



استخراج فایکوسیانین از جلبک *Arthrospira platensis*

با استفاده از حلال‌ها و روش‌های مختلف

فهیمه شاه حسینی^۱، محمدعلی نعمت‌اللهی^{۲*}، سید ولی حسینی^۳

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۲. استاد گروه شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۳. دانشیار گروه شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۰۹

تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۰۸/۱۳

چکیده

در این مطالعه، استخراج رنگدانه فایکوسیانین از میکروجلبک *Arthrospira platensis* با استفاده از حلال‌ها (آب مقطر، بافر سدیم فسفات) و روش‌های مختلف (سونیکیشن، مایکروویو و انجماد و ذوب) برای مقایسه و تعیین بهترین حلال و روش به منظور رسیدن به بیش‌ترین بازده انجام شد. میزان ۰/۱ گرم پودر جلبک *A. platensis* در ۱۰ میلی لیتر حلال (آب مقطر و بافر سدیم فسفات (pH= 7.4 ± 0.1)) در سه روش استخراج سونیکیشن با دامنه ۵۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه، مایکروویو در ۱۰۰ وات به مدت ۳ دقیقه و انجماد در ۲ ± ۲۰- درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت و ذوب در دمای اتاق انجام شد. تجزیه واریانس برای میانگین داده‌ها ±SD (انحراف معیار) با استفاده از SPSS در سطح اطمینان (P < 0.05) به دست آمد. بیش‌ترین بازده استخراج توسط بافر سدیم فسفات و روش انجماد و ذوب (PC = 146/3 ± 1/55 mg/g) و کم‌ترین توسط آب مقطر و روش مایکروویو (PC = 94/4 ± 2/68 mg/g) به دست آمد.

واژگان کلیدی: اسپیرولینا، فایکوسیانین، استخراج، سونیکیشن، مایکروویو



Extraction of phycocyanin from *Arthrospira platensis* with different solvents and methods

Fahimeh Shahhosseini¹, Mohammad Ali Nematollahi^{2*}, Seyed Vali Hosseini³

¹MSc Graduated, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

²Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

³Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Received: 04-Nov-2021

Accepted: 29-Jan-2021

Abstract

In this study, phycocyanin pigment extraction from *Arthrospira platensis* microalgae was carried out using various solvents (distilled water, phosphate buffered saline) and methods (sonication, microwave and freezing & thawing) for comparison and determine the best solvent and method in order to achieve higher extraction yield. Rate of 0.1 g *A. platensis* powder in 10 cc of solvent (distilled water and phosphate buffered saline) was similar in each three extraction method whereas the conditions of extraction methods sonication, microwave and freezing & thawing as follows, respectively: 50% amplitude and 15 min, 100 W and 3 min, frozen at -20 ± 2 °C for 24 h and thawing at room temperature. The analysis of variance was obtained for data mean \pm SD (standard deviation) using SPSS in confidence level of ($P < 0.05$). Most extraction yield was obtained by phosphate buffered saline (PBS) and method Freezing & Thawing ($pc = 146/3 \pm 1/55$ mg/g) and least by distilled water and method Microwave ($pc = 94/4 \pm 2/68$ mg/g).

Key Words: *Arthrospira platensis*, Phycocyanin, Extraction, Sonication, Microwave

۱. مقدمه

جلبک *Arthrospira platensis* یک ریز جلبک (سیانوباکتری) رشته‌ای، مارپیچی شکل و به صورت مایع سبز آبی است (Serban *et al.*, 2015). اسپیرولینا به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است و ارتباط مستحکمی بین مصرف و مزایای درمانی آن در یک مجموعه گسترده از آسیب شناسی‌ها ایجاد شده است که شامل کلسترول بالا، قند بالا عفونت‌های ویروسی، بیماری‌های قلبی عروقی، التهابی و سرطان است (Deng and Chow, 2010). اسپیرولینا بر حسب وزن خشک شامل ۵۰-۷۰ درصد پروتئین، ۲۵-۱۵ درصد کربوهیدرات، ۶-۱۳ درصد لیپیدها، ۲/۴-۶/۲ درصد نوکلئیک اسیدها و ۴/۸-۲/۲ درصد مواد مغذی است (Belay, 2002; Habib and Parvin, 2008; Hosseini *et al.*, 2013). این گونه به مقدار بسیار کم تقریباً در هر ۱۰۰ میلی‌گرم از ساختارش ۰/۱ میلی‌گرم کلسترول دارد، و یک جایگزین مناسب برای پروتئین حیوانی است (Reboleira *et al.*, 2019). گونه‌های *Arthrospira maxima* و *Arthrospira platensis* و بهترین گونه‌های شناخته شده از اسپیرولینا هستند که در مکتوبات علمی مورد پژوهش واقع شده‌اند، و برای مصرف ایمن‌اند (Thengodkar and Sivakami, 2010).

