

سید الشهدا



نوع نشریه: دستورالعمل فنی

نام نشریه: استخراج و خالص سازی رنگدانه فیکوسیانین از ریزجلبک اسپیرولینا

نویسندگان: دکتر مریم شهبازی، فرزانه فکرت، بهنام نامی، اکرم غفاری

ویراستاران ادبی: دکتر حسن رهنما و عصمت جعفری نژاد

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 اطلاع رسانی کشاورزی ۵۶۱۶۲ به تاریخ ۱۳۹۸/۰۶/۲۴ است



استخراج و خالص سازی رنگدانه فیکوسیانین از ریز جلبک اسپیرولینا

دکتر مریم شهبازی

فرزانه فکرت، بهنام نامی، اکرم غفاری

فهرست مطالب

۱.....	کلیات
۱.....	اهمیت استفاده از ترکیبات باارزش به ویژه رنگ های طبیعی از جلبک ها در دنیا و کشور.....
۲.....	اهمیت و ضرورت کشت ریزجلبک اسپیرولینا برای فرآوری رنگ طبیعی فیکوسیانین.....
۳.....	ضرورت و اهمیت استخراج و خالص سازی رنگدانه فیکوسیانین.....
۳.....	مضرات رنگ های مصنوعی و اهمیت رنگ طبیعی خوراکی.....
۴.....	رنگ آبی در صنایع غذایی.....
۶.....	دستورالعمل استخراج و خالص سازی رنگدانه فیکوسیانین موجود در ریزجلبک اسپیرولینا.....
۶.....	خصوصیات محیط کشت اسپیرولینا.....
۷.....	استخراج رنگدانه فیکوسیانین.....
۸.....	تخریب سلولی و جداسازی.....
۹.....	جداسازی و خالص سازی اول.....
۱۰.....	خالص سازی دوم و تغلیظ.....
۱۱.....	خصوصیات فیکوسیانین استحصالی.....
۱۳.....	میزان پایداری فیکوسیانین.....
۱۴.....	خلاصه و نتیجه گیری.....
۱۶.....	فهرست منابع.....

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 میکروارگانیزم‌های 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 آبی‌پروری، 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 آبی‌پروری 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 غیرمعتارف (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 بر روی 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 می باشد. در حال حاضر شرکت های بزرگی در کانادا، ژاپن و آلمان به تولید این جلبک به منظور استفاده به عنوان مکمل غذایی و نیز رنگ مبادرت می ورزند (Enzing *et al.*, 2014).

اسپیرولینا منبع غنی از پروتئین سریع الهضم تا ۶۰ درصد ماده خشک حاوی ۱۸ اسید آمینه ضروری و غیر ضروری (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 می شود. رنگ تیره این جلبک به خاطر وجود مقادیر بالا انواع ترکیبات آنتی اکسیدان و رنگدانه های نظیر فیکوسیانین (۷-۱۴ درصد ماده خشک)، بتاکاروتن، لوتئین و زئاگزانتین می باشد (Kamble *et al.*, 2013).

در بیش از ۴۰ کشور دنیا، بیومس اسپیرولینا به صورت قرص، کپسول یا پودر در اختیار مردم قرار می گیرد و مصرف مستقیم پودر این جلبک به صورت قرص و داروی انرژی زا به عنوان مکمل غذایی کودکان، سالمندان، ورزشکاران و خانم های باردار توصیه می شود. از اواخر ۱۹۷۰ به بعد بعنوان مکمل غذایی در ژاپن و پس از آن در آمریکا مورد مصرف قرار گرفت و تا به امروز هیچ گونه آثار سمی و عوارض برای انسان مشاهده نشده است. اسپیرولینا به واسطه مقادیر بالای آنتی اکسیدان، تقویت سیستم ایمنی و پیشگیری از انواع سرطان، بهبود بیماری های آلزایمر و پارکینسون و خاصیت ضد التهابی در تهیه داروها بکار می رود. 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 می رود.

