



University of Tehran

Journal of Fisheries

Home Page: <https://jfisheries.ut.ac.ir>

Online ISSN: 2423-7809

Extraction and purification of phycocyanin pigment from blue-green algae *Spirulina platensis*: structural characteristics and antioxidant properties analysis

Kobra Ziyaei¹ | Hamid Farahmand^{2*} | Zahra Ataie^{3,4*} |
Mohammad Ali Daneshmehr⁵ | Alireza Mirvaghefi⁶

1. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: k.ziyaei@ut.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: hfarahmand@ut.ac.ir
3. Corresponding Author, Evidence-based Phytotherapy & Complementary Medicine Research Center, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran. Email: zataie@abzums.ac.ir
4. Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.
5. Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran. Email: m.daneshmehr@abzums.ac.ir
6. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: avaghefi@ut.ac.ir

ARTICLE INFO

Article type:

Research Article

Article History:

Received: 11 December 2024

Revised: 31 January 2025

Accepted: 11 August 2025

Published online: 23 September 2025

Keywords:

Antioxidant,
Cytotoxicity,
Extraction,
Phycocyanin,
Spirulina,
Structural characteristics.

ABSTRACT

Phycocyanin, a blue pigment with fluorescent and antioxidant properties, is extracted from blue-green algae such as *Spirulina*. Enhancing the extraction and purification conditions of phycocyanin can broaden its applications as a food and pharmaceutical supplement. This study aimed to extract and purify phycocyanin from dried *Spirulina* biomass and investigate its structural features, cytotoxicity, and antioxidant activity. Phycocyanin was extracted using an ultrasonic bath technique (100 W power and 120 Hz frequency) and a freeze-thaw method (3 cycles). Purification was performed by ammonium sulfate precipitation (25% and 50% saturation) and dialysis membrane (12-14 kDa). The purity, selectivity, yield, and concentration of the extracted phycocyanin were determined to be 1.37, 14.57, 90.15±0.21 mg/g, and 6.01 mg/mL, respectively. The appearance of characteristic peaks in FTIR (peaks at cm⁻¹ 3443 (NH), cm⁻¹ 1625 (Amide I), cm⁻¹ 1543 (Amide II) (C=O stretching bond), and cm⁻¹ 1456 (CN)) and UV spectra (three distinct peaks at 268, 362, and 620 nanometers), along with α and β bands (with a weight range of 10-17 kDa) in SDS-PAGE gel, confirmed the structure and purity of the extracted phycocyanin. Additionally, the molecular weight of phycocyanin was determined to be 2.6×10^6 g/mol using gel permeation chromatography (GPC). Solubility results indicated a decrease in the solubility of extracted phycocyanin at pH= 4 (near the isoelectric point). Evaluation of cytotoxicity and antioxidant activity revealed a dose-dependent increase in the proliferation and viability of HFF2 cells and DPPH free radical scavenging when exposed to phycocyanin. The findings indicate that the use of various methods in extraction (ultrasonic bath and freeze-thaw) and purification (salt precipitation and dialysis membrane) results in the extraction of phycocyanin with significant potential for applications in various pharmaceutical and food industries.

Cite this article: Ziyaei, K., Farahmand, H., Ataie, Z., Daneshmehr, M.A., Mirvaghefi, A.R. (2025). Extraction and purification of phycocyanin pigment from blue-green algae *Spirulina platensis*: structural characteristics and antioxidant properties analysis. *Journal of Fisheries*, 78 (3), 189-203. DOI: <http://doi.org/10.22059/jfisheries.2025.386883.1447>



© The Author(s) **Publisher:** University of Tehran Press.

DOI: <http://doi.org/10.22059/jfisheries.2025.386883.1447>



دانشگاه تهران

شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

شاپا الکترونیکی: ۷۸۰۹-۲۴۲۳

سایت نشریه: <https://jfisheries.ut.ac.ir>

استخراج و خالص سازی رنگدانه فایکوسیانین از ریز جلبک سبز-آبی اسپیرولینا، *Spirulina platensis*: بررسی ویژگی های ساختاری و خاصیت آنتی اکسیدانی

کبری ضیایی^۱ | حمید فرحمند^{۲*} | زهرا عطایی^{۳*} | محمد علی دانش مهر^۴ | علیرضا میرواقفی^۵

۱. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: k.ziyaei@ut.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: hfarahmand@ut.ac.ir

۳. نویسنده مسئول، مرکز تحقیقات گیاه درمانی و طب مکمل مبتنی بر شواهد، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران. رایانامه: zataie@abzums.ac.ir

۴. گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران.

۵. گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران. رایانامه: m.daneshmehri@abzums.ac.ir

ع گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: avaghefi@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

چکیده

نوع مقاله:

پژوهشی

تاریخ های مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۲۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۱/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۲۰

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۷/۰۱

کلیدواژه:

اسپیرولینا،

فایکوسیانین،

استخراج،

آنتی اکسیدانی،

سمیت سلولی،

ویژگی های ساختاری.

فایکوسیانین رنگدانه ای آبی رنگ و دارای خواص فلورسانسی و آنتی اکسیدانی است که از جلبک های سبز-آبی مانند اسپیرولینا استخراج می گردد. بهبود شرایط استخراج و خالص سازی فایکوسیانین می تواند دامنه کاربرد آن را به عنوان مکمل غذایی و دارویی افزایش دهد. از همین رو، این مطالعه با هدف استخراج و خالص سازی فایکوسیانین از زیست توده خشک اسپیرولینا و بررسی ویژگی های ساختاری، سمیت سلولی و فعالیت آنتی اکسیدانی آن انجام شد. استخراج فایکوسیانین با استفاده از تکنیک حمام فراصوت (توان ۱۰۰ وات و فرکانس ۱۲۰ هرتز) و روش انجماد-انجمادزدایی طی سه چرخه انجام شد. خالص سازی با استفاده از سولفات آمونیوم (۲۵ و ۵۰ درصد اشباعیت) و سپس غشاء دیالیز (۱۲-۱۴ کیلودالتون) انجام گردید. میزان خلوص، ضریب انتخاب پذیری، بازدهی و غلظت فایکوسیانین استخراج شده به ترتیب ۱/۳۷، ۱۴/۵۷، ۹۰/۵ (میلی گرم در گرم وزن خشک) و ۶/۰۱ (میلی گرم در میلی لیتر) تعیین شد. ظهور پیک های شاخص در طیف های تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR) (پیک های محدوده 3443 cm^{-1} (NH)، 1625 cm^{-1} (آمید I)، 1543 cm^{-1} (آمید II) (پیوند کششی C=O) و 1456 cm^{-1} (CN))، اسپکتروفتومتری (UV) (سه پیک مشخص در محدوده های ۲۶۸، ۳۶۲ و ۶۲۰ نانومتر) و باندهای آلفا و بتا (با محدوده وزنی ۱۷-۱۰ کیلودالتون) در ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) تأیید کننده ساختار و خلوص فایکوسیانین استخراجی است همچنین وزن ملکولی فایکوسیانین با استفاده از کروماتوگرافی نفوذ ژل (GPC) نیز $10^6 \times 2/6$ گرم بر مول تعیین شد. نتایج حاصل از حلالیت بیانگر کاهش حلالیت فایکوسیانین استخراجی در pH=۴ (نزدیک نقطه ایزوالتریک) بود. ارزیابی سمیت سلولی و فعالیت آنتی اکسیدانی نیز بیانگر افزایش وابسته به غلظت در تکثیر و زنده ماندن سلول های HFF2 و مهار کنندگی رادیکال های آزاد DPPH در مواجهه با فایکوسیانین بود. یافته های به دست آمده نشان می دهد که استفاده از روش های مختلف در استخراج (حمام فراصوت و انجماد-انجمادزدایی) و خالص سازی (رسوب با نمک و غشاء دیالیز) منجر به استخراج فایکوسیانینی با پتانسیل های بالقوه در صنایع مختلف می گردد.

استناد: ضیایی؛ کبری، فرحمند؛ حمید، عطایی؛ زهرا، دانش مهر؛ محمد علی، میرواقفی؛ علیرضا (۱۴۰۴). استخراج و خالص سازی رنگدانه فایکوسیانین از ریز جلبک سبز-آبی اسپیرولینا،

Spirulina platensis: بررسی ویژگی های ساختاری و خاصیت آنتی اکسیدانی. نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران، ۷۸ (۳)، ۲۰۳-۱۸۹.

DOI: <http://doi.org/10.22059/jfisheries.2025.386883.1447>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: <http://doi.org/10.22059/jfisheries.2025.386883.1447>



۱. مقدمه

ریز جلبک *Spirulina platensis* یک سیانوباکتری سبز-آبی است که به دلیل دارا بودن ترکیبات شیمیایی منحصر به فرد و ارزش غذایی، توسط سازمان بهداشت جهانی به عنوان یک غذای فوق العاده (Superfood) شناخته شده است (Shao et al., 2019). سیانوباکتری ها سرشار از چربی ها، پروتئین ها، کربوهیدرات ها، کاروتنوئیدها، (Hsieh-Lo et al., 2019)، اسیدهای چرب غیر اشباع، ویتامین ها، پلی ساکاریدها، مواد معدنی مانند کلسیم، آهن، سلنیوم، روی، منیزیم، منگنز (Gabr et al., 2020)، فایکوبیلی پروتئین ها و کلروفیل ها، (Choi and Lee, 2018) اند که به دلیل حضور همین ترکیبات مغذی و زیستی دارای کاربردهای بالقوه درمانی و غذایی زیادی اند (Munawaroh et al., 2020).

