

# NGHIÊN CỨU TÍNH SẠCH SƠ BỘ C-PHYCOCYANIN TỪ RONG *Ceratophyllum demersum* BẰNG THAN HOẠT TÍNH, CHITOSAN VÀ AMMONIUM SULFATE

Nguyễn Long Nhật, Đỗ Mai Thi,

Lưu Trường Vũ, Hoàng Thị Ngọc Nhơn\*

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

\*Email: [nhonhtn@fst.edu.vn](mailto:nhonhtn@fst.edu.vn)

Ngày nhận bài: 21/9/2020; Ngày chấp nhận đăng: 02/12/2020

## TÓM TẮT

C-phycoyanin (C-PC) là hợp chất có nhiều hoạt tính sinh học quan trọng như kháng oxy hóa, kháng viêm, hỗ trợ chống ung thư. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm trích ly và tinh sạch C-PC thu nhận từ rong *Ceratophyllum demersum*. Dịch chiết C-PC từ rong nguyên liệu ban đầu được hấp phụ qua than hoạt tính và chitosan, sau đó được kết tủa bằng muối ammonium sulfate tại nồng độ bão hòa phù hợp. Kết quả cho thấy tại nồng độ than hoạt tính và chitosan bổ sung lần lượt là 3% (w/v) và 0,3% (v/v) để hấp phụ trong 15 phút, sau đó tiếp tục cho kết tủa bằng muối ammonium sulfate ở nồng độ bão hòa đến 50% đã giúp cải thiện rõ rệt hệ số tinh sạch của C-PC (đạt 2,62 so với dịch chiết thô 0,40) với hiệu suất thu hồi là 51,11%.

*Từ khóa:* Ammonium sulfate, C-phycoyanin, *Ceratophyllum demersum*, chitosan, than hoạt tính.

## 1. GIỚI THIỆU

Rong *Ceratophyllum demersum* là loài thực vật thủy sinh 2 lá, chìm dưới nước, thuộc họ Ceratophyllaceae. *C. demersum* có thân dài 1-3 m, có nhiều chồi bên làm cho chúng xuất hiện như một dạng sinh khối lớn. Các lá tạo thành từng chùm, chiều dài mỗi lá 8-40 mm. *C. demersum* phân bố chủ yếu ở khu vực ôn đới với nhiệt độ phát triển tối ưu 25-35 °C [1]. Thành phần trong rong chủ yếu là carbohydrate với 56%, protein, lipid lần lượt khoảng 18% và 1% chất khô [2].

C-phycoyanin là một trong các sắc tố quang hợp được tìm thấy trong vi khuẩn lam, tảo đỏ, tảo cryptomonad. Chúng hấp thụ năng lượng mặt trời ở vùng quang phổ khả kiến và sau đó chuyển năng lượng kích thích này sang diệp lục trong màng quang hợp. C-PC có màu xanh đậm, hấp thụ ánh sáng màu đỏ, đặc biệt là gần 620 nm và phát huỳnh quang ở khoảng 650 nm. C-phycoyanin có khả năng ứng dụng rộng rãi trong thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm [3]. Để tăng giá trị cho chế phẩm C-PC và tính an toàn, C-PC đòi hỏi có các giá trị tinh khiết cho từng đối tượng ứng dụng. Hệ số tinh sạch của C-PC thường được đánh giá bằng cách sử dụng tỷ lệ hấp thụ của  $A_{620nm}/A_{280nm}$ , trong đó hệ số tinh sạch là 0,7 được coi là cấp thực phẩm, 3,9 là cấp độ phản ứng và lớn hơn 4,0 như cấp phân tích [4]. Hiện nay, đã có nhiều phương pháp hiện đại được nghiên cứu nhằm thu hồi C-PC có hệ số tinh sạch cao. Trong số đó, việc tinh sạch C-PC bằng than hoạt tính, chitosan cũng như ammonium sulfate cho thấy tính hiệu quả tương đối cao, ít tốn kém và thời gian ngắn nhằm thu được C-phycoyanin có hệ số tinh sạch cao, hỗ trợ cho các bước tinh sạch tiếp theo. Nhiều nghiên cứu cho thấy tính hiệu quả tinh sạch của than hoạt tính khi tăng hệ số tinh sạch của C-PC lên từ 2-3 lần [5, 6]. Tinh sạch protein bằng muối trung tính như ammonium sulfate đã được sử dụng từ rất lâu vì tính hiệu

