



بهینه‌سازی تخریب دیواره سلولی، غلظت بافر استخراج و ارزیابی خصوصیات کارکردی رنگدانه فایکواریتین از درشت جلبک قرمز دریای خزر *Osmundea caspica* (Rhodomelaceae, Rhodophyta)

حمید اسحق‌زاده^۱، مریم شهبازی^{۲*}، علی نقی سرپناه^۳

۱. کارشناس مرکز تحقیقات علوم شیلاتی و فنون دریایی دکتر کیوان، دانشگاه آزاد لاهیجان، گیلان، ایران

۲. دانشیار گروه محیط زیست، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران

۳. استادیار موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۰

چکیده

فایکواریتین به‌عنوان رنگدانه طبیعی با خاصیت فلورسانس و آنتی‌اکسیدانی دارای پتانسیل خوبی در صنایع غذایی و پزشکی است. این مطالعه جهت بهینه‌سازی روش استخراج تحت تأثیر غلظت بافر سدیم فسفات، نسبت بافر به جلبک و نوع تخریب فیزیکی دیواره سلولی در درشت جلبک قرمز دریای خزر *Osmundea caspica* در قالب یک طرح کاملاً تصادفی جهت بررسی میزان خلوص، غلظت رنگدانه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خاصیت فلورسانس رنگدانه فایکواریتین انجام شد. در این مطالعه روش انجماد-انجمادزدایی برای استخراج مورد استفاده قرار گرفت، نتایج این مطالعه تفاوت معنی‌داری از نظر میزان خلوص و غلظت رنگدانه تحت تأثیر متغیرهای مورد بررسی نشان داد ($P < 0.05$). بیشترین میزان خلوص و غلظت رنگدانه در تیمار ۱۰۰ میلی مولار سدیم فسفات بافر به ترتیب نسبت ۱ به ۲۰ جلبک به بافر (وزنی-حجمی) و ۱ به ۵ به میزان ۰/۳۳ و ۱ میلی گرم بر گرم جلبک تر به دست آمد. بنابراین، با افزایش غلظت یونی بافر میزان خلوص و غلظت رنگدانه افزایش می‌یابد ولی با افزایش نسبت بافر به جلبک، میزان خلوص کاهش و میزان غلظت رنگدانه (میلی گرم بر گرم جلبک تر) افزایش خواهد یافت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت‌های مختلف ۲ تا ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر به روش DPPH و همچنین خاصیت فلورسانس فایکواریتین استخراج شده مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد که ویژگی فایکواریتین از نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خاصیت فلورسانس به غلظت وابسته است و با افزایش میزان فایکواریتین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خاصیت فلورسانس افزایش می‌یابد. بنابراین، فایکواریتین به دست آمده در بافر ۱۰۰ میلی مولار در مرحله استخراج با خلوص نزدیک به ۱ را می‌تواند با هدف کاربرد در صنایع غذایی معرفی کرد.

واژگان کلیدی: درشت جلبک، *Osmundea caspica*، دریای خزر، استخراج، فایکواریتین



Optimization of cell wall degradation, extraction buffer concentration and evaluation of functional properties of phycoerythrin pigment from Caspian red macroalgae, *Osmundea caspica* (Rhodomelaceae, Rhodophyta)

Hamid Eshaghzadeh¹, Maryam Shahbazi^{2*}, Ali Naghi Sarpanah³

1. Scientific Expert, Keyvan Marine Science and Technology Research Center, Islamic Azad University (IAU), Lahijan Branch, Lahijan, Iran
2. Associate Professor, Department of Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, Iran
3. Assistant Professor, Iranian fisheries science research institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran

Received: 11-Mar-2023

Accepted: 13-May-2023

Abstract

Phycoerythrin (PE) is a naturally produced colorant with great fluorescent and antioxidant properties, which has an important potential in food pharmaceutical industries. This study was conducted by randomly experimental design in order to optimize the phycoerythrin extraction under different independent variable (biomass: buffer ratio, buffer ionic strength and cellular disruption method) from Caspian Sea red macroalgae (*Osmundea caspica*). Purity and concentrations of PE changed significantly under different treatments ($P < 0.05$). The highest PE purity and concentrations was obtained in 100mM sodium phosphate buffer and 1:20 biomass: buffer ratio. Therefore, the positive correlation has been observed between increasing levels of buffer ionic strength with PE purity and concentrations while lowest PE purity and highest PE concentrations (mg/gr fresh algae) were obtained with increasing level of biomass: buffer ratio. Antioxidant activity of extracted PE was evaluated by measuring the free radical scavenging ability using DPPH. PE was found to have better free radical scavenging activity at highest concentration with dose-dependent manner. Therefore, the obtained phycoerythrin in 100mM buffer in the extraction process approximately with a purity of one can be introduced with the aim of application in the food industry.

Keywords: Seaweed, *Osmundea caspica*, Caspian Sea, Extraction, Phycoerythrin

۱. مقدمه

درشت‌جلبک‌ها شامل گروهی از جلبک‌های دریایی شامل سه گروه مهم جلبک‌های سبز (Chlorophyta)، قهوه‌ای (Phaeophyta) و قرمز (Rhodophyta) هستند. جلبک‌ها از نظر وجود ترکیبات آلی نظیر آگار، کاراگینان، اسید آلژینیک و همچنین اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب ضروری، املاح معدنی، ویتامین‌ها و رنگدانه‌ها مورد توجه و استفاده بشر قرار گرفته‌اند (Richa *et al.*, 2011). دریای خزر به‌عنوان بزرگترین دریاچه جهان از نظر تعداد گیاهان ماکروفیتوبنتوز غنی نمی‌باشد و تنها ۱۳ گونه جلبک قهوه‌ای و ۲۵ گونه جلبک قرمز توسط محققین روسی گزارش شده است (Karpinsky *et al.*, 2005) و در سواحل ایران تنها دو گونه درشت‌جلبک سبز و یک گونه درشت‌جلبک قرمز گزارش شده است (Mehdipour *et al.*, 2014). مشاهدات عینی در سواحل ایران (سواحل جنوبی دریای خزر) نشان می‌دهد که تنها یک گونه درشت‌جلبک قرمز با نام علمی *Osmundea caspica* وجود دارد و دارای پراکنش در سواحل سنگی و صخره‌ای مناطق دریای خزر می‌باشد. البته جنس این گونه جلبکی در تقسیم‌بندی‌های اخیر براساس مطالعات ژنتیکی تغییر یافته است و در گذشته به جنس *Laurencia* تعلق داشته است (Rousseau *et al.*, 2017). با توجه به وجود ترکیبات زیست‌دارویی از نظر خاصیت ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد سرطانی در این جلبک (Moshfegh *et al.*, 2019)، تاکنون مطالعاتی بر روی این جلبک در خصوص بررسی محتوی رنگدانه و خصوصیات عملکردی آن انجام نشده است. این ویژگی‌ها می‌تواند اهمیت این جلبک را به‌عنوان یک گونه جدید پرورشی در صنعت آبی‌پروری دریای خزر پررنگ‌تر نماید. جلبک‌ها دارای ساختارهای فتوسنتز کننده می‌باشند که یکی از این سیستم‌ها، مجموعه جمع‌آوری کننده نور به نام فایکوبیلیزوم‌ها (Phycobilisomes) می‌باشند که درون میکروتوبول‌ها (اجزاء ریز کیسه‌ای) موجود در کلروپلاست وجود دارند. فایکوبیلیزوم‌ها در واقع کمپلکس