نشان داده شده است که جلبک اسپیرولینا آنتی اکسیدان های آنزیمی درون زا را تقویت، رادیکال های آزاد را جذب و پراکسیداسیون لیپیدی را در داخل بدن مهار می کند (Abdelkhalek et al., 2015). همچنین به دلیل خواص ضد التهابی و تعدیل کننده سیستم ایمنی (Nikolova et al., 2024) و محافظت کنندگی کبد (İlter et al., 2018) و آنتی اکسیدانی (Rame et al., 2018) به طور فزاینده ای به عنوان مکمل غذایی می تواند مورد استفاده قرار گیرد. اسپیرولینا حاوی حداکثر ۱ گرم در کیلوگرم کاروتنوئید و بین ۶ تا ۱۱ گرم در کیلوگرم کلروفیل و فایکوبیلی پروتئین ها می باشد (Nikolova et al., 2024). فایکوبیلی پروتئین ها شامل فایکوارترین (C-PE، رنگ قرمز) و فایکوسیانین (PC، رنگ آبی) است. کوسیانین ها شامل C-phycocyanin (C-PC)، R-phycocyanin (R-PC) و آلفا فایکوسیانین (APC) می باشند که از نظر خواص طیفی، ترکیب ساختاری و رنگ متفاوت هستند (Ruiz-Domínguez et al., 2019). بسته به شرایط و محیط رشد، اسپیرولینا می تواند تا ۲۰ درصد فایکوسیانین داشته باشد (Sudhakar et al., 2015). این رنگدانه به عنوان رنگ طبیعی در انواع محصولات غذایی و آرایشی بهداشتی استفاده می گردد (Li et al., 2022).

فایکوسیانین را می توان هم از زیست توده مرطوب و هم زیست توده خشک جلبک استخراج کرد، اگرچه مطالعات نشان داده اند که زیست توده مرطوب بازدهی بیشتری دارد (Mao et al., 2024). قرار گرفتن در معرض دمای بالا در طول فرآیندهای خشک کردن جلبک می تواند بر فایکوسیانین تأثیر گذاشته و به از بین رفتن آن نیز کمک کند (Sarada et al., 1999). بازده استخراج نیز به روش و حلال های مورد استفاده، نسبت حلال به زیست توده و زمان استخراج بستگی دارد (Abalde et al., 1998). امروزه تکنیک ها مختلفی برای استخراج فایکوسیانین استفاده می شود که شامل روش های شیمیایی (استفاده از اسید آلی و معدنی)، فیزیکی (انجماد-انجمادزدایی، فراصوت و میدان الکتریکی پالسی)، آنزیمی (لیزوزیم) و ترکیبی از این روش ها است. روش انجماد-انجمادزدایی به عنوان ساده ترین و کارآمدترین روش توصیه می گردد که به طور گسترده برای استخراج فایکوسیانین از سیانوباکتری های آب شیرین و دریایی مورد استفاده قرار می گیرد (Moraes et al., 2011; Chittapun et al., 2020).

بسیاری از مطالعات گزارش کردند که کارآمدترین روش برای استخراج فایکوسیانین از *Spirulina* sp. روش انجماد-انجمادزدایی می باشد (Chittapun et al., 2020; Tavanandi et al., 2018). چرخه های انجماد-انجمادزدایی روشی است که باعث آسیب مداوم به غشای پلاسماتیک سلولی می شود (Fernandes et al., 2023). تعداد چرخه ها و نسبت های بهینه حلال استخراج از عواملی هستند که می توانند بر میزان خلوص و بازده فایکوسیانین استخراج شده تأثیر گذارند که توسط بسیاری از مطالعات نیز مورد بررسی قرار گرفته اند (Tavanandi et al., 2018; Ge et al., 2019). با توجه به مطالعات انجام شده، سیکل های متوالی انجماد-انجمادزدایی به دلیل افزایش حجم ناشی از کریستال های یخ و پاره شدن غشای سلولی، فایکوسیانین به راحتی از سلول ها آزاد و استخراج می گردد (Moraes et al., 2011). البته با توجه به دیواره های سلولی چند لایه ای اسپیرولینا، تخریب آنها برای استخراج فایکوسیانین بسیار مهم و ضروری است (Jaeschke et al., 2019). از همین رو بسیاری دیگر از تکنیک ها مانند فراصوت که به تخریب بیشتر این دیواره ها کمک می کند، می تواند به افزایش بازدهی استخراج کمک کند. بنابراین، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر شرایط استخراج با تکنیک فراصوت و سپس روش انجماد-انجمادزدایی بر بازدهی، شاخص های خلوص، ویژگی های ساختاری، و فعالیت آنتی اکسیدانی فایکوسیانین استخراج شده از *S. platensis* انجام شد.

۲. مواد و روش ها

۲-۱. استخراج و خالص سازی فایکوسیانین

استخراج فایکوسیانین در این پژوهش از ریز جلبک *S. platensis* (خریداری شده از شرکت ریز جلبکی پارسیان (رشت، ایران) و با استفاده از تکنیک فراصوت و سپس روش انجماد-انجمادزدایی انجام شد. بر همین اساس، ابتدا سوسپانسیون جلبکی (۶ درصدی) بر اساس روش گزارش شده توسط Li و همکاران (۲۰۱۹) تهیه شد. به همین منظور، ۳۰۰ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۱۰ میلی مولار (pH=۷/۴) به ۱۸ گرم ریز جلبک اسپیرولینا خشک اضافه شد و پس از هم زدن، به مدت ۳۰ دقیقه در حمام فراصوت با توان ۱۰۰ وات و فرکانس ۱۲۰ هرتز قرار داده شد. سوسپانسیون حاصل پس از همگن شدن به فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد منتقل گردید و پس از گذشت ۲۴ ساعت از انجماد، انجمادزدایی در دمای محیط انجام شد. این چرخه سه بار تکرار شد و در نهایت بعد از آخرین مرحله انجمادزدایی سوسپانسیون جلبکی به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ (PART AZMA.co، ساخت ایران) شد و سپس روشناور (سوپرناتانت) جمع آوری شد (Li et al., 2019). خالص سازی فایکوسیانین با استفاده از روش رسوب دهی با نمک (Salting out) آمونیوم سولفات $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) طبق روش Munawaroh و همکاران (۲۰۲۰) انجام گرفت. بر همین اساس، دو سطح اشباعیت ۲۵ و ۵۰ درصد نمک آمونیوم سولفات در نظر گرفته شد. به منظور خالص سازی، ابتدا اشباعیت سوپرناتانت حاصل از مرحله قبل با افزودن نمک آمونیوم سولفات به ۲۵ درصد رسید و پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد و طی هم زدن مداوم، سانتریفیوژ (سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه) گردید و سپس سوپرناتانت جمع آوری شد. پس از این، میزان اشباعیت سوپرناتانت حاصل به ۵۰ درصد افزایش یافت و همانند مرحله قبل پس از ۲۴ ساعت نگهداری سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ رسوبات حاصل جمع آوری و پس از افزودن بافر فسفات سدیم (۱۰ میلی مولار pH=۷/۴) به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد با غشاء دیالیز (۱۴-۱۰ کیلودالتون) دیالیز و سپس با خشک کن انجمادی پودر گردید.

۲-۲. ارزیابی های تحلیلی فایکوسیانین

شاخص های میزان خلوص، غلظت، بازده و شاخص انتخابی، جهت ارزیابی تحلیلی فایکوسیانین تولید شده اندازه گیری و ارائه شد. برای محاسبه این شاخص ها، جذب فایکوسیانین خالص شده از مراحل قبل با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-vis) (Unico, 2100)، در طول موج ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر اندازه گیری شد.

