

## فایکوسیائین: ترکیب زیست‌فعال دریایی نوین، ساختار و روش‌های استخراج

سید مهرداد حسنی اژدری<sup>۱</sup>، زهرا حسین آبادی<sup>۲</sup>، سید ولی حسینی<sup>۳\*</sup><sup>۱</sup>گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.<sup>۲</sup>گروه بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

\*نویسنده مسئول hosseinisv@ut.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۲۷

## چکیده

اقیانوس‌ها و دریاها بیش از هفتاد درصد از مساحت کره زمین را به خود اختصاص داده‌اند. این زیستگاه‌ها محل حضور بسیاری از ماکرو و میکرو ارگانیسم‌هایی هستند که توانایی تولید ترکیبات مختلف زیست‌فعال با کاربردهای مختلف جهت رفع نیازهای بشر را دارند. بسیاری از رنگدانه‌ها به خصوص فایکوسیائین از جمله این ترکیبات زیست‌فعال قابل استحصال از ارگانیسم‌های آبی هستند. فایکوسیائین پروتئینی از خانواده فیکوبیلی‌پروتئین‌ها است که رنگ آبی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی از ویژگی‌های آن‌ها می‌باشد. این پروتئین یکی از رنگدانه‌های اصلی سیانوباکتری‌ها و بسیاری از جلبک‌های دریایی از جمله جلبک‌های قرمز می‌باشد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی این رنگدانه، آن را به گزینه‌ای مناسب جهت استفاده به عنوان افزودنی غذایی تبدیل کرده است. علاوه بر این، فایکوسیائین استفاده گسترده‌ای در بخش‌هایی مانند صنایع آرایشی و بهداشتی و همچنین پزشکی دارد. برای استفاده از فایکوسیائین روش‌های مختلفی جهت استخراج آن وجود دارد که هر کدام دارای مزایا و معایبی می‌باشد. مطالعه حاضر سعی در معرفی و مرور فایکوسیائین و ساختار آن و همچنین روش‌های مختلف استخراج و تاثیر فاکتورهای دخیل در این فرآیند دارد.

واژگان کلیدی: فاکوسیائین، فاکوبیلی‌پروتئین، رنگدانه، ترکیبات زیست‌فعال دریایی.

## مقدمه

به‌طور کلی در طول ۴ دهه گذشته بیش از ۱۰۰۰۰ ترکیب زیست‌فعال مختلف از این موجودات دریایی به‌دست آمده است و هم‌اکنون این روند کشف و استحصال ترکیبات مختلف رشد چشمگیری دارد. در این میان جلبک‌ها دارای طیف وسیعی از ترکیبات زیست‌فعال از جمله اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (Polyunsaturated fatty acids)، ویتامین‌ها (گروه B)، کاروتنوئیدها، پلی‌فنل‌ها، فیبرهای غذایی، پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و ... هستند که پتانسیل گسترده‌ای در استفاده‌های مختلف صنعتی دارند (Ibañez et al., 2012). همچنین جلبک‌ها تولید کننده بالقوه ترکیباتی با فعالیت ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد توموری نیز می‌باشند (Amaro HM et al., 2011). ریزجلبک‌ها از جمله منابع زیستی مهم برای تولید ترکیبات زیست‌فعال جدید هستند که دارای ترکیبات ارزشمندی از جمله اسیدهای چرب

اقیانوس‌ها و دریاها بیش از ۷۰٪ از سطح کره زمین را در بر گرفته و دارای ارگانیسم‌هایی هستند که توانایی تولید ترکیبات با قابلیت‌هایی همچون خاصیت دارویی و قابلیت استفاده در صنایع غذای را دارند. طبق گزارش‌های مختلف حدود ۳۰۰۰۰۰ گونه شناخته شده از انواع ماکرو و میکرو ارگانیسم در اقیانوس‌ها وجود دارد، با این حال برآورد می‌شود که تعداد کل گونه‌ها بیش از این مقدار باشد. از انواع میکروارگانیسم‌های دریایی می‌توان به انواع باکتری‌ها، سیانوباکتری‌ها، ریزجلبک‌ها و ... که در بعضی مواقع با دیگر گیاهان و حیوانات ساکن آب هم‌زیست می‌باشند اشاره کرد (عبادی گل تپه و همکاران، ۱۳۹۸).

