بسم الله الرحمن الرحيم

نوع نشریه: دستورالعمل فنی
نام نشریه: استخراج و خالص‌سازی رنگدانه فیکوسیانین از ریزجلبک اسپیرولینا
نویسندگان: دکتر مریم شهبازی، فرزانه فکرت، بهنام نامی، اکرم غفاری
ویراستاران ادبی: دکتر حسن رهنما و عصمت جعفری‌نژاد
طراحی: محمد جداری
تهیه شده در: پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی
شمارگان: ۳۰
نوبت انتشار: اول
سال انتشار: ۱۳۹۸
مسئولیت صحت مطالب با نویسندگان است.

شماره ثبت در مرکز فناوری اطلاعات و اطلاع‌رسانی کشاورزی ۵۶۱۶۲ به تاریخ ۱۳۹۸/۰۶/۲۴ است

استخراج و خالص‌سازی رنگدانه فیکوسیانین از ریزجلبک اسپیرولینا

دکتر مریم شهبازی

فرزانه فکرت، بهنام نامی، اکرم غفاری

فهرست مطالب

کلیات ۱

اهمیت استفاده از ترکیبات باارزش به ویژه رنگ‌های طبیعی از جلبک‌ها در دنیا و کشور..... ۱

اهمیت و ضرورت کشت ریزجلبک اسپیرولینا برای فرآوری رنگ طبیعی فیکوسیانین..... ۲

ضرورت و اهمیت استخراج و خالص‌سازی رنگدانه فیکوسیانین..... ۳

مضرات رنگ‌های مصنوعی و اهمیت رنگ طبیعی خوراکی ۳

رنگ آبی در صنایع غذایی ٤

دستورالعمل استخراج و خالص‌سازی رنگدانه فیکوسیانین موجود در ریزجلبک اسپیرولینا.... ٦

خصوصیات محیط کشت اسپیرولینا ٦

استخراج رنگدانه فیکوسیانین..... ۷

تخریب سلولی و جداسازی ۸

جداسازی و خالص‌سازی اول ۹

خالص‌سازی دوم و تغلیظ..... ۱۰

خصوصیات فیکوسیانین استحصالی ۱۱

میزان پایداری فیکوسیانین..... ۱۳

خلاصه و نتیجه‌گیری ۱٤

فهرست منابع ۱٦

۱- کلیات

۱-۱- اهمیت استفاده از ترکیبات باارزش به‌ویژه رنگ‌های طبیعی از جلبک‌ها در دنیا و کشور

در حال حاضر با توجه به چالش‌های جهانی چون تغییرات آب و هوایی و گرم شدن کره زمین و کاهش منابع آب شیرین و خشک و شور شدن اراضی قابل کشت و با توجه به افزایش رو به رشد جمعیت کره زمین و افزایش تقاضای جهانی برای مواد غذایی و نظر به محدودیت‌های محیط طبیعی، کشاورزی سنتی به تنهایی نمی‌تواند این نیازها را تامین نماید. به همین دلیل طراحی سیستم‌های کشت میکروارگانیسم‌های فتوسنتز کننده در جهان از سال ۱۹۵۰ آغاز شده و در سی سال اخیر کشت تجاری ریزجلبک‌ها به ویژه اسپیرولینا برای غذای سالم، در کشورهای مختلف جهان انجام می‌شود و تولید محصولات باارزش فراوان و متنوع از ریزجلبک‌ها به سرعت در حال افزایش می‌باشد (Enzing *et al*., 2014). در سال‌های اخیر آبزی‌پروری، توسعه کشت جلبک‌ها و تولید ترکیبات باارزش از جلبک‌ها مورد توجه ویژه قرار گرفته است. تولید بالا و پایین بودن ضایعات در فرآیند تولید از مزایای آبزی‌پروری و کشت ریزجلبک‌ها می‌باشد. این خصوصیات بهره‌وری و بازدهی سیستم‌های کشت و تولید ریزجلبک در مقایسه با سایر فرآیندهای تولید در بخش کشاورزی به مراتب بالاتر می‌برد. از مزایای دیگر این سیستم‌ها امکان رشد جلبک در مناطق نامناسب یا با استفاده از آب‌های غیرمتعارف (شور) برای بخش کشاورزی است. مع‌الوصف انتخاب شرایط بهینه برای تولید محصول با کمترین هزینه و در کمترین زمان مهم‌ترین چالش در کشت صنعتی ریزجلبک‌ها می‌باشد.

اسپیرولینا یک جلبک نواری از گروه سیانوباکترها یا جلبک‌های سبزآبی است که در آب شور رشد می‌کند و گونه‌ای از آن در شوری تا ۵/۱۷ گرم در لیتر قادر به رشد می‌باشد (Sharma *et al*., 2014). جلبک‌های سبزآبی از حدود ۳۰۰ میلیون سال قبل برروی زمین می‌زیسته‌اند و از ده‌ها هزار سال قبل توسط مردم بومی اطراف دریاچه‌های شور مکزیک و آفریقا به عنوان یک ماده غذایی و منبع پروتئین مورد استفاده قرار می‌گرفته‌اند. در پی افزایش بی‌رویه جمعیت جهان و کمبود مواد غذایی سازمان ملل در بیانیه‌ای در سال ۱۹۸۰ جلبک اسپیرولینا را به عنوان غذای آینده معرفی نمود. در حال حاضر نیز از این جلبک به عنوان ماده غذایی فضانوردان استفاده می‌شود. اگرچه تولید این جلبک در ۲۰۱۳ ده هزار تن می‌باشد ولی نیاز جهانی با

توجه به مقدار توصیه شده سه گرم در روز تنها ۲۰۰ میلیون تن برای کودکان جهان مورد نیاز می‌باشد. در حال حاضر شرکت‌های بزرگی در کانادا، ژاپن و آلمان به تولید این جلبک به منظور استفاده به عنوان مکمل غذایی و نیز رنگ مبادرت می‌ورزند (Enzing *et al*., 2014).

