trong đệm acetate vì pH trung tính thích hợp cho việc trích li phycobiliprotein [15]. pH quá cao hoặc quá thấp là nguyên nhân gây ra lực hút tĩnh điện nội phân tử do thay đổi điện tích trên bề mặt phân tử protein tích điện dương, và ở protein giai đoạn này duỗi ra, kém liên kết với dung môi dẫn đến sự biến tính của protein. Ngoài ra, việc thêm NaCl 0,15 M vào dung dịch đệm phosphate đã cải thiện trích li Phycocyanin trong tảo Spirulina và phycoerythrin trong Carrolina [14]. Điều này chứng tỏ rằng ion  $\text{Na}^+$  và  $\text{Cl}^-$  đóng vai trò rất quan trọng trong trích li thu nhận phycobiliprotein.

Bảng 1. Kết quả trích li R-PE với các dung môi khác nhau.

Dạng dung môi	Lượng R-PE (mg/ml)	Độ tinh khiết ( $A_{565}/A_{280}$ )
Đệm phosphate pH7	(0,148 ± 0,0415) <sup>a</sup>	(0,553 ± 0,0335) <sup>a</sup>
Đệm phosphate pH7 (0,1M NaCl)	(0,160 ± 0,0105) <sup>b</sup>	(0,672 ± 0,0095) <sup>a</sup>
Đệm acetate pH6	(0,103 ± 0,0231) <sup>c</sup>	(0,367 ± 0,0012) <sup>b</sup>
Đệm acetate pH6 (0,1M NaCl)	(0,119 ± 0,0007) <sup>d</sup>	(0,440 ± 0,0105) <sup>c</sup>
Nước cất 2 lần	(0,130 ± 0,0019) <sup>d</sup>	(0,500 ± 0,0100) <sup>d</sup>

Trong cùng một cột, các các chữ cái khác nhau có ý nghĩa khác nhau theo phân tích ANOVA ( $\alpha=0,05$ )

### 3.2. Trích li R-phycoerythrin từ rong nước lợ *Cheatomorpha sp.* bằng enzyme cellulase

Khi tăng nồng độ enzyme thì lượng protein thu được sẽ tăng, tuy nhiên nếu lượng enzyme tăng quá cao so với lượng cơ chất có sẵn thì hiệu quả phá vỡ thành tế bào rong và giải phóng protein sẽ không tiếp tục tăng. Từ kết quả trình bày trong Bảng 2 cho thấy, nồng độ enzyme thích hợp là 125 UI/g sẽ được sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo. Ở các nồng độ nguyên liệu là 10 %, 12,5 % và 15 % thì lượng R-PE thu được thay đổi không đáng kể. Với một lượng enzyme xác định, nếu tăng dần lượng cơ chất trong dung dịch thì ban đầu hoạt tính của enzyme tăng dần, nhưng đến một lúc nào đó thì sự gia tăng về nồng độ cơ chất cũng không làm tăng hoạt tính của enzyme. Do đó, tùy theo từng quá trình trích li cụ thể, cần lựa chọn được nồng độ nguyên liệu thích hợp để tiết kiệm chi phí. Trong thí nghiệm này, nồng độ nguyên liệu 10 % là nồng độ thích hợp để sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo. Quá trình enzyme không làm biến tính các protein sắc tố và do đó tăng hiệu quả thu hồi R-PE. Fleurence và cộng sự đã nghiên cứu việc sử dụng enzyme để cải thiện quá trình trích li protein từ rong *Chondrus crispus*, *Gracilaria verrucosa*, *Palmaria palmate* và cho kết quả khả quan [16]. Quá trình trích li bằng enzyme được xem là thân thiện, an toàn và rẻ để thu nhận protein.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme, nồng độ nguyên liệu đến trích li R-PE.