هر کدام از میکروارگانیسم‌های دریایی نوع خاصی از ترکیبات زیست‌فعال را تولید می‌کنند که معمولاً با ترکیباتی که توسط موجودات خشکی تولید می‌شوند متفاوت هستند (عبادی گل تپه و همکاران، ۱۳۹۸).

می‌گیرد که در آن فاکتورهای مؤثر بر روند استخراج و همچنین روش‌های مختلفی که می‌توان برای استخراج این رنگدانه مورد استفاده قرار داد، معرفی می‌شوند تا با توجه به سایر عوامل بهترین راهبرد برای استحصال هرچه بهینه‌تر این رنگدانه توسط محققین اتخاذ شود.

**فایکوسیانین:** PC که یکی از رنگدانه‌های اصلی بسیاری از سیانوباکتری‌ها و جلبک‌های یوکاریوتی مثل رودوفیتا و کریپتوموناداها می‌باشد (Glazer and Stryer, 1983)، که در جدول ۱ تعدادی از گونه‌های مناسب برای استحصال این رنگدانه معرفی شده‌اند. پروتئینی از خانواده PBP (Patel et al., 2005) بوده و از مشخصه‌های آن می‌توان به رنگ آبی اشاره نمود. PBP ها از فراوان‌ترین پروتئین‌ها در بسیاری از گونه‌های سیانوباکتری‌ها و جلبک‌ها می‌باشند. با این حال، تصور می‌شود که PBP ها برای عملکرد سلول چندان ضروری نمی‌باشند، زیرا در صورت فقدان نیتروژن تجزیه می‌شوند. لذا، PBP ها را به‌عنوان منبعی برای ذخیره نیتروژن در نظر می‌گیرند (Sloth et al., 2006). PBP ها در آب محلول بوده و رنگ روشنی دارند، علاوه بر این دارای خاصیت فلورسنت بالا هستند. همچنین، ویژگی‌های کیفی و کمی متفاوت و منحصر به فردی از جمله طیف وسیع جذب نور مرئی و ضریب جذب بالا را از خود نشان می‌دهند (Glazer and Stryer, 1983; Chattopadhyay et al., 2012). در میان PBP ها، PC رنگدانه اصلی سنتز شده توسط سیانوباکتری‌ها است که تا ۲۰ درصد از وزن توده سلولی آن‌ها را تشکیل می‌دهد (Hsieh-Lo et al., 2019). به‌طور کلی PC را با توجه به خواص به سه نوع C-PC (به‌دست آمده از سیانوباکتری‌ها)، R-PC (به‌دست آمده از جلبک‌های قرمز) و R-PCII (به‌دست آمده از گونه‌های *Synechococcus*) طبقه‌بندی می‌شوند (Kuddus et al., 2013; Wang et al., 2014).

به‌طور کلی PC به‌عنوان افزودنی ایمن (Generally Recognized As Safe) شناخته می‌شود که می‌توان