اسپیرولینا منبع غنی از پروتئین سریع‌الهضم تا ٦٠ درصد ماده خشک حاوی ۱۸ اسیدآمینه ضروری و غیرضروری (در مقایسه با ۵ درصد پروتئین در کنجاله سویا، ۳ درصد در شیر، ۲۳ درصد در پنیر و ۱۸ درصد در گوشت) است به عنوان یک منبع پروتئینی با چربی کم، کالری کم و بدون کلسترول محسوب می‌شود. رنگ تیره این جلبک به خاطر وجود مقادیر بالا انواع ترکیبات آنتی‌اکسیدان و رنگدانه‌های نظیر فیکوسیانین (١٤-٧ درصد ماده خشک)، بتاکاروتن، لوتئین و زئاگزانتین می‌باشد (Kamble *et al*., 2013).

در بیش از ٤٠ کشور دنیا، بیومس اسپیرولینا به صورت قرص، کپسول یا پودر در اختیار مردم قرار می‌گیرد و مصرف مستقیم پودر این جلبک به صورت قرص و داروی انرژی‌زا به عنوان مکمل غذایی کودکان، سالمندان، ورزشکاران و خانم‌های باردار توصیه می‌شود. از اواخر ۱۹۷۰ به بعد بعنوان مکمل غذایی در ژاپن و پس از آن در آمریکا مورد مصرف قرار گرفت و تا به امروز هیچ‌گونه آثار سمی و عوارض برای انسان مشاهده نشده است. اسپیرولینا به واسطه مقادیر بالای آنتی‌اکسیدان، تقویت سیستم ایمنی و پیشگیری از انواع سرطان، بهبود بیماری‌های آلزایمر و پارکینسون و خاصیت ضدالتهابی در تهیه داروها بکار می‌رود. همچنین مصرف مستقیم اسپیرولینا (غنی شده از کاروتنوئیدها) به عنوان غذای ماهی و میگو بسیار متداول است. عصاره اسپیرولینا و رنگ فیکوسیانین به عنوان رنگ طبیعی در صنایع غذایی (بستنی، پاستا، بیسکویت، اسنک، آبمیوه و ...) و صنایع آرایشی بکار می‌رود.

۱-۲- اهمیت و ضرورت کشت ریزجلبک اسپیرولینا برای فرآوری رنگ طبیعی فیکوسیانین

با افزایش تقاضای جهانی برای مواد غذایی و نظر به محدودیت‌های بخش کشاورزی، توسعه کشت جلبک‌ها و تولید ترکیبات با ارزش از آن‌ها در سال‌های اخیر مورد توجه ویژه قرار گرفته است. رنگدانه فیکوسیانین (آبی درخشان) با خواص فلورسنت و آنتی‌اکسیدانی از جلبک‌های سبزآبی به ویژه اسپیرولینا (Spirulina) بدست می‌آید و در سطح وسیعی در کشورهای مختلف به عنوان رنگ آبی طبیعی مورد استفاده

قرار می‌گیرد. براساس درصد خلوص این رنگدانه، فرآورده‌ها یا بیومس این جلبک کاربردهای متعددی به عنوان مکمل غذایی و دارویی پیدا می‌کند. بهبود تولید، استخراج و خالص‌سازی فیکوسیانین می‌تواند دامنه کاربرد آن را افزایش دهد. تولید موفق بیومس جلبک با فیکوسیانین بالا به عوامل متعددی از جمله شرایط رشد جلبک، قابلیت تجمع رنگدانه، تکنولوژی تولید و کارآیی فرآیند پایین دستی بستگی دارد.

در این تحقیق، روش مرسوم استخراج و رسوب فیکوسیانین با استفاده از آمونیوم سولفات (ایزدی و فضیلتی، ۱۳۹۶) با یک روش ابداعی برای استحصال رنگی با خلوص بیشتر و در مدت زمان کوتاه‌تر و با استفاده از مواد غیرسمی کیتوزان و زغال فعال مورد مقایسه قرار گرفت. پس از مراحل جداسازی، خالص‌سازی و تغلیظ، رنگدانه فیکوسیانین با قابلیت مصرف غذایی تولید و از نظر خلوص و خواص آنتی‌اکسیدانی با نمونه وارداتی مقایسه می‌شود.

۲- ضرورت و اهمیت استخراج و خالص‌سازی رنگدانه فیکوسیانین

۲-۱- مضرات رنگ‌های مصنوعی و اهمیت رنگ طبیعی خوراکی

امروزه در صنعت غذا از رنگ‌های خوراکی مصنوعی به میزان زیادی در تهیه انواع آبمیوه، بستنی، بیسکویت و انواع شیرینی‌جات استفاده می‌شود. این دسته از افزودنی‌ها که بیشتر به منظور جذب مشتری، پوشش دادن رنگ نامطلوب محصول و شدت بخشیدن به رنگ یا هویت ماده غذایی استفاده می‌شود، اغلب منشأ شیمیایی داشته و می‌تواند در طولانی‌مدت مسمومیت‌هایی را در مصرف‌کننده ایجاد کند. البته در گروه رنگ‌های خوراکی رنگ‌های طبیعی که منشأ گیاهی داشته یا رنگ‌های مشابه طبیعی که فرمولی مشابه با رنگ‌های طبیعی دارد، نیز وجود دارند ولی به دلیل آن‌که رنگ‌های شیمیایی جذابیت بیشتر داشته و ارزان‌تر و راحت‌تر تهیه می‌شوند، بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند. اگرچه استفاده در حد مجاز از رنگ‌های خوراکی شیمیایی مورد تایید در کوتاه‌مدت اثر نامطلوبی بر سلامت افراد ندارد؛ ولی استفاده بیش از حد این افزودنی‌ها در یک زمان یا مصرف مداوم در طولانی مدت می‌تواند برای مصرف‌کننده مخاطره‌آمیز باشد.