Nồng độ enzyme (UI/g)	Lượng R-PE (mg/ml)	(A <sub>565</sub> /A <sub>280</sub> )	Nồng độ nguyên liệu (%)	Lượng R-PE (mg/ml)	(A <sub>565</sub> /A <sub>280</sub> )
50	(0,068 ± 0,0045) <sup>a</sup>	(0,250 ± 0,0135) <sup>a</sup>	5%	(0,128 ± 0,0411) <sup>a</sup>	(0,320 ± 0,0157) <sup>a</sup>
75	(0,072 ± 0,0115) <sup>b</sup>	(0,472 ± 0,0205) <sup>b</sup>	7,5%	(0,142 ± 0,0123) <sup>b</sup>	(0,413 ± 0,0106) <sup>b</sup>
100	(0,139 ± 0,0211) <sup>c</sup>	(0,597 ± 0,0121) <sup>c</sup>	10%	(0,165 ± 0,0009) <sup>c</sup>	(0,687 ± 0,0115) <sup>c</sup>
125	(0,156 ± 0,0009) <sup>d</sup>	(0,680 ± 0,0105) <sup>d</sup>	12,5%	(0,169 ± 0,0076) <sup>c</sup>	(0,700 ± 0,0320) <sup>d</sup>
150	(0,160 ± 0,0106) <sup>d</sup>	(0,676 ± 0,0211) <sup>d</sup>	15%	(0,159 ± 0,0098) <sup>c</sup>	(0,696 ± 0,0011) <sup>d</sup>

Trong cùng một cột, các các chữ cái khác nhau có ý nghĩa khác nhau theo phân tích ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ).

### 3.3. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến quá trình trích li R-PE

Từ Bảng 3 nhận thấy, nhiệt độ phòng cho kết quả lượng R-PE, độ tinh khiết A<sub>565</sub>/A<sub>280</sub> cao hơn 4 °C và 50 °C. Điều này có thể do nhiệt độ 4 °C quá thấp không thích hợp cho enzyme cellulase hoạt động còn đối với nhiệt độ 50 °C trong thời gian dài có thể làm biến tính R-PE. Tác giả Joël Fleurence đã nghiên cứu trích li R-PE trên đối tượng tảo *P. Palmata* cho kết quả hiệu suất thu hồi R-PE ở nhiệt độ ≥ 50 °C có thể giảm đến 70 % trong thời gian trích 4 giờ [3].

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình trích li R-PE.

Nhiệt độ (°C)	Lượng R-PE (mg/ml)	Độ tinh khiết (A <sub>565</sub> /A <sub>280</sub> )
4 °C	(0,093 ± 0,0050) <sup>a</sup>	(0,200 ± 0,0154) <sup>a</sup>
Nhiệt độ phòng	(0,168 ± 0,0121) <sup>b</sup>	(0,563 ± 0,0234) <sup>b</sup>
50 °C	(0,111 ± 0,0541) <sup>c</sup>	(0,367 ± 0,0081) <sup>c</sup>

Trong cùng một cột, các các chữ cái khác nhau có ý nghĩa khác nhau theo phân tích ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ).

Kết quả từ Bảng 4 cho thấy, nếu thời gian trích li tăng thì lượng R-PE thu được tăng do tăng thời gian cơ chất tiếp xúc dung môi, làm khuếch tán các phân tử chất tan vào trong dung

môi. Tuy nhiên, sự khuếch tán sẽ chậm dần cho đến khi chênh lệch nồng độ đạt đến trạng thái cân bằng. Trong khảo sát này, thời gian từ 180 phút trở đi thì lượng R-PE tăng không có ý nghĩa về mặt thống kê. Như vậy, điều kiện thích hợp trích li protein R-PE bằng enzyme cellulase là: nồng độ enzyme 125 UI/g, nồng độ nguyên liệu là 10 %, thời gian 3 giờ, nhiệt độ phòng.

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình trích li R-PE.