پروتئینی می‌باشد که به بخش درونی کلروپلاست متصل شده است و از دو بخش تشکیل شده است که بخش رنگی محلول در آب درخشان و فلورسانس را فایکوبیلی پروتئین و بخش دیگر متصل به پلی‌پپتید آب‌گریز می‌باشد (Liu, 2016). ویژگی طیف سنجی و ساختاری فایکوبیلی پروتئین براساس گروه‌های موجود در زنجیره پروتئین مشخص می‌شود که به‌صورت ۴ حلقه پیروپول خطی هستند که به‌عنوان فایکوبیلین شناخته می‌شوند و شامل فایکوس-یانوبیلین، فایکواریترویلین، فایکوآوربیلین و فایکوبیلی ویولین می‌باشند که از نظر تعداد و ترکیب پیوندهای دوگانه با یکدیگر متفاوت می‌باشند. هر کدام از این فایکوبیلین‌ها به‌طور جداگانه و یا ترکیبی در به‌وجود آمدن و نامگذاری فایکوبیلی پروتئین‌ها نقش دارند که به رنگدانه‌های محلول در آب معروف می‌باشند و به‌طور عمده به فایکوسیانین، فایکواریترین، آلفافایکوسیانین و فایکواریتروسیانین طبقه‌بندی می‌شوند. پتانسیل حفاظتی فایکواریترین نسبت به سایر فایکوبیلی پروتئین‌ها در برابر تغییرات pH و عوامل اکسیدکننده قوی‌تر می‌باشد (Sonani *et al.*, 2016). فایکواریترین به سه گروه R، B و C تقسیم می‌شود که این تقسیم‌بندی براساس منشاء (نوع جلبک) و جذب طیف نوری می‌باشد. اختلاف در جذب طیف نوری شکل‌های مختلف فایکواریترین به‌خاطر وجود شکل‌های مختلف فایکوبیلین یا زنجیره‌های باز کروموفور تراپیروپول می‌باشد که به بخش پروتئینی متصل می‌باشند. ترکیب اصلی فایکواریترین یک ترکیب زیستی به نام (R-phycoerythrin, R-PE) در جلبک‌های قرمز و سیانوباکترها می‌باشد که یک رنگدانه محلول در آب و دارای فلورسانس قرمز با وزن مولکولی ۲۱۰ تا ۲۴۰ کیلو دالتون است و بخش پروتئینی آن از ۳ زیر واحد α ، β و γ به‌صورت هگزامری از $(\alpha\beta)_6$ می‌باشد. زیر واحد α حدود ۱۷ کیلودالتون، زیر واحد β حدود ۱۸ کیلودالتون و زیر واحد γ حدود ۳۰ کیلودالتون است. مولکول فایکواریترین شامل بخش کروموفوری فایکواریترویلین و فایکوآوربیلین با مشخصات طیف جذبی مشخص است و دارای کاربردهای مهم و فراوانی در حوزه درمان و تشخیص

است (Dumay et al., 2013, Chen et al., 2015). در این مطالعه بازدهی استخراج فایکواریتترین در تنها گونه بومی در بای خزر تحت تأثیر عوامل مؤثر نظیر روش انجماد-انجمادزدایی، غلظت بافر، نسبت بافر به جلبک و حالت جلبک از نظر تخریب فیزیکی و همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی و فلورسانس فایکواریتترین مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. نحوه جمع‌آوری جلبک و آماده‌سازی

جمع‌آوری نمونه جلبک *Osmundea caspica* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) در سواحل استان گیلان (E ۲۶° ۲۳' ۵۳"، N ۳۰° ۵۱' ۳۶") در فروردین ماه ۱۳۹۹ انجام شد و در محیط دریا یک بار جلبک‌های جمع‌آوری شده با آب دریا برای خارج کردن شن و ماسه و سایر اجرام ناخواسته شستشو داده شد و سپس در آزمایشگاه به ترتیب چندین بار با آب لوله‌کشی و آب مقطر شستشو داده شدند تا در مراحل بعدی آزمایش مورد استفاده قرار گیرند.

۲.۲. روش تخریب دیواره سلولی بر استخراج

رنگدانه

از روش فیزیکی انجماد-انجمادزدایی و بافر سدیم فسفات جهت استخراج فایکواریتترین استفاده شد. در ابتدا، جلبک‌ها در ۳ حالت مختلف به صورت قطعات زیر ۱ سانتی‌متر (قطعه قطعه شده)، خمیری شده (له شده با دستگاه میکسر) و پودر شده (با ازت مایع و هاون) تیمار بندی شد تا بهترین حالت یا شکل جلبک برای انجام آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گیرد. سپس مقدار مشخص و یکسان از سدیم فسفات بافر به تیمارها اضافه شد و به مدت ۴ ساعت روی شیکر ۲۰۰ دور در دقیقه باقی ماند (Behdad, Iran). در ادامه این تیمارها به مدت ۱۲ ساعت در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری

بیماری (به دلیل ویژگی زیست‌فعال و پروب ایمنوفلورسانس)، در حوزه مواد آرایشی و غذایی (ترکیب رنگی) است. همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌دیابت، آنتی‌تومور، آنتی‌التهاب و محافظ سلول‌های عصبی و کبدی این رنگدانه در مطالعات گذشته تأیید شده است. این رنگدانه ارزش تجاری خوبی دارد و قیمت آن براساس میزان خلوص بین ۱۸۰ تا ۲۵۰ دلار به‌ازای هر میلی‌گرم می‌باشد (Mittal and Raghavarao 2018). به‌عنوان مثال میزان خلوص ۰/۷ برای درجه غذایی و میزان خلوص ۴ برای درجه آنالیتیکال مورد استفاده قرار می‌گیرد (Mittal et al., 2019).

پیشرفت‌های زیادی در استخراج و خالص‌سازی فایکواریتترین در مقیاس‌های مختلف انجام شده است، اما اغلب روش‌ها مشکل و با هزینه‌های بالایی قابل انجام هستند. همچنین به دلیل ماهیت پروتئینی این رنگدانه حساسیت آن به دما، pH، نور، الکل و غیره استخراج آن نسبت به دیگر ترکیبات موجود در ساختار درشت جلبک دارای پیچیدگی‌های خاصی می‌باشد. روش‌های فیزیکی و شیمیایی در فرآیند استخراج رنگدانه مورد استفاده قرار می‌گیرند که عموماً روش‌های فیزیکی مانند انجماد-انجمادزدایی و فراصوت به دلیل قابلیت استفاده در مقیاس صنعتی، کم‌هزینه بودن و کم‌ترین تأثیر در ماهیت مولکولی رنگدانه توصیه شده است (Saluri et al., 2019; Dewi et al., 2019; Tan et al., 2020). بنابراین می‌بایست شرایط استخراج و خالص‌سازی به نحوی صورت گیرد که کمترین تغییرات در ساختار آن ایجاد شود. به‌منظور استخراج فایکواریتترین از درشت‌جلبک‌ها می‌بایست ابتدا دیواره سلولی آن‌ها شکسته شود. انتخاب روش مناسب جهت استخراج رنگدانه در درشت‌جلبک به منظور دستیابی به حداکثر بازدهی به عوامل مختلفی نظیر نوع جلبک (ماهیت ساختاری دیواره سلولی)، شرایط جغرافیایی، حالت جلبک مصرفی (به‌صورت تر و تازه یا خشک شده)، تخریب فیزیکی (انجماد-انجمادزدایی و کاربرد امواج صوتی) و شیمیایی (آنزیم سلولاز و زایلاناز) دیواره سلولی، نوع و غلظت بافر و نسبت بافر به جلبک متفاوت

شد. در یک مرحله انجماد و انجمادزدایی نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در فریز ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس مجدد انجمادزدایی در دمای محیط انجام شد. در تیمار دیگر (دو مرحله انجماد و انجمادزدایی) این فرآیند دو بار و در مدت ۲۴ ساعت انجام شد. پس از آن محلول عصاره خام حاوی فایکواریتترین مانند مراحل گذشته سانتریفوژ شد و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر از نظر میزان خلوص و غلظت رنگدانه مورد ارزیابی قرار گرفت (Pereira et al., 2020).