نسبت میزان جذب دو طول موج ۲۸۰ و ۶۲۰ نانومتر به عنوان خلوص فایکوسیانین گزارش گردید (معادله ۱). غلظت فایکوسیانین نیز به عنوان مقدار کل فایکوسیانین و آلفافایکوسیانین در نظر گرفته شد. این مقادیر به عنوان میزان جذب در ۶۲۰ و ۶۵۲ نانومتر اندازه گیری و با استفاده از معادلات زیر محاسبه شدند (معادله های ۲ و ۳): (Chaiklahan et al., 2012).

$$\text{غلظت فایکوسیانین} = \frac{A_{620}}{A_{280}} \quad (\text{معادله ۱})$$

$$\text{غلظت فایکوسیانین (میلی گرم بر میلی لیتر)} = \frac{A_{620} - 0.474 (A_{652})}{5.34} \quad (\text{معادله ۲})$$

$$\text{غلظت آلفافایکوسیانین (میلی گرم بر میلی لیتر)} = \frac{A_{652} - 0.208 (A_{620})}{5.09} \quad (\text{معادله ۳})$$

ضریب انتخاب پذیری (Selectivity) نیز با نسبت میزان جذب در دو طول موج ۶۲۰ و ۶۸۰ نانومتر گزارش شد (معادله ۴). این ضریب به عنوان شاخصی برای ارزیابی وجود کلروفیل *a* در محلول فایکوسیانین استخراجی در نظر گرفته شد.

$$\text{ضریب انتخابی} = \frac{A_{620}}{A_{680}} \quad (\text{معادله ۴})$$

بازده استخراج فایکوسیانین استخراجی نیز از طریق معادله ۵ محاسبه شد: (Demirel and Sukatar, 2019).

$$\text{بازده (میلی گرم بر گرم)} = \frac{(C-PC) \times (V)}{DB} \quad (\text{معادله ۵})$$

که در این معادله (C-PC): معادل غلظت فایکوسیانین محاسبه شده بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر، V: حجم بافر فسفات سدیم (میلی لیتر) مورد استفاده و DB: هم میزان زیست توده خشک (گرم) جلبکی است.

۲-۳. اسپکتروفتومتری (UV)

یکی از اولین واکاوی های مورد نیاز جهت بررسی میزان خلوص و تغییرات پس از خالص سازی در فایکوسیانیین، بررسی پیک جذبی آن در بازه طول موجی ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر و تغییر در میزان جذب پیک های شاخص آن، به ویژه در ۶۲۰ نانومتر (λ_{max})، می باشد (Bai et al., 2023). از همین رو از فایکوسیانیین خشک و پودر شده محلولی با غلظت ۰/۳ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه و سپس جذب آن در محدوده طول موجی ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد.

۲-۴. طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR)^۱

طیف FTIR جهت بررسی ویژگی های ساختاری فایکوسیانیین استخراج شده با استفاده از دستگاه طیف سنج فروسرخ Thermo Nicolet iS10 Fourier (Nicolet iS10) به دست آمد. به همین جهت ابتدا نمونه ها با پودر پتاسیم برماید خشک شده با نسبت ۱ به ۱۰۰ مخلوط و سپس به صورت ورقه ای فشرده شدند. طیف نمونه ها بین $4000-400\text{ cm}^{-1}$ و با وضوح 4 cm^{-1} اندازه گیری شد (Munawaroh et al., 2020).

۲-۵. تعیین وزن ملکولی

۲-۵-۱. ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE)

جهت بررسی میزان خلوص و وزن ملکولی فایکوسیانیین استخراج شده، SDS-PAGE روی یک سل الکتروفورز (Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad)) انجام شد. نمونه فایکوسیانیین (۲ میلی گرم بر میلی لیتر) با نسبت ۱ به ۵ با بفر (SDS-) (buffer sample 6X) مخلوط به مدت ۲ دقیقه جوشانده شد و پس از آن، ۶ میکرولیتر از مخلوط نهایی برای الکتروفورز استفاده شد. سپس نمونه های آماده شده به همراه لدر (Sinaclon7001sl (10-250 KDa)) روی ژل های جداکننده و فشرده کننده ۱۵ و ۶ درصد (PAGE) بارگذاری شدند. الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت برای جداسازی پروتئین ها براساس وزن مولکولی آنها انجام شد. پس از الکتروفورز، ژل ها به مدت ۶۰ دقیقه با استفاده از رنگ بریلینانت کوماسی بلو، رنگ آمیزی شدند تا باندهای تشکیل شده قابل مشاهده باشند. پس از آن، ژل ها با استفاده از روش های استاندارد رنگبری شدند و در نهایت، ژل ها برای تجزیه و تحلیل بیشتر تصویربرداری شدند (Paramanya et al., 2024).

۲-۵-۲. تعیین کروماتوگرافی نفوذ ژل (GPC)^۲

یکی دیگر از روش های تعیین وزن ملکولی پلیمرها کروماتوگرافی نفوذ ژل (GPC) است. به همین منظور نمونه فایکوسیانیین در آب دیونیزه حل شد و سپس از فیلتر غشایی ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد و در نهایت روی ستون آبی GPC (Water, Pl aquagel-) (OH 8 μm mixed-H 300 $\times$ 7.5mm (6000 – 107 g/mol)) تحت شرایط دمایی ۳۵ درجه سانتی گراد و سرعت ۱ ml/min میلی لیتر/دقیقه اعمال شد (Soliman et al., 2024).

۲-۶. حلالیت

یکی از مهمترین خواص عملکردی پروتئین ها میزان حلالیت آنها است. در این پژوهش بعد از استخراج فایکوسیانیین، میزان حلالیت آن براساس روش ارائه شده توسط Charoensuk و همکاران (۲۰۱۸) و Lu و همکاران (۲۰۲۱) با اندکی اصلاحات اندازه گیری شد. به طور خلاصه، محلول فایکوسیانیین با غلظت ۱ درصد (وزنی / حجمی) در آب مقطر تهیه شد و سپس و تحت هم زدن آهسته در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت نگهداری شد. جهت بررسی حلالیت فایکوسیانیین در pH های مختلف pH محلول فایکوسیانیینی از ۳ تا ۹ تنظیم شد و پس از آنکه یک ساعت هم زده شد در این pH ها و در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. سپس محتوای پروتئینی در سوپرناتانت

^۱Fourier transform infrared spectroscopy

^۲ Gel permeation chromatography

جمع‌آوری شده و با استفاده از روش لوری (Oliver H. Lowry) اندازه‌گیری شد. برای محاسبه میزان حلالیت فایکوسیانین از معادله زیر استفاده شد:

$$\text{معادله ۶)} \quad \text{درصد حلالیت} = \frac{C_s}{C_0} \times 100$$

که در آن C_0 : غلظت اولیه فایکوسیانین (میلی گرم بر میلی لیتر) برای محلول فایکوسیانینی می‌باشد و C_s : (میلی گرم بر میلی لیتر) غلظت فایکوسیانین در سوپرناتانت بعد از سانتریفیوژ می‌باشد.

۲-۷. سمیت سلولی

برای بررسی سمیت سلولی فایکوسیانین استخراج شده از روش MTT^1 استفاده گردید. MTT رایج‌ترین روش برای بررسی فعالیت متابولیکی سلول به‌عنوان شاخص میزان تکثیر و سمیت سلولی می‌باشد. از همین رو سلول‌های فیروبلاست HFF2 از انستیتو پاستور خریداری شده و سپس در محیط کامل DMEM-F12 همراه با سرم جنین گاوی (FBS)^۲ ۱۰ درصد و محلول آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین (۱ درصد وزنی/وزنی) و در اتمسفر مرطوب با ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد هوا در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. پس از کشت (با تراکم ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک)، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف فایکوسیانین (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) تیمار و انکوبه شدند (Villela et al., 2024). پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، محیط رویی سلول‌ها دور ریخته شد و چاهک‌ها با بافر فسفات سدیم شسته شدند و سپس محلول MTT ۱:۱۱ به هر چاهک اضافه شد. پس از انکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت سه ساعت، معرف MTT با دقت از چاهک‌ها خارج و با دی متیل سولفوکسید (DMSO) ۱۰۰ درصد جایگزین شد. پس از این، میزان جذب محلول هر چاهک به ترتیب در طول موج‌های ۵۴۰ و ۵۷۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد (Dierckx et al., 2024).

۲-۸. فعالیت آنتی‌اکسیدانی

جهت ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی فایکوسیانین‌ها از روش و معرف DPPH (۲، ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل)^۳ استفاده شد. در این ارزیابی، غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر فایکوسیانین با محلول متانولی از پیش آماده‌شده DPPH (۴ میلی مولار) با نسبت ۱:۱ ترکیب و پس از نیم ساعت انکوبه کردن در یک محیط تاریک و در دمای اتاق، جذب آنها در ۵۱۷ نانومتر قرائت شد و سپس درصد مهارکنندگی آن با استفاده از معادله ۷ محاسبه گردید (Paramanya et al., 2024). محلول متانولی DPPH بدون نمونه فایکوسیانین به‌عنوان شاهد استفاده شد.

$$\text{معادله ۷)} \quad \text{درصد مهارکنندگی} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

که در آن A_0 : میزان جذب نمونه کنترل (محلول متانولی DPPH) و A_1 : میزان جذب محلول DPPH بعد از اضافه کردن نمونه‌ها می‌باشد.

۲-۹. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

به‌منظور تحلیل آماری داده‌ها، از نرم‌افزار (SPSS نسخه ۱۸) استفاده گردید. نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کولموگروف-اسمیرنوف تعیین شدند. داده‌های پارامتری توسط تجزیه واریانس یک‌طرفه ANOVA و داده‌های ناپارامتری توسط آنالیز Kruskal-Wallis با سطح اطمینان ۹۵ درصد ارزیابی شدند و سپس به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان گردیدند.