Thời gian (phút)	Lượng R-PE (mg/ml)	Độ tinh khiết ( $A_{565}/A_{280}$ )
30	(0,089 ± 0,0025) <sup>a</sup>	(0,320 ± 0,0165) <sup>a</sup>
60	(0,139 ± 0,0715) <sup>b</sup>	(0,413 ± 0,0203) <sup>b</sup>
120	(0,161 ± 0,0911) <sup>c</sup>	(0,557 ± 0,0021) <sup>c</sup>
180	(0,173 ± 0,0016) <sup>d</sup>	(0,623 ± 0,0085) <sup>c</sup>
240	(0,178 ± 0,0161) <sup>d</sup>	(0,676 ± 0,0011) <sup>c</sup>
480	(0,176 ± 0,0091) <sup>d</sup>	(0,700 ± 0,0056) <sup>c</sup>
720	(0,175 ± 0,0203) <sup>d</sup>	(0,696 ± 0,0781) <sup>c</sup>

Trong cùng một cột, các các chữ cái khác nhau có ý nghĩa khác nhau theo phân tích ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ).

### 3.4. Kết quả thu nhận R-phycoerythrin bằng dung môi hữu cơ (cồn, giấm, acetone, acetic)

#### 3.4.1. Nồng độ dung môi hữu cơ sử dụng

Từ số liệu của Bảng 5 cho thấy, dung môi cồn 70 % cho hiệu quả tủa R-PE cao hơn (0,973 mg/ml) so với cồn 50 % và 96 %. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận với acetone 70 %, tuy nhiên lượng R-PE thu được thấp hơn (0,787 mg/ml). Trong khi đó giấm gạo cũng thể hiện là dung môi phù hợp để trích R-PE (1,071 mg/ml); Mặt khác dung môi cồn và giấm gạo không gây độc đối với cơ thể. Điều đáng chú ý là với tác nhân tủa là acid acetic với nồng độ 50 % cho kết quả về lượng và độ tinh khiết của R-PE là cao nhất (1,493 mg/ml) và  $A_{565}/A_{280}$  (1,689).

Bảng 5. Ảnh hưởng của các dung môi hữu cơ đến kết quả thu nhận R-PE.

Dung môi	Lượng R-PE (mg/ml)	( $A_{565}/A_{280}$ )
Cồn 50 %	(0,356 ± 0,0005) <sup>a</sup>	(0,530 ± 0,0135) <sup>a</sup>
Cồn 70 %	(0,775 ± 0,0234) <sup>c</sup>	(0,973 ± 0,0275) <sup>b</sup>
Cồn 96 %	(0,782 ± 0,0443) <sup>b</sup>	(0,718 ± 0,0021) <sup>c</sup>
Giấm gạo	(1,071 ± 0,0080) <sup>c</sup>	(1,180 ± 0,0101) <sup>d</sup>
Acetone 50 %	(0,358 ± 0,0006) <sup>d</sup>	(0,466 ± 0,0067) <sup>e</sup>
Acetone 70 %	(0,787 ± 0,0109) <sup>e</sup>	(0,686 ± 0,0095) <sup>f</sup>
Acetone 96 %	(0,803 ± 0,0112) <sup>f</sup>	(0,536 ± 0,0084) <sup>a</sup>
Acetic 30 %	(1,107 ± 0,0026) <sup>d</sup>	(1,191 ± 0,0607) <sup>f</sup>
Acetic 50 %	(1,493 ± 0,0004) <sup>c</sup>	(1,689 ± 0,0015) <sup>g</sup>
Acetic 70 %	(1,463 ± 0,0110) <sup>f</sup>	(1,375 ± 0,0214) <sup>d</sup>

Trong cùng một cột, các các chữ cái khác nhau có ý nghĩa khác nhau theo phân tích ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ).

Một điểm cần lưu ý là dung môi hữu cơ có khả năng làm biến tính protein ngay cả ở nhiệt độ thường. Do vậy, quá trình tủa protein bằng dung môi hữu cơ phải được thực hiện ở nhiệt độ thấp 0 – 5 °C và chọn lựa dung môi thích hợp.

### 3.4.2. Tỷ lệ dung môi hữu cơ sử dụng

Kết quả khảo sát cho thấy acid acetic 50 % thể hiện là dung môi tốt nhất để kết tủa R-PE ở tỷ lệ (1:2) với độ tinh khiết nhận được là 1,890, tiếp theo là đến giấm gạo (tỷ lệ 1:3) với độ tinh khiết là 1,573 (Bảng 6).