این رنگ‌ها اغلب روی دو سیستم سم‌زدایی بدن مثل کلیه و کبد بیشتر از سایر اندام‌ها تأثیر سوء داشته و

شدت تأثیر آن در کودکان، خانم‌های باردار و سالمندان بیش از گروه‌های دیگر است. این رنگ‌ها به طور نسبی سمی بوده و برخی از آن‌ها حالت تجمعی در بافت‌های بدن دارند و کمتر دفع می‌شوند. بنابراین با گذشت زمان بر مقدار آن‌ها افزوده شده و مسمومیت‌زا می‌شوند (Kobylewski and Jacobson, 2012). نگرانی‌های مصرف‌کنندگان در ارتباط با ایمنی رنگ‌های شیمیایی، موجب محدودیت استفاده آن‌ها در صنایع غذایی و نوشیدنی شده و موجب افزایش تقاضا برای استفاده از رنگ‌های طبیعی در این صنایع شده است.

۲-۲- رنگ آبی در صنایع غذایی

از میان رنگ‌های طبیعی، رنگ آبی با توجه به محدود بودن منابع گیاهی آن به دو تیره روناسیان (Gardenia) و وسمه (Indigo) کاربرد کمتری در صنایع غذایی داشته و بیشتر از رنگ‌های شیمیایی چون Brilliant Blue استفاده می‌شود. براساس استاندارد سازمان بهداشت جهانی (FAO/WHO) و همچنین کمیته افزودنی‌های غذا (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA) میزان مصرف قابل قبول روزانه رنگ شیمیایی بریلیانت بلو که بر اساس آزمایشات حیوانی و انسانی بدست آمده است ۱۲/۵ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن می‌باشد (Tanaka *et al*., 2012).

در سال‌های اخیر استفاده از سایر منابع طبیعی چون ریزجلبک‌ها، موجب افزایش تقاضا برای رنگ آبی فیکوسیانین بدست آمده از ریزجلبک اسپیرولینا شده است. در حال حاضر آگاهی از اثرات مضر رنگ‌های صنعتی و اقبال عمومی در استفاده از فرآورده‌های طبیعی موجب شده ریزجلبک‌ها به عنوان منبع مهمی برای رنگ‌ها و رنگدانه‌های طبیعی مورد توجه قرار گیرد. از سال ۲۰۱۳ براساس تصمیم FDA به عنوان رنگ آبی طبیعی در حجم وسیعی در صنایع غذایی آمریکا مورد توجه قرار گرفته است. این رنگدانه در حال حاضر در کشور تولید نمی‌شود؛ در حالی‌که یک کیلوگرم آن با مجوز مصرف غذایی (به عنوان مکمل غذایی یا تهیه قرص‌های تقویتی) با قیمت ۱۵۰۰ دلار آمریکا و قیمت یک گرم بسیار خالص آن باارزش آنالیزی، با قیمت ۲۵۰۰ دلار آمریکا به فروش می‌رسد و البته این قیمت‌ها بدون محاسبه هزینه نقل و انتقال به کشور می‌باشد (Mogany, 2014). هر کیلوگرم فیکوسیانین وارداتی از شرکت هانسن (Hansen, Denmark) در داخل ایران به بیش از ۵۰،۰۰۰،۰۰۰ ریال به فروش می‌رسد.

حجم بازار جهانی رنگ‌های طبیعی از جمله فیکوسیانین حدود ۲۵۰ میلیون دلار است که پیش‌بینی می‌شود طی ۵ سال آینده به ۱۰ برابر افزایش یابد (DIC report, 2013).

رنگدانه فیکوسیانین از جلبک‌های سبزآبی به ویژه اسپیرولینا بدست آمده و میزان این ماده در حدود ۷ تا ۱٤درصد وزن خشک این ریزجلبک می‌باشد و در سطح وسیعی در کشورهای مختلف به عنوان رنگ آبی طبیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد. حدود ۵۰ درصد از کل پروتئین تولید شده توسط این سویه مربوط به خانواده پروتئینی فیکوبیلی‌پروتئین می‌باشد. فیکوبیلی‌پروتئین‌ها از دسته پروتئین‌های فلوروسنت رنگی محلول در آب با ساختار پیچیده بوده که از سیانوباکتری‌ها و جلبک‌های یوکاریوت بدست می‌آیند. پروتئین‌های رنگی فیکوبیلی‌زوم در سه گروه کلی فیکواریترین، فیکوسیانین و آلوفیکوسانین قرار می‌گیرند که هرکدام رنگ متفاوتی دارند. فیکوبیلی‌زوم‌ها مجموعه‌ای از آنتن‌های جذب نور در غشاهای پلاستی بوده که همگی متشکل از چند زنجیره پروتئینی به نام آپوپروتئین که به صورت کووالان از محل سیستئین به فیکوبیلین متصل شده‌اند. فیکوبیلین یک زنجیره باز کروموفور تتراپیرول می‌باشد. حدود ۲۰ درصد از خانواده فیکوبیلی پروتئین‌ها نیز مربوط به پروتئین ارزشمند فیکوسیانین می‌باشد. فیکوسیانین (C-PC) یک رنگدانه آبی و آنتن جمع‌کننده نور در سیانوباکتری‌ها و یکی از پیگمان‌های اصلی سیانوباکتری‌ها می‌باشد. C-PC از دو جز پروتئین و کروموفور تشکیل شده که بخش پروتئینی آن شامل دو زیر واحد α و β بوده که دارای وزن مولکولی بین ۱۸ تا ۲۰ کیلودالتون می‌باشند.