۲-۱- اهمیت و ضرورت کشت ریز جلبک اسپیرولینا برای فراوری رنگ طبیعی فیکوسیانین

با افزایش تقاضای جهانی برای مواد غذایی و نظر به محدودیت های بخش کشاورزی، توسعه کشت جلبک ها و تولید ترکیبات با ارزش از آنها در سال های اخیر مورد توجه ویژه قرار گرفته است. رنگدانه فیکوسیانین (آبی درخشان) با خواص فلورسنت و آنتی اکسیدانی از جلبک های سبز آبی به ویژه اسپیرولینا (*Spirulina*) بدست می آید 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 فیکوسیانیین می‌تواند دامنه کاربرد آن را افزایش دهد. تولید موفق بیومس جلبک با فیکوسیانیین بالا به عوامل متعددی از جمله شرایط رشد جلبک، قابلیت تجمع رنگدانه، تکنولوژی تولید و کارایی فرآیند پایین دستی بستگی دارد.

در این تحقیق، روش مرسوم استخراج و رسوب فیکوسیانیین 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 فیکوسیانیین 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 فیکوسیانیین

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 طولانی مدت 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 اسپرولینا 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 حالی که 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 با ارزش 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 ۱۴ درصد 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 فیکوبیلی پروتئین می‌باشد. فیکوبیلی پروتئین‌ها از دسته پروتئین‌های فلوروسنت رنگی محلول در آب با ساختار پیچیده بوده که از سیانوباکتری‌ها و جلبک‌های یوکاریوت بدست می‌آیند. پروتئین‌های رنگی فیکوبیلی زوم در سه گروه کلی فیکواریترین، فیکوسیانین و آلفوفیکوسانین قرار می‌گیرند که هر کدام رنگ متفاوتی دارند. فیکوبیلی زوم‌ها 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 سیستمین 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 فرایند تولید صنعتی، بسته‌بندی و نگهداری محصول رنگی می‌باشد. نتایج این مطالعات نشان می‌دهد شدت نور 3×10^6 لوکس به مدت ۲۴ ساعت در محلول آبی با ۵ و ۷ pH 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 خالص سازی فیکوسیانین می‌تواند دامنه کاربرد آن را افزایش دهد. خلوص عصاره‌های فیکوسیانین (رابطه ۱) براساس نسبت جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر (ماکزیمم جذب فیکوسیانین) به جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر مربوط به کل پروتئین‌ها (جدول ۱)، 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.

(رابطه ۱)

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

(رابطه ۲)

$$\text{Concentration (mg/ml)} = \frac{A_{620} - (0.47 \times A_{650})}{5.34}$$

(رابطه ۳)

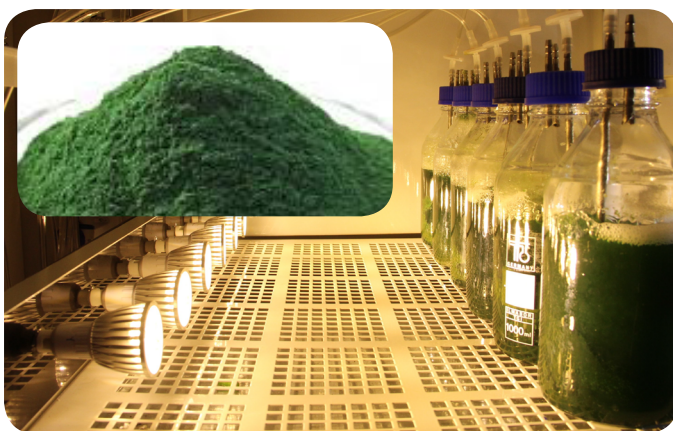
$$\text{Yield} = \frac{\text{phycocyanin concentration (mg/ml)} \times \text{collected volume (ml)}}{\text{initial phycocyanin concentration (mg/ml)} \times \text{initial volume (ml)}}$$