¹ 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide

² Fetal bovine serum

³ 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

۳. نتایج

۳-۱. استخراج، خالص سازی و ارزیابی های تحلیلی فایکوسیانین استخراج شده از *S. platensis*

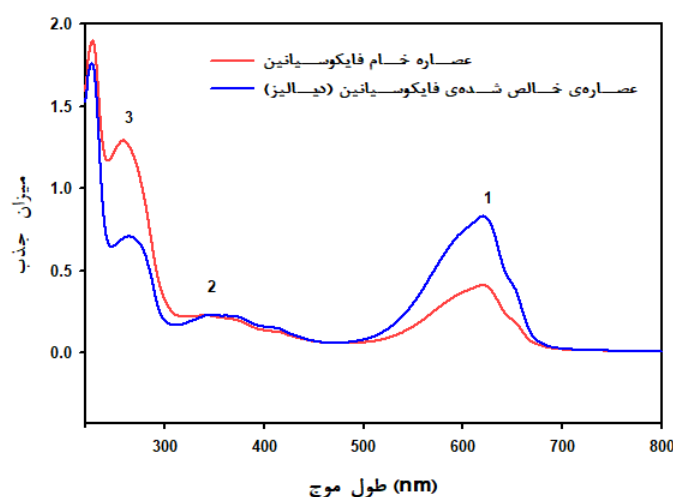
شاخص های مرتبط با ارزیابی تحلیلی فایکوسیانین استخراج شده در جدول ۱ ارائه شده است. با توجه به نتایج، استخراج و خالص سازی فایکوسیانین در این مطالعه طی چهار مرحله اصلی، تهیه عصاره خام (مرحله اول)، رسوب با نمک آمونیوم سولفات $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) با اشباعیت های ۲۵ (مرحله دوم) و ۵۰ درصد (مرحله سوم) و سپس دیالیز با غشاء (مرحله چهارم) انجام شد. براساس نتایج، پس از افزودن نمک آمونیوم سولفات و رساندن اشباعیت عصاره خام فایکوسیانین از صفر به ۲۵ درصد، میزان فایکوسیانین (A_{620}/A_{280}) نیز از ۰/۴۴ به ۰/۴۷ افزایش یافت. با افزودن بیشتر نمک و افزایش اشباعیت تا ۵۰ درصد، میزان خلوص فایکوسیانین نیز به طور معنی داری ($P < 0/50$) به ۱/۲۶ افزایش یافت. در آخرین مرحله، که خالص سازی با غشاء دیالیز می باشد میزان خلوص پس از ۴۸ ساعت دیالیز به ۱/۳۷ افزایش یافت. بنابراین از تولید عصاره خام تا دیالیز با غشاء دیالیز، خلوص فایکوسیانین استخراجی سه برابر افزایش یافت.

۳-۲. طیف جذبی عصاره خام فایکوسیانین

شکل ۱ بیانگر طیف جذبی عصاره خام فایکوسیانین در طول موج های بین ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر می باشد. با توجه به شکل، طیف جذبی حاصل از فایکوسیانین استخراج شده دارای ۳ پیک در محدوده های ۲۶۸ (پیک شماره ۳)، ۳۶۲ (پیک شماره ۲) و ۶۲۰ نانومتر (پیک شماره ۱) می باشد که پیک های شماره ۲ و ۳ به ترتیب بیانگر حضور کاروتنوئیدها (یا بیلین ها) و پروتئین ها (اسیدهای آمینه آروماتیک) می باشند. پیک شماره ۱، نیز وجود رنگدانه های فایکوسیانین را در این عصاره مشخص می کند. با توجه به شکل، با انجام فرآیندهای خالص سازی بیشتر، مانند رسوب با نمک آمونیوم سولفات و غشاء دیالیز، میزان جذب نیز در طول موج ۶۲۰ نانومتر افزایش یافت (جدول ۱ و شکل ۱). همچنین هیچ پیک جذبی در طول موج های ۵۴۰ و ۶۵۰ نانومتر مشاهده نگردید که نشان دهنده عدم وجود سایر فایکوبیلی پروتئین ها می باشد.

جدول ۱- شاخص های مرتبط با ارزیابی های تحلیلی فایکوسیانین استخراج شده از *S. platensis*

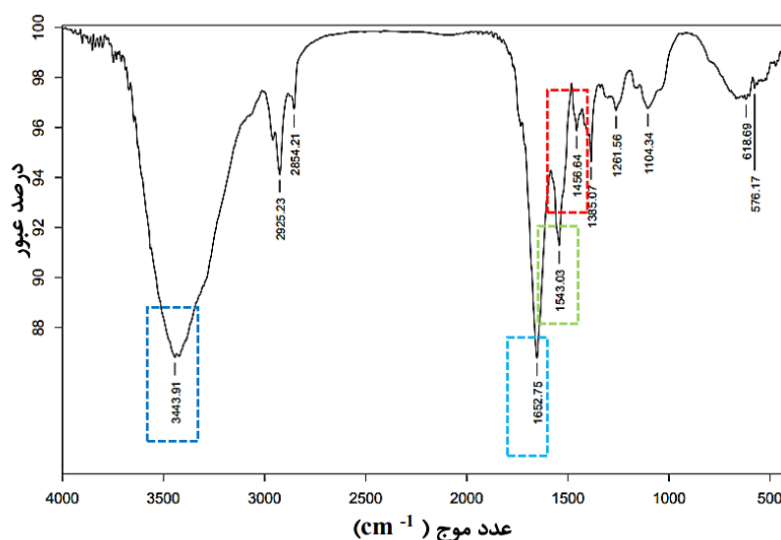
غلظت فایکوبیلی پروتئین ها (میلی گرم بر گرم)		میزان جذب (A)						مراحل
آلوفایکوسیانین	فایکوسیانین	ضریب انتخاب پذیری ($\frac{A_{620}}{A_{680}}$)	خلوص ($\frac{A_{620}}{A_{280}}$)	جذب ۶۵۲ نانومتر	جذب ۶۸۰ نانومتر	جذب ۶۲۰ نانومتر	جذب ۲۸۰ نانومتر	
۱/۰۷	۲/۹۸	۹/۷۶	۰/۴۴	۰/۱۹۴	۰/۰۴۲	۰/۴۱۰	۰/۹۲۶	مرحله ۱ (عصاره خام)
۱/۳۶	۲/۹۲	۴/۹۲	۰/۴۷	۰/۲۲۶	۰/۰۸۵	۰/۴۱۹	۰/۸۸۴	مرحله ۲ (اشباعیت ۲۵ درصد نمک آمونیوم سولفات)
۲/۹۲	۷/۹۹	۱۵/۱۲	۱/۲۶	۰/۵۲۷	۰/۰۷۳	۱/۱۰۴	۰/۸۷۰	مرحله ۳ (اشباعیت ۵۰ درصد نمک آمونیوم سولفات)
۲/۲۱	۶/۰۱	۱۴/۵۷	۱/۳۷	۰/۳۹۸	۰/۰۵۷	۰/۸۳۱	۰/۶۰۶	مرحله ۴ (غشاء دیالیز)
			۹۰/۱۵					بازدهی (میلی گرم بر گرم)
غلظت فایکوبیلی پروتئین ها (میلی گرم بر گرم)		میزان جذب (A)						مراحل
آلوفایکوسیانین	فایکوسیانین	ضریب انتخاب پذیری ($\frac{A_{620}}{A_{680}}$)	خلوص ($\frac{A_{620}}{A_{280}}$)	جذب ۶۵۲ نانومتر	جذب ۶۸۰ نانومتر	جذب ۶۲۰ نانومتر	جذب ۲۸۰ نانومتر	
۱/۰۷	۲/۹۸	۹/۷۶	۰/۴۴	۰/۱۹۴	۰/۰۴۲	۰/۴۱۰	۰/۹۲۶	مرحله ۱ (عصاره خام)
۱/۳۶	۲/۹۲	۴/۹۲	۰/۴۷	۰/۲۲۶	۰/۰۸۵	۰/۴۱۹	۰/۸۸۴	مرحله ۲ (اشباعیت ۲۵ درصد نمک آمونیوم سولفات)
۲/۹۲	۷/۹۹	۱۵/۱۲	۱/۲۶	۰/۵۲۷	۰/۰۷۳	۱/۱۰۴	۰/۸۷۰	مرحله ۳ (اشباعیت ۵۰ درصد نمک آمونیوم سولفات)
۲/۲۱	۶/۰۱	۱۴/۵۷	۱/۳۷	۰/۳۹۸	۰/۰۵۷	۰/۸۳۱	۰/۶۰۶	مرحله ۴ (غشاء دیالیز)
			۹۰/۱۵					بازدهی (میلی گرم بر گرم)



شکل ۱- نمودار طیف جذبی UV-vis عصاره خام و خالص شده فایکوسیسانین استخراج شده از *S. platensis*
پیک شماره ۱. فایکوسیسانین ۲. بیلین، کاروتنوئیدها و پیک شماره ۳. پروتئین‌ها (آمینواسیدهای آروماتیک)

۳-۳. طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR)