گونه *A. platensis* به عنوان یک سیانو باکتری غیر سمی، به وسیله سطوح زیادی از کربنات و بی‌کربنات در یک محیط قلیایی شناخته می‌شود (İlter *et al.*, 2018). *A. platensis* به خاطر دارا بودن محتوای پلی‌ساکاریدی، ویتامین‌ها، مواد معدنی، اسیدهای چرب غیراشباع، کاروتنوئیدها و فیکوبیلی پروتئین‌ها به عنوان یک مکمل غذایی استفاده می‌شود (Su *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2016).

فیکوبیلی پروتئین‌ها رنگدانه‌ی فتوسنتتیک فرعی هستند که در سلول به عنوان فایکوبیلی‌زوم‌ها تجمع می‌کنند، که به غشای تیلاکوئید موجود در کلروپلاست وابسته هستند (Arad and Yaron, 1992).

فایکوسیانوبیلین یک زنجیره باز از ترکیب تتراپیرولیک است (Falkeborg *et al.*, 2018). فیکوبیلی پروتئین‌ها به طور گسترده‌ای در مواد دارویی، غذایی، لوازم آرایشی و مواد فلورسنت استفاده می‌شود (Eriksen, 2008; Kannaujiya and Sinha, 2016). فیکوبیلی پروتئین‌های سیانوباکتری‌ها می‌توانند به دسته اصلی فایکواریترین صورتی و قرمز روشن، فایکوسیانین آبی تیره و آلفافایکوسیانین آبی روشن تقسیم شوند (Ghosh *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2015).

فایکوسیانین یک پروتئین فعال در سیانو-باکترها است که همراه با تغییرات درون سلولی زیاد حضور دارد (Yan *et al.*, 2018). فایکوسیانین را می‌توان از *A. platensis* استخراج کرد که به طور گسترده در صنایع غذایی و مواد آرایشی به عنوان یک رنگ طبیعی استفاده می‌شود (Walter *et al.*, 2011). این سیانو باکتریوم، پتانسیل مهار سرطان در سلول‌های حیوانی را داراست (Roy *et al.*, 2007)، و فعالیت‌های ضد سرطانی، ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی فایکوسیانین در مقالات Boussiba و Richmond (1980)، Hao و همکاران (Jiang, 2018) و همکاران (Park, 2017)، Ravi و همکاران (2015) مطرح شده است. رنگ‌های طبیعی آبی، سبز و بنفش از لحاظ در دسترس بودن در محدوده کمی هستند و برای استفاده در غذا، در مقایسه با رنگ‌های طبیعی قرمز، زرد و نارنجی محدود هستند (Falkeborg *et al.*, 2018). در صنعت غذا و نوشیدنی، پژوهشگران به دنبال استخراج رنگ‌های طبیعی با سایه آبی برای جایگزین شدن با رنگ‌های تولیدی شیمیایی رایج‌اند (Jespersen *et al.*, 2005; Newsome *et al.*, 2014).

روش‌های مختلف فیزیکی، مکانیکی، شیمیایی و زیستی برای شکستن دیواره سلول اسپیرولینا و تسهیل استخراج فایکوسیانین، مورد مطالعه قرار گرفته است (Moraes *et al.*, 2011) و روش‌های سونیکیشن، مایکروویو و انجماد و ذوب از روش‌های معمول به شمار می‌رود. در روش سونیکیشن، حمام التراسونیک باعث

پایین ذکر شده، از مقالات Chaiklahan و همکاران (۲۰۱۱)، Vernès و همکاران (۲۰۱۵)، Ho و همکاران (۲۰۱۸)، Fontoura Prates و همکاران (۲۰۱۸)، Ilter و همکاران (۲۰۱۸) و Pan-utai و Iamtham (۲۰۱۸) استفاده شد.

