ارزیابی تاثیر دما، زمان و pH بر پایداری رنگدانه فیکوسیانین استخراج شده از جلبک اسپیرولینا (*Spirulina platensis*)

رضا صفری[۱]، زینب رفتنی امیری[۱*]، رضا اسماعیل زاده کناری[۱]

* zramiri@gmail.com

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۶

چکیده

فیکوسیانین رنگدانه آبی جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* بوده که دارای ویژگی‌های آنتی اکسیدانی، ضدسرطانی و ضدالتهابی می-باشد. در این مطالعه، پس از کشت اولیه جلبک اسپیرولینا در محیط کشت زاروک تغییر یافته و استخراج فیکوسیانین با آنزیم لیزوزیم، خالص‌سازی نسبی فیکوسیانین (با استفاده از سولفات آمونیوم ۴۰ درصد) انجام شد. در نهایت، پایداری فیکوسیانین در قالب طرح کاملاً تصادفی بر پایه آزمایش فاکتوریل با در نظر گرفتن سه فاکتور دما در سه سطح ۱۸- ، ۴ و ۱۰ درجه سانتی گراد، pH در سه سطح ۴/۵ ، ۵/۵ و ۷ و زمان در سه سطح ۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت و خلوص فیکوسیانین به‌ترتیب، در عصاره خام ۱/۸۱۵ و ۰/۸۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در عصاره خالص‌سازی شده ۳/۷۵۱ و ۱/۱۳۵ میلی-گرم در میلی‌لیتر بود. نتایج حاکی از کاهش نسبی پایداری فیکوسیانین با افزایش زمان نگهداری در دماهای مورد بررسی بود. با این وجود، بیشترین پایداری فیکوسیانین در دمای ۱۸- و سپس ۴ درجه سانتی گراد با روند مشابه در دامنه pH های مورد بررسی بوده است. با افزایش دمای نگهداری به ۱۰ درجه سانتی گراد، پایداری فیکوسیانین خصوصا در pH=۵/۵ کاهش شدیدی داشته و جذب نوری آن در روز ۳۰ به صفر رسید. بهترین شرایط جهت حداقل کاهش غلظت فیکوسیانین، pH=۴/۵، دمای ۱۸- درجه سانتی گراد و زمان ۳۰ روز بود. با توجه به نتایج بدست آمده، امکان استفاده از فیکوسیانین در فراورده‌های غذایی که در دمای یخچال و یا انجماد (فراورده های لبنی و بستنی) نگهداری می شوند وجود دارد.

کلمات کلیدی: *اسپیرولینا پلاتنسیس*، رنگدانه فیکوسیانین، پایداری، پارامترهای محیطی

* نویسنده مسئول

مقدمه

میکروجلبک اسپیرولینا جزء جلبک‌های سبز- آبی بوده و از گونه‌های غالب این جلبک می‌توان به *پلاتنسیس* (*Platensis*) و *ماکسیما* (*Maxima*) اشاره نمود. این جلبک به لحاظ قابلیت هضم و ارزش غذایی بالا (بین ۷۰-۵۰ درصد پروتئین) و هم‌چنین دارا بودن اسیدهای آمینه ضروری، از اهمیت خاصی در صنایع غذایی، دارویی و آبزی پروری برخوردار می‌باشد (مستولی زاده و همکاران.، ۱۳۹۶; انصاری فرد و همکاران.، ۱۳۹۶). فیکوسیانین بعنوان یکی از رنگدانه های اسپیرولینا، نقش مهمی در فرآیند فتوسنتز داشته و از رنگدانه های محلول در آب گروه فیکوبیلی پروتئین ها می‌باشد (Saranraj & Sivasakthi, 2014). میزان فیکوبیلی پروتئین‌ها در اسپیرولینا، ۶۰-۴۰% از کل پروتئین‌های محلول بوده و درصد فیکوسیانین، کلروفیل و کاروتنوئیدها نیز به ترتیب ۱۹-۱۵%، ۱/۷-۱/۳% و ۰/۴-۰/۳% از کل رنگدانه‌های موجود را تشکیل می‌دهند(Jaouen *et al.*, 1999; Leema *et al.*, 2010; IIMSAM. 2014). فیکوسیانین به‌عنوان رنگدانه طبیعی در انواع مواد غذایی نظیر آدامس، شکلات، ژله‌ها ، نوشیدنی‌ها و همچنین محصولات آرایشی مورد استفاده قرار میگیرد (Silveira *et al.*, 2007; Saranraj & Sivasakthi, 2014). جهت استخراج رنگدانه فیکوسیانین از روش‌های مختلف نظیر انجماد و انجماد زدایی، روش آنزیمی، تکنیک اولتراسوند، فشار هیدرواستاتیک بالا، اولترا سانتریفوژ، اولتراهموژنیزاسیون، استخراج با آب و حلال‌های آلی و معدنی استفاده شده که هر یک دارای مزایا و معایب خاص خود می‌باشند (Prabakaran & Ravindran, 2013; Durai *et al.*, 2015). تجزیه فیکوسیانین به شرایط تجمعی ساختمان پروتئینی آن بستگی داشته که این وضعیت متاثر از فاکتورهایی نظیر نور، pH، دما و غلظت پروتئین می‌باشد (Sarada *et al.*, 1999; Jesperse *et al.*, 2005; Eriksen, 2008; Kuddus *et al.*, 2013).