غیراشباع، رنگدانه‌های مختلف و ترکیبات با قابلیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (Sousa et al., 2008). از بین بسیاری از ترکیبات مغذی و زیست‌فعال به‌دست آمده از ریز جلبک‌ها، رنگدانه‌ها به‌دلیل کاربرد فراوان و فرآیند ساده استخراج، حائز اهمیت می‌باشند. بسیاری از رنگدانه‌هایی که در مقیاس تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرند از منابع غیرطبیعی به‌دست می‌آیند که البته دارای اثرات مضر می‌باشند، این امر لزوم استفاده از رنگدانه‌های با منبع طبیعی را بیش از پیش مشخص می‌سازد (Borowitzka, 1995). امروزه رنگ‌های طبیعی در زمینه‌هایی مثل صنایع غذایی، دارویی و صنایع آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. با این حال برخی از این رنگدانه‌ها بنا به دلایلی همچون توانایی ضعیف در ایجاد رنگ و ماندگاری کوتاه مدت در بخش صنایع استفاده محدودی دارند. در این میان فاکوبیلی پروتئین‌ها (Phycobiliproteins) که فایکوسیانین‌ها (Phycocyanin) جزئی از آن‌ها می‌باشند، رنگ‌های پروتئینی طبیعی هستند و در صنعت غذا و دارو کاربرد دارند (Sousa et al., 2008). فایکوسیانین در کشورهایی مثل ژاپن و چین در نقش رنگدانه طبیعی در محصولات غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Jespersen et al., 2005). لازم به ذکر است که بخش اعظمی از این رنگدانه‌های طبیعی دارای قابلیت آنتی‌اکسیدانی نیز هستند (Batista et al., 2006). در حال حاضر چیزی در حدود ۱۱ شرکت در دنیا مشغول تولید و فروش PBP ها و مشتقات آن‌ها همچون PC هستند (Sekar et al., 2008). PC توسط یک شرکت ژاپنی با عنوان Blue Lina تجاری‌سازی شده است که این محصول پودری آبی رنگ، غیرسمی، بدون بو و شیرین است (Cisneros and Rito-Palomares, 2004). هدف از این مطالعه معرفی PC به‌عنوان یک رنگدانه کاربردی با استفاده گسترده در صنایع غذایی و دارویی، به‌دست آمده از ریزجلبک‌ها و جلبک‌های دریایی می‌باشد، همچنین در ادامه استخراج این رنگدانه مورد بررسی قرار

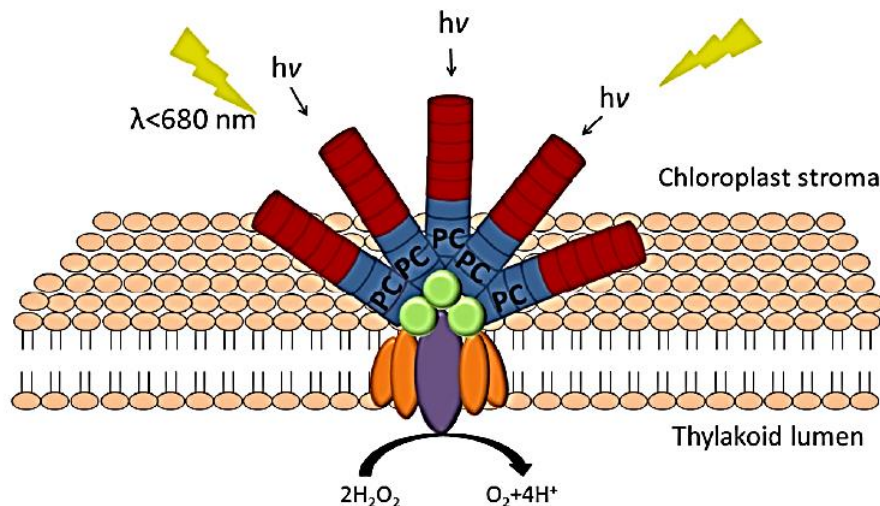
جدول ۱- برخی از گونه‌های مورد استفاده برای استخراج PC.