از آب مقطر و بافر سدیم فسفات (قرص بافر فسفات سالین تهیه شده از شرکت تماد کالا که در دمای ۲۵ درجه دارای $pH = 7.4 \pm 0.1$ می باشد) بافر فسفات سالینیک (PBS) محلول بافری است که به طور شایع در تحقیقات زیستی استفاده می شود. این ترکیب یک محلول نمکی حاوی کلرید سدیم، فسفات سدیم و (در برخی فرمولا سیون ها) کلرید پتا سیم و فسفات پتا سیم است. به عنوان محیط استخراج به صورت جدا گانه در هر روش استفاده شد. به این صورت که ۱/۱ گرم پودر جلبک و ۱۰ میلی لیتر حلال که به ترتیب با نسبت ۱ به ۱۰۰ با استفاده از همزن شیشه ای در هم مخلوط شدند و بعد از ۳۰ دقیقه استراحت نمونه ها، با استفاده از روش های سونیکیشن، ماکروویو و انجماد و ذوب استخراج تکمیل شد. سونیکیشن نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در حمام التراسونیک انجام شد. ماکروویو کردن نمونه ها به مدت ۳ دقیقه در ماکروویو با توان ۱۰۰ W وات صورت گرفت و برای انجماد و ذوب؛ نمونه ها در فریزر $20 \pm$ درجه سانتی گراد قرار داده شد، بعد از مدت ۲۴ ساعت از فریزر خارج و در دمای اتاق ذوب شد.

۲.۳. اسپکتروفتومتر

بازده فایکوسیانین توسط اسپکتروفوتومتر Unico SPECTROPHOTOMETER, Model: (S2100SUV) در طول موج های ۶۲۰ و ۶۵۲nm اندازه گیری شد و غلظت فایکوسیانین (mg/ml) به شرح ذیل حساب شد (Bennett and Bogorad, 1973):

$$Py = \frac{(OD_{620} - 0.474(OD_{652}))}{5.34}$$

OD₆₂₀ و OD₆₅₂ به ترتیب مقادیر جذب از نمونه در ۶۲۰ و ۶۵۲ نانومتر است و مقدار ۵/۳۴، برابر با میزان

ارتعاشات با فرکانس زیاد و منجر به حفره زایی شده، به این صورت که حباب های کوچک در محیط مایع تشکیل می شود (Vernès et al., 2015). در طی ترکیدن حباب ها، دیواره ی سلولی آسیب دیده و منجر به انتشار ترکیبات سودمند در محیط می شود (Dey and Rathod, 2013). این روش می تواند در دمای پایین تخریب پذیر باشد و این مزیتی برای محدود بودن ترکیبات حساس به تنش گرمایی است (Vernès et al., 2015). در روش ماکروویو محیط استخراج (معمولا حلال) گرم شد تا محتویات بیشتری از مواد با ارزش از زیست توده استخراج شود (Jain et al., 2009). در روش انجماد و ذوب؛ انجماد باعث تشکیل بلورهای یخ در داخل سلول می شود، هرچه اگر این فرآیند آهسته تر صورت گیرد، بلورهای تشکیل شده بزرگ تر بوده و آسیب بیشتری به دیواره و غشای سلول وارد می کند. در نتیجه استفاده از فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد جهت شکستن سلول مطلوب تر از انجماد در دماهای کمتر خواهد بود (Hoseini et al., 2013). این روش مزایای ساده بودن، قابل تکرار بودن، و همچنین ضرر نداشتن در عملکرد بیولوژیکی پروتئین را دارا است (Moraes et al., 2011). استخراج این مرحله اغلب در حلالی مانند بافر فسفات صورت می گیرد (Vernès et al., 2015).

در سال های اخیر محققان به دنبال روشی هستند که در هنگام تخریب دیواره سلولی کمترین آسیب به ساختار پروتئینی فایکوسیانین وارد شود. بنابراین، هدف از این پژوهش یافتن بهترین حلال و روش برای دستیابی به بیشترین بازده فایکوسیانین می باشد.

۲. مواد و روش ها

۲.۱. تهیه نمونه جلبک

پودر خشک جلبک *A. platensis* از شرکت خدمات تحقیقاتی آرین گستر، برند سوباشی تهیه شد.

۲.۲. روش های استخراج فایکوسیانین

برای استخراج فایکوسیانین از طریق روش هایی که در

جذب است. محتوای فایکوسیانین (میلی گرم/گرم mg/g) در محاسبه جلبک توسط معادله زیر به دست می‌آید (Nakagawa *et al.*, 2016):

$$PC = \frac{[Py] \times V}{DW}$$

اینجا PC محتوای فایکوسیانین در جلبک است، v حجم محلول (ml) و DW وزن نمونه خشک شده (g) است. غلظت کل پروتئین‌ها در محلول، با مقدار جذب در طول موج ۲۸۰nm در نظر گرفته شده است (Antelo *et al.*, 2010; Sudhakar *et al.*, 2015).

۲.۴. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمام آزمایش‌ها در چهار بار انجام شد و نتایج همراه با مقادیر انحراف معیار ارائه شد و سطح معنی‌دار در فاصله اطمینان ۹۵ درصد تعیین شد. تجزیه تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه

۳. نتایج

۳.۱. نتایج و تعیین بازده فایکوسیانین توسط حلال

آب مقطر در هر ۳ تیمار

غلظت‌های فایکوسیانین به دست آمده در روش‌های سونیکیشن، مایکروویو و انجماد و ذوب (بعنوان تیمارهای این آزمایش) توسط حلال آب مقطر در جدول ۱ آورده شده است.