۳- دستورالعمل استخراج و خالص سازی رنگدانه فیکوسیانین موجود در ریزجلبک اسپیرولینا

۳-۱- خصوصیات محیط کشت اسپیرولینا

مهم ترین 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 بهینه سازی

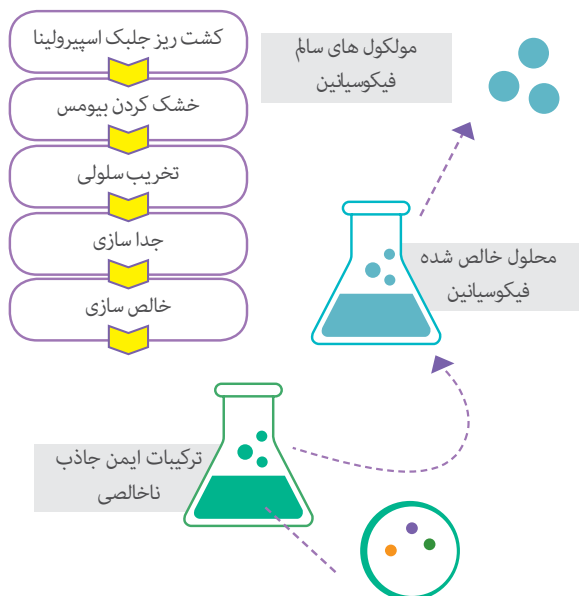
محیط و شرایط محیط کشت بر روی نرخ رشد سویه‌های مورد استفاده و تولید فیکوسیانیین تأثیر دارد. بهترین محیط کشت برای رشد جلبک اسپیرولینا محیط کشت زاروک، دمای ۲۸ درجه سانتی گراد، نور $۲۰۰-۴۰۰ \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ و $\text{pH} = 9$ با هوادهی کافی پیشنهاد شده است (شکل ۱) که با اصلاحات لازم برای هر سویه مناسب می‌باشد (داده‌های منتشر نشده).



شکل ۱- کشت آزمایشگاهی ریز جلبک اسپیرولینا و پودر اسپیرولینا با ارزش‌های غذایی مختلف

۳-۲- استخراج رنگدانه فیکوسیانیین

به منظور استخراج فیکوسیانیین 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 فیکوسیانیین از سلول، روش‌های گوناگونی وجود دارد. در مقیاس تجاری و بزرگ نیاز به روش‌های ساده، کارآمد، موثر و مقرون به صرفه در جداسازی فیکوسیانیین می‌باشد. مراحل فرآیند استخراج فیکوسیانیین (شکل ۲) در ذیل توضیح داده شده است.



شکل ۲- مراحل استخراج و خالص سازی فیکوسیانین

الف- تخریب سلولی و جداسازی

برای شکستن دیواره سلولی روش های متنوعی نظیر استفاده از فرآیندهای فیزیکی مانند شوک اسمزی، انجماد در ۲۰- درجه سانتی گراد و بازگشت به دمای ۴ درجه سانتی گراد در چند مرحله، سونیکاسیون یا استفاده از دستگاه پرس و یا روش های شیمیایی مانند استفاده از آنزیم ها، شوینده ها (Detergents)، اسیدها و بافرها وجود دارند. طبق مشاهدات در بین روش های 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 سیتрат و سدیم فسفات نتایج بهتری از نظر خلوص و میزان فیکوسیانین نشان داد. لذا این بافر به عنوان بهترین محلول استخراج کننده انتخاب گردید. غلظت های متفاوت بافر (آب، بافر ۵۰ میلی مولار و بافر ۱۰۰ میلی مولار 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 زمان های مختلف، به مدت ۴ ساعت در همزن (N-BIOTEK، کره جنوبی) با دور

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

جدول ۱- پارامترهای موثر بر استخراج فیکوسیپانین

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

ب- جداسازی و خالص‌سازی اول

مرحله خالص‌سازی یکی از مهم‌ترین مراحل تولید فیکوسیپانین به شمار می‌رود. ۵۰ تا ۹۰ درصد هزینه‌های مربوط به تولید این رنگ مربوط به مراحل خالص‌سازی آن می‌باشد. بهبود تولید، استخراج و خالص‌سازی فیکوسیپانین 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 فیکوسیپانین از موادی چون آمونیوم سولفات، کیتوزان، زغال فعال و پلی‌اتیلن‌گلیکول استفاده می‌شود. پلی‌اتیلن‌گلیکول 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 فیکوسیپانین 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 دنا توره شدن پروتئین فیکوسیپانین و کاهش میزان فعالیت آن می‌گردد. کیتوزان پلیمر ترکیبی گلوکز آمین و N-استیل گلوکز آمین است که به وسیله پیوندهای ۱ و ۴ 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- خالص سازی دوم و تغلیظ