منبع	گونه
Samsonoff <i>et al.</i> , 2001	<i>Acaryochloris marina</i>
Gantar <i>et al.</i> , 2012	<i>Anabaena</i>
Chapman <i>et al.</i> , 1968	<i>Anabaena variabilis</i>
Gantar <i>et al.</i> , 2012	<i>Aphanotheca</i>
Chapman <i>et al.</i> , 1968	<i>Anacystis nidulans</i>
Shanab <i>et al.</i> , 2012	<i>Anabaena flous aquae</i>
Chapman <i>et al.</i> , 1968	<i>Calothrix membranacea</i>
Samsonoff <i>et al.</i> , 2001	<i>Cryptomonads</i>
Samsonoff <i>et al.</i> , 2001	<i>Cyanidium caldarium</i>
Samsonoff <i>et al.</i> , 2001	<i>Democarpa violacea</i>
Sørensen <i>et al.</i> , 2013 ; Moon <i>et al.</i> , 2014	<i>Galdieria sulphuraria</i>
Gantar <i>et al.</i> , 2012	<i>Limnothrix</i>
Gantar <i>et al.</i> , 2012	<i>Lyngbya sp.</i>
Chapman <i>et al.</i> , 1968	<i>Microcystis aeruginosa</i>
Chittapun <i>et al.</i> , 2020	<i>Nostoc commune</i>
Chittapun <i>et al.</i> , 2020	<i>Oscillatoria okeni</i>
Thangam <i>et al.</i> , 2013	<i>Phormidium bigranulatum</i>
Kumari <i>et al.</i> , 2014	<i>Phormidium fragile</i>
Chapman <i>et al.</i> , 1968	<i>Plectonema boryanum</i>
Wang <i>et al.</i> , 2014	<i>Polysiphonia urceolata</i>
Sarada <i>et al.</i> , 1999; Silveira <i>et al.</i> , 2007; Tavanandi <i>et al.</i> , 2018; İter <i>et al.</i> , 2018; Käferböck <i>et al.</i> , 2020; Akaberi <i>et al.</i> , 2020; Ferreira-Santos <i>et al.</i> , 2020;	<i>Spirulina sp.</i>
Chapman <i>et al.</i> , 1968	<i>Synechococcus lividus</i>
Shanab <i>et al.</i> , 2012	<i>Wollea saccata</i>

آن را به عنوان رنگ در فرمولاسیون محصولات غذایی مانند دسر، شیرینی، تزئین کیک، آدامس، ژله و بستنی و همچنین در لوازم آرایشی، نوشیدنی‌های الکلی، بیوتکنولوژی و پزشکی (دارو) مورد استفاده قرار داد (Yoshida *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2010; Antelo *et al.*, 2008). نحوه دسته‌بندی PC

برای کاربردهای مختلف بر اساس میزان خلوص آن می‌باشد. در گذشته اعتقاد بر این بود که PC نسبت به نور حساسیت ندارد (Abeliovich *et al.*, 1972) اما شواهد اخیر نشان می‌دهد که این رنگدانه نسبت به نور حساس بوده و لازم است در تاریکی نگهداری شود (Benedetti *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2014). علت این حساسیت این است که PC در حضور نور گونه‌های اکسیژن‌فعال (Reactive Oxygen Species) را که از عوامل ایجاد اکسایش هستند، تولید می‌کند. علاوه بر این، این پروتئین باید در دمای بین ۴ تا ۵ درجه سانتی‌گراد خالص شود، (Benedetti *et al.*, 2006; Jian-Feng *et al.*, )

PC دارای ظرفیت واکنشی در برابر گونه‌های اکسیژن‌فعال، مانند رادیکال هیدروکسیل (Hydroxyl Radical)، رادیکال آلکوکسیل (Alkoxy Radical) و رادیکال پراکسیل (Proxyl Radical) است، علاوه بر این دارای خواص ضد التهابی، ضد میکروبی، محافظت‌کننده سیستم عصبی و محافظت از کبد می‌باشد (Estrada *et al.*, 2001; Fernández-; Rojas *et al.*, 2014). بنابراین، علاقه و تمایل به استفاده از PC به دلیل رنگ آبی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می‌باشد. ساختار: فایکوبیلیزوم‌ها (Phycobilisome) فقط در سیانوباکتری‌های پروکاریوتی و جلبک‌های قرمز