۴.۲. ارزیابی کیفی و کمی فایکواریتترین

ارزیابی کیفی و کمی فایکواریتترین در تیمارهای مختلف با استفاده از دو پارامتر درجه خلوص و میزان غلظت فایکواریتترین به ترتیب براساس معادله‌های ۱ و ۲ در طیف‌های جذبی مورد نظر قرائت و مورد بررسی قرار گرفت (Mittal et al., 2019).

$$\text{Purity ratio} = A_{564}/A_{280} \quad (\text{معادله ۱})$$

$$\text{R-PE concentration (mg/ml)} = 0.1247 [(A_{564\text{nm}} - A_{730}) - 0.4583(A_{618} - A_{730})] \quad (\text{معادله ۲})$$

در انتها نمونه‌های استخراج شده در تیمار بهینه (تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار بافر سدیم فسفات بافر و نسبت ۱ به ۱۰ جلبک به بافر) با استفاده از خشک‌کن پاششی خشک و تبدیل به پودر شد تا از نظر خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ویژگی فلورسانس در ۵ سطح (۱۰، ۸، ۶، ۴، ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مورد بررسی قرار گیرد. فعالیت مهارکننده آنتی‌اکسیدانی فایکواریتترین در غلظت‌های مختلف با روش DPPH ارائه شده توسط Burits and Bucar (۲۰۰۰) به روش اسپکتروفتومتری بر پایه کاهش رادیکال‌های آزاد با اندکی تغییرات استفاده شد. ۴۰ میکرولیتر از نمونه مورد نظر به ۳ میلی‌لیتر محلول DPPH (با غلظت ۱ میلی‌مولار) اضافه شد. محلول به مدت ۱۰ ثانیه به شدت تکان داده شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه جهت واکنش در دمای اتاق و در محیط تاریک نگهداری شد. سپس

شدند و سپس اقدام به انجمادزدایی نمونه‌ها در دمای محیط شد. در نهایت، نمونه‌ها با نیروی نسبی ۱۵۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد (Hermle GmbH, Germany). پس از این مرحله، قسمت رویی (فایکواریتترین) جدا شد. خلوص و غلظت رنگدانه جهت ارزیابی کیفی و کمی فایکواریتترین با استفاده از اسپکتروفتومتر (Biochrom Inc., UK) مورد بررسی قرار گرفت.

۳.۲. بهینه‌سازی استخراج

با توجه به نتایج به دست آمده در آزمایشات مقدماتی، جلبک در حالت پودر شده با ازت مایع در ادامه مورد استفاده قرار گرفت. در هر مرحله از بهینه‌سازی، آماده‌سازی مقدار مشخصی از جلبک تازه از محیط دریا همان‌طور که توضیح داده شد، انجام شد و سپس با استفاده از ازت مایع و هاون تبدیل به پودر شد. دامنه متغیرهای غلظت یونی بافر و نسبت بافر به زیست‌توده جلبک جهت بهینه‌سازی براساس آزمایشات مقدماتی و مرور منابع مطالعات گذشته طراحی شد (Fekrat et al., 2018; Dewi et al., 2019). بافر سدیم فسفات در ۳ سطح غلظت یونی (۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌مولار) به‌طور جداگانه در ۳ نسبت بافر به زیست‌توده جلبک (۱:۵، ۱:۱۰، ۱:۲۰) در نظر گرفته شد و تیمارها به مدت ۴ ساعت روی شیکر با ۲۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. در ادامه این تیمارها به مدت ۱۲ ساعت در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس اقدام به انجمادزدایی نمونه‌ها در دمای محیط شد و در نهایت مطابق با توضیحات قبل سانتریفوژ شد. همچنین تعداد دفعات سیکل انجماد-انجمادزدایی (در یک یا دو بار سیکل انجماد-انجمادزدایی) جهت دستیابی به بهترین دستورالعمل از نظر درجه خلوص و میزان غلظت فایکواریتترین مورد بررسی قرار گرفت (Pereira et al., 2020). سپس نمونه‌ها در دو تیمار جدا شامل یک مرحله انجماد-انجمادزدایی و دو مرحله انجماد-انجمادزدایی مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله بدون انجماد، نمونه با بافر مخلوط و فرآیند استخراج انجام

جذب نمونه‌ها و کنترل با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۵ نانومتر قرائت شد. در نهایت در صد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد با استفاده از معادله ۳ محاسبه شد:

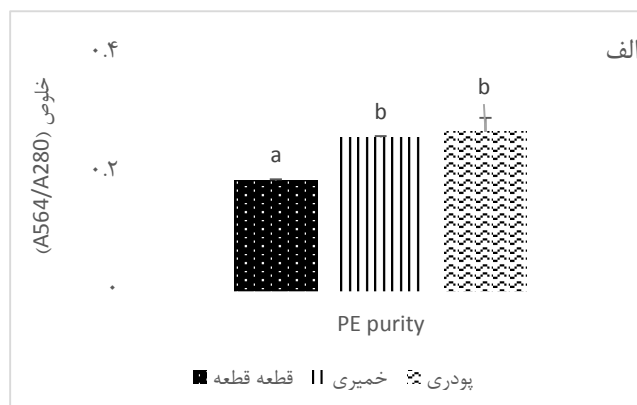
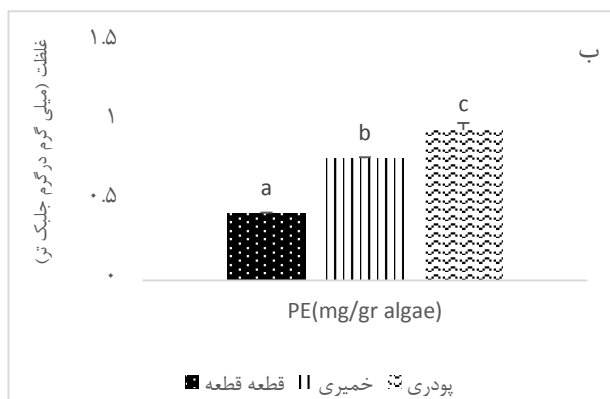
میزان درصد جذب و مهار رادیکال‌ها (معادله ۳) = $(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100$

۳. نتایج

۱.۳. تأثیر تخریب دیواره سلولی بر روند استخراج

نتایج به‌دست آمده از بررسی تخریب فیزیکی دیواره سلولی به صورت قطعه قطعه، خمیری و پودری نشان داد که میزان خلوص و غلظت فایکواریتترین (میلی گرم به ازای هر گرم جلبک‌تر) در این آزمایش تفاوت معنی‌داری بین تیمارها از خود نشان داد ($P < 0.05$). درجه خلوص بین تیمارها در محدوده ۰/۱۸ و ۰/۲۷ به دست آمد و بالاترین میزان خلوص در حالت پودری جلبک مشاهده شد. میزان غلظت فایکواریتترین بین ۰/۴ و ۰/۹ میلی گرم به ازای هر گرم ماده تر جلبک مشاهده شد که بالاترین میزان در حالت پودری گزارش شد (نمودارهای شکل ۱).

در این معادله، A_{control} : میزان جذب نمونه کنترل و A_{sample} : میزان جذب نمونه می‌باشد. همچنین فعالیت فلوروسانس غلظت‌های مختلف (۱۰، ۸، ۶، ۴، ۲) میلی گرم از فایکواریتترین حل شده در یک میلی لیتر بافر فسفات در طول موج تحریکی ۵۷۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. در طول مراحل مطالعه، برای هر واحد آزمایشی ۳ تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های مربوط به میزان غلظت، خلوص فایکواریتترین در تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA انجام شد. برای مقایسه میانگین بین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای توکی و نیز وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال



شکل ۱ میزان خلوص (الف) و غلظت فایکواریتترین (میلی گرم در گرم ماده جلبک تر) (ب)

در حالت‌های مختلف تخریب دیواره سلولی (Mean±SD)

(حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ می‌باشد)

مختلف ۵، ۱۰، ۲۰ درصد به جلبک تر از نظر درجه خلوص و میزان غلظت فایکواریتترین (میلی گرم به ازای هر گرم جلبک تر) مورد بررسی قرار گرفت و تفاوت