*Bảng 6. Ảnh hưởng của tỷ lệ giấm gạo và acid acetic đến kết tủa thu nhận R-PE.*

Tỷ lệ dung môi	Lượng R-PE (mg/ml)	Độ tinh khiết (A <sub>565</sub> /A <sub>280</sub> )	Tỷ lệ dung môi	Lượng R-PE (mg/ml)	Độ tinh khiết (A <sub>565</sub> /A <sub>280</sub> )
Acetic 50 % (1:0,1)	(0,537 ± 0,0068) <sup>a</sup>	(0,729 ± 0,0116) <sup>a</sup>	Giấm (1:0,1)	(0,530 ± 0,0095) <sup>a</sup>	(0,720 ± 0,0125) <sup>a</sup>
Acetic 50 % (1:0,5)	(0,976 ± 0,0405) <sup>b</sup>	(1,010 ± 0,0135) <sup>b</sup>	Giấm (1:0,5)	(0,708 ± 0,0107) <sup>b</sup>	(0,903 ± 0,0105) <sup>b</sup>
Acetic 50 % (1:1)	(1,550 ± 0,0211) <sup>c</sup>	(1,707 ± 0,0161) <sup>c</sup>	Giấm (1:1)	(1,103 ± 0,0221) <sup>c</sup>	(1,198 ± 0,0217) <sup>c</sup>
Acetic 50 % (1:2)	(1,571 ± 0,0057) <sup>c</sup>	(1,890 ± 0,0098) <sup>d</sup>	Giấm (1:2)	(1,205 ± 0,009) <sup>d</sup>	(1,380 ± 0,0098) <sup>d</sup>
Acetic 50 % (1:3)	(1,567 ± 0,0019) <sup>c</sup>	(1,786 ± 0,0067) <sup>c</sup>	Giấm (1:3)	(1,368 ± 0,0036) <sup>d</sup>	(1,483 ± 0,0221) <sup>e</sup>
Acetic 50 % (1:4)	(1,641 ± 0,0080) <sup>c</sup>	(1,476 ± 0,0091) <sup>e</sup>	Giấm (1:4)	(1,237 ± 0,0043) <sup>e</sup>	(1,386 ± 0,0067) <sup>d</sup>
Acetic 50 % (1:5)	(1,670 ± 0,0092) <sup>c</sup>	(1,263 ± 0,0041) <sup>f</sup>	Giấm (1:5)	(1,332 ± 0,0109) <sup>e</sup>	(1,256 ± 0,0401) <sup>e</sup>

*Trong cùng một cột, các các chữ cái khác nhau có ý nghĩa khác nhau theo phân tích ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ).*

Ngoài ra, với các tỷ lệ cao hơn thì cho lượng R-PE cao hơn nhưng độ tinh khiết thấp hơn vì trong quá trình kết tủa, ngoài R-PE thì các protein màu khác cũng được kết tủa, dẫn đến độ tinh khiết giảm.

### 3.5. Kết tủa thu nhận R-phycoerythrin bằng muối ammonium sulfate

*Bảng 7. Kết quả khảo sát quá trình kết tủa thu nhận R-PE bằng muối (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.*

Nồng độ muối (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> bão hòa (%)	Lượng R-PE (mg/ml)	Độ tinh khiết (A <sub>565</sub> /A <sub>280</sub> )
Dịch trích	0,173	0,623
10	(0,256 ± 0,0095) <sup>a</sup>	(0,330 ± 0,0075) <sup>a</sup>
20	(0,398 ± 0,0089) <sup>b</sup>	(0,672 ± 0,0215) <sup>b</sup>
30	(0,581 ± 0,0022) <sup>c</sup>	(0,980 ± 0,0021) <sup>c</sup>
40	(0,895 ± 0,0178) <sup>d</sup>	(1,071 ± 0,0005) <sup>d</sup>
50	(1,189 ± 0,0092) <sup>e</sup>	(1,207 ± 0,0067) <sup>e</sup>
60	(1,305 ± 0,0056) <sup>f</sup>	(1,508 ± 0,0095) <sup>f</sup>
70	(1,333 ± 0,0018) <sup>f</sup>	(1,496 ± 0,0131) <sup>f</sup>