این رنگدانه محلول در آب به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدان، ضد حساسیت و محافظت‌کننده کبد و خصوصیت جذب امواج فیکوسیانین به طور گسترده در غذا، لوازم آرایشی و بهداشتی و دارویی استفاده می‌شود. همچنین از فیکوسیانین به عنوان معرف فلوروسنت برای کاربردهای تشخیصی به دلیل غیرسمی بودن و خاصیت فلوروسنت استفاده می‌شود. برای استفاده از رنگ‌های طبیعی در صنایع غذایی نیاز به دانش بیشتری در مورد پایداری شرایط رنگ و جلوگیری از تخریب آن در طول فرآیند تولید صنعتی، بسته‌بندی و نگه‌داری محصول رنگی می‌باشد. نتایج این مطالعات نشان می‌دهد شدت نور ۳×۱۰^{۵} لوکس به مدت ۲٤ ساعت در محلول آبی با ۵ و pH = ۷ و موجب تجزیه شدن ۸۰ درصد فیکوسیانین می‌شود (Jespersen *et al*., 2005).

براساس درصد خلوص این رنگدانه، فرآورده‌ها یا بیومس این جلبک کاربردهای متعددی به عنوان مکمل غذایی و دارویی پیدا می‌کند. بهبود تولید، استخراج و خالص‌سازی فیکوسیانین می‌تواند دامنه کاربرد آن را افزایش دهد. خلوص عصاره‌های فیکوسیانین (رابطه۱) براساس نسبت جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر (ماکزیمم جذب فیکوسیانین) به جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر مربوط به کل پروتئین‌ها (جدول۱)، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible بدست می‌آید (Kamble *et al*., 2012). همچنین جهت محاسبه غلظت و راندمان تولید فیکوسیانین به ترتیب از روابط ۲ و ۳ استفاده می‌شود.

(رابطه۱)

$$R = A_{620}/A_{280}$$

(رابطه۲)

$$\text{Concentration (mg/ml)} = \frac{A620 - (0.47 \times A650)}{5.34}$$

(رابطه۳)

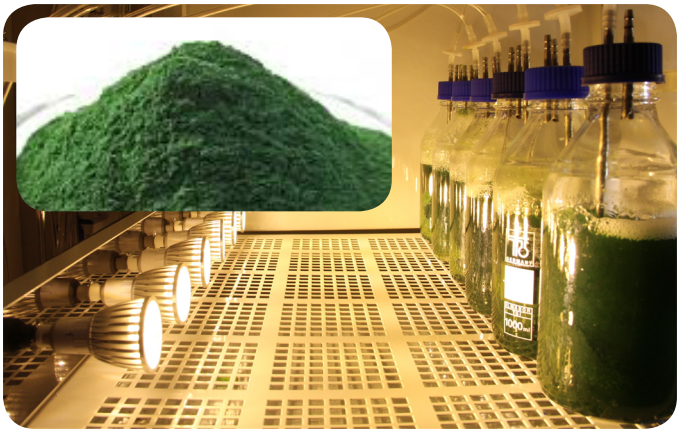
$$\text{Yield} = \frac{\text{phycocyanin concentration (mg/ml)} \times \text{collected volume (ml)}}{\text{initial phycocyanin concentration (mg/ml)} \times \text{initial volume (ml)}}$$

۳- دستورالعمل استخراج و خالص‌سازی رنگدانه فیکوسیانین موجود در ریزجلبک اسپیرولینا

۳-۱- خصوصیات محیط کشت اسپیرولینا

مهم‌ترین اصل در توسعه فرآیند تولید تجاری ریزجلبک‌ها در مقیاس وسیع، افزایش تولید بیومس و ماده خام است. رشد ریزجلبک‌ها تحت تأثیر فاکتورهای فیزیکی (نور، دما و pH) و شیمیایی (عناصر ماکرو و میکرو به عنوان مواد مغذی) مختلفی قرار دارد. در این دانش فنی از محیط غذایی متداول برای اسپیرولینا استفاده شد و بدیهی است بهینه‌سازی

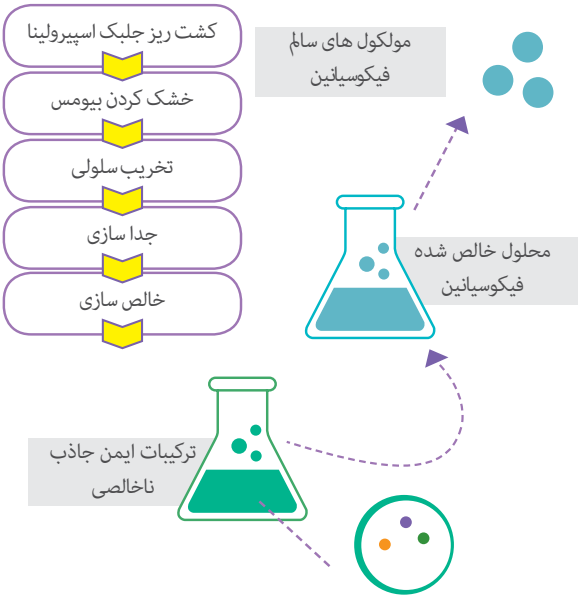
محیط و شرایط محیط کشت بر روی نرخ رشد سویه‌های مورد استفاده و تولید فیکوسیانین تاثیر دارد. بهترین محیط کشت برای رشد جلبک اسپیرولینا محیط کشت زاروک، دمای ۲۸ درجه‌سانتی گراد، نور ۲۰۰–۴۰۰ $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ و pH =۹ با هوادهی کافی پیشنهاد شده است (شکل ۱) که با اصلاحات لازم برای هر سویه مناسب می‌باشد (داده‌های منتشرنشده).