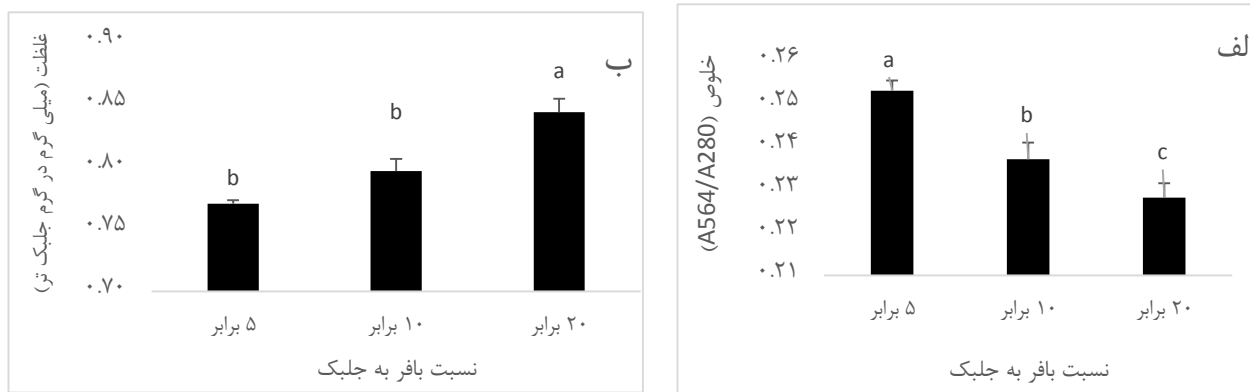
۲.۳. بهینه‌سازی استخراج از نظر غلظت یونی بافر

و نسبت بافر به جلبک

بررسی اثر غلظت بافر ۲۵ میلی مولار در نسبت‌های

۰/۷۷ و ۰/۸۴ میلی گرم به ازای هر گرم جلبک تر مشاهده شد که بالاترین میزان در نسبت ۲۰ به ۱ بافر به جلبک گزارش شد (نمودارهای شکل ۲).

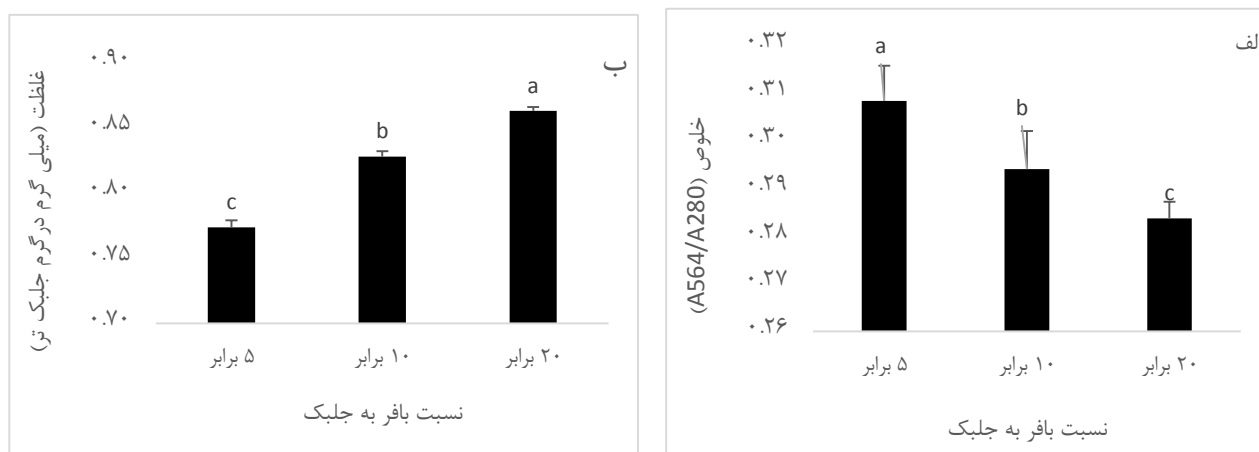
معنی‌داری بین تیمارها نشان داد ($P < 0.05$). درجه خلوص بین تیمارها در محدوده ۰/۲۲ و ۰/۲۵ به دست آمد و بالاترین میزان درجه خلوص در نسبت ۵ به ۱ بافر به جلبک مشاهده شد و میزان غلظت فایکواریتترین بین



شکل ۲- نمودارهای میزان خلوص (الف) و غلظت فایکواریتترین (میلی گرم در گرم ماده جلبک تر) (ب) در بافر ۲۵ میلی مولار در نسبت‌های مختلف ۵، ۱۰، ۲۰ درصد به جلبک تر (Mean±SD). (حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ است)

۰/۳ به دست آمد و بالاترین میزان درجه خلوص در نسبت ۵ به ۱ بافر به جلبک مشاهده شد و میزان غلظت فایکواریتترین بین ۰/۷۷ و ۰/۸۶ میلی گرم به ازای هر گرم جلبک تر مشاهده شد که بالاترین میزان در نسبت ۲۰ به ۱ بافر به جلبک گزارش شد.

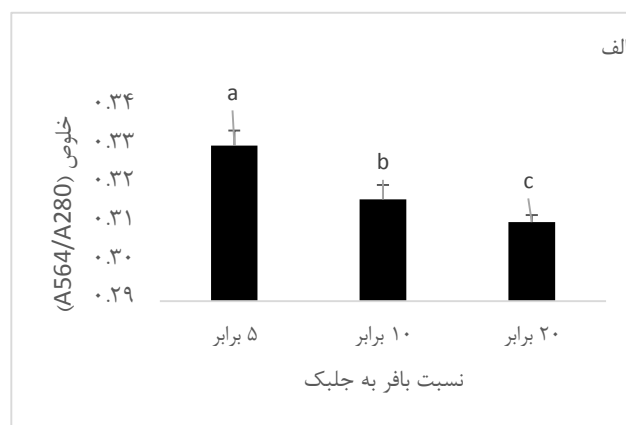
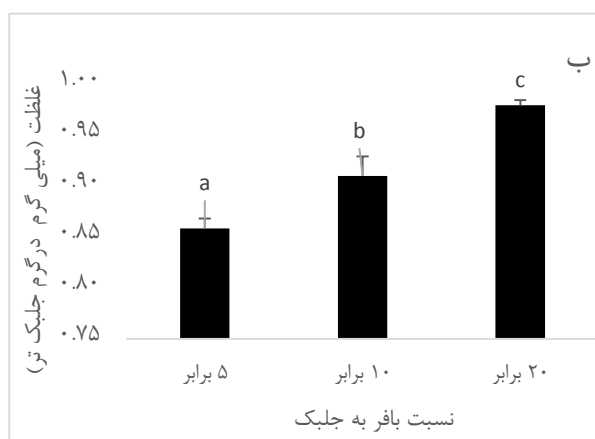
درجه خلوص و میزان غلظت فایکواریتترین (میلی گرم به ازای هر گرم جلبک تر) در بافر ۵۰ میلی مولار در نسبت‌های مختلف ۵، ۱۰، ۲۰ درصد به جلبک تر تفاوت معنی‌داری بین تیمارها نشان داد ($P < 0.05$) (نمودارهای شکل ۳). درجه خلوص بین تیمارها در محدوده ۰/۲۸ و



شکل ۳- نمودارهای میزان خلوص (الف) و غلظت فایکواریتترین (میلی گرم در گرم ماده جلبک تر) (ب) در غلظت بافر ۵۰ میلی (Mean±SD) (حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ می‌باشد)

میزان غلظت فایکواریتترین در غلظت‌ها مختلف و نسبت‌های مختلف بافر به جلبک با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارد ($P < 0/05$) به طوری که بالاترین میزان درجه خلوص در بافر ۱۰۰ میلی‌مولار و نسبت ۵ برابر بافر به جلبک به میزان ۰/۳۳ مشاهده شد، همچنین بالاترین میزان غلظت فایکواریتترین با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار و نسبت ۲۰ برابر بافر به جلبک به میزان ۰/۹۷ میلی‌گرم بازای هر گرم جلبک تر مشاهده شد. بنابراین در نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان نمود که با افزایش غلظت بافر میزان خلوص و غلظت رنگدانه افزایش می‌یابد ولی با افزایش نسبت بافر به جلبک، میزان خلوص کاهش ولی میزان غلظت رنگدانه (میلی‌گرم بر گرم جلبک تر) افزایش یافت.