برای حفظ کیفیت ساختمان پروتئینی فیکوسیانین از مواد پایدارکننده نظیر آزید سدیم و دی تیوتریتول استفاده می‌شود. مواد مذکور به لحاظ سمی بودن دارای عوارض جانبی بوده و برای تولید فیکوسیانین با کیفیت خوراکی، مناسب نبوده و فقط جهت تولید فیکوسیانین برای آنالیز آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Vonshak, 1997; Mishra *et al.*, 2008). با توجه به رنگ آبی و هم‌چنین خواص آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین، می‌توان از آن به عنوان رنگدانه و آنتی‌اکسیدان طبیعی در انواع مواد غذایی با هدف خواص درمانی و هم‌چنین تنوع در محصولات تولید شده استفاده نمود. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر دما (۱۰-، ۴ و ۱۰ درجه سانتیگراد)، زمان (۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز) و pH (۴/۵، ۵/۵ و ۷) بر پایداری فیکوسیانین با تاکید بر استفاده از آن در جهت تولید محصولات غذایی فراسودمند بوده است.

مواد و روش کار

تهیه کشت اسپیرولینا: نمونه خالص جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* (*Spirulina platensis*) از آزمایشگاه جلبک-شناسی، بخش بیولوژی دانشگاه تربیت مدرس تهیه گردید. جهت کشت اسپیرولینا از محیط کشت زاروک با فرمولاسیون متفاوت استفاده شد. پس از کشت در مقیاس‌های کوچکتر، کشت نهایی در حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر انجام شد. ترکیبات محیط کشت مذکور (گرم در لیتر) شامل $NaHCO_3$ ۸ گرم، K_2HPO_4 ۰/۵ گرم، $NaNO_3$ ۲/۵ گرم، K_2SO_4 ۰/۵ گرم، NaCl ۲ گرم، $MgSO_4$ ۷ آبه ۰/۲ گرم، $FeSO_4$ ۲ آبه ۰/۰۵ گرم و اوره ۰/۲ گرم بوده و pH در محدوده ۸/۵ تنظیم گردید. پس از کشت جلبک و قرار دادن در برابر نور فلورسنت با شدت ۳۵۰۰ لوکس نوری (با پریود زمانی ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی)، نمونه‌ها در دمای ۲۹ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ روز قرار داده شدند. نمونه‌ها روزانه ۳ بار تکان داده شده تا رشد جلبک بخوبی انجام گیرد. پس از مشاهده بلوم جلبکی، نسبت به جمع آوری توده سلولی اقدام شده که این فرآیند با استفاده از صافی های ۱۰۰ و ۲۰ میکرونی انجام شده که به ترتیب برای جداسازی ذرات بزرگتر و توده جلبک مورد استفاده قرار گرفتند. توده جمع آوری شده ۳ بار شستشو داده شد که این عمل برای از بین رفتن اثرات محیط کشت انجام شد. برای خشک کردن جلبک، نمونه ها در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند (Kamble *et al.*, 2013; Prabakaran & Ravindran, 2013; Joshi *et al.*, 2014).

استخراج فیکوسیانین: استخراج فیکوسیانین طبق روش ارائه شده توسط Jerle و Prabu (۲۰۱۵) و Muthulakshmi و همکاران (۲۰۱۲) با اندکی تغییر انجام گرفت. ابتدا ۲ گرم از توده خشک اسپیرولینا (خشک شده در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد آون به مدت ۴۸ ساعت) به ۴۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار

اضافه شده (pH=7) و سپس از آنزیم لیزوزیم (۴۰ میلی‌گرم به ازای یک گرم از ماده خشک) و EDTA (برای غیرفعال کردن یون منیزیم و تخریب غشاء سیتوپلاسمی) به مقدار ۱۰۰ میلی‌مولار استفاده شد. مخلوط تهیه شده، در دمای ۴۴ درجه سانتی گراد حمام آب گرم برای مدت ۴ ساعت شیک شد. بعد از اتمام فرایند تیمار با آنزیم، نمونه در دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شده و مایع رویی (رنگ آبی تیره) برای آزمایش خالص-سازی مورد استفاده قرار گرفت.