بر اساس نتایج جدول ۱ بازده فایکوسیانین در هر سه روش با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارد ($P < 0.05$). کم‌ترین و بیش‌ترین مقدار فایکوسیانین به ترتیب توسط روش‌های مایکروویو و انجماد و ذوب استخراج شد.

جدول ۱. تاثیر حلال آب مقطر و روش‌های سونیکیشن، مایکروویو و انجماد و ذوب بر بازده فایکوسیانین

روش استخراج	رنگدانه	میلی گرم در گرم
سونیکیشن	PC	110.23 ± 6.39^b
مایکروویو	PC	94.47 ± 2.67^a
انجماد و ذوب	PC	130.14 ± 2.48^c

۳.۳. مقایسه عملکرد استخراج فایکوسیانین بین

حلال‌های آب مقطر و سدیم فسفات در هر بین تیمارها

جدول ۳ مقایسه عملکرد استخراج فایکوسیانین بین آب مقطر و سدیم فسفات می‌باشد، که به عنوان حلال همراه با ۳ روش نام برده استفاده شد. نتایج نشان داد که سدیم فسفات در همه روش‌ها نسبت به آب مقطر بازدهی بیشتری از نظر میزان استخراج داشته تنها در روش سونیکیشن (حلال سدیم فسفات) که مقدار استخراج آن با روش‌های انجماد و ذوب اختلاف معنی‌دار نداشته است ($P > 0.05$). بیش‌ترین میزان استخراج توسط حلال

۳.۲. بازده فایکوسیانین توسط حلال سدیم

فسفات در هر سه تیمار

غلظت‌های فایکوسیانین به دست آمده در روش‌های سونیکیشن، مایکروویو و انجماد و ذوب توسط حلال سدیم فسفات در جدول ۲ آورده شده است.

بر اساس نتایج جدول ۲ بازده فایکوسیانین در هر سه روش با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارد ($P < 0.05$). کم‌ترین و بیش‌ترین مقدار فایکوسیانین به ترتیب توسط روش‌های مایکروویو و انجماد و ذوب استخراج شد.

سدیم فسفات و روش انجماد و ذوب و کمترین توسط حلال آب مقطر و روش ماکروویو به دست آمد.

جدول ۲. تاثیر حلال سدیم فسفات و روش‌های سونیکیشن، مایکروویو و انجماد و ذوب بر بازده فایکوسیانین.

روش استخراج	رنگدانه	میلی گرم در گرم
سونیکیشن	PC	۱۳۵/۶۱ ± ۲/۱۴ ^b
مایکروویو	PC	۱۰۴/۴۱ ± ۶/۵ ^a
انجماد و ذوب	PC	۱۴۶/۳۶ ± ۱/۵۸ ^c

جدول ۳. مقایسه تاثیر حلال و روش‌های استفاده شده.

حلال	روش استخراج	PC (mg/g)
آب مقطر	سونیکیشن	۱۱۰/۲۳ ± ۶/۳۲ ^b
	مایکروویو	۹۴/۴۷ ± ۲/۶۷ ^a
	انجماد و ذوب	۱۳۰/۱۴ ± ۲/۴۸ ^c
بافر سدیم فسفات	سونیکیشن	۱۳۵/۶۱ ± ۲/۱۴ ^c
	مایکروویو	۱۰۴/۴۱ ± ۶/۵ ^b
	انجماد و ذوب	۱۴۶/۳۶ ± ۱/۵۸ ^c

۴. بحث و نتیجه گیری

جلبک *Arthrospira platensis* به منظور بررسی و مقایسه‌ی حلال‌ها و روش‌های مختلف برای استخراج فایکوسیانین انتخاب شد. گونه‌هایی از جنس اسپیرولینا در مطالعات به عنوان یک منبع غنی و ارزان قیمت فایکوسیانین شرح داده شده‌اند (Minkova et al., 2003; Moraes et al., 2010). فایکوسیانین، عمده فایکوبیلی پروتئین با منشاء *A. platensis* بوده و یک جزء ضروری کارآمد است (Wu et al., 2016). با این حال، کاربرد فایکوسیانین در زمینه‌های مختلف به واسطه‌ی حساسیت به روش کار و شرایط ذخیره سازی که می‌تواند به راحتی باعث دناتوراسیون، ته نشینی و بی رنگی آن شود، منع شده است (Wu et al., 2016)، بنابراین، توجه ویژه‌ای بر انتخاب شکل فیزیکی زیست توده، حلال و روش مناسب برای استخراج فایکوسیانین ضروری است.