بافر ۱۰۰ میلی‌مولار در نسبت‌های مختلف ۵، ۱۰، ۲۰ درصد به جلبک تر از نظر درجه خلوص و میزان غلظت فایکواریتترین (میلی‌گرم به ازای هر گرم جلبک تر) تفاوت معنی‌داری بین تیمارها از خود نشان داد ($P < 0/05$) (نمودارهای شکل ۴). درجه خلوص بین تیمارها بین ۰/۳۱ و ۰/۳۳ به دست آمد و بالاترین میزان درجه خلوص در نسبت ۵ به ۱ بافر به جلبک مشاهده شد و میزان غلظت فایکواریتترین بین ۰/۸۵ و ۰/۹۷ میلی‌گرم به ازای هر گرم جلبک تر مشاهده شد که بالاترین میزان در نسبت ۲۰ به ۱ بافر به جلبک گزارش شد. نتایج حاصل از آزمایشات مرتبط با تعیین میزان غلظت بافر و نسبت بافر به جلبک از نظر درجه خلوص و میزان غلظت فایکواریتترین نشان داد که شرایط بهینه درجه خلوص و



شکل ۴- نمودارهای میزان خلوص (الف) و غلظت فایکواریتترین (میلی‌گرم در گرم ماده جلبک تر) (ب) در غلظت بافر ۱۰۰ میلی‌مولار در نسبت‌های مختلف ۵، ۱۰، ۲۰ درصد به جلبک تر (Mean±SD) (حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ می‌باشد)

درجه خلوص و میزان غلظت فایکواریتترین اثرگذار می‌باشد و بالاترین میزان در فرآیند ۲ بار انجماد-انجمادزدایی به دست آمد (نمودارهای شکل ۵).

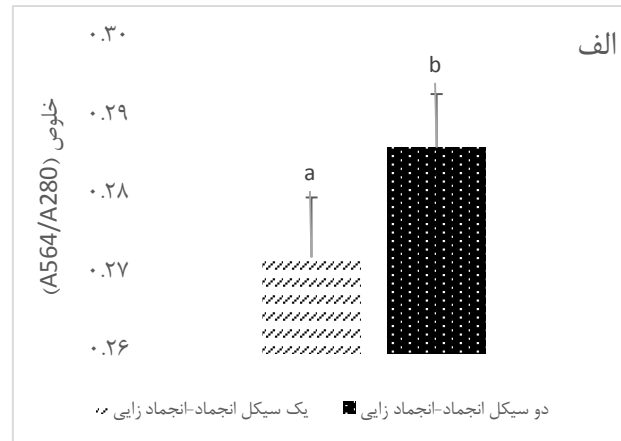
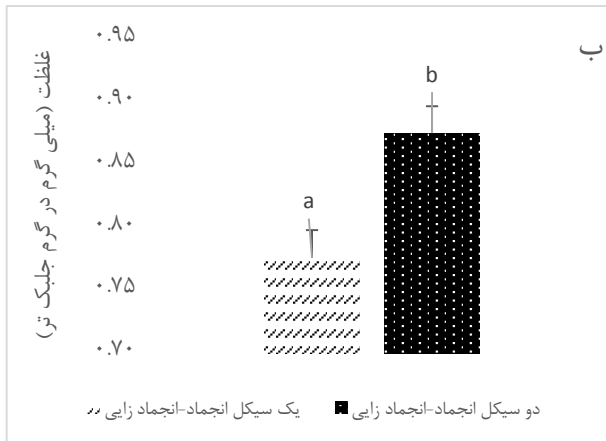
۳.۳. ارزیابی کیفی و کمی فایکواریتترین

مقایسه خواص فلورسانس و آنتی‌اکسیدان فایکواریتترین استخراج شده در روش انجماد-انجمادزدایی در جدول ۱

بررسی اثر دفعات انجماد و انجمادزدایی در این مطالعه تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P < 0/05$). بافر ۱۰۰ میلی‌مولار به نسبت ۱ به ۱۰ در این مرحله مورد استفاده قرار گرفت تا اثر یک و دو بار فرآیند انجماد-انجمادزدایی روی مخلوط بافر و جلبک مورد بررسی قرار گیرد. نتایج به دست آمده از تحلیل t مستقل نمودارهای شکل ۵ نشان داد که تعداد دفعات فرآیند انجماد-انجمادزدایی روی

آمده، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فلورسانس با افزایش غلظت فایکواریت‌ترین روند افزایشی معنی‌داری داشت و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمار ۱۰ میلی‌گرم فایکواریت‌ترین در میلی‌لیتر $78/4 \pm 0/9$ درصد و ویژگی فلورسانس ۴۲۱۶ (a.u.: arbitrary units) به‌دست آمد.

ارائه شده است. نتایج به‌دست آمده بیانگر ارتباط غلظت فایکواریت‌ترین با خواص کارکردی آن (خواص فلورسانس و آنتی‌اکسیدان) می‌باشد و نیز حفظ کارایی و خصوصیات ذاتی این پروتئین است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی در شرایط آزمایشگاهی با پنج غلظت (۱۰، ۸، ۶، ۴، ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست



شکل ۵- نمودارهای میزان خلوص (الف) و میزان غلظت فایکواریت‌ترین (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) (ب) در تعداد دفعات انجماد و انجمادزدایی (Mean±SD) (حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ می‌باشد)

جدول ۱- مقایسه خواص فلورسانسی و آنتی‌اکسیدانی فایکواریت‌ترین در غلظت‌های مختلف (Mean±SD) (حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ می‌باشد)

غلظت فایکواریت‌ترین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	فلورسانس (a.u.)	آنتی‌اکسیدان (%)
۲	$940/1246 \pm 15/58^a$	$65/03 \pm 0/7^a$
۴	$1641/117 \pm 30/08^b$	$67/4 \pm 2/35^b$
۶	$2368/33 \pm 42/08^c$	$70/33 \pm 0/94^c$
۸	$3040/436 \pm 54/55^d$	$75/7 \pm 1/8^d$
۱۰	$4216/611 \pm 76/37^e$	$78/36 \pm 0/92^e$

استفاده می‌شود. فایکواریت‌ترین قرمز تا بنفش رنگ، به شدت فلورسانس، محلول در آب و دریافت‌کننده نور در جلبک‌های قرمز می‌باشند. به‌طور کل از نظر وزنی ۸۰ درصد کمپلکس پروتئینی در فایکوبیلی پروتئین رنگی می‌باشد و ۲۰ درصد آن غیر رنگی یا پروتئین لینکر می‌باشد. آن‌ها در غشای تیلاکوئید ناحیه درونی کلروپلاست جهت دریافت انرژی خورشید و انتقال آن به

۴. بحث و نتیجه‌گیری نهایی

۱.۴. تأثیر شکل و حالت نمونه جلبک بر استخراج

فایکواریت‌ترین در *Osmundea caspica*

فایکوبیلی پروتئین‌ها از پروتئین‌های رنگی موجود در جلبک و سیانوباکتری‌ها می‌باشند. این رنگدان‌ها به‌طور گسترده در صنایع غذایی، بیوتکنولوژیک و پزشکی دارویی

مشاهده شد. در گونه‌های جلبکی دیگر مانند *Grateloupia turuturu*، *Kappaphycus alvarezii* و *Polysiphonia urceolata* در حالت تر میزان خلوص به ترتیب ۰/۱۹، ۰/۱۴ و ۰/۵ گزارش شد (Niu et al., 2006; Denis et al., 2009). انتخاب روش مناسب جهت استخراج رنگدانه در درشت‌جلبک تحت تأثیر عوامل مختلف نظیر ماهیت ساختاری دیواره سلولی، شرایط اقلیمی (شدت نور)، حالت جلبک مورد استفاده (به صورت تر و تازه یا خشک شده)، تخریب فیزیکی و شیمیایی دیواره سلولی، شکل و سایز قطعات خرد شده بافت جلبک، نوع و غلظت بافر، نسبت بافر به جلبک و هزینه و زمان فرآیند متفاوت است (Dumay et al., 2013; Chen et al., 2015).