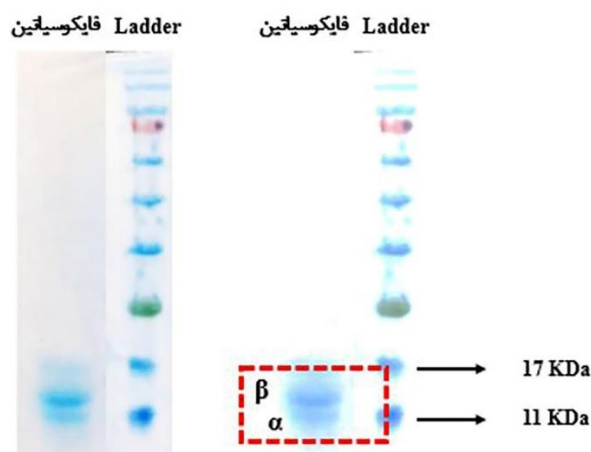
جهت بررسی ترکیب و ساختار شیمیایی فایکوسیسانین از طیف‌سنجی FTIR استفاده گردید. با توجه به شکل ۲، در طیف IR فایکوسیسانین چندین پیک شاخص قابل مشاهده می‌باشد که از ویژگی‌های اصلی ساختاری در فایکوسیسانین می‌باشند. پیک‌های محدوده 3443.91 cm^{-1} (NH)، 1622.75 cm^{-1} (آمید I)، 1543.03 cm^{-1} (آمید II) (پیوند کششی C=O) و 1456.64 cm^{-1} (CN) از پیک‌های برجسته ساختاری در طیف فایکوسیسانین می‌باشند. ظهور هر کدام از این پیک‌ها تأییدکننده ساختار فایکوسیسانین می‌باشد.



شکل ۲- نمودار طیف FTIR فایکوسیسانین استخراج شده از *S. platensis*

۳-۴. SDS-PAGE

در این پژوهش جهت ارزیابی وزن ملکولی و تأیید زیرواحدهای تشکیل‌دهنده فایکوسیسانین استخراج شده، از الکتروفورز (SDS-PAGE) استفاده گردید. با توجه به شکل ۳، دو باند پروتئینی متمایز آلفا (α) و بتا (β) با وزن ملکولی بین ۱۰ و ۱۷ کیلو دالتون در ژل فایکوسیسانین استخراجی مشاهده گردید. هر دو زیر واحد آلفا و بتا ساختار هسته پروتئین را تشکیل می‌دهند و به تعداد مساوی در فایکوسیسانین وجود دارند.



شکل ۳- الکتروفورز (SDS-PAGE) فایکوسیانیین استخراج شده از *S. platensis*

۳-۵. کروماتوگرافی نفوذ ژل (GPC)

یکی از مهمترین خواص فیزیکوشیمیایی ترکیبات آلی تعیین وزن مولکولی آنهاست. GPC یکی از نسبی ترین و دقیق ترین تکنیک ها برای تعیین وزن مولکولی است. با توجه به منحنی های به دست آمده میزان وزن ملکولی فایکوسیانیین استخراج شده $2/6 \times 10^6$ گرم بر مول و میزان شاخص پراکندگی $1/33$ به دست آمد (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج کروماتوگرافی نفوذ ژل فایکوسیانیین استخراج شده از *S. platensis*

زمان بازداری (دقیقه)	وزن ملکولی متوسط عددی (Mn) (گرم بر مول)	وزن ملکولی (Mw) (گرم بر مول)	شاخص پراکندگی چندگانه (PDI)
۱۲/۳۷۳	$1/95 \times 10^6$	$2/6 \times 10^6$	۱/۳۳

۳-۶. حلالیت

داده های حاصل از حلالیت فایکوسیانیین در pH های مختلف ۳، ۴ و ۵ در جدول ۳ نشان داده شده است. براساس نتایج، فایکوسیانیین کمترین حلالیت ($28/91 \pm 1/8$ درصد) را در $pH = 4$ ، که نزدیک به نقطه ایزوالکتریک آن ($pI = 3/4$) است، نشان داد. با افزایش pH به ۵ حلالیت به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0/05$).

جدول ۳- میزان حلالیت فایکوسیانیین استخراج شده از *S. platensis*

حلالیت (درصد)	pH
$42/36 \pm 0/34^{a*}$	۳
$28/91 \pm 1/8^b$	۴
$94/87 \pm 1/5^c$	۵

* اعداد بیانگر میانگین $\pm$ انحراف معیار می باشند.

میانگین های دارای حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ می باشند.

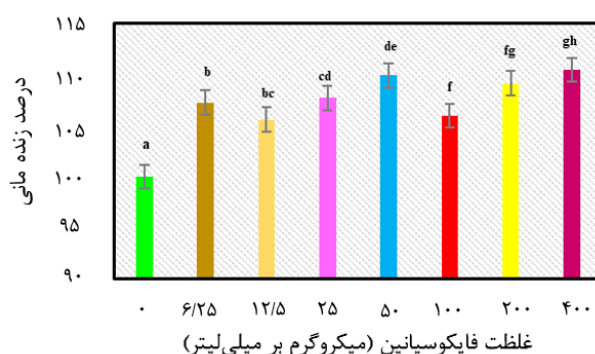
۳-۷. سمیت سلولی

تأثیر غلظت های مختلف فایکوسیانیین بر زنده ماندن سلول های فیرو بلاست انسانی HFF2 با استفاده از روش MTT ارزیابی شد. همان طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، تمامی غلظت های فایکوسیانیین (۰، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم

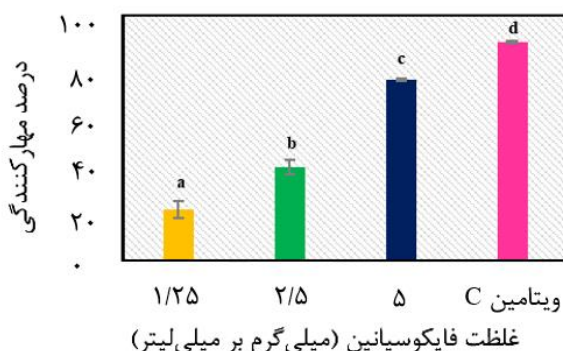
بر میلی لیتر) باعث افزایش معنی داری در زنده ماندن سلول ها شد ($P < 0.05$)، به گونه ای که با افزایش غلظت فایکوسیانین تا ۴۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر درصد زنده ماندی به 110.43 ± 2.45 درصد افزایش یافت.

۳-۸. فعالیت آنتی اکسیدانی

نتایج حاصل از فعالیت آنتی اکسیدانی فایکوسیانین استخراج شده در شکل ۵ گزارش شده است. براساس نتایج، قدرت آنتی اکسیدانی فایکوسیانین در غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر بیشتر از سایر غلظت ها می باشد (81.03 ± 0.57 درصد). اگرچه این غلظت فایکوسیانین نسبت به استاندارد (اسید آسکوربیک با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر) در سطح پایین تری قرار داشت (97.90 ± 0.36 درصد) ($P < 0.05$).



شکل ۴- نمودار زنده ماندی و تکثیر سلول های HFF2 در مواجهه با غلظت های مختلف فایکوسیانین استخراج شده از *S. platensis*. اعداد بیانگر میانگین $\pm$ انحراف معیار می باشند. میانگین های دارای لاقل یک حرف متفاوت دارای اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ می باشند.



شکل ۵- نمودار ظرفیت آنتی اکسیدانی فایکوسیانین استخراج شده از *S. platensis* در مواجهه با معرف DPPH. اعداد بیانگر میانگین $\pm$ انحراف معیار می باشند. میانگین های دارای حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ می باشند.

۴. بحث و نتیجه گیری نهایی

فایکوسیانین یک فایکوبیلی پروتئین است که به دلیل اتصال به پروتئین های مختلف نیاز به خالص سازی دارد، به همین منظور برای به دست آوردن فایکوسیانین خالص استفاده از فرآیندهای خالص سازی بیشتر، مورد نیاز می باشد. اولین مرحله از خالص سازی، رسوب دادن فایکوسیانین با استفاده از نمک آمونیوم سولفات می باشد. مکانیسم اصلی رسوب دهی با آمونیوم سولفات پدیده نمک زدایی می باشد. در این فرآیند نمک بر حلالیت پروتئین نقش مهمی دارد. سولفات آمونیوم در غلظت کم، مولکول پروتئین را احاطه می کند که در واقع Salting in نامیده می شود. در حالی که در در غلظت های زیاد نمک، قدرت یونی زیاد است و به همین دلیل اتصال با مولکول های آب