خلوص فیکوسیانین قبل از مرحله خالص سازی به دلیل حساسیت بالای آن به نور، اکسیژن و رطوبت و همچنین میزان بالای دیگر پروتئین ها پایین است. لذا خالص سازی بیشتر و تغلیظ امری مهم در فرآیند تولید فیکوسیانین به شمار می رود. روش های متنوعی به منظور حذف پروتئین های دیگر، خالص سازی و تغلیظ فیکوسیانین وجود دارند. یکی از بهترین و ارزان ترین روش ها جهت بهبود کیفیت رنگ و بالابردن خلوص، استفاده از فناوری فیلتراسیون غشایی می باشد. فناوری های غشایی که مواد را به صورت فیزیکی و براساس وزن مولکولی جدا می کنند، یکی از کارآمدترین روش ها برای جداسازی پروتئین ها به شمار می روند. چنانچه در بالا اشاره شده بخش پروتئینی رنگ فیکوسیانین دارای وزن مولکولی بین ۱۸ تا ۲۰ کیلودالتون می باشند. برای خالص سازی پروتئین، معمولاً استفاده از فیلترهای غشایی با وزن مولکولی کمی بالاتر پیشنهاد می شود، لذا در دستورالعمل پیشنهادی پژوهشگاه، پس از مطالعه فیلترهای مختلف، فیلتر ۳۰ کیلودالتون (Amicon® Stirred Cells, Millipore) به منظور حذف ناخالصی های با وزن مولکولی کمتر از این مقدار، پیشنهاد می شود. 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.



شکل ۳- رنگ استحصالی فیکوسیانین با گرید غذایی

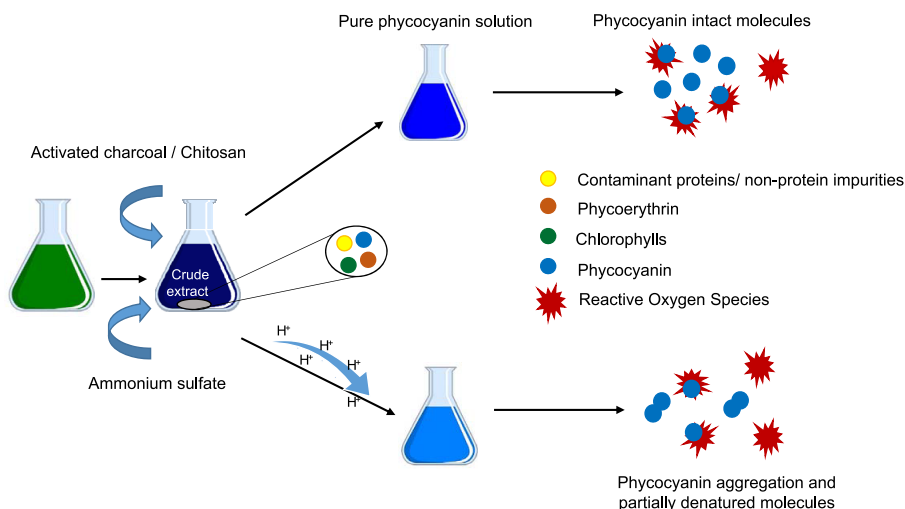
۳-۳- خصوصیات فیکوسیانیین استحصالی

نتایج آزمایشات انجام شده نشان داد که استفاده همزمان از کیتوزان با وزن مولکولی پایین (۱/۰ تا ۵/۰ درصد وزنی - حجمی) با $pH=3/9$ 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 می دهد (جدول ۲). همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی رنگ استحصالی به روش کیتوزان/ زغال فعال بالاتر از روش مرسوم و در حد نمونه خارجی بوده است (جدول ۲). به نظر می رسد افزایش اسیدیته در اثر اضافه کردن آمونیوم سولفات برای ترسیب پروتئین در روش مرسوم منجر به تغییرات ساختاری در مولکول فیکوسیانیین، تجمع مولکول ها و تاحدی دنا تورا سیون مولکول های فیکوسیانیین شده است (Fekrat et al., 2018) (شکل ۴).

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

نمونه	خلوص (R)	*فعالیت آنتی اکسیدانی (درصد)
رنگ خالص شده به روش مرسوم	$1/88 \pm 0/09$	$6/5 \pm 2/1$
رنگ خالص شده با کیتوزان / زغال فعال	$3/14 \pm 0/12$	$78/4 \pm 1/9$
نمونه خارجی (شرکت Hansen)	$2/44 \pm 0/02$	$75/4 \pm 1/4$

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



شکل ۴- مقایسه فرآیند خالص سازی فیکوسیانین براساس روش پیشنهادی استفاده از جاذب ها 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 مولکول ها و تا حدی دناتوراسیون مولکول های فیکوسیانین می شود. آلودگی هایی که به کمک روش استفاده از جاذب ها حذف می شود عبارتند از سایر پروتئین ها و رنگدانه های دیگری مثل کلروفیل و فیکواریترین. خاصیت آنتی اکسیدانی و مهار رادیکال های آزاد اکسیژن (ROS) توسط رنگ استحصالی به روش استفاده از جاذب ها بیش از رنگ استحصالی به روش مرسوم ترسیب پروتئین است.