quả và ổn định của chúng. Minkova *et al.* đã sử dụng muối ammonium sulfate tinh sạch C-PC từ *Spirulina* cho hệ số tinh sạch của C-PC đạt 4,3 khi thực hiện kết tủa tại nồng độ muối 70% độ bão hòa [7] hay Patel *et al.* tủa C-PC trên *Spirulina sp.*, *Phormidium sp.*, *Lyngbya sp.* tại nồng độ muối bão hòa 50% cho hệ số tinh sạch lần lượt là 2,66; 1,62; 1,46 [8]. Nghiên cứu này thực hiện tinh sạch C-PC từ rong *C. demersum* bằng ammonium sulfate kết hợp với than hoạt tính và chitosan.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Rong *C. demersum* được thu nhận ở các ao nuôi tôm quảng canh tại xã Gia Thuận, huyện Gò Công Đông, tỉnh Tiền Giang, rong thu hái ở giai đoạn già và đang có dấu hiệu phân hủy với màu nâu sậm. Sau khi thu hái, rong được vận chuyển trong ngày đến phòng thí nghiệm, tại đây được rửa bằng nước máy và nước cất, loại bỏ các tạp chất bám trên rong như vỏ ốc, các mảnh vụn san hô và bảo quản ở -5 °C.

Hóa chất: Than hoạt tính, chitosan và ammonium sulfate (Trung Quốc), enzyme cellulast (chế phẩm của enzyme cellulase) (Novozymes).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Thu nhận dịch trích ly C-PC từ rong *C. demersum*

Cân 1 g rong khô hòa với đệm phosphat 0,1M pH 5,8 theo tỷ lệ 1:20 (w/v), bổ sung enzyme cellulast với nồng độ 80 EGU/g khuấy từ ở 31 °C trong 240 phút, ly tâm thu dịch chiết C-PC thô [9].

#### 2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ than hoạt tính, chitosan và thời gian hấp phụ đến quá trình tinh sạch C-PC

Dịch chiết thô C-PC hòa với than hoạt tính ở các nồng độ khảo sát (0, 1, 2, 3, 4, 5% w/v), sau đó tinh sạch với chitosan ở mỗi nồng độ tương ứng khác nhau (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5% v/v) ở nhiệt độ phòng tại các mốc thời gian (5, 15, 25, 35, 45 phút), thực hiện ly tâm thu dịch để đánh giá hệ số tinh sạch của C-PC.

#### 2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ bão hòa ammonium sulfate đến quá trình tinh sạch C-PC

Dịch sau tinh sạch bằng than hoạt tính và chitosan được kết tủa 2 phân đoạn với ammonium sulfate. Tủa phân đoạn 1 (tủa tạp, bã còn lại trong dịch): Thêm ammonium sulfate đến nồng độ bão hòa 20%, kết tủa trong 2 giờ ở nhiệt độ 4 °C, sau đó ly tâm 5500 vòng/phút trong 15 phút để thu nhận phần phần dịch nổi. Tủa phân đoạn 2, phần dịch nổi được khảo sát tại các khoảng nồng độ bão hòa khác nhau (từ 20-30%, 20-40%, 20-50% và 20-60%), thời gian nhiệt độ và ly tâm như phân đoạn 1, tủa thu được sau ly tâm được xác định hệ số tinh sạch của C-PC.

### 2.3. Phương pháp phân tích

Hàm lượng và hệ số tinh sạch của C-PC được xác định bằng máy quang phổ UV-Vis (Spectrophotometer genesys 10S UV-Vis) như sau:

- Hàm lượng C-PC (mg/mL) =  $(A_{620nm} - 0,7A_{650nm}) / 7,38$  và
- Hệ số tinh sạch của C-PC được tính theo tỷ lệ của  $A_{620nm} / A_{280nm}$ .

