شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۵، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱
صفحات ۱۹۲-۱۸۳

استخراج فایکوسیانین ازجلبک *Arthrospira platensis* با استفاده از حلال‌ها و روش‌های مختلف

فهیمه شاه حسینی[۱]، محمدعلی نعمت اللهی[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 ارسال: ۱۴۰۰/۰۸/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۰۹

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 لیترحلال (آب مقطر و بافر سدیم فسفات (pH= ۷,۴ ± ۰/۱)) در سه روش استخراج سونیکیشن با دامنه ۵۰درصد 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 < ۰/۰۵) به دست آمد. بیش‌ترین بازده استخراج توسط بافر سدیم فسفات و روش انجماد و ذوب (PC = ۱۴۶/۳ ± ۱/۵۵ mg/g) و کم‌ترین توسط آب مقطر و روش مایکروویو (PC = ۹۴/۴ ± ۲/۶۸ mg/g) به دست آمد.

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

* نویسنده مسئول: محمدعلی نعمت اللهی
Email: malahi@ut.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 75, No. 2, Summer 2022
pp. 183-192

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

Fahimeh Shahhosseini[1], Mohammad Ali Nematollahi[2*], Seyed Vali Hosseini[3]

[1]MSc Graduated, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
[2]Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
[3]Associate 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 ± 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 ± 1/55 mg/g) and least by distilled water and method Microwave (pc= 94/4 ± 2/68 mg/g).

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

Corresponding author: Mohammad Ali Nematollahi Email: malahi@ut.ac.ir

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، ۶/۲-۴ 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 تقریبا در هر ۱۰۰ میلی‌گرم از ساختارش ۰/۱ میلی‌گرم کلسترول دارد، ویک جایگزین مناسب برای پروتئین حیوانی است (Reboleira *et al*., 2019). گونه های *Arthrospira platensis*، *Arthrospira maxima* و *Arthrospira fusiformis* 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 فیکو بیلی پروتئین‌ها به عنوان یک مکمل غذایی استفاده می‌شود (Su *et al*., 2014; Wu *et al*., 2016).

فیکو بیلی پروتئین‌ها رنگدانه‌ی فتوسنتتیک فرعی هست 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). فیکو بیلی پروتئین‌ها به طور گسترده‌ای در مواد دارویی، غذایی، لوازم آرایشی و مواد فلورسنت استفاده می‌شود (Eriksen, 2008; Kannaujiya and Sinha, 2016). فیکو بیلی پروتئین‌های سیانوباکتری‌ها می‌توانند به دسته اصلی فایکواریترین صورتی و قرمز روشن، فایکوسیانین آبی تیره و آلوفایکوسیانین آبی روشن تقسیم شوند (Ghosh *et al*., 2015; Kumar *et al*., 2014; Singh *et al*., 2015).

فایکوسیانین یک پروتئین فعال در سیانو-باکتر ها است که همراه با تغییرات درون سلولی زیاد حضور دارد (Yan *et al*., 2018). فایکوسیانین را می توان 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 سیانوباکتریوم، پتانسیل مهار سرطان در سلول‌های حیوانی را دارا ست (Roy *et al*., 2007)، و فعالیت‌های ضد سرطانی، ضد التهابی و آنتی اکسیدانی فایکوسیانین در مقالات Boussiba و Richmond (1980)، Hao و همکاران (۲۰۱۸)، Jiang و همکاران (۲۰۱۷)، Park و همکاران (۲۰۱۸)، Ravi و همکاران (۲۰۱۵) 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 رنگ های 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

ارتعاشات با فرکانس زیاد و منجر به حفره زایی شده، به این صورت که حباب‌های کوچک در محیط مایع تشکیل می‌شود (Vernès *et al*., 2015). در طی ترکیدن حباب‌ها، دیواره‌ی سلولی آسیب دیده و منجر به انتشار ترکیبات سودمند در محیط می شود (Dey and Rathod, 2013). این روش می‌تواند 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 می‌شود، هرچه اگر این فرآیند آهسته‌تر صورت گیرد، بلورهای تشکیل شده بزرگ‌تر بوده و آسیب بیشتری به دیواره و غشای سلول وارد می‌کند. در نتیجه استفاده از فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد جهت شکستن سلول مطلوب‌تر از انجماد در دماهای کمتر خواهد بود (Hoseini *et al*., 2013). این روش مزایای ساده بودن، قابل تکرار بودن، و همچنین ضرر نزدن در عملکرد بیولوژیکی پروتئین را دارا ست (Moraes *et al*., 2011). استخراج این مرحله اغلب در حلالی مانند بافر فسفات صورت می‌گیرد (Vernès *et al*., 2015).