شکل ۱– کشت آزمایشگاهی ریزجلبک اسپیرولینا و پودر اسپیرولینا با ارزش‌های غذایی مختلف

۳-۲-استخراج رنگدانه فیکوسیانین

به منظور استخراج فیکوسیانین از جلبک اسپیرولینا می‌بایست ابتدا دیواره سلولی میکروارگانیسم شکسته شود. استخراج رنگ از جلبک‌های سبزآبی به دلیل دیواره سلولی مقاوم و اندازه کوچک سلول تا حدودی دشوار است. جهت شکستن دیواره سلولی و آزادسازی فیکوسیانین از سلول، روش‌های گوناگونی وجود دارد. در مقیاس تجاری و بزرگ نیاز به روش‌های ساده، کارامد، موثر و مقرون به صرفه در جداسازی فیکوسیانین می‌باشد. مراحل فرآیند استخراج فیکوسیانین (شکل ۲) در ذیل توضیح داده شده است.



شکل ۲– مراحل استخراج و خالص‌سازی فیکوسیانین

الف– تخریب سلولی و جداسازی

برای شکستن دیواره سلولی روش‌های متنوعی نظیر استفاده از فرآیندهای فیزیکی مانند شوک اسمزی، انجماد در ۲۰– درجه سانتی‌گراد و بازگشت به دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در چند مرحله، سونیکاسیون یا استفاده از دستگاه پرس و یا روش‌های شیمیایی مانند استفاده از آنزیم‌ها، شوینده‌ها (Detergents)، اسیدها و بافرها وجود دارند. طبق مشاهدات در بین روش‌های مزبور، استفاده از بافر در استخراج به دلیل حفظ ماهیت پروتئینی فیکوسیانین و تخریب کمتر آن تحت این شرایط، نتایج بهتری بدست داد. در روش استخراج با بافر، ابتدا به منظور تعیین نوع بافر آزمایشی طراحی شد که در آن بافر پتاسیم فسفات در مقایسه با بافرهای سدیم سیترات و سدیم فسفات نتایج بهتری از نظر خلوص و میزان فیکوسیانین نشان داد. لذا این بافر به عنوان بهترین محلول استخراج‌کننده انتخاب گردید. غلظت‌های متفاوت بافر (آب، بافر ۵۰ میلی‌مولار و بافر ۱۰۰ میلی‌مولار پتاسیم فسفات) با نسبت مشخصی از بیومس اختلاط گردید (۱:۲۵، ۱:۵۰، ۱:۷۵ و ۱:۱۰۰) و فرآیند استخراج طبق نتایج بدست آمده از آزمایشات به عمل آمده در مدت زمان‌های مختلف، به مدت ٤ ساعت در همزن (N-BIOTEK، کره جنوبی) با دور

۲۲۰ rpm انجام گردید. سپس نمونه‌ها در دور g ۱۸۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و پس از این مرحله، قسمت رویی (فیکوسیانین ناخالص) جدا شد. در جدول ۱ عوامل موثر بر استخراج فیکوسیانین مشاهده می‌شود.

جدول ۱- پارامترهای موثر بر استخراج فیکوسیانین

نوع استخراج	نوع بافر	غلظت بافر	نسبت بافر به بیومس	مدت زمان	دور همزن
بافری	پتاسیم‌فسفات	۱۰۰-۲۵ میلی مولار	۱:۱۰۰ - ۱:۲۵	۲-۶ ساعت	۲۲۵ rpm

ب- جداسازی و خالص‌سازی اول

مرحله خالص‌سازی یکی از مهم‌ترین مراحل تولید فیکوسیانین به شمار می‌رود. ۵۰ تا ۹۰ درصد هزینه‌های مربوط به تولید این رنگ مربوط به مراحل خالص‌سازی آن می‌باشد. بهبود تولید، استخراج و خالص‌سازی فیکوسیانین می‌تواند دامنه کاربرد آن را افزایش دهد. براساس درصد خلوص، این رنگدانه کاربردهای متعددی به عنوان رنگ خوراکی، مکمل غذایی و دارویی پیدا می‌کند. خالص‌سازی این ماده پس از تولید عصاره خام، به منظور استفاده در صنایع غذایی ضروری به نظر می‌رسد. برای خالص‌سازی فیکوسیانین از موادی چون آمونیوم سولفات، کیتوزان، زغال فعال و پلی‌اتیلن‌گلایکول استفاده می‌شود. پلی‌اتیلن‌گلایکول و آمونیوم سولفات هر دو جزو مواد سمی بوده (Brooks *et al*., 2002)، زمان فرآیند در این روش بسیار زیاد بوده و با توجه به اینکه این مواد با فیکوسیانین ترکیب می‌شوند، جداسازی آن‌ها از هم بسیار دشوار می‌باشد. همچنین نتایج آزمایشات انجام شده نشان داد که استفاده از آمونیوم سولفات به مدت طولانی یک یا دو روز نیاز دارد که این فرآیند موجب دناتوره شدن پروتئین فیکوسیانین و کاهش میزان فعالیت آن می‌گردد. کیتوزان پلیمر ترکیبی گلوکز آمین و N- استیل گلوکز آمین است که به وسیله پیوندهای ۱و ٤ گلیکوزیدی به هم متصل شده‌اند. کیتوزان بدلیل غیرسمی بودن، خاصیت جذب بالا، خواص ضدباکتریایی و ضدتوموری، امکان تجزیه در طبیعت، سازگاری با محیط زیست طبیعی، قیمت نسبتاً پایین، توانایی حذف محدوده وسیعی از رنگ‌ها و فلزات، سینتیک سریع و در نهایت امکان تهیه مشتقات فراوان از آن بسیار مورد توجه بوده و امروزه در صنایع مختلف از جمله زیست فناوری، دارویی و پزشکی، به‌سازی فاضلاب، آرایشی و صنایع غذایی استفاده می‌شود (Hafdani and Sadeghinia, 2011).