Trong đó,  $A_{620nm}$ ,  $A_{650nm}$  lần lượt là độ hấp thụ cực đại và độ phát quang cực đại của C-PC và  $A_{280nm}$  là độ hấp thụ của tổng protein [10, 11].

## 2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, kết quả được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2019, sự khác biệt và chọn các thông số phù hợp dựa trên kết quả phân tích của phần mềm IBM SPSS Statistics 23. Kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình  $\pm$  sai số.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ than hoạt tính

Nồng độ than hoạt tính có tác động đáng kể đến hệ số tinh sạch cũng như hàm lượng của C-PC. Ảnh hưởng của than hoạt tính lên hệ số tinh sạch và hàm lượng C-PC thể hiện trong Bảng 1.

Hấp phụ qua than hoạt tính đã làm sạch các protein trọng lượng phân tử thấp trong chiết xuất C-PC thô, Herrera *et al.* (1989) đã phát hiện rằng sau quá trình xử lý bằng than hoạt tính, các protein tạp có trọng lượng phân tử thấp hơn 25 kDa, giảm 30% so với mẫu không được xử lý bằng than hoạt tính [12]. Các thử nghiệm tinh sạch sử dụng than hoạt tính trước đây trên chiết xuất thô của C-PC cho thấy hàm lượng C-PC giảm và hệ số tinh sạch đạt cao nhất khi nồng độ than hoạt tính tăng.

*Bảng 1.* Ảnh hưởng của nồng độ than hoạt tính đến hệ số tinh sạch C-PC

Nồng độ than hoạt tính (% w/v)	Hệ số tinh sạch	Hàm lượng C-PC (mg/mL)
0	(0,401 $\pm$ 0,037) <sup>a</sup>	(0,184 $\pm$ 0,007) <sup>d</sup>
1	(0,745 $\pm$ 0,068) <sup>b</sup>	(0,181 $\pm$ 0,007) <sup>d</sup>
2	(1,182 $\pm$ 0,045) <sup>c</sup>	(0,173 $\pm$ 0,004) <sup>d</sup>
3	(1,487 $\pm$ 0,030) <sup>d</sup>	(0,141 $\pm$ 0,009) <sup>c</sup>
4	(1,507 $\pm$ 0,022) <sup>d</sup>	(0,128 $\pm$ 0,007) <sup>b</sup>
5	(1,558 $\pm$ 0,044) <sup>d</sup>	(0,110 $\pm$ 0,006) <sup>a</sup>

*a,b,c,d:* Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê theo phân tích ANOVA ( $\alpha = 0,05$ )

Than hoạt tính có khả năng hấp phụ tốt và nhanh giúp tăng hiệu quả tinh sạch C-PC từ dịch chiết thô. Bảng 1 cho thấy tại nồng độ than hoạt tính 5%, hệ số tinh sạch C-PC đạt 1,56, tăng 3,9 lần so với không sử dụng than hoạt tính (0,40). Tuy nhiên, tại nồng độ than hoạt tính 5% không khác biệt ý nghĩa về hệ số tinh sạch so với nồng độ 3% và 4%, đồng thời với lượng than hoạt tính nhiều sẽ hấp phụ cả C-PC dẫn đến giảm nồng độ C-PC trong dịch chiết thô, do đó nồng độ than hoạt tính 3% được chọn để tiến hành thí nghiệm tiếp theo. Kết quả này có sự khác biệt so với các nghiên cứu trước đây: Gantar *et al.* (2012) sử dụng cho tinh sạch C-PC từ *Limnotherix sp.* với than hoạt tính ở nồng độ 1% (w/v) [13] thu được chế phẩm C-PC có hệ số tinh sạch 3,6, thí nghiệm của Safaei *et al.* sử dụng nồng độ than hoạt tính là 12% (w/v) cho hệ số tinh sạch C-PC 2,56 [14] hay với nồng độ than hoạt tính 50 g/L được Herrera *et al.* sử dụng tinh sạch trên dịch chiết thô C-PC thu nhận từ *Spirulina maxima* [12] và Liao *et al.* tinh sạch C-PC từ *Spirulina platenis* với nồng độ than hoạt tính 80 g/L [5] cho hệ số tinh sạch C-PC lần lượt là 1,46 và 2,78. Sự khác biệt này có thể do hàm lượng khác nhau của C-PC và các protein khác trong dịch chiết thô của mỗi nguyên liệu, khi hàm lượng C-PC cũng như của protein tạp nhiều trong dịch chiết thô C-PC đòi hỏi nồng độ than hoạt tính nhiều hơn để thu được C-PC