خالص‌سازی نسبی فیکوسیانین: برای خالص‌سازی نسبی فیکوسیانین از روش Muthulakshmi و همکاران (۲۰۱۲) با اندکی تغییر استفاده گردید. در این روش ابتدا سولفات آمونیم با درجه اشباع ۴۰ درصد به آرامی به محلول حاوی فیکوسیانین اضافه شده و برای مدت یک ساعت هم زده شد. پس از قرار دادن نمونه حاوی مخلوط فوق در مکان تاریک و دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت، فرایند سانتریفوژ در دور ۱۵۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. مایع بی رنگ رویی حاصل از سانتریفوژ دور ریخته شده و به رسوب آبی رنگ مقداری محلول بافر فسفات(pH=7) اضافه شده و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

محاسبه غلظت و خلوص فیکوسیانین: برای محاسبه غلظت فیکوسیانین، جذب نوری محلول در طول موج های ۶۱۵ و ۶۵۲ نانومتر قرائت شده و غلظت فیکوسیانین بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر طبق فرمول ذیل محاسبه گردید (Antelo *et al.*, 2010)

$$\text{C-PCmg/ml} = \frac{A620 - 0.474 \times A652}{5.34}$$

C_{-PC}: غلظت فیکوسیانین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، A۶۱۵: جذب درطول موج ۶۱۵ نانومتر،A۶۵۲ : جذب در طول موج ۶۵۲ نانومتر، ۵/۳۴ : فاکتور ثابت.. برای محاسبه خلوص فیکوسیانین، نسبت جذب نوری در طول موج ۶۲۰ (ماکزیمم جذب فیکوسیانین) به جذب نوری در طول موج ۲۸۰ (غلظت پروتئین در محلول) تقسیم شد (Liu *et al.*, 2005; Muthulakshmi *et al.*, 2012).

ارزیابی پایداری فیکوسیانین: پس از تهیه سوسپانسیون فیکوسیانین در بافر فسفات سدیم و تهیه محلول اولیه رنگدانه، مقدار فیکوسیانین در زمان‌های تعیین شده (۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز) با قرائت جذب در دستگاه اسپکتروفتومتر (طول موج‌های ۶۱۵ و ۶۵۲ نانومتر) تعیین گردید (Duangsee *et al.*, 2009; Muthulakshmi *et al.*, 2012).

تجزیه و تحلیل آماری: نرم افزار مورد استفاده برای تجزیه و احلیل داده ها، SPSS بوده و جهت ارزیابی رشد جلبک، غلظت و خلوص فیکوسیانین، از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و به منظور بررسی پایداری رنگدانه فیکوسیانین در شرایط مختلف، از زمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی استفاده گردید.

نتایج

رشد جلبک و تولید توده سلولی: تغییرات جذب نوری جلبک اسپیرولینا در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج حاکی از آن است که رشد جلبک از زمان صفر تا ۱۶ روز، دارای روند صعودی بوده و تغییرات حاصله تا روز ۱۴ معنی دار بوده است($p<۰/۰۵$). مقدار ماده خشک در انتهای دوره رشد نیز ۱۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر بود. در نتایج به جدول جایگزین نمودار گردید.

جدول۱: تغییرات جذب نوری جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در زمان های مختلف

Table 1: The optical density of *Spirulina platensis* in different time

زمان (روز)	جذب نوری جلبک در طول موج ۵۴۰ نانومتر
صفر	۰/۰۷±۰/۰۰۲^{h}
۲	۰/۲۱±۰/۰۱۴^{g}
۴	۰/۴۴±۰/۰۱^{f}
۶	۰/۸۳±۰/۰۲^{e}
۸	۱/۲۱۵±۰/۰۲^{d}
۱۰	۱/۷۱±۰/۰۵^{c}
۱۲	۲/۱۶۵±۰/۰۹^{b}
۱۴	۲/۳۲۵±۰/۰۷۷^{a}
۱۶	۲/۳۵±۰/۰۴۴^{a}

حروف متفاوت حاکی از اختلاف معنی دار ما بین داده ها می-باشد($p<۰/۰۵$).