در مورد زیست توده سیانوباکترها، مطالعاتی وجود دارد که تخریب سلول و استخراج فایکوسیانین از زیتوده

خشک (Moraes et al., 2010) و مرطوب (Moraes et al., 2011; Sarada et al., 1999) را مورد ارزیابی قرار داده است. فرآیند خشک کردن عاملی مهم برای ذخیره‌ی بیشترین فایکوسیانین در سلول زیست توده محسوب می‌شود و موجب کارآمدی روش‌های استخراج و افزایش نسبت خلوص خواهد شد. استخراج فایکوبیلی پروتئین از زیتوده مرطوب مناسب‌تر گزارش شده است، زیرا این روش از خسارت به رنگدانه جلوگیری می‌کند (Manirafasha et al., 2016). با این حال، زیتوده مرطوب می‌تواند به پروتئین در طی زمان انتظار برای استخراج خسارت وارد کند و همچنین برای ذخیره سازی مناسب نیست (Pan-Utai and Iamtham, 2019).

در روش حلال: برای استخراج مواد جامد، مقدار pH بسیار مهم است و حلالیت ترکیبات زیستی وابسته به تغییر pH است. غلظت در pH= ۷ متعادل تر است (Su et al., 2014).

در روش استخراج: انجماد راهی برای ذخیره سازی

فریز شد و سپس بیومس در ۱۰ Mm بافر تریس هیدروکلراید (pH= 8.3) به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط شد. روش انجماد و ذوب با قرار گرفتن بیومس در معرض ۴ چرخه انجماد (۱۸-) و ذوب (دمای اتاق) انجام گرفت و با مقدار $APC=26 \pm 1$ mg/g و $PC=101 \pm 0.2$ mg/g بیشترین بازده را نسبت به روش‌های دیگر به دست آورده است که از نظر آماری با روش هموژنایزر التراسونیک با مقدار $APC=70 \pm 0.3$ mg/g و $PC=90 \pm 0.4$ mg/g اختلاف معنی‌دار ندارد. هموژنایزر التراسونیک به دلیل قدرت بالاتر، از کارایی بیشتری نسبت به حمام التراسونیک برخوردار است.

مایکروویو ممکن است باعث برانگیختن الکترون شود اما انرژی لازم برای شکستن پیوندهای شیمیایی را ندارد (Martinez-Guerra *et al.*, 2014). با این حال، تولید گرمای بیش از حد و محدود در یک محل توسط مایکروویو (ناشی از موقعیت دوقطبی و هدایت یونی) واکنش‌های سریع را امکان‌پذیر می‌کند (Martinez-Guerra *et al.*, 2014). روش مایکروویو بیشتر برای استخراج لیپید از جلبک استفاده شده است (Hoseini *et al.*, 2013). به طور مثال در مقاله‌ی Hoseini و همکاران (۲۰۱۳) کارایی مایکروویو نسبت به امواج اولتراسونیک و انجماد برای استخراج چربی بیشتر بوده، در صورتی که این روش برای استخراج فایکوسیانین از جلبک نتایج متفاوت دارد. در مقاله Ilter و همکاران (۲۰۱۸) از بین بیومس منجمد، خشک و مرطوب، بیومس منجمد و از روش‌های مایکروویو و التراسوند با استفاده از دو حلال آب مقطر و بافر سدیم فسفات، روش اولتراسوند همراه با دو حلال منجر به حداکثر استخراج فایکوسیانین شد.

نتیجه‌گیری نهایی

در این مطالعه، فایکوسیانین با استفاده از حلال‌ها (آب مقطر و بافر سدیم فسفات) و روش‌های مختلف (التراسونیک، مایکروویو و انجماد و ذوب) استخراج شد. با توجه به نتایج به دست آمده مناسب‌ترین حلال در هر ۳ روش استخراج بافر