*Trong cùng một cột, các các chữ cái khác nhau có ý nghĩa khác nhau theo phân tích ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ).*

R-PE thu được bằng phương pháp tủa với muối ammonium sulfate ở các nồng độ muối bão hòa khác nhau đều có độ tinh khiết cao hơn so với dịch trích, điều này cho thấy có thể sử dụng phương pháp này để làm tăng độ tinh khiết của dịch trích. R-PE thu được có độ tinh khiết thấp nhất ở nồng độ muối bão hòa 10 %, độ tinh khiết cao nhất ở nồng độ muối bão hòa 60 % (1,508). Lượng R-PE thu được cao nhất khi kết tủa ở nồng độ muối bão hòa 70 % (1,333 mg/ml), tiếp đến là ở nồng độ 60 % (1,305 mg/ml), sự chênh lệch của các kết quả này không có ý nghĩa về mặt thống kê (Bảng 7). Sau khi thẩm tích lượng protein R-PE gần như không thay đổi, tuy nhiên độ tinh khiết tăng lên 1,612 từ 1,508 (sau khi tủa bằng ammonium sulfate), tăng 2,59 lần so với chế phẩm protein R-PE thô. Quá trình thẩm tích đã loại đi một lượng muối đáng kể trong kết tủa protein R-PE, dẫn đến làm tăng độ tinh khiết của sản phẩm.

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã sử dụng nguyên liệu rong tươi *Cheatomorpha* sp. để trích li thành công R-PE trong môi trường đệm phosphate pH 7 bổ sung muối NaCl 0,1 M. Quá trình trích li sử dụng enzyme cellulase với nồng độ enzyme 125 UI/g, nồng độ cơ chất 10 % trong thời gian 3 giờ ở nhiệt độ phòng. Dung dịch acid acetic 50 % là dung môi thích hợp nhất để kết tủa thu nhận R-PE với độ tinh khiết và lượng R-PE thu được lần lượt là 1,890 và 1,571 mg/ml (khi sử dụng tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/2). Tiếp theo đó là muối ammonium sulfate 60 % cho độ tinh khiết của chế phẩm R-PE đạt 1,508 và sau thẩm tích là 1,612 với lượng R-PE thu được là 1,305 mg/ml. Các chế phẩm R-PE này có độ tinh khiết ( $A_{565}/A_{280}$ ) > 0,7 nên có thể ứng dụng được trong sản phẩm thực phẩm chức năng [17]. Tuy nhiên, để ứng dụng được trong thuốc (> 2) và trong phân tích hoặc công nghệ sinh học (> 3,2) [17], cần phải tiếp tục nghiên cứu nâng cao độ tinh khiết của R-PE.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sekar S. and Chandramohan M. - Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization, J. Appl. Phycol. **20** (2008) 113–136.
2. Kawsar S. M. A., Fujii Y., Matsumoto R., Yasumitsu H. and Ozeki Y. - Protein R-phycoerythrin from marine red alga *Amphiroa anceps*: extraction, purification and characterization, Phytologia Balcanica **17** (3) (2011) 347–354.
3. Fleurence J. - R-Phycoerythrin from red macroalgae: Strategies for extraction and potential application in Biotechnological area, Applied Biotechnology, Food Science and Policy **1** (1) (2003) 1 – 6.
4. Rossano R., Ungaro N., Ambrosio D. A., Liuzzi G. M. and Riccio P. - Extracting and purifying R-phycoerythrin from Mediterranean red algae *Corallina elongata* Ellis & Solander, Journal of Biotechnology **101** (3) (2003) 289-293.
5. Kronick M. N. and Grossman P. D. - Immunoassay Techniques with Fluorescent Phycobiliprotein Conjugates – 1582, Clinical chemistry **29** (9) (1983) 1582 – 1586.
6. Kronick M. N. - The use of phycobiliproteins as fluorescent labels in immunoassay, Journal of Immunological Methods **92** (1) (1986)1-13.
7. Niu J., Xu M., Wang G., Zhang K. and Peng G. - Comprehensive Extraction of Agar and R-phycoerythrin from *Gracilaria lemaneiformis* (Bangiales, Rhodophyta), Indian Journal of Geo-Marine Sciences **42** (1) (2013) 21-28.