غلظت اولیه و میزان خلوص فیکوسیانین: پس از استخراج آنزیمی فیکوسیانین و خالص‌سازی نسبی آن توسط سولفات آمونیوم ۴۰ درصد، غلظت و خلوص فیکوسیانین در محلول خام استخراج شده و هم‌چنین محلول خالص‌سازی شده تعیین گردید (جدول ۲). پس از

خالص‌سازی، غلظت فیکوسیانین بطور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$).

جدول ۲: غلظت و خلوص فیکوسیانین استخراج شده از جلبک اسپیرولینا

Table 2: Concentration and purification of phycocyanin extracted from spirulina

مرحله خالص‌سازی	خلوص (A620/A280)	غلظت فیکوسیانین (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)
عصاره خام	۰/۸۲۵±۰/۰۴^{b}	۱/۸۱۵±۰/۰۶^{b}
رسوب با سولفات آمونیوم ۴۰%	۱/۱۳۵±۰/۰۸^{a}	۳/۷۵۱±۰/۰۵^{a}

حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان از اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

پایداری فیکوسیانین: اثر فاکتورهای مستقل و هم-چنین متقابل زمان، دما و pH بر غلظت فیکوسیانین و میانگین غلظت فیکوسیانین بر مبنای هر یک از فاکتورهای مستقل به‌ترتیب در جداول ۳ و ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که اثر فاکتورهای دما، pH و زمان هریک به تنهایی و اثرات متقابل همه فاکتورها به‌جز اثر متقابل pH × زمان، بر غلظت فیکوسیانین معنی‌دار بوده است ($p<۰/۰۵$). بطور کلی پایداری فیکوسیانین با افزایش زمان نگهداری از ۱۵ روز به ۴۵ روز و هم‌چنین افزایش دما از ۱۸- درجه سانتی گراد به ۱۰ درجه سانتی گراد، کاهش داشته است. کمترین پایداری فیکوسیانین در میانه محدوده pH مورد بررسی (۵/۵) مشاهده شد و با دور شدن pH از میانه به دو طرف محدوده pH (۴/۵ و ۷) شدت رنگ فیکوسیانین افزایش پیدا کرد.

جدول۳: میانگین مربعات غلظت فیکوسیانین بر مبنای فاکتورهای مختلف زمان، دما و pH

Table 3: Mean squres of phycocyanin concentration based on time, tempreture and pH

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
Corrected Model	۲۶	۰/۸۵۸**
Intercept	۱	۱۰۲/۳۹۹**
زمان	۲	۲/۱۸۷**
دما	۲	۷/۸۵۴**
pH	۱	۰/۳۶۲**
زمان × دما	۴	۰/۲۰۰**
pH × زمان	۴	۰/۰۰۱^{ns}
pH × دما	۴	۰/۱۶۱**
pH × دما × روز	۸	۰/۰۰۸**
خطا	۵۴	۰/۰۰۱
کل	۸۱	-
Corrected Total	۸۰	-

** اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد و ns اختلاف غیر معنی‌دار است.

جدول ۴: میانگین غلظت فیکوسیانین بر مبنای فاکتورهای زمان، دما و pH

Table 4: Mean of phycocyanin concentration based on time, tempreture and pH

فاکتور	سطح	غلظت فیکوسیانین
زمان (روز)	۱۵	۱/۴۳۲^{a}
	۳۰	۱/۰۶۹^{b}
	۴۵	۰/۸۷۱^{c}
دما (سانتی گراد)	۴	۱/۲۰۳^{b}
	۱۰	۰/۵۴۹^{c}
	-۱۸	۱/۶۱۹^{a}
pH	۴/۵	۱/۲۲۱^{a}
	۵/۵	۰/۹۹۶^{c}
	۷	۱/۱۵۵^{b}

حروف متفاوت در ستون برای هر یک از فاکتورها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

بحث

توده سلولی اسپیرولینا: به هنگام مناسب بودن شرایط محیطی و هم‌چنین وجود مواد مغذی، جلبک اسپیرولینا رشد خوبی از خود نشان می‌دهد. این جلبک آب لب‌شور (تا شوری ppt ۱۳) را نسبت به آب‌های شیرین و شور ترجیح داده ولی با این وجود پارامترهای مختلفی بر روند رشد این جلبک تاثیرگذار می‌باشند (Vonshak, 1997; Sharma *et al.*, 2014). Jerley و Prabu (۲۰۱۵) در مطالعه خود از محیط کشت زاروک تغییریافته با ۹ =pH* و دوره کشت ۹ روزه استفاده کردند. نتایج توده سلولی جلبک بعد از ۹ روز، ۲۸۰ میلی‌گرم در لیتر بود که در مقایسه با مطالعه حاضر بسیار کمتر بوده است. به نظر می‌رسد که غلظت بالاتر نمک سدیم، pH=۸/۵ و اضافه کردن اوره بعنوان منبع ازت، در رشد بیشتر جلبک در محیط کشت زاروک تهیه شده موثر بوده است. Ismaiel و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که بیشترین توده سلولی اسپیرولینا در pH=۹، دوره ۱۴ روزه در محیط کشت زاروک معادل ۱۳۲۰ میلی‌گرم ماده خشک در لیتر بوده که به نتایج مطالعه حاضر نزدیک می‌باشد.