تولیدات کشاورزی برای دور کردن قابل توجه تغییرات در محتوای شیمیایی و خواص فیزیکی است، با این حال گاهی اوقات ساختار سلول را می‌شکند، که شاید روی خواص یک محصول تاثیر بگذارد (Chan *et al.*, 2013, 2009). روش انجماد و ذوب، فایکوبیلی پروتئین بالایی تولید می‌کند، اما این روش به دلیل طولانی بودن مدت زمان استخراج دارای محدودیت است. با این حال، افزایش زمان استخراج باعث افزایش غلظت و خلوص فایکوبیلی پروتئین می‌شود. Nakagawa و همکاران (۲۰۱۶) گزارش دادند که شکست سلولی ناشی از انجماد بازده استخراج فایکوسیانین را بهبود می‌بخشد. بر طبق مکتوبات، روش ذوب و انجماد به طور گسترده برای استخراج فایکوسیانین از زیتوده تازه برای بهبود بازده استخراج استفاده می‌شود (Abalde, 1998; Doke, 2005; Minkova *et al.*, 2003;) (Soni *et al.*, 2006). التراسوند یکی از متداولترین روش‌ها برای شکستن سلول و استخراج در مقیاس آزمایشگاهی است (Geciova *et al.*, 2002) و همین‌طور به عنوان یک روش موثر در استخراج شناخته شده است، به خصوص برای تجزیه مخمر (Medeiros *et al.*, 2008) و میکروجلبک (Moraes *et al.*, 2011). التراسونیک موجب کاویتاسیون یا غاری شدن شده که منجر به تورم سلول، جذب بیشتر حلال و ایجاد حفره بزرگ در دیواره سلولی می‌شود. به طور مثال ores و همکاران (۲۰۱۶) برای استخراج ترکیبی آنزیم، فایکوسیانین و آلفافایکوسیانین از بافر ۱۰ Mm Tris-Hcl (pH= 8.3) همراه با ۷ روش استفاده کرد: هموژنایزر التراسونیک با فرکانس (Ores *et al.*, 2013)، حمام التراسونیک همراه با مهره‌های شیشه‌ای (Medeiros *et al.*, 2008)، مخلوط کردن زیست توده همراه با مهره‌های شیشه‌ای (Medeiros *et al.*, 2008)، همگن‌سازی زیست توده منجمد توسط هاون (Moraes *et al.*, 2011)، روش انجماد و ذوب به صورتی که زیتوده ۲ تا ۴ بار در معرض فریز ۱۸- و ذوب در دمای اتاق قرار گیرد و در روشی دیگر زیتوده به مدت ۲۴ ساعت در ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک و در ۱۸- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت

سدیم فسفات و مناسب‌ترین روش استخراج با استفاده از هر دو حلال انجماد و ذوب تعیین شد.

References

۵. منابع

- Abalde, J., 1998. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus sp.* 109201. *Plant Science* 136(-), 109–120.
- Antelo, F.S., Anschau, A., V Costa, J.A., Kalil, S.J., 2010. Extraction and purification of C-phycocyanin from *Arthrospira platensis* in conventional and integrated aqueous two-phase systems. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 21(-), 921–926.
- Arad, S. (Malis), Yaron, A., 1992. Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends in Food Science and Technology* 3(-), 92–97.
- Belay, A., 2002. The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *Journal of the American Nutraceutical Association* 5(2), 26–49.
- Bennett, A., Bogorad, L., 1973. Complementary chromatic adaption in a filamentous blue green alga. *Journal of Cell Biology* 58(-), 419–435.
- Boussiba, S., & Richmond, A. E., 1980. C-phycocyanin as a storage protein in the blue green alga *Arthrospira platensis*. *Archives of Microbiology* 125(1–2), 143–147.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Wong, S.K., Lim, K.K., Tan, S.P., Lianto, F.S., Yong, M.Y., 2009. Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. *Food Chemistry* 113(-), 166–172.
- Chan, E.W.C., Lye, P.Y., Eng, S.Y., Tan, Y.P., 2013. Antioxidant properties of herbs with enhancement effects of drying treatments: a synopsis. *Free Radicals and Antioxidants* 3(-), 2–6.
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Loha, V., Tia, S., Bunnag, B., 2011. Separation and purification of phycocyanin from *Arthrospira sp.* using a membrane process. *Bioresource Technology* 102(-), 7159–7164.
- Deng, R., Chow, T.-J., 2010. Hypolipidemic, antioxidant and antiinflammatory activities of microalgae *Arthrospira*. *Cardiovascular Therapeutics* 28(-), 33–45.
- Dey, S., Rathod, V.K., 2013. Ultrasound assisted extraction of b-carotene from *Arthrospira platensis*. *Ultrason Sonochem* 20(-), 271–276.
- Doke, J.M., 2005. An improved and efficient method for the extraction of phycocyanin from *Arthrospira sp.* *International Journal of Food Engineering* 1(-), 1–11.
- Eriksen, N.T., 2008. Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80(-), 1–14.
- Falkeborg, M.F., Roda-Serrat, M.C., Burnæs, K.L., Nielsen, A.L.D., 2018. Stabilizing phycocyanin by anionic micelles. *Food Chemistry* 239(-), 771–780.
- Fontoura Prates, D., Radmann, E.M., Duarte, J.H., Morais, M.G., Vieira Costa, J.A., 2018. *Arthrospira* cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production. *Bioresource Technology* 256(-), 38–43.
- Geciova, J., Bury, D., Jelen, P., 2002. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry – a review. *International Dairy Journal* 12(6), 541–553.
- Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., Mishra, S., 2015. Microalgal Rainbow Colours for Nutraceutical and Pharmaceutical Applications. In: Bahadur, B., Venkat Rajam, M., Sahijram, L., Krishnamurthy, K. (Eds.), *Plant Biology and Biotechnology*. Springer, New Delhi, pp. 777–791.