có hệ số tinh sạch cao nhất và hàm lượng C-PC giảm không đáng kể về mặt thống kê.

### 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan

Chitosan cung cấp khả năng liên kết mạnh mẽ (do chứa nhóm amino và hydroxyl), chitosan có thể hoạt động như một chất hấp phụ các phân tử, bao gồm các hợp chất polyphenol, thuốc nhuộm và ion kim loại [15], từ đó có thể hỗ trợ trong quá trình tinh sạch C-PC. Ảnh hưởng của chitosan lên quá trình tinh sạch C-PC được thể hiện trong Bảng 2. Nồng độ chitosan ảnh hưởng đáng kể đến hệ số tinh sạch của C-PC. Khi sử dụng chitosan ở hàm lượng thấp làm giảm khả năng hấp thụ các tạp chất, trong khi ở hàm lượng cao, pH môi trường bị giảm do nồng độ acetic acid cao, dẫn đến C-PC có thể bị biến tính, kết tủa hay mất ổn định. Bên cạnh đó, do khả năng hấp phụ màu của chitosan có thể hấp thụ một phần màu của các hợp chất màu bên trong dịch chiết thô, do đó có thể hấp thụ màu của C-PC, giảm tính ứng dụng của C-PC sau này. Tỷ lệ chitosan/dịch chiết phù hợp cho thí nghiệm là 0,3% (v/v) đạt hệ số tinh sạch 1,97. Do độ bất ổn định trong môi trường acid của C-PC mà nhiều nghiên cứu thường sử dụng tỷ lệ chitosan/dịch chiết từ 0,1-1%. Safaei *et al.* [14], khi tinh sạch C-PC từ *Limnithrix sp. NS01* đã sử dụng dung dịch chitosan 2% và tỷ lệ chitosan/chiết xuất là 0,2% với pH được điều chỉnh là 6,9 hay Liao *et al.* [5], thực hiện trên *Spirulina platensis* cho thấy tỷ lệ chitosan/dịch chiết 0,3% là tối ưu để thu được C-PC có hệ số tinh sạch cao nhất.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan đến hệ số tinh sạch và hàm lượng C-PC

Tỷ lệ chitosan/ dịch chiết (% v/v)	Hệ số tinh sạch	Hàm lượng C-PC (mg/mL)
0	(1,505 ± 0,043) <sup>a</sup>	(0,130 ± 0,005) <sup>e</sup>
0,1	(1,591 ± 0,035) <sup>a</sup>	(0,120 ± 0,006) <sup>de</sup>
0,2	(1,722 ± 0,032) <sup>b</sup>	(0,112 ± 0,005) <sup>cd</sup>
0,3	(1,968 ± 0,057) <sup>d</sup>	(0,102 ± 0,007) <sup>bc</sup>
0,4	(1,822 ± 0,028) <sup>c</sup>	(0,098 ± 0,007) <sup>b</sup>
0,5	(1,795 ± 0,082) <sup>bc</sup>	(0,081 ± 0,002) <sup>a</sup>

<sup>a,b,c,...</sup>: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê theo phân tích ANOVA ( $\alpha = 0,05$ )

### 3.3. Ảnh hưởng của thời gian hấp phụ bằng than hoạt tính và hấp phụ bởi chitosan

Thời gian có tác động đến hầu hết các phương pháp trích ly cũng như tinh sạch, thời gian quá ngắn khiến quá trình hấp phụ chưa hoàn toàn, thời gian quá dài ảnh hưởng lớn đến hàm lượng C-PC dẫn đến giảm hiệu suất thu hồi. Hệ số tinh sạch C-PC khi khảo sát thời gian hấp phụ bởi than hoạt tính thể hiện trong Bảng 3.