غلظت و خلوص فیکوسیانین: کارایی استخراج، خلوص و غلظت فیکوسیانین به روند تخریب پوشش سلولی بستگی دارد. در مطالعه حاضر لیزوزیم، EDTA و بافر فسفات جهت استخراج فیکوسیانین مورد استفاده قرار گرفتند. لیزوزیم بیشتر بر دیواره سلولی تاثیر گذاشته ولی EDTA و بافر فسفات با کلاته کردن یون منیزیم و تخریب غشای سیتوپلاسمی ، باعث آزاد شدن فیکوسیانین می‌گردند. محققین از روش‌های مختلفی نظیر آنزیمی، اولتراسوند، هموژنیزه کردن، انجماد و انجمادزدایی و استفاده از حلال‌های آلی و معدنی جهت استخراج فیکوسیانین استفاده کرده‌اند (Duangsee *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2016). نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت فیکوسیانین در عصاره خام و خالص‌سازی شده به‌ترتیب ۱/۸۱۵ و ۳/۷۵۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده که بالاتر از گزارش Jerle و Prabu (۲۰۱۵) و مشابه مطالعه انجام شده توسط Ismaiel و همکاران (۲۰۱۶) بود. به نظر می‌رسد که ترکیب متفاوت مورد استفاده از زاروک با pH=۸/۵ بر روند تولید بیشتر رنگدانه موثر باشد. مطالعات نشان داده که هر چند اسپیرولینا در pH های قلیایی رشد خوبی از خود نشان می‌دهد ولی میزان تولید رنگدانه در pH بین ۸/۵-۸ بیشتر می‌باشد(Kuddus *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2013). مطالعات نشان داده هنگامی که نسبت A620/A280 از ۴ بیشتر باشد فیکوسیانین استخراج شده دارای درجه آزمایشگاهی و دارویی بوده و زمانی‌که این مقدار بین ۰/۷ تا ۳/۹ باشد جهت مصارف غذایی و آرایشی قابل استفاده می‌باشد (Muthulakshmi *et al.*, 2012). خلوص فیکوسیانین استخراج شده در این مطالعه قابلیت استفاده در مواد غذایی و آرایشی را دارا می‌باشد (۱/۱۳۵).

بررسی اثر متقابل دما × pH بر پایداری فیکوسیانین: مطابق نتایج این مطالعه، پایداری فیکوسیانین در دماهای پائین، بیشتر از دمای بالا بوده و این پایداری در pH=۴/۵ بیشتر pH=۵/۵ و pH=۷ بوده است. یکی از روش‌های نگهداری مواد پروتئینی نگهداری در دمای انجماد بوده که در این شرایط کمترین تغییرات در ساختار مولکولی پروتئین رخ می‌دهد. با افزایش نسبی دما، ساختمان پروتئین تحت تاثیر قرار گرفته و در نتیجه پایداری آن نیز کاهش می‌یابد (Chaiklahan *et al.*, 2012). فیکوسیانین به لحاظ ماهیت پروتئینی از این وضعیت مستثنی نبوده و تحت تاثیر شرایط محیطی قرار گرفته است. یکی از پارامترهای موثر در تجزیه مواد پروتئینی در شرایط مختلف دمایی، pH بوده و pH های مختلف اسیدی، خنثی یا قلیایی دارای اثرات متفاوت می‌باشند. نتایج این تحقیق حاکی از آن است که در pH=۴/۵، کمترین تغییرات در پایداری فیکوسیانین مشاهده شده ولی با افزایش pH به ۵/۵، غلظت فیکوسیانین را تحت تاثیر قرار داده و در نتیجه پایداری آن را کاهش می‌دهد. نتایج تغییرات مذکور در pH=۷ تابع شرایط موجود نبوده و مشابه pH=۴/۵ می‌باشد. مطالعات نشان داده هنگامی‌که فیکوسیانین در دماهای بالاتر (۴۵ تا ۷۵ سانتی گراد) قرار گیرد ساختار پروتئینی آن دناتوره شده و اگر این فرایند غیرقابل برگشت باشد، از پایدای آن کاسته می‌شود. استفاده از نگهدارنده‌های مختلف نظیر ساکارز، گلوکز و کلرید سدیم باعث افزایش پایداری فیکوسیانین در شرایط مختلف دمایی و pH می‌شود (Chaiklahan *et al.*, 2012). مطالعات Antelo و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که عصاره فیکوسیانین در دمای بالا و pH پائین دارای پایداری بیشتری بوده و به‌عبارت دیگر ارتباط معکوسی بین pH و دما وجود دارد. در مطالعه Duangsee و همکاران (۲۰۰۹) مشخص گردید هنگامی‌که فیکوسیانین در دمای پائین و pH ۴/۵ تا ۵ قرار داده شود دارای پایداری بیشتری بوده ولی با