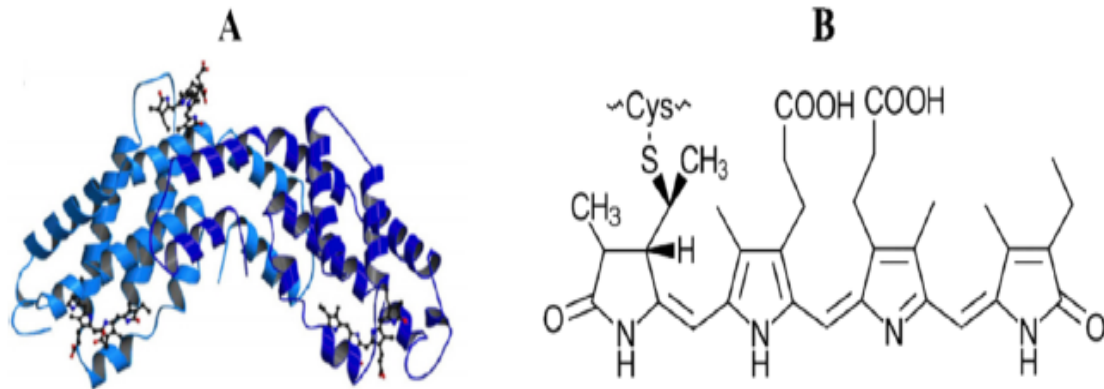


شکل ۱- ساختار PBS برگرفته از: (Fernández-Rojas *et al.*, 2014). مجموعه اصلی جمع‌آوری انرژی نورانی در سیانوباکتری‌ها و جلبک‌های قرمز. PBS ها از صدها کروموفور به ظاهر مشابه، که پروتئین هستند، تشکیل شده‌اند و به گونه‌ای چیده شده‌اند که انتقال بسیار کارآمد انرژی را به صورت یک طرفه به مرکز واکنش امکان‌پذیر می‌کند. چندین PBP در یک آبشار انتقال انرژی از PE (استوانه‌های قرمز) به PC (استوانه آبی) و APC (کره سبز) و در نهایت به مرکز واکنش در فتوسیستم II (بیضی بنفش) و I (بیضی‌های نارنجی) دخیل هستند.

جذب می‌شود، انرژی نوری از کروموفورهای پراانرژی PE عبور کرده و به PC می‌رسد، بعد از طریق کروموفورهای انرژی متوسط PC عبور کرده و به کروموفورهای کم انرژی APS با بازده کلی نزدیک به ۱۰۰٪ منتقل شده و در نهایت به کلروفیل a موجود در فتوسیستم‌های I و II منتقل می‌شود. بنابراین، PC نقش مهمی در واسطه انتقال انرژی نورانی از PE ها به APS ها و همچنین ساختار PBS دارند (L Sun *et al.*, 2009).

ساختار PC از یک مونومر تشکیل شده است که دو زیر واحد مارپیچ شکل به نام‌های آلفا ( $\alpha$ ) و بتا ( $\beta$ ) دارد، یک کروموفور بیلین به زیر واحد  $\alpha$  و دو عدد از آن‌ها به زیر واحد  $\beta$  متصل است. مونومرها با هم جمع می‌شوند و یک تریمر حلقه‌ای  $(\alpha\beta)_3$  را تشکیل می‌دهند که منجر به ساختارهای هگزامری می‌شود  $[(\alpha\beta)_3]_2$  (Fernández-Rojas *et al.*, 2014; Ferraro *et al.*, 2020). کروموفوری به نام فایکوسیانیوبیلین (Phycocyanobilin)، مسئول رنگ آبی مولکول است و از یک گروه تتراپیرول زنجیره‌باز تشکیل شده است که پروتئین‌ها را از طریق پیوند تیو اتر (Thioether) متصل می‌کند (شکل ۲) (Stanek