همچنین رنگ تولید شده به روش کیتوزان/ زغال فعال پس از هر دو مرحله خالص سازی قدرت رنگ یکسانی با رنگ خارجی (شرکت Hansen) نشان می دهد، اگرچه فیکوسیانین تولیدی و رنگ خارجی Hansen، هر دو قدرت رنگ کمتری (حدود ۱/۲۰) در مقایسه با رنگ آبی شیمیایی (بریلیانت بلو) دارند (شکل ۵).



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

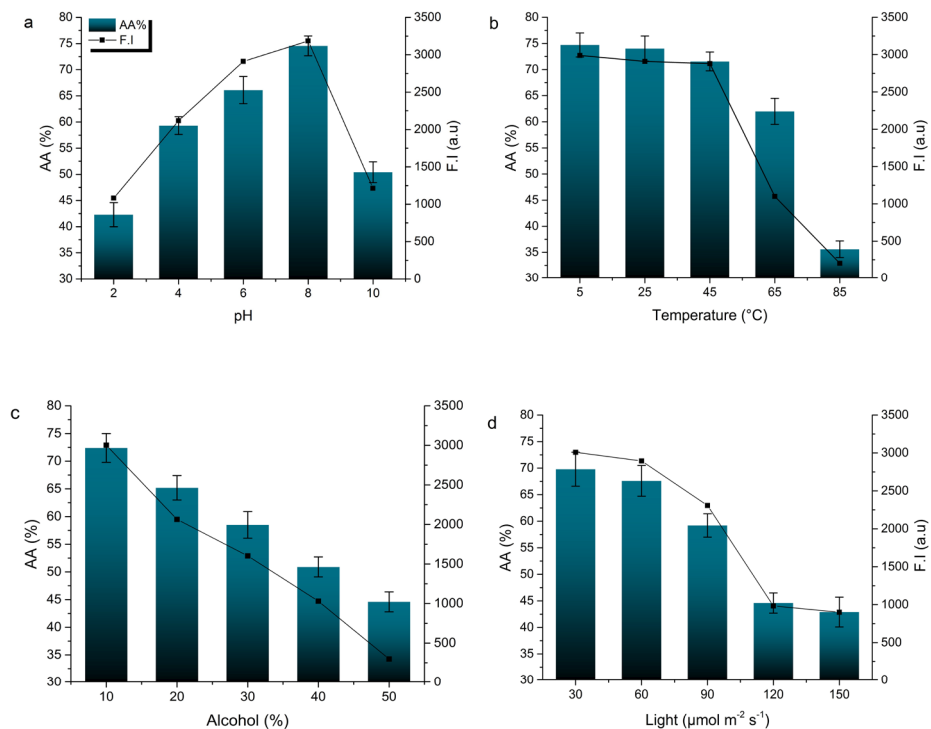
ارزیابی کمی رنگ استحصالی با استفاده از دستگاه رنگ سنج هانتربل (Hunterlab) و با اندازه گیری پارامترهای رنگ سنجی L^* (سفید - سیاه)، a^* (قرمز-سبز) و b^* (زرد-آبی) نیز انجام شد. L^* برابر صفر بیانگر رنگ سیاه و L^* برابر صد بیانگر رنگ سفید، مقادیر منفی a^* توصیف کننده رنگ سبز و مقادیر مثبت a^* توصیف کننده رنگ قرمز می باشد. همچنین مقادیر منفی b^* نشان دهنده میزان رنگ آبی و مقادیر مثبت b^* نشان دهنده میزان رنگ زرد می باشد. جدول ۳ مقایسه این پارامترها در عصاره خام، رنگ خالص شده به روش مرسوم، رنگ استحصالی با استفاده از کیتوزان/ زغال فعال، رنگ شرکت Hansen و رنگ بریلیانت بلو را نشان می دهد. نتایج بیانگر آن است که در میان پارامترهای رنگ سنجی، پارامتر b^* (توصیف کننده رنگ آبی) در نمونه خارجی و نمونه استحصالی به روش کیتوزان/ زغال فعال مشابه می باشد.