در سال‌های 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 می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. تهیه نمونه جلبک

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

۲.۲. روش‌های استخراج فایکوسیانین

برای استخراج فایکوسیانین از طریق روش‌هایی که در 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±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 ۰/۱ 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 نمونه‌ها، با استفاده از روش‌های سونیکیشن، ماکروویو و انجماد و ذوب استخراج تکمیل شد. سونیکیشن نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در حمام التراسونیک انجام شد. ماکروویو کردن نمونه‌ها به مدت ۳ دقیقه در ماکروویو با توان ۱۰۰ W وات صورت گرفت و برای انجماد و ذوب؛ نمونه ها در فریز ۲ ± ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد، بعد از مدت ۲۴ ساعت از فریز خارج و در دمای اتاق ذوب شد.

۲.۳. اسپکتروفتومتر

بازده فایکوسیانین توسط اسپکتروفوتومتر (Unico SPECTROPHOTOMETER, Model: S2100SUV) در طول موج‌های ۶۲۰ و ۶۵۲nm اندازه‌گیری شد و غلظت فایکو سیانین (mg/ml) به شرح ذیل حساب شد (Bennett and Bogorad, 1973):

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

OD_{620} و OD_{652} به ترتیب مقادیر جذب از نمونه در ۶۲۰ و ۶۵۲ نانومتر است و مقدار ۵/۳۴، برابر با میزان

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 پروتئین ها 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 (One-Way ANOVA) با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ برای ویندوز، انجام شد و سطح معنی‌دار بودن در بین متغییرها با استفاده از روش دانکن تعیین شد.

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 ($P < ۰/۰۵$). کم‌ترین و بیش‌ترین مقدار فایکوسیانین به ترتیب توسط روش‌های ماکروویو 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	۱۱۰/۲۳± ۶/۳۹ [b]
مایکروویو	PC	۹۴/۴۷± ۲/۶۷ [a]
انجماد و ذوب	PC	۱۳۰/۱۴± ۲/۴۸ [c]

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 ($P < ۰/۰۵$). کم‌ترین و بیش‌ترین مقدار فایکوسیانین به ترتیب توسط روش‌های ماکروویو و انجماد و ذوب استخراج شد.

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 می‌باشند، 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 درروش سونیکیشن (حلال سدیم فسفات) که مقدار استخراج آن با روش‌های انجماد و ذوب اختلاف معنی دار نداشته است ($P > ۰/۰۵$). بیش‌ترین میزان استخراج توسط حلال

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]

جدول۳. مقایسه تاثیر حلال و روش های 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 [e]

۴. بحث و نتیجه گیری

جلبک *Arthrospira platensis* به منظور بررسی و مقایسه‌ی حلال‌ها و روش‌های مختلف برای استخراج فایکو سیانین انتخاب شد. گونه‌هایی از جنس ا سپیرولینا در م طالعات به عنوان یک منبع غنی و ارزان قیمت فایکوسیانین شرح داده شده‌اند (Minkova *et al*., 2003; Moraes *et al*., 2010). فایکوسیانین، عمده فایکوبیلی‌پروتئین 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 روش‌کار 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 ا ستخراج فایکو سیانین 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 می شود و موجب کارآمدی روش‌های ا ستخراج و افزایش ن سبت خلوص خواهد شد. ا ستخراج فایکوبیلی‌پروتئین 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 می‌توا ند به پروتئین در طی ز مان انت ظار 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 متعادل‌تر است (Su *et al*., 2014).

در روش استخراج: انجماد راهی برای ذخیره سازی

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، فایکوبیلی‌پروتئین 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 فایکوبیلی‌پروتئین 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 ی سلولی می‌شود. به طور مثالores و همکاران (۲۰۱۶) برای استخراج ترکیبی آنزیم، فایکوسیانین و آلوفایکوسیانین از بافر Tris-Hcl ۱۰ Mm (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 مهره های 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 سانتی گراد خشک و در ۱۸- درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت فریز شد و سپس بیومس در Mm ۱۰ 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 PC=101 ± ۰/۲ mg/g و APC=26 ± 1 mg/g بیش‌ترین بازده را نسبت به روش‌های دیگر به دست آورده است که از نظر آماری با روش هموژنایزر التراسونیک با مقدار PC=90 ±۰/۴ mg/g و APC=70± mg/g ۰/۳ 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 نتایجی 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

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

۵. منابع References

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-phycocyanin reduces inflammation by inhibiting NF-κ- activity through downregulating pdcd5 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 phycocyanin 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 phycocyanin 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. Phycocyanin: A potential drug for cancer treatment. *Journal of Cancer* 8(17), 3416–3429.

Kannaujiya, V.K., Sinha, R.P., 2016. Thermokinetic stability of phycocyanin 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-phycocyanin 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-phycocyanin from *Arthrospira fusiformis*. J*ournal of Biotechnology* 102(-), 55–59.

Moraes, C.C., Burkert, J.F.D., Kalil, S.J., 2010. C-Phycocyanin 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-phycocyanin 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 phycocyanin 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-phycocyanin, 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-phycocyanin 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., Chiuh, 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.