افزایش دما به ۴۰ تا ۶۸ سانتی گراد، فیکوسیانین به سرعت دناتوره شده و رسوب می‌کند. نتایج تحقیق حاضر حاکی از افزایش پایداری فیکوسیانین در دماهای پائین و pH=۴/۵ بوده ولی در pH=۵/۵ چنین وضعیتی مشاهده نشد.

بررسی اثر متقابل دما × زمان: تغییرات فیکوسیانین در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد، از زمان ۱۵ تا ۴۵ روز، از ۱/۷۸ به ۱/۴۷ میلی گرم بر میلی لیتر کاهش داشته که این کاهش در مقایسه با دو دمای ۴ و ۱۰ درجه سانتی گراد بسیار کمتر بوده است. در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد، غلظت فیکوسیانین در زمان‌های ۳۰ و ۴۵ روز، کاهش شدیدی داشته و به‌ترتیب در محدوده ۰/۳۷ و ۰/۲۴ میلی گرم بر میلی لیتر بود. هرچه دمای نگهداری ماده پروتئینی افزایش یابد، از پایداری آن کاسته شده و در دماهای بالاتر، با گسسته شدن پیوندهای بین و درون زنجیره‌ای، ساختار فضایی پروتئین تحت تاثیر قرار گرفته و با دناتوره شدن پروتئین، پایداری آن کاهش می‌یابد. بنابراین بین افزایش دما و تغییرات جذب نوری فیکوسیانین ارتباط معکوس وجود دارد. Sarada و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند که جذب نوری فیکوسیانین در طول ۶ روز نگهداری در دماهای ۴ و ۹ درجه سانتی گراد تغییر معنی‌داری نداشته ولی با افزایش دما به ۳۰ ، ۵۵ و ۶۵ درجه سانتی گراد، جذب نوری فیکوسیانین کاهش یافته به‌طوری‌که در دماهای ۵۵ و ۶۵ درجه سانتی گراد، جذب نوری فیکوسیانین به ترتیب بعد از ۳ و ۲ روز به صفر رسید. نتایج گزارش Sarada با نتایج مطالعه حاضر شامل تغییرات فیکوسیانین در دمای ۴ درجه سانتیگراد (هر سه pH ۴/۵ ، ۵/۵ و ۷) و دمای ۱۰ درجه سانتی گراد در pH=۴/۵ همخوانی داشته ولی با دمای ۱۰ درجه سانتی گراد در pH=۵/۵ مغایرت دارد.

بررسی اثر متقابل دما × زمان × pH: بیشترین پایداری فیکوسیانین در این مطالعه، در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد بوده و با افزایش دما تا ۱۰ درجه سانتی گراد، غلظت فیکوسیانین در همه بازه‌های زمانی نگهداری (۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز) کاهش می‌یابد. در مطالعه انجام شده توسط Chaiklahan و همکاران (۲۰۱۲) مشخص گردید که غلظت فیکوسیانین در دمای ۴ درجه سانتی گراد پس از ۱۲۰ روز کاهش نسبی داشته و این روند در pH=۵ بیشتر از pH های ۶ و ۷ بوده و بیشترین پایداری در pH=۶ گردید. با توجه به ماهیت پروتئینی فیکوسیانین، به نظر می‌رسد که این رنگدانه در دماهای پائین و pH های ۶ و یا ۷ کمتر تحت تاثیر آلودگی و تجزیه میکروبی قرار گرفته و ساختار پروتئینی آن حفظ شده هرچند که غلظت آن بطور محسوسی کاهش یافته است (Doke, 2005).