۲.۴. بهینه‌سازی غلظت بافر استخراج و تخریب

سلولی به روش انجماد و انجمادزدایی

با افزایش غلظت بافر، میزان خلوص و غلظت رنگدانه (میلی‌گرم بازای هر گرم جلبک تر) افزایش می‌یابد. همچنین با افزایش نسبت بافر به جلبک، میزان خلوص کاهش می‌یابد و در مقابل میزان غلظت رنگدانه (میلی‌گرم بازای هر گرم جلبک تر) افزایش می‌یابد. وجود نمک در بافر روی حلالیت پروتئین اثرگذار است و غلظت پایین نمک در بافر (کمتر از ۱ مولار) حلالیت پروتئین در حلال را افزایش می‌دهد (Timasheff and Arakawa, 1988). به‌طور کلی بافرهای رقیق دارای توانایی بهتری در استخراج پروتئین می‌باشند. بنابراین از یک طرف با توجه به غلظت‌های انتخاب شده که نسبتاً رقیق (زیر ۱ مولار) می‌باشند و از طرف دیگر افزایش خلوص و غلظت رنگدانه با افزایش غلظت بافر، در این مطالعه می‌توان انتظار داشت که در گونه جلبک *Osmundea caspica* با افزایش غلظت بافر تا ۱ مولار نتایج بهتری به دست آمد. در مطالعه حاضر، غلظت رنگدانه فایکواریتترین در غلظت‌های مختلف بافر و نسبت بافر به جلبک حدود ۰/۷ تا ۰/۹ میلی‌گرم بر جلبک تر به دست آمد که این میزان در مطالعات گذشته برای جلبک *Kappaphycus alvarezii* حدود ۰/۵ و

هسته زیرواحدهای مربوط به فرآیند فتوسنتز واقع شده‌اند که با فایکوبیلی زوم‌ها ترکیب می‌شود. در واقع فایکوبیلی زوم یک ساختار ترکیبی (کمپلکس) شامل آلفایکو سیانین، فایکواریتترین و فایکو سیانین می‌باشد که در سطح بیرونی غشای تیلاکوئیدی قرار دارند (Samsonoff and MacColl 2001; Sekar and Chandramohan 2008). بنابراین، فایکوبیلی پروتئین‌ها به وسیله روش‌های مختلف تخریب سلولی و استخراج رنگدانه در حلال‌ها به دست می‌آید. فاکتورهای مختلفی روی استخراج رنگدانه اثرگذار است و ترکیب روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی برای تخریب دیواره سلولی مورد استفاده قرار گرفته است. نوع و ساختار دیواره سلولی جلبک، pH بافر، نسبت بافر به زیست‌توده و روش استخراج (سونیکشن و هموزن کردن) از جمله مواردی می‌باشند که در روند استخراج و بازدهی اثرگذار می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تمام فاکتورهای مورد بررسی جهت استخراج فایکواریتترین مانند حالت جلبک مصرفی (به صورت پودر شده، خمیری و قطعه‌قطعه شده)، نسبت بافر به جلبک و غلظت بافر روی غلظت و خلوص فایکواریتترین تفاوت معنی‌داری دارد.

تخریب دیواره سلولی جلبک‌های پرسلولی برای افزایش میزان بازدهی استخراج متابولیت‌ها پیشنهاد می‌شود و تیمارهای مختلف جلبک تازه به صورت قطعه‌قطعه شده، خمیری شده در میکسیر و پودر شده با ازت مایع روی زیست‌توده درشت‌جلبک جهت استخراج رنگدانه مورد استفاده قرار گرفته است که به صورت مقایسه در گونه‌های مختلف جلبکی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. در درشت‌جلبک *Palmaria palmate* سه شکل مختلف جلبک به صورت قطعه‌قطعه شده، خمیری شده در میکسیر و پودر شده با ازت برای جلبک تر و خشک مورد استفاده قرار گرفت و میزان خلوص در حالت قطعه‌قطعه شده ۰/۰۱ و در حالت پودری ۰/۱۸ در جلبک تازه و تر گزارش شد (Dumay et al., 2013). در مطالعه حاضر میزان خلوص و غلظت رنگدانه در جلبک تر به ترتیب بین ۰/۲ تا ۰/۳ و ۰/۸ تا ۰/۹ میلی‌گرم در هر گرم جلبک تر

در مرحله اول انجماد-انجماد زدایی به دست آمد. بنابراین صرفه‌جویی در زمان و هزینه جهت استخراج رنگدانه باید مورد توجه قرار گیرد (Nguyen et al., 2018). همچنین خلوص و غلظت فایکواریتترین در جلبک *Osmundea caspica* تحت تأثیر غلظت یونی بافر اختلاف معنی‌داری نشان داد و با افزایش غلظت یونی خلوص و غلظت رنگدانه افزایش داشت. در درشت‌جلبک *Mastocarpus Stellatus* دو غلظت بافر فسفات بافر (۲۰ و ۵۰ میلی مولار) به همراه آب مقطر مورد مقایسه قرار گرفتند و بالاترین میزان غلظت فایکواریتترین در غلظت ۲۰ میلی‌مولار گزارش شد (Nguyen et al., 2018). در بیشتر مطالعات، اختلاف در میزان خلوص و غلظت فایکواریتترین به نوع گونه، مکان، شرایط نوری و شوری در زمان نمونه‌برداری جلبک از محیط دریا نسبت داده شده است (Munier et al., 2013; Sudhakar et al., 2015;). بنابراین با توجه به این که گونه‌های که در مطالعات گذشته مورد بررسی قرار گرفته‌اند در شوری ۴۰ درصد دریا رشد و نمو یافته‌اند، در بافرهایی با غلظت یونی پایین دارای بازدهی بالاتری در زمان استخراج می‌باشند، ولی برای جلبک *Osmundea caspica* که در شرایط دریای خزر و با شوری کمتر از ۱۵ درصد رشد و نمو یافته است و براساس نتایج به دست آمده می‌توان انتظار داشت که افزایش غلظت یونی بافر میزان خلوص و غلظت فایکواریتترین افزایش یابد.

به‌طور کلی، اطلاعات در مورد نسبت بافر به جلبک با استفاده از روش انجماد-انجماد زدایی بسیار کم می‌باشد و بیشتر اطلاعات مربوط به روش استفاده از آنزیم و یا امواج فراصوت می‌باشد. در مطالعه حاضر، با افزایش نسبت بافر به جلبک، میزان خلوص کاهش می‌یابد و در مقابل میزان غلظت رنگدانه (میلی‌گرم بازای هر گرم جلبک) افزایش می‌یابد، به‌طوری‌که بالاترین غلظت فایکواریتترین در تمام غلظت‌های یونی بافر (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) در نسبت ۱ به ۲۰ جلبک به بافر مشاهده شد. در مطالعه انجام شده دیگری روی گونه *Gracilaria gracilis* نسبت‌های مختلف جلبک به بافر (۲ تا ۲۰ درصد) در روش خیساندن جهت