Than hoạt tính là một chất xốp có diện tích bề mặt hấp phụ lớn, khả năng phân tán và hấp phụ tốt, có thể hấp phụ các tạp chất vật lý. Do đó, thông thường thời gian cần thiết để hấp phụ các tạp chất không nhiều. Thời gian tinh sạch bằng than hoạt tính phù hợp cho thí nghiệm là 15 phút với hệ số tinh sạch đạt 2,01. Kết quả phù hợp với công bố của Fekrat *et al.* [16] rằng với thời gian hấp phụ bằng than hoạt tính lớn hơn 18 phút tác động xấu đến hàm lượng C-PC do than hoạt tính sẽ hấp phụ cả C-PC thay vì hấp thụ protein khác, Carol *et al.* cũng thực hiện tinh sạch với than hoạt tính và chitosan trong 15 phút, sau đó tiến hành ly tâm thu dịch cho bước tinh sạch tiếp theo [17].

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian hấp phụ bằng than hoạt tính và chitosan đến hệ số tinh sạch và hàm lượng C-PC

Thời gian (phút)	Hệ số tinh sạch	Hàm lượng C-PC (mg/mL)
5	(1,909 ± 0,020) <sup>a</sup>	(0,123 ± 0,003) <sup>d</sup>
15	(2,012 ± 0,025) <sup>b</sup>	(0,117 ± 0,009) <sup>d</sup>
25	(2,077 ± 0,056) <sup>b</sup>	(0,104 ± 0,003) <sup>c</sup>
35	(2,091 ± 0,035) <sup>b</sup>	(0,086 ± 0,005) <sup>b</sup>
45	(2,069 ± 0,065) <sup>b</sup>	(0,075 ± 0,007) <sup>a</sup>

<sup>a,b,c,d</sup>: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê theo phân tích ANOVA ( $\alpha = 0,05$ )

### 3.4. Tinh sạch C-PC bằng ammonium sulfate

Tiến hành rửa dịch sau ly tâm bằng ammonium sulfate với phân đoạn 1 (0-20% bão hòa) để loại bỏ một số protein tạp và khảo sát từ 20% bão hòa lên các nồng độ 30, 40, 50, 60% bão hòa để thu rửa C-PC [18]. Bảng 4 cho thấy nồng độ và hệ số tinh sạch của C-PC trong quá trình tinh sạch bằng ammonium sulfate.

Bảng 4. Ảnh hưởng của độ bão hòa ammonium sulfate đến tinh sạch C-PC

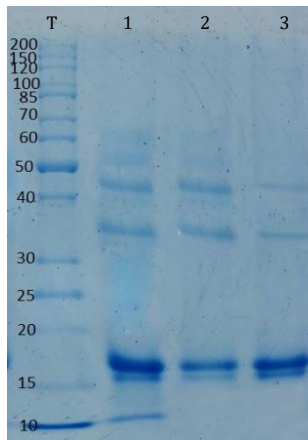
Thí nghiệm	Nồng độ bão hòa ammonium sulfate (%)	Tinh khiết	Hàm lượng C-PC (mg/mL)
1	20 - 30	(1,827 ± 0,057) <sup>a</sup>	(2,000 ± 0,060) <sup>a</sup>
2	20 - 40	(2,420 ± 0,046) <sup>b</sup>	(2,474 ± 0,055) <sup>b</sup>
3	20 - 50	(2,623 ± 0,042) <sup>c</sup>	(3,676 ± 0,030) <sup>c</sup>
4	20 - 60	(2,550 ± 0,078) <sup>c</sup>	(3,739 ± 0,119) <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup>: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê theo phân tích ANOVA ( $\alpha = 0,05$ )