نتایج تجزیه و تحلیل آماری انجام گرفته در این مطالعه بیانگر اثر متقابل معنی‌دار دما × زمان × pH بر غلظت فیکوسیانین بوده که برای به حداقل رساندن کاهش غلظت فیکوسیانین، شرایط pH=۴/۵، دمای ۱۸- درجه سانتی گراد و بازه زمان نگهداری ۳۰ روزه پیشنهاد می‌شود. با توجه به نتایج بدست آمده، فیکوسیانین قابلیت استفاده در بستنی و فراورده های لبنی و سایر فراورده هایی که در دمای پائین نگهداری می‌شوند را دارا می‌باشد. با توجه به آنکه مقدار فیکوسیانین مورد مصرف در فرمولاسیون فرآورده‌های مذکور کم می‌باشد، به نظر می‌رسد که قیمت تمام شده محصول چندان افزایش پیدا نکند. از سوی دیگر به لحاظ خواص درمانی و آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین، استفاده از آن موجب ارتقاء امنیت غذایی و سلامت افراد شده و افزایش جزئی در قیمت تمام شده محصول از این نظر توسط مصرف‌کننده قابل پذیرش می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از همکاری پرسنل بخش بیوتکنولوژی آبزیان پژوهشکده اکولوژی دریای خزر آقایان مهندس مجید ابراهیم زاده و علی اکبر عرب احمدی تشکر و قدرانی می نمایند.

منابع

انصاری فرد، ف.، رجبی اسلامی، ه.، شمسایی مهرجان، م. و سلطانی، مهدی.، ۱۳۹۶. تاثیر مکمل اسپیرولینا بر سیستم ایمنی و فاکتورهای بیوشیمیایی خون ماهی کوی (*Cyprinus carpio carpio*). مجله علمی شیلات ایران، ۳(۲۶): ۳۳-۲۳.

مستولی زاده، ص.، مرادی، ی.، مرتضوی، م.ص.، مطلبی، ع. و قائنی، م.، ۱۳۹۶. تاثیر افزودن پودر میکروجلبک اسپیرولینا بر ترکیب اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه پاستا. مجله علمی شیلات ایران، ۴(۲۶): ۱۳۱-۱۱۹.

Antelo, F.S., Anschau, A., Costa, J. and Kalil, S.J., 2010. Extraction and purification of C-phycocyanin from

Spirulina platensis in conventional and integrated aqueous two-phase systems. Journal of the Brazilian Chemical Society, 21: 1-12.

Antelo, F.S., Costa, J.A.V. and Kalil, S.J., 2008. Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. Biochemistry Engineering Journal, 41: 43–47.

Chaiklahan, R., Chirasuwan, N. and Bunnag, B., 2012. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. Process Biochemistry, 47: 659–664.

Doke, J.M., 2005. An improved and efficient method for the extraction of phycocyanin from *Spirulina* sp. International Journal of Food Engineering, 1: 1–13.

Duangsee, R., Phoopat, N. and Ningsanond, S., 2009. Phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* and extract stability under various pH and temperature. Asian Journal of Food and Agro-Industry, 4: 819-826.

Durai, P., Batool, M. and Choi, S., 2015. Structure and effects of cyanobacterial lipopolysaccharides. Marine Drugs, 13: 4217-4230.

Eriksen, N.T., 2008. Production of Phycocyanin – a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. Applied Microbiology and Biotechnology, 80: 1–14.

Intergovernmental Institution for the use of Micro-algae *Spirulina* against malnutrition, 2014. Establishing spirulina cultivation facility & humanitarian aid distribution facility for spirulina & phycocyanin to combat severe hunger and malnutrition with IIMSAM. Final report. pp: 1-92.

Ismaiel, M.M., El-Ayouty, Y.M. and Piercey-Normorea, M., 2016. Role of pH on antioxidants production by *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*. Brazilian Journal of Microbiology, 47: 298–304.

Jaouen, P., Lépine, B., Rossignol, N., Royer, R. and Quéméneur, F., 1999. Clarification and concentration with membrane technology of a phycocyanin solution extracted from *Spirulina platensis*. Biotechnology Techniques, 13: 877–81.

Jerley, A.A. and Prabu, D.M., 2015. Purification, characterization and antioxidant properties of C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. Scrutiny International Research Journal of Agriculture, Plant Biotechnology and Bio Products, 2: 7-15.

Jesperse, L., Strømdahl, L.D., Olsen, K. and Skibsted, L.H., 2005. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionary and beverages. European Food Research and Technology, 220: 261–266.

Joshi, M., Kaur, K., Mishra, T. and Singh, S., 2014. To evaluate lab scale cultivation of spirulina by using different substrates and to evaluate its chlorophyll and protein content. International Research Journal of Biological Science, 3: 22-30.