برای جلبک *Portieria hornemannii* حدود ۱/۲۳ میلی‌گرم بر جلبک تر و همچنین در درشت‌جلبک *Gracilaria crassa* پرورش یافته در شوری‌های مختلف بین ۰/۱ و ۰/۴ گزارش شد. روش استخراج، نوع گونه و زمان نمونه‌برداری جلبک (فصل) از جمله عوامل ذکر شده در میزان غلظت فایکواریتترین عنوان شده است (Senthilkumar et al., 2013; Baghel et al.; 2014;) (Pereira et al., 2020). در روش انجماد-انجماد زدایی، کریستال‌های یخی در مرحله انجماد شکل می‌گیرد و کریستال‌ها در زمان انجماد زدایی موجب تخریب دیواره سلولی و آزاد شدن محتویات داخل سلول می‌شود. بنابراین تکرار پروسه انجماد-انجماد زدایی جهت بالا بردن بازدهی استخراج استفاده می‌شود (Li et al., 2019;) (Pereira et al., 2020). نتایج بهتری در انجام دو بار فرآیند انجماد-انجماد زدایی نسبت به انجام یک بار فرآیند انجماد-انجماد زدایی در مطالعه حاضر مشاهده شد که هم‌سمو با نتایج استخراج فایکوبیلی پروتئین از جلبک تر اسپیرولینا، نشان داد که بالاترین میزان استخراج فایکوسیانین با انجام ۴ سیکل انجماد-انجماد زدایی به دست آمد که علت این امر افزایش زمان استخراج و به دنبال آن افزایش مکان‌های واکنش و شکست دیواره سلولی در طول فرآیند استخراج می‌باشد که منجر به افزایش خلوص و غلظت فایکوبیلی پروتئین استخراج شده می‌شود (Vali Aftari et al., 2015;) (Da Costa Ores et al., 2016). که با نتایج به دست آمده در این مطالعه هم‌سمو بود و دو بار تکرار انجماد-انجماد زدایی موجب افزایش غلظت فایکواریتترین نسبت به بکارگیری ۱ بار انجماد-انجماد زدایی شد. همچنین در مطالعه دیگری، میزان غلظت فایکواریتترین در درشت‌جلبک *Mastocarpus Stellatus* با اعمال ۴ سیکل انجماد-انجماد زدایی به‌طور متوالی ولی جداگانه مورد سنجش و مقایسه قرار گرفت که در مرحله اول میزان استخراج رنگدانه ۰/۲۷ میلی‌گرم در گرم جلبک خشک بود ولی در مرحله چهارم استخراج به ۰/۰۲ میلی‌گرم در جلبک خشک رسید که حدود ۷۵ درصد استخراج رنگدانه

فایکوبیلی پروتئین‌ها و دناتوره شده پروتئین می‌تواند در کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پس از استخراج و خالص‌سازی مؤثر باشد (Zhou et al., 2005). ولی ترکیبات آنتی‌اکسیدان دیگر موجود در عصاره خام مانند ترکیبات فنلی و نیز آلفایکوسیانین می‌تواند علت بالابودن میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره خام باشد. به‌علاوه، اثرات ناخواسته مراحل استخراج و خالص‌سازی بر روی پروتئین فایکوبیلی پروتئین‌ها و دناتوره شده پروتئین می‌تواند در کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پس از استخراج و خالص‌سازی سهمیم باشد (Zhou et al., 2005). فایکواریتترین ترکیب فلورسانسی است و در حضور یک بافر آبی خواص فلورسانسی خود را نشان می‌دهد (Eriksen, 2008). برای تأیید پایداری رنگدانه از طول موج (excitation) ۴۹۷ نانومتر انجام شد که مطابق با یافته‌های مطالعات مشابه بود (Wang et al., 2015; Munier et al., 2015). کاهش شدت فلورسانس در اثر کاهش غلظت رنگدانه فایکواریتترین به دلیل اثرات ناکافی بودن مولکول برای انتشار فلورسانس و کم بودن ساختار فضایی مولکول فایکواریتترین در محیط برای ایجاد نیروی برهم‌کنش بر یکدیگر است. نتایج به دست آمده در بررسی حاضر، همسو با نتایج Patil و همکاران (۲۰۰۶) نشان می‌دهد وقتی ساختار طبیعی فایکواریتترین کم باشد، شدت فلورسانس کاهش می‌یابد. در حقیقت می‌توان رابطه مستقیمی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و شدت فلورسانس فایکواریتترین در نظر گرفت.

نتیجه گیری نهایی

نتایج به دست آمده در بررسی حاضر، همسو با نتایج Patil و همکاران (۲۰۰۶) نشان می‌دهد وقتی ساختار طبیعی فایکواریتترین کم باشد، شدت فلورسانس کاهش می‌یابد. در حقیقت می‌توان رابطه مستقیمی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و شدت فلورسانس فایکواریتترین در نظر گرفت.

تقدیر و تشکر

طرح تحقیقاتی حاضر تحت حمایت مالی صندوق

استخراج فایکواریتترین مورد بررسی قرار گرفت. بالاترین میزان فایکواریتترین در تیمار ۱ به ۵۰ زیست‌توده جلبک به بافر بدست آمد (Pereira et al., 2020). بالاترین میزان استخراج فایکواریتترین با استفاده از روش انجماد-انجمادزدایی با نسبت بافر به جلبک ۱ به ۲۵ وزنی-حجمی در جلبک خشک‌شده *Gracilaria lemaneiformis* گزارش شد (Liu et al., 2013)، در حالی که استخراج به روش خیساندن به نسبت ۱ به ۵۰ در مقایسه با روش انجماد-انجمادزدایی در جلبک *Gracilaria gracilis* کارآمدتر بود (Pereira et al., 2020). بنابراین تفاوت در نسبت بافر به جلبک در مطالعات مختلف جهت استخراج فایکواریتترین می‌تواند به دلیل نوع دیواره سلولی جلبک، روش استخراج (انجماد-انجمادزدایی، خیساندن و استفاده از امواج فراصوت) و حالت جلبک (خشک یا تر) باشد. افزایش غلظت فایکواریتترین در تیمار ۱ به ۲۰ جلبک به بافر می‌تواند باعث نفوذ بیشتر بافر در بافت جلبک شود که در فرآیند انجماد و انجمادزدایی حرکت مولکول‌های فایکواریتترین از طریق پدیده انتشار از بافت جلبک به داخل بافر تسهیل می‌شود و علاوه بر آن سایر مولکول‌های دیگر به درون بافر آزاد می‌شود و همین امر موجب کاهش خلوص محلول استحصالی می‌شود که همسو با نتایج انجام شده برای فایکواریتترین در جلبک *Gracilaria gracilis* می‌باشد (Pereira et al., 2020; Reboleira et al., 2020).

۳.۴. فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فلورسانس

فایکواریتترین استحصالی

در مطالعه حاضر مشخص شد که فعالیت آنتی‌اکسیدان و فلورسانس در فایکواریتترین استخراج شده را میزان رنگدانه فایکواریتترین رابطه مستقیم دارد. عموماً کمیت و کیفیت این مولکول، تعیین‌کننده خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن نیز می‌باشد (Estrada et al., 2001) ولی ترکیبات آنتی‌اکسیدان دیگر موجود در عصاره خام مانند ترکیبات فنلی و نیز آلفایکوسیانین می‌تواند علت بالابودن میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره خام باشد. به‌علاوه، اثرات ناخواسته مراحل استخراج و خالص‌سازی بر روی پروتئین

شیلاتی و فنون دریایی دکتر کیوان و پرسنل مربوطه جهت انجام این پروژه، تقدیر و تشکر می‌شود.

حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به شماره طرح ۹۹۰۲۰۸۹ انجام شد. همچنین از همکاری صمیمانه آقای صادق پور مدیر یت محترم مرکز تحقیقات علوم

۵. منابع

References

- Baghel R.S., Reddy C., Jha B., 2014. Characterization of agarophytic seaweeds from the biorefinery context. *Bioresource Technology* 159(5), 280-285.
- Burits M., Bucar F., 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research* 14(5), 323-328.
- Chen C.L., Chang J.S., Lee D.J., 2015. Dewatering and drying methods for microalgae. *Drying Technology* 33(4), 443-454.
- Dewi N., Santoso J., Setyaningsih I., Hardingtyas S., 2020. Extraction of phycoerythrin from *Kappaphycus alvarezii* seaweed using ultrasonication. In: the IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. Bristol.UK. pp: 1-8.
- Da Costa Ores J., De Amarante M.C.A., Kalil S. J., 2016. Co-production of carbonic anhydrase and phycobiliproteins by *Spirulina* sp. and *Synechococcus nidulans*. *Bioresource Technology* 219(1), 219-227.
- Denis C., Ledorze C., Jaouen P., Fleurence J., 2009. Comparison of different procedures for the extraction and partial purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Grateloupia turuturu*. *Botanica Marina* 52(3), 278-281.
- Dumay J., Clément N., Morançaïs M., Fleurence J., 2013. Optimization of hydrolysis conditions of *Palmaria palmata* to enhance R-phycoerythrin extraction. *Bioresource Technology* 131(1), 21-27.
- Dumay J., Morançaïs M., 2016. Proteins and pigments Seaweed in health and disease prevention Elsevier. pp: 275-318.
- Eriksen N.T., 2008. Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80(1), 1-14.
- Estrada J.P., Bescós, P.B., Del Fresno A.V., 2001. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Farmaco II* 56(5-7), 497-500.
- Fekrat F., Nami B., Ghanavati H., Ghafari A., Shahbazi M., 2019. Optimization of chitosan/activated charcoal-based purification of *Arthrospira platensis* phycocyanin using response surface methodology. *Journal of Applied Phycology* 31(2), 1095-1105.
- Karpinsky M.G., Shiganova T.A., Katunin D.N., 2005. Introduced species. In: Kostianoy, A.G., Kosarev, A.N. (eds) *The Caspian Sea Environment*. Springer, Berlin, pp: 175-190.
- Li W., Su H.N., Pu Y., Chen J., Liu L.N., Liu Q., Qin S., 2019. Phycobiliproteins: Molecular structure, production, applications, and prospects. *Biotechnology Advances* 37(2), 340-353.
- Liu L.N., 2016. Distribution and dynamics of electron transport complexes in cyanobacterial thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1857(3), 256-265.
- Liu M.Q., Yang X.Q., Qi B., Li L.H., Deng J. C., Hu, X., 2013. Study of Ultrasonic-freeze-thaw-cycle assisted extraction of polysaccharide and phycobiliprotein from *Gracilaria lemaneiformis*. *Advanced Materials Research* 781, 1818-1824.
- Mehdipour N., Sheijooni Fumani N., Rahnama R., 2014. Proximate and fatty acid composition of the southern Caspian Sea macroalgae, *Journal of Persian Gulf* 5(18), 63-72
- Mittal R., Raghavarao K., 2018. Extraction of R-Phycoerythrin from marine macro-algae, *Gelidium pusillum*, employing consortia of enzymes. *Algal Research* 34, 1-11.

- Mittal R., Sharma R., Raghavarao K., 2019. Aqueous two-phase extraction of R-Phycoerythrin from marine macro-algae, *Gelidium pusillum*. *Bioresource technology* 280, 277-286.
- Moshfegh A., Salehzadeh A., Sadat Shandiz S.A., Shafaghi M., Naeemi A.S., Salehi, S., 2019. Phytochemical analysis, antioxidant, anticancer and antibacterial properties of the Caspian Sea red macroalgae, *Laurencia caspica*. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science* 43(1), 49-56.
- Munier M., Morançais M., Dumay J., Jaouen P., Fleurence J., 2015. One-step purification of R-phycoerythrin from the red edible seaweed *Grateloupia turuturu*. *Journal of Chromatography B* 992 (15), 23-29.
- Munier M., Dumay J., Morançais M., Jaouen P., Fleurence J., 2013. Variation in the biochemical composition of the edible seaweed *Grateloupia turuturu* Yamada harvested from two sampling sites on the Brittany coast (France): The influence of storage method on the extraction of the seaweed pigment R-phycoerythrin. *Journal of Chemistry* 2013, 1-8.
- Niu J.F., Wang G.C., Tseng C.K., 2006. Method for large-scale isolation and purification of R-phycoerythrin from red alga *Polysiphonia urceolata* Grev. *Protein Expression and Purification* 49(1), 23-31.
- Nguyen H.P.T., Morançais M., Fleurence J., Tran T.N. L., Dumay, J., 2018. Extracting and purifying pigment R-phycoerythrin from the red alga *Mastocarpus stellatus*. Fourth international conference on green technology and sustainable development (GTSD). Ho Chi Minh City, Vietnam.
- Patil G., Raghavarao K., 2007. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycoerythrin. *Biochemical Engineering Journal* 34(2), 156-164.
- Pereira T., Barroso S., Mendes S., Amaral R. A., Dias J.R., Baptista T., Gil M.M., 2020. Optimization of phycobiliprotein pigments extraction from red algae *Gracilaria gracilis* for substitution of synthetic food colorants. *Food chemistry* 321, 126688.
- Reboleira J., Ganhão R., Mendes S., Adão P., Andrade, M., Vilarinho F., Bernardino S., 2020. Optimization of extraction conditions for *Gracilaria gracilis* extracts and their antioxidative stability as part of microfiber food coating additives. *Molecules*, 25(18), 4060.
- Richa K.V., Kesheri M., Singh G., Sinha R., 2011. Biotechnological potentials of phycobiliproteins. *International Journal of Pharma Bio Sciences* 2, 446-454.
- Rousseau F., Gey D., Kurihara A., Maggs C.A., Martin-Lescanne J., Payri C., 2017. Molecular phylogenies support taxonomic revision of three species of *Laurencia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta), with the description of a new genus. *European Journal of Taxonomy* 269(2):1-19.
- Saluri M., Kaldmäe M., Tuvikene R.J.A., 2019. Extraction and quantification of phycobiliproteins from the red alga *Furcellaria lumbricalis*. *Algal Research* 37, 115-123.
- Samsonoff W.A., MacColl R., 2001. Biliproteins and phycobilisomes from cyanobacteria and red algae at the extremes of habitat. *Archives of Microbiology* 176(6), 400-405.
- Sekar S., Chandramohan M., 2008. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology* 20(2), 113-136.
- Senthilkumar, N., Suresh, V., Thangam, R., Kurinjimalar, C., Kavitha, G., Murugan, P., Rengasamy, R., (2013). Isolation and characterization of macromolecular protein R-Phycoerythrin from *Portieria hornemannii*. *International Journal of Biological Macromolecules* 55(1), 150-160.
- Silveira S.T., Burkert J.D. M., Costa J.A.V., Burkert C.A.V., Kalil, S.J., 2007. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource Technology* 98(8), 1629-1634.
- Sonani R.R., Patel S., Bhastana B., Jakharia K., Chaubey M.G., Singh N.K., Madamwar D., 2017. Purification and antioxidant activity of phycocyanin from *Synechococcus* sp. R42DM isolated from industrially polluted site. *Bioresource Technology* 245, 325-331.
- 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(1), 115-120.

- Tan H. T., Khong N.M., Khaw Y.S., Ahmad S.A., Yusoff F.M., 2020. Optimization of the freezing-thawing method for extracting phycobiliproteins from *Arthrospira* sp. *Molecules* 25(17), 3894.
- Timasheff S.N., Arakawa T., 1988. Mechanism of protein precipitation and stabilization by co-solvents. *Journal of Crystal Growth* 90(1-3), 39-46.
- Vali Aftari R., Rezaei K., Mortazavi A., Bandani A.R., 2015. The optimized concentration and purity of *Spirulina platensis* C-phycoerythrin: a comparative study on microwave-assisted and ultrasound-assisted extraction methods. *Journal of Food Processing and Preservation* 39(6), 3080-3091.
- Wang L., Wang S., Fu X., Sun L., 2015. Characteristics of an R-Phycocerythrin with two γ subunits prepared from red macroalga *Polysiphonia urceolata*. *PLoS One*, 10(3), e0120333.
- Wu H. L., Wang G.H., Xiang W.Z., Li T., He H., 2016. Stability and antioxidant activity of food-grade phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*. *International Journal of Food Properties*, 19(10), 2349-2362.
- Zhou Z.P., Liu L.N., Chen X.L., Wang J.X., Chen M., Zhang, Y.Z., Zhou, B.C., 2005. Factors that affect antioxidant activity of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis*. *Journal of Food Biochemistry*, 29(3), 313-322.