Sau khi sơ bộ tinh sạch bằng than hoạt tính và chitosan, tiếp tục tiến hành tinh sạch bằng phương pháp kết tủa phân đoạn ammonium sulfate. Kết quả cho thấy, khi được rửa ở nồng độ bão hòa từ 20-50% thì hệ số tinh sạch của C-PC cao nhất đạt 2,62. Kết quả này tương tự với thí nghiệm của Silva *et al.* khi khảo sát quá trình rửa phân đoạn bằng ammonium sulfate ở các nồng độ bão hòa khác nhau: 20-50%, 25-50%, 35-50% và 40-50%, hệ số tinh sạch của C-PC đạt cao nhất là 1,66 ở phân đoạn 20-50%. Ở phân đoạn đầu 20%, hệ số tinh sạch của C-PC cải thiện không đáng kể, tuy nhiên, khi nồng độ bão hòa tăng lên 50% thì loại bỏ được đáng kể các protein tạp [19]. Tương tự với kết quả nghiên cứu của Moraes & Kalil khi tiến hành tinh sạch C-PC từ *S. platensis*, đã thực hiện kết tủa ở 0-20% và 20-50% và thu được hệ số tinh sạch cao gấp 2 lần so với dịch trích thô [20]. Phương pháp kết tủa phân đoạn cũng được Kamble *et al.* ứng dụng để tinh sạch C-PC từ bột tảo *Spirulina*, từ dịch trích có hệ số tinh sạch 0,161, qua giai đoạn rửa ammonium sulfate ở nồng độ bão hòa 50%, hệ số tinh sạch đã tăng lên đáng kể gấp 4 lần là 0,628 [21]. Patel *et al.* cũng sử dụng muối ammonium sulfate để thực hiện tinh sạch C-PC từ 2 loại tảo là *Spirulina* và *Phormidium*. Patel *et al.* thực hiện kết tủa 2 phân đoạn 25-50%, kết quả cho thấy, ở phân đoạn đầu 25% thì hệ số tinh sạch tăng lên không đáng kể (ở *Spirulina* tăng từ dịch trích thô 0,80 lên 0,82, *Phormidium* tăng từ 0,69 lên 0,73). Phân đoạn 50% cho thấy loại bỏ được một lượng lớn các tạp chất có trong dịch trích và độ tăng sạch tăng lên đáng kể (*Spirulina* tăng từ 0,82 lên 2,66, *Phormidium* tăng từ 0,73 lên 1,62) [8]. Các kết quả

trên đều cho thấy, C-PC bị kết tủa ở khoảng nồng độ ammonium sulfate là 50%. Tuy nhiên, khi so sánh kết quả với nghiên cứu của Song *et al.*, quá trình tinh sạch C-PC từ *S. platensis* bằng ammonium sulfate ở nồng độ bão hòa 20-30% đạt được hệ số tinh sạch cao nhất là 1,81, và khi nồng độ bão hòa của ammonium sulfate tăng trên 50% thì hệ số tinh sạch của C-PC bắt đầu giảm, thậm chí thấp hơn so với dịch trích ban đầu [11]. Sự khác biệt giữa các kết quả nghiên cứu có thể giải thích do các protein có nguồn gốc khác nhau có nồng độ ammonium sulfate cần thiết để tủa khác nhau. Theo nghiên cứu của Figueira *et al.*, thực hiện khảo sát thời gian kết tủa ở các mức 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ và 12 giờ, kết quả cho thấy không có sự khác biệt về hệ số tinh sạch giữa các mức thời gian khảo sát và 2 giờ được cho là thời gian tối ưu để thực hiện quá trình kết tủa ở mỗi phân đoạn [22]. Theo các nghiên cứu của Song *et al.* và Kamble *et al.*, 2 giờ cũng là khoảng thời gian thích hợp để thực hiện quá trình kết tủa protein [11, 21]. Vì vậy, kết tủa phân đoạn 20-50% nồng độ bão hòa ammonium sulfate là phù hợp để tinh sạch C-PC từ *C. demersum*.