آسان تر می شود. اتصال مولکول های آب به نمک باعث افزایش جاذبه بین مولکول های پروتئین در مقایسه با جاذبه بین آب و پروتئین می شود که در نهایت منجر به وقوع برهمکنش های آبریز بین مولکول های پروتئین می شود و کاهش حلالیت و رسوب پروتئین هایی می شود که به فایکوسیانیین متصل هستند. بسیاری از مطالعات نمک آمونیوم سولفات را جهت خالص سازی فایکوبیلی پروتئین ها توصیه می کنند زیرا به حفظ یکپارچگی ساختاری فایکوبیلی پروتئین ها کمک می کند (Kaur et al., 2019; Munawaroh et al., 2020) در مرحله آخر خالص سازی، غشاء دیالیز با حفظ فایکوسیانیین در درون خود، به مولکول های کوچک مانند نمک ها اجازه خروج و انتشار به محیط خارج از نمونه (بافر یا آب) را می دهد و منجر از این طریق منجر به خلوص بیشتر فایکوسیانیین می گردد. میزان خلوص (A_{620}/A_{280}) در فایکوسیانیین با نسبت بین جذب در طول موج ۶۲۰ و ۲۸۰ نانومتر بیان می گردد. به طور کلی میزان خلوص بیشتر از ۰/۷ (≥ 0.7) بیانگر درجه غذایی (Food grade) و میزان خلوص بین اعداد ۳/۹۰ - ۰/۷ به عنوان درجه معرف (Reagent grade) و مقدار بیشتر از ۴ (≥ 4) نیز به عنوان درجه آزمایشگاهی (Analytical grade) در نظر گرفته می شود (Munawaroh et al., 2020). براساس نتایج به دست آمده از این پژوهش، تا مرحله چهارم (خالص سازی با غشاء دیالیز)، فایکوسیانیین استخراج شده تا نسبت درجه معرف ۱/۳۷ خالص شد (جدول ۱). خلوص فایکوسیانیین به دست آمده در نسبت ۱/۳۷ از این پژوهش با نتایج حاصل از مطالعات قبلی قابل مقایسه می باشد (Kuhnholz et al., 2024).

یکی دیگر از عواملی که بر کیفیت و خلوص فایکوسیانیین تأثیر دارد حضور کلروفیل *a* می باشد که منجر به ایجاد رنگ مایل به سبز یا خاکستری در عصاره فایکوسیانیین می گردد (Kuhnholz et al., 2024). بنابراین، شاخصی که نشان دهنده نسبت فایکوسیانیین و کلروفیل، یعنی نسبت جذب در ۶۲۰ و ۶۸۰ نانومتر (حداکثر جذب کلروفیل *a*) باشد در این مطالعه به عنوان ضریب انتخاب پذیری ارائه و مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۱، با انجام فرآیند خالص سازی و افزایش میزان جذب در ۶۲۰ نانومتر میزان ضریب انتخاب پذیری نیز افزایش می یابد. Kuhnholz و همکاران (۲۰۲۴) پس از مقایسه ضریب انتخاب پذیری فایکوسیانیین به دست آمده از روش ها و تکنیک های مختلف، بیشترین و کمترین میزان ضریب انتخاب پذیری را برای فایکوسیانیین استخراج شده از روش انجماد-انجمادزدایی (حدود ۲۷) و تکنیک فراصوت (کمتر از ۲۰) گزارش کردند. آنها افزایش درجه تخریب اجزای سلولی (که منجر به محلول شدن موادی می شود که قرار است با مواد نامحلول جامد از عصاره جدا شوند) و روش جداسازی (مانند سانتریفیوژ، فیلتراسیون و لخته سازی) را از دلایل تأثیرگذار بر میزان انتخاب پذیری فایکوسیانیین های حاصل از این دو روش می دانند.

بازدهی استخراج فایکوسیانیین در این پژوهش نیز ۹۰/۱۵ میلی گرم بر گرم به دست آمد. که با سایر مطالعات نیز همخوانی دارد. Hajiyeva و همکاران (۲۰۲۴) گزارش کردند که تفاوت معنی داری بین میزان بازدهی تولید فایکوسیانیین از زیست توده های مرطوب و خشک سیانوباکتری ها وجود ندارد و میزان بازدهی تولید فایکوسیانیین استخراج شده در مطالعه آنها به ترتیب $0.17 \pm 0.96/8$ و $0.25 \pm 0.95/2$ میلی گرم بر گرم گزارش شد (Hajiyeva et al., 2024). براساس گزارشات ارائه شده، میزان بازدهی در مطالعات مختلف بسته به نوع گونه جلبک، روش و تکنیک های مورد استفاده می تواند متفاوت باشد. یکی از فاکتورهایی که در این مطالعات می تواند بر میزان بازدهی استخراج تأثیر بگذارد میزان تخریب دیواره جلبکی و سپس آزادسازی فایکوسیانیین از آن می باشد. بسیاری از مطالعات، در هنگام استخراج فایکوبیلی پروتئین ها فاکتورهای مختلفی را مورد بررسی قرار می دهند، به عنوان مثال در مطالعه Li و همکاران (۲۰۲۲) پس از بررسی تأثیر پارامترها و تکنیک های مختلف بر سرعت و کیفیت استخراج فایکوسیانیین از زیست توده خشک اسپیرولینا، گزارش کردند که یکی از فاکتورهای اصلی در استخراج فایکوسیانیین حلال و قدرت یونی (قطبیت) مورد استفاده می باشد. حداقل قدرت یونی (کمتر از ۵ گرم در لیتر) به کاهش استخراج همزمان کلروفیل و افزایش خلوص فایکوسیانیین استخراجی منجر می گردد. آنها همچنین پس از بررسی تأثیر pH و تکنیک هایی مانند پردازش با فشار زیاد (HPP)، میدان الکتریکی پالسی (PEF) و فراصوت گزارش کردند که استخراج با بافر بافر فسفات سدیم (۱۰۰ میلی مولار) در pH ۷/۵ سریع ترین و بالاترین عملکرد را دارد و استخراج با تکنیک فراصوت منجر به تجزیه بیشتر اسپیرولینا و آزادسازی بیشتر فایکوسیانیین می گردد (Li et al., 2022). از همین رو در پژوهش ما استخراج فایکوسیانیین با استفاده از روش انجماد-انجمادزدایی با بافر فسفات سدیم (۱۰۰ میلی مولار) و pH حدود ۷/۴ همراه با تکنیک حمام فراصوت (به مدت ۳۰ دقیقه) انجام شد. علاوه بر این، فرآیندهای خالص سازی بر میزان و غلظت

فایکوسیانیین نیز تأثیر دارد. در این مطالعه پس از استخراج و خالص سازی الگوی جذبی عصاره فایکوسیانیین تولید شده مورد بررسی قرار گرفت. طیف جذبی فایکوسیانیین شامل سه پیک جذب در طول موج های تقریبی ۲۶۸، ۳۶۲ و ۶۲۰ نانومتر می باشد. الگوی جذبی فایکوسیانیین توسط بیلین که متعلق به گروه کروموفور و گروه پروتز (Prosthetic group) پروتئین هاست، ایجاد می شود و تحت تأثیر نوع، مقدار و ترکیب بیلینی است که به صورت کووالانسی به پروتئین متصل شده است (Stadnichuk et al., 2015; Stanic- Vucinic et al., 2018). فایکوسیانیین، دارای سه گروه کروموفور (بیلین) در هر یک از مونومرهای خود می باشد که هر مونومر از زیر واحدهای آلفا و بتا تشکیل شده است. در زیر واحد آلفا، یک بیلین وجود دارد، در حالی که در زیر واحد بتا دو بیلین وجود دارد (Sun et al., 2006). عصاره های فایکوسیانیین تولید شده در تمام مراحل خالص سازی دارای رنگ آبی تیره بودند و دارای حداکثر میزان جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر می باشند که وجود رنگدانه های فایکوسیانیین را مشخص می کند و با انجام فرآیندهای خالص سازی بیشتر مانند رسوب با نمک آمونیوم سولفات و غشای دیالیز میزان آن در عصاره ها افزایش یافت (جدول ۱). کاهش پیک جذب در ۲۸۰ نانومتر نیز نشان دهنده حذف سایر ناخالصی های پروتئینی در مراحل خالص سازی می باشد. این یافته ها با نتایج گزارش شده در تحقیقات قبلی مطابقت دارد (Rastogi et al., 2015; Munawaroh et al., 2020).

علاوه بر طیف جذبی UV، طیف سنجی FTIR نیز در جهت شناسایی بسیاری از پلیمرها و ساختار آنها مورد استفاده قرار می گیرد. در طیف IR فایکوسیانیین ۴ پیک شاخص قابل مشاهده می باشد که از ویژگی های اصلی ساختاری فایکوسیانیین می باشند. این ۴ پیک شاخص در فایکوسیانیین استخراج شده در این مطالعه با یافته های مطالعات قبلی مطابقت دارد و این می تواند قابلیت اطمینان فایکوسیانیین استخراج شده در این مطالعه را تقویت کند. Munawaroh و همکاران (۲۰۲۰) پس از استخراج فایکوسیانیین از زیست توده *S. platensis*، طیف IRی گزارش کردند که مشابه طیف IR به دست آمده در این مطالعه است که دارای چهار پیک شاخص بود و هر کدام با گروه های عملکردی خاص یا ارتعاشات مولکولی ذاتی فایکوسیانیین مرتبط بودند.