یوکاریوتی وجود دارند. PBS ها روی سطح خارجی تیلاکوئیدها، جایی که فتوسنتز انجام می‌شود، قرار دارند و به‌عنوان بخشی از سیستم جذب نور عمل می‌کنند (Glazer, 1984; Galland-Irmouli *et al.*, 2000; Li Sun *et al.*, 2004). به‌عنوان یک کمپلکس فوق مولکولی (Supramolecular complex)، معمولاً دارای دو زیر ناحیه هستند: میله‌های محیطی و هسته مرکزی. هر دو زیر ناحیه از PBP ها و پلی‌پپتیدهای پیونددهنده مربوط به آن‌ها تشکیل شده‌اند. PBP ها با توجه به ویژگی‌های جذب نور به سه گروه تقسیم می‌شوند: فایکواریترین‌ها (Phycocerythrin) ( $\lambda_{max}=565$  نانومتر)، PC ها ( $\lambda_{max}=620$  نانومتر) و آلو فایکوسیانیین‌ها (Alo Phycocerythrin) ( $\lambda_{max}=650$  نانومتر). در PBS ها، PE ها در نوک میله‌های PBS قرار دارند، PC ها که همیشه در مجاورت هسته‌های PBS هستند در انتهای دیگر میله‌ها قرار دارند و در این بین APS ها تنها نوع PBP ها هستند که با کمک پلی‌پپتیدهای پیونددهنده هسته جمع می‌شوند و هسته‌های PBS را تشکیل می‌دهند. هنگامی که نور خورشید توسط PBS ها



شکل ۲- (A) نمایش شماتیک زیر واحدهای  $\alpha$  (رنگ روشن تر) و  $\beta$  (رنگ تیره تر) PC. (B) ساختار شیمیایی PCB (اقتباس از: Hsieh-Lo *et al.*, 2019).

تخریبی احتمالاً مربوط به تغییراتی در ساختارهای دوم، سوم و چهارم پروتئین هستند که در دماهای بالا ایجاد می‌شوند (Ferreira-Santos *et al.*, 2020). بنا به دلایل فوق ممکن است در روند استخراج از دماهای بالا اجتناب و ترجیح بر استفاده از روش‌های قابل انجام در دماهای پایین باشد. اکثر روش‌هایی که برای تخریب مکانیکی دیواره سلولی استفاده می‌شوند در دمای ۲۵ الی ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام می‌گیرند (İlter *et al.*, 2018; Pan-utai *et al.*, 2019; Tavanandi *et al.*, 2020). علاوه بر این، دما تأثیر زیادی بر خلوص عصاره خام به‌دست آمده نیز دارد به‌طوری‌که دمای بالا استخراج دیگر پروتئین‌های سیتوپلاسمی و سایر ترکیبات دیگر را امکان‌پذیر می‌کند که نتیجه آن کاهش خلوص PC به‌دست آمده و ضرورت انجام فرآیندهای خالص‌سازی بعد از استخراج می‌باشد (Silveira *et al.*, 2007).

**pH و نوع حلال مورد استفاده:** pH به‌دلیل تأثیری که قدرت یونی حلال بر ساختار پروتئین دارد، مستقیماً بر حلالیت PC تأثیر می‌گذارد. بهترین دامنه pH برای استخراج PC بین ۶ و ۷ گزارش شده است (C.-H. Su *et al.*, 2014; Vali Aftari *et al.*, 2015)، زیرا PC در pH های کمتر از ۵ و بالاتر از ۸ ناپایدار می‌باشد (G Patil *et al.*, 2007; C.-H. Su *et al.*, 2014). در واقع اثر pH بر پایداری PC از طریق کنترل تشکیل مونومرها، تریمرها، هگزامرها و

(*et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2021).

### روش‌های استخراج

**عوامل موثر بر استخراج:** استخراج PC عمدتاً تحت تأثیر پارامترهای فیزیکی و شیمیایی همچون دما، pH، نوع حلال، نسبت زیست‌توده به حلال و خشک یا تازه بودن زیست‌توده می‌باشد (Jaeschke *et al.*, 2021) که در ادامه نحوه اثر هرکدام بیان می‌شود.

**دما:** تأثیر دما بر استخراج ترکیبات زیست‌فعال درون سلولی از طریق تغییراتی است که در ساختار غشای سلولی ایجاد می‌کند و موجب خروج این ترکیبات به محیط بیرون می‌شود. در مورد استخراج PC، بازده این فرآیند با بالا رفتن درجه حرارت افزایش می‌یابد. البته این افزایش دما تا حدی می‌تواند بر روند استخراج تأثیر مثبت داشته باشد به عنوان مثال گزارش شده که بازده استخراج با افزایش دما از ۳۰ به ۵۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافته است در صورتی که در دماهای بالاتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد کاهش غلظت PC استخراج شده در مقایسه با غلظت‌های استخراج شده در دماهای پایین‌تر مشاهده شده است (Su *et al.*, 2014). علت این امر نیز دنا توره شدن ساختار پروتئینی PC است که در دمای بیش از ۵۰ درجه سانتی‌گراد ایجاد می‌شود و به موجب آن تغییراتی در پایداری کروموفور (Muller, 1994) و تغییرات رنگ ایجاد می‌شود (Jespersen *et al.*, 2005; C.-H. Su *et al.*, 2014). این واکنش‌های