Hiệu quả của quá trình tinh sạch bằng muối ammonium sulfate được trình bày ở Bảng 5, hiệu suất thu hồi đạt 51,11%.



Hình 1. Điện di C-PC sau mỗi bước tinh sạch  
(T: Thang chuẩn, 1: Dịch chiết thô; 2: C-PC sau tinh sạch với than hoạt tính và chitosan;  
3: C-PC sau tinh sạch với ammonium sulfate).

Bảng 5. Hiệu suất thu hồi sau quá trình tinh sạch C-PC

Quá trình xử lý	Thể tích mẫu (mL)	Hàm lượng C-PC (mg/mL)	Hàm lượng C-PC (mg/g sinh khối khô)	Hiệu suất thu hồi (%)
Trích ly 3 lần (trích kiệt)	200	0,089	4,430	100
Trích ly 1 lần (thông thường)	80	0,180	3,600	81,21
Tủa ammonium sulfate	2	3,680	1,840	51,11

#### 4. KẾT LUẬN

Ảnh hưởng của nồng độ chất gây hấp thụ, thời gian hấp thụ và kết tủa (than hoạt tính, tỷ lệ chitosan/dịch chiết), thời gian và độ bão hòa ammonium sulfate đến độ tinh khiết của C-PC đã được tiến hành khảo sát. Kết quả cho thấy: Nồng độ than hoạt tính 3% (w/v), tỷ lệ chitosan/dịch chiết 0,3% (v/v) với thời gian tủa trong 15 phút và nồng độ ammonium sulfate ở mức bão hòa 50% là phù hợp để sơ bộ tinh sạch C-PC từ rong *Ceratophyllum submersum*. Độ tinh khiết của C-PC cao hơn 6 lần so với C-PC ở dịch chiết thô (2,62 so với 0,4 mg/mL) và hiệu suất thu hồi đạt 51,11%.

## TÀI LIỆU KHAM KHẢO

1. Hyldgaard B., Sorrell B. and Brix H. - Closely related freshwater macrophyte species, *Ceratophyllum demersum* and *Ceratophyllum submersum*, differ in temperature response, *Freshwater Biology* **59** (4) (2014) 777-788.
2. Janauer G. and Dokulil M. - Macrophytes and algae in running waters, *Biological monitoring of rivers, Application perspectives* (2006) 89-109.
3. Vernès L., Granvillain P., Chemat F., Vian M. - Phycocyanin from *Arthrospira platensis*, Production, extraction and analysis, *Current Biotechnology* **4** (4) (2015) 481-491.
4. Rito-Palomares M., Nunez L. and Amador D. - Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for C-phycoerythrin recovery from *Spirulina maxima*, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **76** (12) (2001) 1273-1280.
5. Liao X., Zhang B., Wang X., Yan H. and Zhang X. - Purification of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* by single-step ion-exchange chromatography, *Chromatographia* **73** (3-4) (2011) 291-296.
6. Gupta A. and Sainis J. K. - Isolation of C-phycoerythrin from *Synechococcus* sp., (*Anacystis nidulans* BD1), *Journal of Applied Phycology* **22** (3) (2010) 231-233.
7. Minkova K., Tchernov A., Tchordadjieva M., Fournadjieva S., Antova R., Busheva M.C. - Purification of C-phycoerythrin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*, *Journal of Biotechnology* **102** (1) (2003) 55-59.
8. Patel A., Mishra S., Pawar R. and Ghosh P. - Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat, *Protein Expression Purification* **40** (2) (2005) 248-255.
9. Mittal R., Raghavarao K. - Extraction of R-Phycocyanin from marine macro-algae, *Gelidium pusillum*, employing consortia of enzymes, *Journal Algal Research* **34** (2018) 1-11.
10. Abalde J., Betancourt L., Torres E., Cid A. and Barwell C. - Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201, *Plant Science* **136** (1) (1998) 109-120.
11. Song W., Zhao C. and Wang S. - A large-scale preparation method of high purity C-phycoerythrin, *International Journal of Bioscience, Biochemistry Bioinformatics* **3** (4) (2013) 293-297.
12. Herrera A., Boussiba S., Napoleone V., Hohlberg A. - Recovery of C-phycoerythrin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*, *Journal of Applied Phycology* **1** (4) (1989) 325-331.
13. Gantar M., Simović D., Djilas S., Gonzalez W. W. and Miksovská J. - Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycoerythrin from *Limnospira* sp. strain 37-2-1, *Journal of Biotechnology* **159** (1-2) (2012) 21-26.
14. Safaei M., Maleki H., Soleimanpour H., Norouzy A., Zahiri H.S., Vali H., Noghabi K.A. - Development of a novel method for the purification of C-phycoerythrin pigment from a local cyanobacterial strain *Limnospira* sp. NS01 and evaluation of its anticancer properties, *Scientific Reports* **9** (1) (2019) 1-16.
15. Crini G. - Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review, *Bioresource Technology* **97** (9) (2006) 1061-1085.
16. Fekrat F., Nami B., Ghanavati H., Ghaffari A., Shahbazi M. - Optimization of chitosan/activated charcoal-based purification of *Arthrospira platensis* phycocyanin