نتایج به دست آمده از الکتروفورز فایکوسیانیین بیانگر ظهور دو باند پروتئینی مجزا با محدوده وزن ملکولی ۱۰ تا ۱۷ کیلودالتون بود. عدم وجود باندهای دیگر می تواند نشان دهنده خلوص فایکوسیانیین تولید شده باشد. این مشاهدات با یافته های گزارش شده توسط Santiago-Santos و همکاران (۲۰۰۴) و Li و همکاران (۲۰۲۲) همسو است. در مطالعه آنها باندهای آلفا و بتا مشاهده شده در ژل SDS-PAGE فایکوسیانیین استخراج شده از *Calothrix* sp. و *Spirulina* در محدوده وزن های ملکولی ۱۰ تا ۱۷ کیلودالتون قرار داشتند و این همسویی با مطالعات، یکپارچگی ساختاری هسته پروتئینی متشکل از هر دو زیر واحد آلفا و بتا را تأیید می کند. علاوه بر این، بسیاری از مطالعات گزارش می کنند که زیر واحدهای آلفا و بتا در فایکوسیانیین در مقادیر مساوی یافت می شوند با این حال، مقدار دقیق جفت های آلفا و بتا، که منجر به شکل مولکولی می شوند، می تواند در بین گونه های مختلف متفاوت باشد. از همین رو، وزن ملکولی به دست آمده برای فایکوسیانیین استخراج شده در این پژوهش با مطالعات دیگر متفاوت می باشد اما به طور کلی محدوده وزنی گزارش شده برای فایکوسیانیین ۱۱۰-۷۰ کیلودالتون می باشد (Patel et al., 2005; Soliman et al., 2024). این در حالی است که شاخص پراکندگی چندگانه (PDI) گزارش شده برای فایکوسیانیین استخراج شده در این مطالعه مانند مطالعه Soliman و همکاران (۲۰۲۴) بیشتر از ۱ (۱/۹۰) به دست آمد. شاخص پراکندگی چندگانه اساساً شاخصی از توزیع اندازه واحدهای تشکیل دهنده یک پلیمر می باشد که با نسبت Mw/Mn تعریف می شود که در این نسبت Mw معرف میانگین وزنی و Mn نیز معرف میانگین عددی وزن مولکولی است. محدوده تعریف شده برای شاخص پراکندگی چندگانه از صفر تا ۱ متغیر می باشد که اعداد نزدیک تر به صفر بیانگر یکنواختی کامل نمونه و هم اندازه بودن واحدها می باشد در حالی که اعداد نزدیک به ۱ و بالاتر از آن بیانگر عدم یکنواختی نمونه و تفاوت در اندازه واحدهای آن پلیمر می باشد که نتایج حاصل از الکتروفورز فایکوسیانیین استخراج شده (شکل ۳) گواه این موضوع می باشد.

نتایج حلالیت، به عنوان یکی از مهم ترین خواص عملکردی پروتئین، در pH های مختلف بیانگر کاهش حلالیت فایکوسیانیین در محدوده pH= ۴ است. به طور کلی فایکوسیانیین در محدوده pH بین ۴ تا ۴/۸ ناپایدار است، که نسبتاً نزدیک به نقطه ایزوالکتریک آن (pH= ۳/۴) می باشد (Li et al., 2022). به طور کلی بار خالص فایکوسیانیین در pH ایزوالکتریک صفر است بنابراین در این pH دافعه الکترواستاتیکی بین مولکول ها کاهش می یابد و در نتیجه منجر به افزایش تجمع و رسوب پروتئین می گردد. برخی

از محققان گزارش کردند که فایکوسیانین در شرایط اسیدی نامحلول است ($\text{pH}=3$) اما در شرایط خنثی ($\text{pH}=7$) بسیار محلول است (Antelo et al., 2008) که با حلالیت فایکوسیانین استخراج شده پژوهش حاضر در pHهای ۳ و ۵ (به ترتیب 0.36 ± 0.42 و 0.87 ± 0.94 درصد) مطابقت دارد.

با توجه به نتایج MTT، فایکوسیانین تا دوز ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، تکثیر و زنده ماندن سلول ها را افزایش داد. ارزیابی زنده ماندن سلول ها نشان می دهد که فایکوسیانین می تواند بدون ایجاد سمیت و خطر برای مصرف کننده در انواع فرمولاسیون های غذایی و دارویی استفاده قرار گیرد. یکی دیگر از خواص فایکوسیانین که توانایی بالقوه آن را در این صنایع تأیید می کند، فعالیت آنتی اکسیدانی آن می باشد. نتایج فعالیت آنتی اکسیدانی نشان دهنده توانایی مهارکنندگی فایکوسیانین در برابر رادیکال های آزاد می باشد به گونه ای که بیشترین میزان فعالیت مهاری در برابر رادیکال های DPPH برای غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر و برابر 0.57 ± 0.81 درصد بود. درواقع فایکوسیانین استخراج شده قادر بود رادیکال DPPH پایدار را به دی فنیل پیکریل هیدرازین زرد رنگ کاهش دهد (Cao et al., 2024; Soliman et al., 2024). این یافته با مطالعات قبلی که خواص آنتی اکسیدانی فایکوسیانین و پتانسیل آن برای مهار رادیکال های آزاد را گزارش کردند، مطابقت دارد (Renugadevi et al., 2018). با توجه به فعالیت مهاری رادیکال های آزاد گزارش شده برای فایکوسیانین، می توان آن را به عنوان یک کاندید بالقوه برای استفاده در طیف گسترده ای از فرمولاسیون های غذایی و دارویی در نظر گرفت.

۵. نتیجه گیری نهایی

اخیراً، فایکوسیانین به دلیل خواص گسترده و توانایی های بالقوه در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری ها، مورد توجه محققین قرار گرفته و به عنوان یک ترکیب غذا داروی طبیعی (Nutraceutical) شناخته شده است. از همین رو روش های استخراج و خالص سازی که منجر به حفظ یکپارچگی و خواص آن گردد از اهمیت فوق العاده ای برخوردار است. در این مطالعه، جهت استخراج فایکوسیانین از زیست توده خشک اسپیرولینا، از تکنیک حمام فراصوت و روش انجماد-انجمادزدایی استفاده شد. تکنیک فراصوت به شکست بیشتر اسپیرولینا و آزادسازی بهتر فایکوسیانین کمک نمود. پس از این خالص سازی با رسوب نمک آمونیوم سولفات و غشاء دیالیز انجام شد که منجر به افزایش سه برابری میزان خلوص در عصاره فایکوسیانین گردید. به طور خلاصه، مطالعه ما نشان می دهد که فایکوسیانین تولید شده به این روش می تواند به عنوان یک مکمل به رشد و تکثیر سلول های HFF2 کمک کند و زنده ماندن آن را افزایش دهد. علاوه بر این، توانایی مهارکنندگی این فایکوسیانین در برابر رادیکال های آزاد پتانسیل آن برای استفاده در انواع فرمولاسیون های غذایی و دارویی را دوچندان می کند.

References

- Abalde, J., Betancourt, L., Torres, E., Cid, A., Barwell, C., 1998. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. *Plant Science* 136(1), 109-120. DOI: 10.1016/S0168-9452(98)00113
- Abdelkhalek, N.K., Ghazy, E.W., Abdel-Daim, M.M., 2015. Pharmacodynamic interaction of *Spirulina platensis* and deltamethrin in freshwater fish Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: impact on lipid peroxidation and oxidative stress. *Environmental Science and Pollution Research* 22(4), 3023-3031. DOI: 10.1007/s11356-014-3578-0.
- Bai, Y., Li, X., Xie, Y., Wang, Y., Dong, X., Qi, H., 2023. Ultrasound treatment enhanced the functional properties of phycocyanin with phlorotannin from *Ascomyllum nodosum*. *Frontiers in Nutrition* 10(6), 1181262. DOI: 10.3389/fnut.2023.1181262
- Cao, J., Zheng, X., Li, Z., Zheng, M., Qian, C., Shen, S., Qi, X., 2024. Exploring marine algae-derived phycocyanin nanoparticles as a safe and effective adjuvant for sunscreen systems. *Discover Applied Sciences* 6(1), 24. DOI: 10.1007/s42452-024-05665-z.
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Bunnag, B., 2012. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochemistry* 47(4), 659-664. DOI: 10.1016/j.procbio.2012.01.010