جدول ۳- مقایسه نمونه های رنگ آبی به وسیله دستگاه هانتربل

عصاره خام	رنگ خالص شده به روش مرسوم	رنگ خالص شده با کیتوزان/ زغال فعال	نمونه خارجی (شرکت Hansen)	بریلیانت بلو (رنگ شیمیایی)	مقادیر
۵۶/۳۶	۴۸/۴۷	۴۲/۹۹	۲۱/۵۵	۴۲/۹۳	L^*
-۱۱/۹۲	-۳/۱۱	-۱/۲۶	۱۴/۷۴	-۶/۸۲	a^*
-۱۷/۱۶	-۲۰/۱۵	-۳۱/۹۶	-۳۹/۰۸	-۲۳/۵۶	b^*

۳-۴- میزان پایداری فیکوسیانیین

فیکوسیانیین محلول در فاز آبی، نسبت به حرارت و نور ناپایدار می باشد. طبق آزمایشات انجام شده در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، فیکوسیانیین در دماهای پایین پایداری بسیار خوبی از خود نشان می دهد اما به دلیل ماهیت پروتئینی، در دماهای بالاتر از ۴۵ درجه سانتی گراد دناتوره شده و رنگ آن به تدریج با افزایش دما ناپدید می شود. پایداری فیکوسیانیین (فعالیت آنی اکسیدانی AA و شدت فلورسانس FI) در برابر pH نیز مورد آزمایش قرار گرفت؛ چنانچه در شکل ۶ مشاهده می شود، فیکوسیانیین در محلول های اسیدی و قلیایی شدید، ناپایدار است. نتایج پایداری فیکوسیانیین در برابر اتانول نیز نشان داد که به طور کلی حدود ۵۰ درصد از فیکوسیانیین در اتانول ۲۵ درصد تجزیه می شود. همچنین شدت نور نیز تاثیر زیادی بر ناپایداری این رنگدانه دارد (شکل ۶).



شکل ۶- بررسی پایداری فیکوسیانین استحصالی و مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی (AA) و شدت فلورسانس (FI) در برابر

pH (a)، درجه حرارت (b)، اتانول (c) و شدت های مختلف نور (d)

۴- خلاصه و نتیجه گیری

رنگ آبی فیکوسیانین رنگ طبیعی خوراکی با خاصیت آنتی اکسیدانی است که در مقایسه با رنگ های شیمیایی و سنتزی کاملاً بی خطر بوده و مصرف آن به هر اندازه عمدتاً منعی ندارد. در روش مرسوم استخراج با استفاده از ترسیب به کمک سولفات آمونیوم باقی مانده این ترکیب سمی در رنگ استحصالی باقی می ماند، در حالی که در روش پیشنهادی ترکیبات استفاده شده سمی نمی باشند. همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی 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 می شود. مزایای دستورالعمل پیشنهادی در این دستورالعمل در جدول ۴ خلاصه شده است.

جدول ۴- مزایای دستورالعمل پیشنهادی استخراج و خالص سازی فیکوسیانیین

مزایای دستورالعمل پیشنهادی	توضیحات
۱- کاهش هزینه تولید و جلوگیری از خروج ارز	در حال حاضر تولید داخلی رنگ طبیعی فیکوسیانیین وجود ندارد و تولید رنگ با روش پیشنهادی قیمت تمام شده محصول را نسبت به فیکوسیانیین وارداتی حداقل تا ۳۰ درصد کاهش خواهد داد.
۲- کاهش زمان فرآیند	سرعت این روش در مقایسه با روش های سنتی معمول مانند ترسیب پروتئین با آمونیوم بیشتر است (۲روز در روش مرسوم و ۶ ساعت در روش پیشنهادی).
۳- حفظ کیفیت و ساختار اولیه مولکول	سبب افزایش راندمان استخراج، افزایش خلوص و نیز حفظ کیفیت آنتی اکسیدانی محصول می شود.
۴- ارتقا سطح سلامت جامعه	استفاده از ترکیبات غیرسمی در محدوده قابل توصیه جهت تثبیت رنگ و حفظ پایداری آن می باشد.

فهرست منابع

- ایزدی م و فضیلتی م (۱۳۹۶). استخراج و خالص سازی فیکوسیانین از جلبک /سپیرولینا پلاتنسیس و بررسی فعالیت آنٹی اکسیدانی و ضدالتهابی آن. ششمین کنگره سراسری فناوری های 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.
- Hafdari 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.