- Habib, M.A.B., Parvin, M., 2008. A review on culture, production and use of *Arthrospira* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*, 1034.
- Hao, S., Yan, Y., Huang, W., Gai, F., Wang, J., Liu, L., Wang, C., 2018. C-phycoyanin reduces inflammation by inhibiting NF- κ - activity through downregulating pcd5 in lipopolysaccharide-induced raw 264.7 macrophages. *Journal of Functional Foods* 42(-), 21–29.
- Ho, S.-H., Liao, J.-F., Chen, C.-Y., Chang, J.-S., 2018. Combining light strategies with recycled medium to enhance the economic feasibility of phycoyanin production with *Arthrospira platensis*. *Bioresource Technology* 247(-), 669–675.
- Hosseini, S.M., Khosravi, K., Mozafari, M.R., 2013. Nutritional and medical applications of *Spirulina* microalgae. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 13 (-), 1231–1237.
- Hoseini S.M., Montazeri F., Afsharzadeh S. 2013. Comparison of cell disruption methods for extracting lipid from *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris*. *Journal of Agriculture Biotechnology* 5(3), 45-56.
- Ilter, I., Akyil, s., Demirel, Z., Koc, M., Conk-Dalay, M., Kaymak-Ertekin, F., 2018. Optimization of phycoyanin extraction from *Arthrospira platensis*. *Journal of Food using different techniques composition and Analysis* 70 (-), 78-88.
- Jain, T., Jain, V., Pandey, R., Shukila, S.S., 2009. Microwave assisted extraction for phytoconstituents—an overview. *Asian Journal of Research in Chemistry* 2 (-), 19–25.
- Jespersen, L., Strømdahl, L., Olsen, K., Skibsted, L., 2005. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. *European Food Research and Technology* 220(3), 261–266.
- Jiang, L., Wang, Y., Yin, Q., Liu, G., Liu, H., Huang, Y., Li, B., 2017. Phycoyanin: A potential drug for cancer treatment. *Journal of Cancer* 8(17), 3416–3429.
- Kannaujiya, V.K., Sinha, R.P., 2016. Thermokinetic stability of phycoyanin and phycoerythrin in food-grade preservatives. *Journal of Applied Phycology* 28(-), 1063–1070.
- Kumar, D., Dhar, D.W., Pabbi, S., Kumar, N., Walia, S., 2014. Extraction and purification of C-phycoyanin from *Arthrospira platensis* (CCC540). *Indian Journal of Plant Physiology* 19(2), 184-188.
- Manirafasha, E., Ndikubwimana, T., Zeng, X., Lu, Y., Jing, K., 2016. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochemical Engineering Journal* 109(-), 282–296.
- Martinez-Guerra, E., Gude, V.G., Mondala, A., Holmes, W., Hernandez, R., 2014. Microwave and ultrasound enhanced extractive-transesterification of algal lipids. *Applied Energy* 129(-), 354–363.
- Medeiros, F.O., Alves, F.G., Lisboa, C.R., Martins, D.D.S., Burkert, C.A.V., Kalil, S.J., 2008. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de b-galactosidase para uso em laboratório. *Química Nova* 31(2), 336–339.
- Minkova, K.M., Tchernov, A.A., Tchorbadjieva, M.I., Fournadjieva, S.T., Antova, R.E., Busheva, M.C., 2003. Purification of C-phycoyanin from *Arthrospira fusiformis*. *Journal of Biotechnology* 102(-), 55–59.
- Moraes, C.C., Burkert, J.F.D., Kalil, S.J., 2010. C-Phycoyanin extraction process for large-scale use. *Journal of Food Biochemistry* 34 (-), 133–148.
- Moraes, C.C., Sala, L., Cerveira, G.P., Kalil, S. J., 2011. C-phycoyanin extraction from *Arthrospira platensis* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 28(1), 45-49.
- Nakagawa, K., Ritcharoen, W., Sri-Uam, P., Pavasant, P., Adachi, S., 2016. Antioxidant properties of convective air-dried *Arthrospira maxima*: Evaluation of phycoyanin retention by a simple mathematical model of air-drying. *Food and bioproducts processing* 100(-), 292–302.
- Newsome, A., Culver, C., Breemen, R., 2014. Nature's palette: the search for natural blue colorants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(28), 6498–6511.