- Charoensuk, D., Brannan, R. G., Chanasattru, W., Chaiyasit, W., 2018. Physicochemical and emulsifying properties of mung bean protein isolate as influenced by succinylation. *International Journal of Food Properties* 21(1), 1633-1645. DOI: 10.1080/10942912.2018.1502200.
- Chittapun, S., Jonjaroen, V., Khumrangsee, K., Charoenrat, T., 2020. C-phycoerythrin extraction from two freshwater cyanobacteria by freeze thaw and pulsed electric field techniques to improve extraction efficiency and purity. *Algal Research* 46, 101789. DOI: 10.1016/j.algal.2020.101789
- Choi, W.Y., Lee, H.Y., 2018. Enhancement of neuroprotective effects of *spirulina platensis* extract from a high-pressure homogenization process. *Applied Sciences* 8(4), 634. DOI: 10.3390/app8040634.
- Demirel, Z., Sukatar, A., 2019. Purification of phycocyanin from isolated and identified hot spring cyanobacteria. *Indian Journal of Experimental Biology* 57(5):338-345.
- Dierckx, S., Patrizi, M., Merino, M., González, S., Mullor, J.L., Nergiz-Unal, R., 2024. Collagen peptides affect collagen synthesis and the expression of collagen, elastin, and versican genes in cultured human dermal fibroblasts. *Frontiers in Medicine* 11, 1397517. DOI: 10.3389/fmed.2024.1397517.
- Fernandes, F., Campos, J., Serra, M., Fidalgo, J., Almeida, H., Casas, A., Toubarro, D., I.R.N.A. Barros, A., 2023. Exploring the benefits of phycocyanin: From Spirulina cultivation to its widespread applications. *Pharmaceutical* 16(592), 1-34. DOI: /10.3390/ph16040592.
- Gabr, G.A., El-Sayed, S.M., Hikal, M.S., 2020. Antioxidant activities of phycocyanin: A bioactive compound from *Spirulina platensis*. *Journal of Pharmaceutical Research International* 32(2), 73-85. DOI: 10.9734/jpri/2020/v32i230407.
- Ge, Y., Kang, Y.-K., Dong, L., Liu, L.-H., An, G.-Y. 2019. The efficacy of dietary Spirulina as an adjunct to chemotherapy to improve immune function and reduce myelosuppression in patients with malignant tumors. *Translational Cancer Research* 8(4), 1065–1073. DOI: 10.21037/tcr.2019.06.13.
- Hajiyeva, S., Cankilic, M.Y., Sariozlu, N.Y., 2024. Production, Large-Scale Extraction, and Purification of Phycocyanin by Different Cyanobacteria Isolated from Various Environments. *Biointerface Research in Applied Chemistry* 14(4), 1-16. DOI: 10.33263/BRIAC144.091.
- Hsieh-Lo, M., Castillo, G., Ochoa-Becerra, M.A., Mojica, L., 2019. Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability. *Algal Research* 42, 101600. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101600>
- İlter, I., Akyıl, S., Demirel, Z., Koç, M., Conk-Dalay, M., Kaymak-Ertekin, F., 2018. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. *Journal of Food Composition and Analysis* 70, 78-88. DOI: 10.1016/j.jfca.2018.04.007
- Jaeschke, D.P., Mercali, G.D., Marczak, L.D.F., Müller, G., Frey, W., Gusbeth, C., 2019. Extraction of valuable compounds from *Arthrospira platensis* using pulsed electric field treatment. *Bioresource Technology* 283(), 207-212. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.03.035
- Kaur, S., Khattar, J., Singh, Y., Singh, D., Ahluwalia, A., 2019. Extraction, purification and characterisation of phycocyanin from *Anabaena fertilissima* PUPCCC 410.5: as a natural and food grade stable pigment. *Journal of Applied Phycology* 31, 1685-1696. DOI: 10.1007/s10811-018-1722-9.
- Kuhnholz, J., Glockow, T., Siebecke, V., Le, A. T., Tran, L.-D., & Noke, A., 2024. Comparison of different methods for extraction of phycocyanin from the cyanobacterium *Arthrospira maxima* (*Spirulina*). *Journal of Applied Phycology* 36, 1725–1735, 1-11. DOI: 10.1007/s10811-024-03224-y.
- Lu, Y., Pan, D., Xia, Q., Cao, J., Zhou, C., He, J., Sun, Y., Xu, S., 2021. Impact of pH-dependent succinylation on the structural features and emulsifying properties of chicken liver protein. *Food Chemistry* 358, 129868. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129868.
- Li, Y., Zhang, Z., Paciulli, M., Abbaspourrad, A., 2019. Extraction of phycocyanin—A natural blue colorant from dried spirulina biomass: Influence of processing parameters and extraction techniques. *Journal of Food Science* 85(3):727-735. DOI: 10.1111/1750-3841.14842.
- Mao, M., Han, G., Zhao, Y., Xu, X., Zhao, Y., 2024. A review of phycocyanin: Production, extraction, stability and food applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 280(3), 135860. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.135860
- Moraes, C.C., Sala, L., Cerveira, G. P., & Kalil, S.J., 2011. C-phycoerythrin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 28(1), 45-49. DOI: 10.1590/S0104-66322011000100006.

- Munawaroh, H.S.H., Gumilar, G.G., Alifia, C.R., Marthania, M., Stellasary, B., Yuliani, G., Wulandari, A.P., Kurniawan, I., Hidayat, R., Ningrum, A., 2020. Photostabilization of phycocyanin from *Spirulina platensis* modified by formaldehyde. *Process Biochemistry* 94, 297-304. DOI: 10.1016/j.procbio.2020.04.021.
- Nikolova, K., Petkova, N., Mihaylova, D., Gentscheva, G., Gavrilov, G., Pehlivanov, I., Andonova, V., 2024. Extraction of phycocyanin and chlorophyll from *Spirulina* by "Green Methods. *Separations* 11(2), 57. DOI: 10.3390/separations11020057
- Paramanya, A., Abiodun, A.O., Ola, M.S., Ali, A., 2024. Enhancing the quality and antioxidant capacity of phycocyanin extracted from *Spirulina platensis* PCC 7345: A quality-by-design approach. *Arabian Journal of Chemistry* 17(3), 105653. DOI: 10.1016/j.arabjc.2024.105653.
- Patel, A., Mishra, S., Pawar, R., Ghosh, P., 2005. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expression and Purification* 40(2), 248-255. DOI: 10.1016/j.pep.2004.10.028.
- Rame, R., Silvy, D., Novarina, I.H., Agus, P., Ganang, R.D.H., 2018. Cell-wall disruption and characterization of phycocyanin from microalgae: *Spirulina platensis* using Catalytic ozonation. *E3S Web of Conferences*.
- Rastogi, R. P., Sonani, R. R., & Madamwar, D., 2015. Effects of PAR and UV radiation on the structural and functional integrity of phycocyanin, phycoerythrin and allophycocyanin isolated from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp. A09DM. *Photochemistry and Photobiology* 91(4), 837-844. DOI: 10.1111/php.12449.
- Renugadevi, K., Valli Nachiyar, C., Sowmiya, P., Sunkar S., 2018. Antioxidant activity of phycocyanin pigment extracted from marine filamentous cyanobacteria *Geitlerinema* sp TRV57. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 16, 237-242. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.08.009.
- Ruiz-Domínguez, M.C., Jáuregui, M., Medina, E., Jaime, C., Cerezal, P., 2019. Rapid green extractions of C-phycocyanin from *Arthrospira maxima* for functional applications. *Applied Sciences* 9(10), 1987. DOI: 10.3390/app9101987
- Sarada, R., Pillai, M.G., Ravishankar, G.A., 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), 795-801. DOI: 10.3390/app9101987.
- Shao, W., Ebaid, R., El-Sheekh, M., Abomohra, A., Eladel, H., 2019. Pharmaceutical applications and consequent environmental impacts of *Spirulina* (*Arthrospira*): An overview. *Grasas y Aceites* 70(1), e292-e292. DOI: 10.3989/gya.0690181
- Soliman, T. N., El-Dein, A. N., Abd Al-Diam, S., Allayeh, A., Awad, H., Flefil, N. S., 2024. Characterization of C-phycocyanin antioxidant, anti-inflammatory, anti-tumour, and anti-HCoV-229E activities and encapsulation for implementation in an innovative functional yogurt. *Heliyon* 10(11). DOI: 10.3989/gya.0690181.
- Stadnichuk, I., Krasilnikov, P., Zlenko, D., 2015. Cyanobacterial phycobilisomes and phycobiliproteins. *Microbiology* 84, 101-111. DOI: 10.1134/S0026261715020150.
- Stanic-Vucinic, D., Minic, S., Nikolic, M.R., Velickovic, T.C., 2018. *Spirulina* phycobiliproteins as food components and complements. *Microalgal Biotechnology* 5, 129-149. DOI: 10.5772/intechopen.73791.
- Sudhakar, M., Jagatheesan, A., Perumal, K., Arunkumar, K., 2015. Methods of phycobiliprotein extraction from *Gracilaria crassa* and its applications in food colourants. *Algal Research* 8, 115-120. DOI: 10.1016/j.algal.2015.01.011.
- Sun, L., Wang, S., Qiao, Z., 2006. Chemical stabilization of the phycocyanin from cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Journal of Biotechnology* 121(4), 563-569. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.08.017.
- Tavanandi, H.A., Mittal, R., Chandrasekhar, J., Raghavarao, K., 2018. Simple and efficient method for extraction of C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*. *Algal Research* 31, 239-251. DOI: 10.1016/j.algal.2018.02.008
- Villela, K.S.V., Galindo, R.B., Neira, R.E., Solís, V.E., García-Casillas, P.E., 2024. Stability of Starch-Folic Acid/Polyethylene glycol particles for gastrointestinal drug delivery. *Food Hydrocolloids* 157, 110318. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2024.110318.