ج- خالص‌سازی دوم و تغلیظ

خلوص فیکوسیانین قبل از مرحله خالص‌سازی به دلیل حساسیت بالای آن به نور، اکسیژن و رطوبت و همچنین میزان بالای دیگر پروتئین‌ها پایین است. لذا خالص‌سازی بیشتر و تغلیظ امری مهم در فرآیند تولید فیکوسیانین به شمار می‌رود. روش‌های متنوعی به منظور حذف پروتئین‌های دیگر، خالص‌سازی و تغلیظ فیکوسیانین وجود دارند. یکی از بهترین و ارزان‌ترین روش‌ها جهت بهبود کیفیت رنگ و بالابردن خلوص، استفاده از فناوری فیلتراسیون غشایی می‌باشد. فناوری‌های غشایی که مواد را به صورت فیزیکی و براساس وزن مولکولی جدا می‌کنند، یکی از کارآمدترین روش‌ها برای جداسازی پروتئین‌ها به شمار می‌روند. چنانچه در بالا اشاره شده بخش پروتئینی رنگ فیکوسیانین دارای وزن مولکولی بین ۱۸ تا ۲۰ کیلودالتون می‌باشند. برای خالص‌سازی پروتئین، معمولاً استفاده از فیلترهای غشایی با وزن مولکولی کمی بالاتر پیشنهاد می‌شود، لذا در دستورالعمل پیشنهادی پژوهشگاه، پس از مطالعه فیلترهای مختلف، فیلتر ۳۰ کیلودالتون (Amicon® Stirred Cells, Millipore) به منظور حذف ناخالصی‌های با وزن مولکولی کمتر از این مقدار، پیشنهاد می‌شود. استفاده از غشای اولترافیلتراسیون باعث افزایش خلوص و تغلیظ رنگ شده و قدرت رنگ را افزایش داد (شکل ۳). رنگ جداسازی شده به روش اسپری درایر خشک می شود.

شکل۳- رنگ استحصالی فیکوسیانین با گرید غذایی

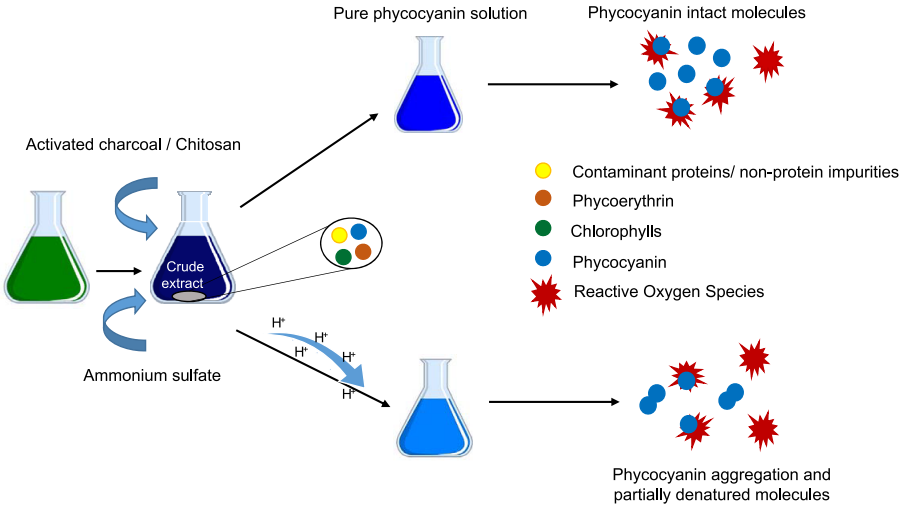
۳-۳- خصوصیات فیکوسیانین استحصالی

نتایج آزمایشات انجام شده نشان داد که استفاده همزمان از کیتوزان با وزن مولکولی پایین (۰/۱ تا ۰/۵ درصد وزنی – حجمی) با pH=۳/۹ و زغال فعال (mesh size ۴۰۰–۱۰۰) (۳ تا ۱۵ درصد وزنی–حجمی) در زمان کم (حدود ۲۰ دقیقه) میزان خلوص رنگ را به میزان زیادی افزایش می‌دهد (جدول ۲). همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگ استحصالی به روش کیتوزان/زغال فعال بالاتر از روش مرسوم و در حد نمونه خارجی بوده است (جدول ۲). به‌نظر می‌رسد افزایش اسیدیته در اثر اضافه کردن آمونیوم سولفات برای ترسیب پروتئین در روش مرسوم منجر به تغییرات ساختاری در مولکول فیکوسیانین، تجمع مولکول‌ها و تاحدی دناتوراسیون مولکول‌های فیکوسیانین شده‌است (Fekrat*etal*.,2018) (شکل ٤).

جدول ۲- خلوص، غلظت و راندمان فیکوسیانین خالص شده با کیتوزان و زغال فعال

نمونه	خلوص (R)	*فعالیت آنتی اکسیدانی (درصد)
رنگ خالص شده به روش مرسوم	۱/۸۸ ± ۰/۰۹	٦٨/٥ ± ٢/١
رنگ خالص شده با کیتوزان/ زغال فعال	۳/۱٤ ± ۰/۱۲	٧٨/٤ ± ١/٩
نمونه خارجی (شرکت Hansen)	۲/٤٤ ± ۰/۰۲	٧٥/٤ ± ١/٤

* فعالیت آنتی اکسیدانی به روش (DPPH Burits and Bucar, 2000) بر حسب درصد و در صد میکروگرم نمونه بدست آمده است.



شکل ٤– مقایسه فرآیند خالص‌سازی فیکوسیانین براساس روش پیشنهادی استفاده از جاذب‌ها با روش ترسیب پروتئین به کمک آمونیوم سولفات. افزایش اسیدیته در اثر اضافه کردن آمونیوم سولفات در روش مرسوم منجر به تغییرات ساختاری در مولکول فیکوسیانین، تجمع مولکول‌ها و تا حدی دناتوراسیون مولکول‌های فیکوسیانین می‌شود. آلودگی‌هایی که به کمک روش استفاده از جاذب‌ها حذف می‌شود عبارتند از سایر پروتیین‌ها و رنگدانه‌های دیگری مثل کلروفیل و فیکواریترین. خاصیت آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) توسط رنگ استحصالی به روش استفاده از جاذب‌ها بیش از رنگ استحصالی به روش مرسوم ترسیب پروتئین است.