Kamble, S.P., Gaikar, R.B., Padalia, R.B. and Shide, K.D., 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: 149-153.

Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G. and Al-Hazimi, A., 2013. Recent developments in production and biotechnological applications of C- Phycocyanin. BioMed Research International, Article ID 742859, 9P.

Kumar, D., Kumar, N. and Pabbi, S., 2013. Protocol optimization for enhanced production of pigments in Spirulina. Indian Journal of Plant Physiology, 18: 308–312.

Leema, J.T., Kirubagaran, R., Vinithkumar, N.V., Dheenan, P.S. and Karthikayulu, S., 2010. High value pigment production from *Spirulina platensis* cultured in seawater. Bioresource Technology, 101: 9221–7.

Liu, L., Chen, X., Zhang, X., Zhang, X. and Zhou, B., 2005. One- step chromatography method for efficient separation and purification of R- phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. Journal of Biotechnology, 116: 91–100.

Mishra, S.K., Shrivastav, A. and Mishra, S., 2008. Effect of preservatives for food grade C-PC from *Spirulina platensis*. Process Biochemistry, 43: 339–45.

Moraes, C.C., Luisa Sala, G.P. and Kalil, S.J., 2011. C-Phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 28(1): 45–49.

Muthulakshmi, M., Saranya, A., Sudha, M. and Selvakumar, G., 2012. Extraction, partial purification, and antibacterial activity of phycocyanin from Spirulina isolated from fresh water body against various human pathogens. Journal of Algal Biomass Utilization, 3: 7–11.

Prabakaran, P. and Ravindran, A.D., 2013. Efficacy of different extraction methods of phycocyanin from *Spirulina platensis*. International Journal of Research in Pharmacy and Life Sciences, 1: 15-20.

Sarada, R., Pillai, M.G. and Ravishankar, G.A., 1999. Phycocyanin from Spirulina sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. Process Biochemistry, 34: 795–801.

Saranraj, P. and Sivasakthi, S., 2014. *Spirulina platensis* –Food for future. Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology, 4: 26-33.

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 & Biochemical Technology, 6: 202-206.

Silveira, S.T., Burkert, J.F.M., Costa, J.A.V., Burkert, C.A.V. and Kalil, S.J., 2007. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. Bioresource Technology, 98: 1629–34.

Sivasankari, S., Ravindran, N. and Ravindran, D., 2014. Comparison of different extraction methods for phycocyanin extraction and yield from *Spirulina platensis*. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3: 904-909.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering, 101: 87–96.

Vonshak, A., 1997. *Spirulina platensis*: physiology, cell-biology and

biotechnology. Taylor & Francis, London, UK. 233P.

Yu, P., Wu, Y., Wang, G., Jia, T. and Zhang, Y., 2016. Purification and bioactivities of phycocyanin. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2016.1167668. Cited 16 May 2016.

Evaluation of the effect of temperature, time and pH on stability of phycocyanin extracted from *Spirulina platensis*

Safari R.[1]; Raftani Amiri Z.[1*]; Esmaeilzadeh Kenari R.[1]

[*] zramiri@gmail.com

1-Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

Abstract

Phycocyanin is a blue pigment of Spirulina algae that has antioxidant, anticancer and anti-inflammatory properties. In this study, primary culture of Spirulina was performed in the modified Zarrouk medium. Phycocyanin was extracted enzymatically using lysozyme and was purified by the use of ammonium sulfate 40% solution. The stability of phycocyanin was evaluated by the split factorial experiment in a completely randomized design based on three factors including temperature (-18, 4 and 10°C), pH (4.5, 5.5 and 7) and time (15, 30 and 45 days). The concentration and purity of phycocyanin in the crude extract were 1.815 mg/ml and 0.825, respectively whereas the concentration and purity of phycocyanin in the purified extract were 3.751 mg/ml and 1.135, respectively. The results showed that the stability of phycocyanin was relatively decreased by increasing the storage time at various temperatures. However, the highest stability of phycocyanin was observed at -18°C followed by 4°C with the same trend in the range of pH. By increasing the storage temperature to 10°C, the stability of phycocyanin drastically reduced especially in a pH of 5.5 and the absorbance of light was reached to zero in 30 days. The best conditions for the minimum concentration loss of phycocyanin were in a pH of 4.5 at -18 °C and storage duration of 30 days. According to the results, it is possible to use phycocyanin in the food products that are stored in cold or freezing temperatures such as dairy products and ice cream.

Keywords: Spirulina platensis, Phycocyanin pigment, Stability, Environmental parameters

*Corresponding author