8. Ranjitha K. and Kaushik B. D. - Purification of phycobiliproteins from *Nostoc muscorum*, Journal of scientific & Industrial Research **64** (2005) 372-375
9. Minh B. N., Anh H. K., Ánh L. T. H., Srong N. K. - Nghiên cứu trích li protein từ sinh khối rong nước lợ *Chaetomorpha* sp. bằng phương pháp kết hợp enzyme cellulase và dung môi kiềm, Tạp chí Khoa học và Công nghệ **52** (5A) (2014) 255-263.
10. Cai C., Li C., Wu S., Wang Q., Guo Z. and He P. - Large scale preparation of phycobiliproteins from *Porphyra yezoensis* using co-precipitation with ammonium sulfate, Natural Science **4** (8) (2012) 536-543.
11. Chakdar H. and Pabbi S. - Extraction and purification of Phycoerythrin from *Anabaena variabilis* (CCC421), Phycos **42** (1) (2012) 25 – 31.
12. Kursar T. A., Meer J. V. D. and Alberte R. S. - Light harvesting system of the Alga *Gracilaria tikvahiae*, Plant Physiol. **73** (1983) 353-360.
13. Wang G., Sun H. B, Fan X. and T. Seng C. K. - Large isolation and purification of R-phycoerythrin from red algae *Palmaria palmata* using the expanded bed adsorption method, Acta Botanica Sinica **44** (5) (2002) 541-546.
14. Hemlata G. P., Fareha B. and Tasneem F. - Studies on *Anabaena* sp. NCCU-9 with special reference to phycocyanin, Algal Biomass Utiln. **2** (1) (2011) 30–51.
15. Sarada R., Pillai M. G. and Ravishankar G. A. - 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** (1999) 795–801.
16. Fleurence J., Massiani L., Guyader O. and Mabeau S. - Use of enzymatic cell wall degradation for improvement of protein extraction from *Chondrus crispus*, *Gracilaria verrucosa* and *Palmaria palmate*, Journal of Applied Phycology **7** (4) (1995) 393-397.
17. Pan Q., Chen M., Li J., Wu Y., Zhen C. and Liang B. - Antitumour Function and Mechanism of Phycoerythrin from *Porphyra haitanensis*, Biol Res **46** (2013) 87-95.

## ABSTRACT

### THE INITIAL R-PHYCOERYTHRIN PURIFICATION FROM BRACKISH GREEN ALGAE CHAETOMORPHA SP. IN MEKONG DELTA VIETNAM

Hoang Thi Ngoc Nhon, Le Thi Hong Anh \*

*Food Technology Faculty, Ho Chi Minh City University of Food Industry, 140 Le Trong Tan Str.,  
Tay Thanh Ward, Tan Phu Dist., Ho Chi Minh City*

\*Email: lethihongan@gmail.com

R-Phycoerythrin (R-PE) is one of the three phycobiliproteins which are extensively used as fluorescent probes, and it is prepared from red macro-algae. This macromolecular protein has gained importance in many biotechnological applications in food science, immunodiagnostic, therapy, cosmetics, protein and cell labeling, and analytical processes. This study initially receive R-PE from seaweed *Chaetomorpha* sp. in Mekong Delta, Vietnam. The extraction R-PE was done with cellulase enzyme (enzyme concentration 125 UI/g, substrate concentration of 10 %) in 3 hours, at room temperature. The precipitating processing was conducted with organic



solvents such as alcohol, rice vinegar, acetone at different concentration and proportions. The precipitation agent of acetic acid 50 % gave the best result, followed by ammonium sulfate 60 %. The product can be applied in food and functional food.

*Keywords:* acetone, alcohol, ammonium sulfate, cellulase, *Chaetomorpha* sp., rice vinegar, R-phycoerythrin.