همچنین رنگ تولید شده به روش کیتوزان/ زغال فعال پس از هر دو مرحله خالص‌سازی قدرت رنگ یکسانی با رنگ خارجی (شرکت Hansen) نشان می‌دهد، اگرچه فیکوسیانین تولیدی و رنگ خارجیHansen، هر دو قدرت رنگ کمتری (حدود ۱/۲۰) در مقایسه با رنگ آبی شیمیایی (بریلیانت بلو) دارند (شکل۵).

شکل ۵– مقایسه قدرت رنگ بریلیانت بلو (B)، فیکوسیانین استحصالی به روش پیشنهادی (ABRII) و نمونه خارجی از شرکت (Hansen).

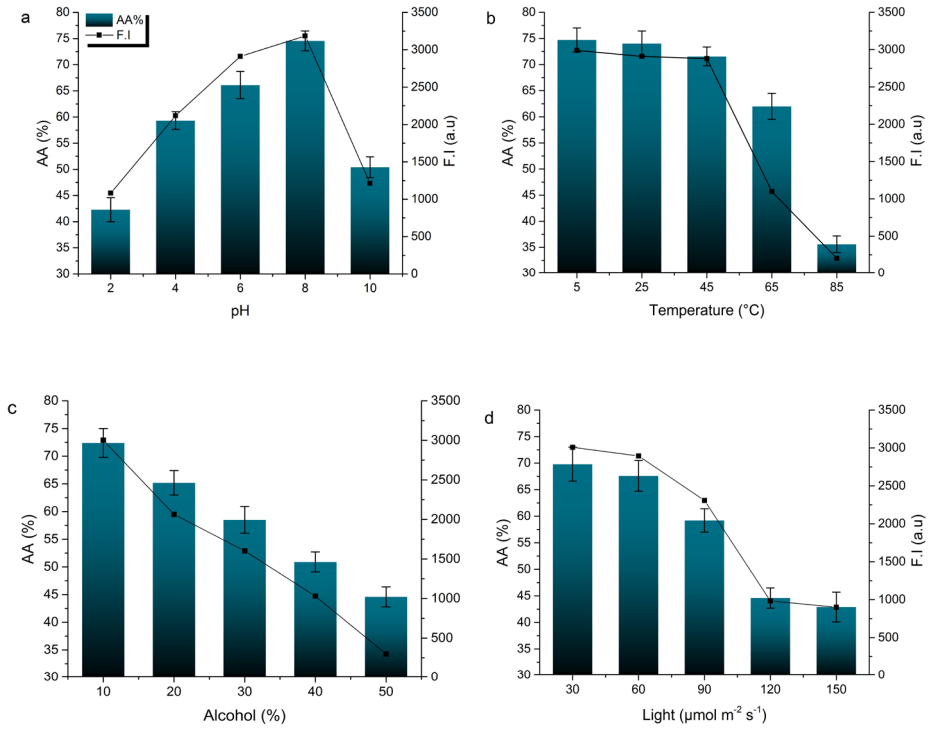
ارزیابی کمی رنگ استحصالی با استفاده از دستگاه رنگ‌سنج هانترلب (Hunterlab) و با اندازه‌گیری پارامترهای رنگ‌سنجی *L (سفید - سیاه)، *a (قرمز–سبز) و *b (زرد–آبی) نیز انجام شد. *L برابر صفر بیانگر رنگ سیاه و *L برابر صد بیانگر رنگ سفید، مقادیر منفی *a توصیف‌کننده رنگ سبز و مقادیر مثبت *a توصیف‌کننده رنگ قرمز می‌باشد. همچنین مقادیر منفی *b نشان‌دهنده میزان رنگ آبی و مقادیر مثبت *b نشان‌دهنده میزان رنگ زرد می‌باشد. جدول ۳ مقایسه این پارامترها در عصاره خام، رنگ خالص‌شده به روش مرسوم، رنگ استحصالی با استفاده از کیتوزان/ زغال فعال، رنگ شرکت Hansen و رنگ بریلیانت بلو را نشان می‌دهد. نتایج بیانگر آن است که در میان پارامترهای رنگ سنجی، پارامتر *b (توصیف‌کننده رنگ آبی) در نمونه خارجی و نمونه استحصالی به روش کیتوزان/ زغال فعال مشابه می‌باشد.

جدول ۳- مقایسه نمونه‌های رنگ آبی به وسیله دستگاه هانتر لب

مقادیر	بریلیانت بلو (رنگ شیمیایی)	نمونه خارجی (شرکت Hansen)	رنگ خالص شده با کیتوزان/ زغال فعال	رنگ خالص شده به روش مرسوم	عصاره خام
L*	٤٢/٩٣	٢١/٥٥	٤٢/٩٩	٤٨/٤٧	٥٦/٣٦
a*	-٦/٨٢	١٤/٧٤	-١/٢٦	-٣/١١	-١١/٩٢
b*	-٢٣/٥٦	-٣٩/٠٨	-٣١/٩٦	-٢٠/١٥	-١٧/١٦

۳-٤- میزان پایداری فیکوسیانین

فیکوسیانین محلول در فاز آبی، نسبت به حرارت و نور ناپایدار می‌باشد. طبق آزمایشات انجام شده در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، فیکوسیانین در دماهای پایین پایداری بسیار خوبی از خود نشان می‌دهد اما به دلیل ماهیت پروتئینی، در دماهای بالاتر از ٤٥ درجه سانتی‌گراد دناتوره شده و رنگ آن به تدریج با افزایش دما ناپدید می‌شود. پایداری فیکوسیانین (فعالیت آنتی‌اکسیدانی AA و شدت فلورسانس FI) در برابر pH نیز مورد آزمایش قرار گرفت؛ چنانچه در شکل ٦ مشاهده می‌شود، فیکوسیانین در محلول‌های اسیدی و قلیایی شدید، ناپایدار است. نتایج پایداری فیکوسیانین در برابر اتانول نیز نشان داد که به طور کلی حدود ٥٠ درصد از فیکوسیانین در اتانول ٢٥ درصد تجزیه می‌شود. همچنین شدت نور نیز تاثیر زیادی بر ناپایداری این رنگدانه دارد (شکل ٦).