- Ores, J.C., Amarante, M.C.A., Kalil, S.J., 2016. Co-production of carbonic anhydrase and phycobiliproteins by *Arthrospira sp.* and *Synechococcus nidulans*. *Bioresource Technology* 219(-), 219-227.
- Ores, J.C., Fernandes, S.S., Amarante, M.C.A., Silva, B.P.d., Kalil, S.J., 2013. Tecnologia enzimática para captura de CO2 cultivo de microalga para obtenção de anidrase carbônica. *Vetor* 23(2), 82-92.
- Pan-Utai, W., Iamtham, S., 2018. Physical extraction and extrusion entrapment of C-Phycocyanin from *Arthrospira platensis*. *Journal of king saud university- Science* 31(-), 1535-1542.
- Pan-utai, W., Iamtham, S., 2019. Extraction, purification and antioxidant activity of phycobiliprotein from *Arthrospira platensis*. *Process Biochemistry* 82(-), 189-198.
- Park, W., Kim, H., Li, M., Lim, D., Kim, J., Kwak, S., M.G., Ferruzzi, Ahn, M., Kang, C.-M., 2018. Two classes of pigments, carotenoids and c-phycoyanin, in spirulina powder and their antioxidant activities. *Molecules* 23(8), 2065.
- Ravi, M., Tentu, S., Baskar, G., Rohan Prasad, S., Raghavan, S., Jayaprakash, P., Jayaprakash, J., Rayala, S.K., Venkatraman, G., 2015. Molecular mechanism of anti-cancer activity of phycocyanin in triple-negative breast cancer cells. *BMC Cancer* 15(1), 768.
- Roy, K.R., Arunasree, K.M., Reddy, N.P., Dheeraj, B., Reddy G.V., Reddanna, P., 2007. Alteration of Mitochondrial Membrane Potential by *Arthrospira platensis* C-phycoyanin Induces Apoptosis in the Doxorubicinresistant Human Hepatocellular-Carcinoma Cell Line HepG2, *Biotechnology and Applied Biochemistry* 47(-), 159-167.
- Sarada, R., Pillai, M.G., Ravishankar, G.A., 1999. Phycocyanin from *Arthrospira 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.
- Serban, M.-C., Sahebkar, A., Dragan, S., Stoichescu-Hogea, G., Ursoniu, S., Andrica, F., Banach, M., 2015. A systematic review and meta-analysis of the impact of Spirulina supplementation on plasma lipid concentrations. *Clinical Nutrition* 35(4), 842-51.
- Singh, N.K., Sonani, R.R., Prasad Rastogi, R., Madamwar, D., 2015. The phycobilisomes: an early requisite for efficient photosynthesis in cyanobacteria. *Excli Journal* 14(-), 268-289.
- Soni, B., Kalavadia, B., Trivedi, U., Madamwar, D., 2006. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*—isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. *Process Biochemistry* 41(-), 2017-2023.
- Su, C.H., Liu, C.S., Yang, P.C., Syu, K.S., Chiu, C.C., 2014. Solid-liquid extraction of phycocyanin from *Arthrospira platensis*: kinetic modeling of influential factors. *Separation and Purification Technology* 123(-), 64-68.
- Sudhakar, M.P., Jagatheesan, A., Perumal, K., Arunkumar, K., 2015. Methods of phycobiliprotein extraction from *Gracilaria crassa* and its applications in food colorants. *Algal Research* 8 (-), 115-120.
- Thengodkar, R.R., Sivakami, S., 2010. Degradation of Chlorpyrifos by an alkaline phosphatase from the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Biodegradation* 21(-), 637-44.
- Vernès, L., Granvillain, P., Chemat, F., Vian, M., 2015. *Current Biotechnology* 4(3), 1-11.
- Walter, A., Carvalho, J.C.D., Soccol, V.T., Faria, A.B.B.D., Ghiggi, F., Soccol, C.R., 2011. Study of phycocyanin production from *Arthrospira platensis* under different light spectra. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 54(-), 675-682.
- Wu, H.L., Wang, G.H., Xiang, W.Z., Li, T., He, H., 2016. Stability and Antioxidant Activity of Food-grade Phycocyanin Isolated from *Arthrospira platensis*. *International Journal of Food Properties* 19(10), 2349-2362.
- Yan, Y., Bao, Z., Shao, J., 2018. Phycocyanin concentration retrieval in inland waters: A comparative review of the remote sensing techniques and algorithms. *Journal of Great Lakes Research* 44(4), 748-755.