- using response surface methodology, *Journal of Applied Phycology* **31** (2) (2019) 1095-1105.
17. Carol D'souza., Pradeep H.N., Chetan A. Nayak - Extraction of phycocyanin from *Spirulina plantesis* using sonication, *Int J Recent Sci Res* **9** (7) (2018) 27974-27978.
  18. Zhang Y.-M. and Chen F. - A simple method for efficient separation and purification of C-phycocyanin and allophycocyanin from *Spirulina platensis*, *Journal Biotechnology Techniques* **13** (9) (1999) 601-603.
  19. Silva L.A., Kuhn K.R., Moraes C.C., Burkert C.A. and Kalil S.J. - Experimental design as a tool for optimization of C-phycocyanin purification by precipitation from *Spirulina platensis*, *Journal of the Brazilian Chemical Society* **20** (1) (2009) 5-12.
  20. Moraes C.C., Kalil S.J. - Strategy for a protein purification design using C-phycocyanin extract, *Bioresource Technology* **100** (21) (2009) 5312-5317.
  21. Kamble S.P., Gaikar R.B., Padalia R.B. and Shinde K.D. - 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** (8) (2013) 149-153.
  22. Figueira F.d.S., Moraes C.C., Kalil S.J. - C-phycocyanin purification: multiple processes for different applications, *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **35** (3) (2018) 1117-112.

## ABSTRACT

### PRELIMINARY PURIFICATION OF C-PHYCOCYANIN FROM *Ceratophyllum Demersum* WITH ACTIVATED CHARCOAL, CHITOSAN AND AMMONIUM SULFATE

Nguyen Long Nhat, Do Mai Thi, Luu Truong Vu, Hoang Thi Ngoc Nhon\*  
*Ho Chi Minh City University of Food Industry*  
\*Email: nhonhtn@fst.edu.vn

C-phycocyanin (C-PC) from raw materials - a compound with many important activities (anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-cancer) has been extracted and preliminarily clean to increase purity for C-PC. C-PC extracts from the raw materials, after being adsorbed via activated carbon and chitosan at each survey parameter were precipitated with ammonium sulfate at suitable saturation concentration. The results showed that the concentration of activated carbon and chitosan was 3% (w/v) and 0.3% (v/v) for 15 minutes, ammonium sulfate precipitated to 50% saturation significantly improved the purity of C-PC (2.62) compared with extract (0.40) and recovery efficiency (51.11%).

**Keywords:** Ammonium sulfate, C-phycocyanin, *Ceratophyllum demersum*, activated charcoal, chitosan.