شکل ٦- بررسی پایداری فیکوسیانین استحصالی و مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی (AA) و شدت فلورسانس (FI) در برابر (a) pH، درجه حرارت (b)، اتانول (c) و شدت‌های مختلف نور (d)

٤- خلاصه و نتیجه‌گیری

رنگ آبی فیکوسیانین رنگ طبیعی خوراکی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی است که در مقایسه با رنگ‌های شیمیایی و سنتزی کاملاً بی‌خطر بوده و مصرف آن به هر اندازه عمدتاً منعی ندارد. در روش مرسوم استخراج با استفاده از ترسیب به کمک سولفات آمونیوم باقی‌مانده این ترکیب سمی در رنگ استحصالی باقی می‌ماند، در حالی‌که در روش پیشنهادی ترکیبات استفاده شده سمی نمی‌باشند. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگ استحصالی به روش کیتوزان/ زغال فعال بالاتر از روش مرسوم و در حد نمونه خارجی بوده است. با توجه به ماهیت پروتئینی این رنگ و تأثیر مخرب نور، دمای بالا و اسیدیته محیط، نگهداری فیکوسیانین در تاریکی و دمای پایین توصیه می‌شود. مزایای دستورالعمل پیشنهادی در این دستورالعمل در جدول ٤ خلاصه شده است.

جدول ٤- مزایای دستورالعمل پیشنهادی استخراج و خالص‌سازی فیکوسیانین

مزایای دستورالعمل پیشنهادی	توضیحات
١- کاهش هزینه تولید و جلوگیری از خروج ارز	در حال حاضر تولید داخلی رنگ طبیعی فیکوسیانین وجود ندارد و تولید رنگ با روش پیشنهادی قیمت تمام شده محصول را نسبت به فیکوسیانین وارداتی حداقل تا ٣٠ درصد کاهش خواهد داد.
٢- کاهش زمان فرآیند	سرعت این روش در مقایسه با روش‌های سنتی معمول مانند ترسیب پروتئین با آمونیوم بیشتر است (٢روز در روش مرسوم و ٦ ساعت در روش پیشنهادی).
٣- حفظ کیفیت و ساختار اولیه مولکول	سبب افزایش راندمان استخراج، افزایش خلوص و نیز حفظ کیفیت آنتی‌اکسیدانی محصول می شود.
٤- ارتقا سطح سلامت جامعه	استفاده از ترکیبات غیرسمی در محدوده قابل توصیه جهت تثبیت رنگ و حفظ پایداری آن می‌باشد.

فهرست منابع

ایزدی م و فضیلتی م (۱۳۹۶). استخراج و خالص‌سازی فیکوسیانین از جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی آن. ششمین کنگره سراسری فناوری‌های نوین ایران با هدف دستیابی به توسعه پایدار مرکز راهکارهای دستیابی به توسعه پایدار تحت حمایت سیویلیکا، تهران.

Brooks SD, Wise ME, Cushing M and Tolbert MA (2002). Deliquescence behavior of organic/ammonium sulfate aerosol. Geophysical Research Letters, 29(19): 23(1-4), doi:10.1029/2002GL014733, 200.

DIC report (2013). http://www.dlt-spl.co.jp/business/en/spirulina.

Enzing C, Ploeg M, Barbosa M and Sijtsma L (2014). Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. Joint Research Centre Scientific and policy reports, EU Commission.

Fekrat F, Nami B, Ghanavati H, Ghaffari A and Shahbazi M (2018). Optimization of chitosan/ activated charcoal-based purification of Spirulina platensis phycocyanin using response surface methodology. J Applied Phycology, doi: 10.1007/s10811-018-1626-8.

Hafdani FN and Sadeghinia N (2011). A Review on application of Chitosan as a natural antimicrobial. World Academic Science, Engineering and Technology, 5(2): 225-229.

Jespersen L, Strømdahl LD, Olsen K and Skibsted LH (2005). Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. European Food Research and Technology, 220(3-4): 261-266.

Kamble SP, Gaikar RB and Padalia RB (2012). Extraction and purification of C-phycocyanin from dry Spirulina and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 1:1-4.

Kamble SP, Gaikar RB, Padalia RB, Keshav D and Shinde KD (2013). Extraction and purification of C-phycocyanin from dry Spirulina powder and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity, Journal of Applied Pharmaceutical Science, 3(08):149-153

Kobylewski S and Jacobson MF (2012). Toxicology of food dyes. International Journal of Occupational and Environmental Health, 18(3): 220-246.

Mogany T (2014). Optimization of culture conditions and extraction method for Phycocyanin production from a hypersaline cyanobacterium. PhD thesis, Durban University.

Sharma G, Kumar M, Irfan Ali M and Dut Jasuja N (2014). Effect of Carbon Content, Salinity and pH on Spirulina platensis for Phycocyanin, Allophycocyanin and Phycoerythrin Accumulation. Microbial and Biochemical Technology, 6(4): 202- 206.

Tanaka T, Takahashi O, Inomata A, Ogata A and Nakae D (2012). Reproductive and neurobehavioral effects of Brilliant Blue FCF in Mice. Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology, 95(6), 395- 409.