بالاتر است. با این حال، میزان بالای نسبت زیست‌توده به حلال موجب کاهش خلوص عصاره استخراج شده می‌شود. نسبت زیست‌توده به حلال برای استخراج PC از سیانوباکتری‌ها توسط تعداد کمی از محققان ارزیابی شده و نتایجی که در این زمینه به دست آمده تا حدودی مبهم هستند. حلالی مثل بافر فسفات سدیم (PH برابر ۸/۶) در نسبت‌های ۱:۰.۶، ۱:۰.۸ و ۱:۱.۰ (w:v) ارزیابی شد که در نسبت ۱:۱۰ بالاترین بازده استخراج حاصل شد. با این حال، در نسبت ۱:۰.۶ حلال به زیست‌توده، PC استخراج شده بالاترین میزان خلوص را داشت. افزایش قابلیت دسترسی حلال علاوه بر اینکه می‌تواند موجب افزایش میزان استخراج شود، کاهش خلوص عصاره بدست آمده نیز سبب می‌شود (Tavanandi *et al.*, 2018). سایر محققان برای بررسی نسبت مناسب حلال به زیست‌توده برای فرآیند استخراج نسبت‌های ۱:۰.۵، ۱:۰.۲۵ و ۱:۰.۵۰ را با استفاده از بافر سدیم‌فسفات (PH برابر ۷) و همچنین دستگاهی به نام Ultra-Turrax (وسيله‌ای برای هموزن یا همگن کردن) به‌عنوان روشی برای تخریب دیواره سلولی مورد ارزیابی قرار دادند. بالاترین بازده استخراج و خلوص در نسبت زیست‌توده به حلال ۱:۰.۵۰ به دست آمد (Pan-utai *et al.*, 2019). طبق مطالعات، نسبت‌های حلال به زیست‌توده رایج مورد استفاده عبارتند از: ۱:۰.۲۵ (Silveira *et al.*, 2007)، ۱:۰.۲۰ (Su *et al.*, 2017; Ferreira-Santos *et al.*, 2020; H.-N. Su *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2020) و ۲:۰.۲۵ (Silveira *et al.*, 2007; Vali *et al.*, 2015). علاوه بر بازده استخراج و خلوص عصاره‌ها، در نظر گرفتن هزینه‌های فرآیند نیز مهم است، چرا که افزایش نسبت زیست‌توده به حلال ممکن است هزینه‌های مربوط به حلال را افزایش دهد افزون براینکه ملاحظات زیست‌محیطی استفاده زیاد از حلال‌ها را نیز باید مدنظر قرار داد.

خشک یا تازه بودن زیست‌توده: به‌طور کلی از زیست‌توده خشک برای استخراج PC استفاده می‌شود و مطالعات اندکی در رابطه با استفاده از زیست‌توده

سایر الیگومرها می‌باشد؛ ساختار هگزامری در برابر داناتوره شدن مقاوم است با این حال در pHهای بالا این ساختارها به تریمر تبدیل می‌شوند؛ در دو مطالعه مجزا اینگونه بیان شد که در pH برابر با ۶، فرم تریمری ۲۳ درصد از پروتئین را تشکیل می‌دهد و بقیه مربوط به فرم هگزامری می‌باشد، در حالی که در pH برابر با ۷ چیزی در حدود ۸۲ درصد از فیکوسیانین دارای ساختار تریمری می‌باشد (Chaiklahan *et al.*, 2012). نقطه ایزوالکتریک PC بسته به منبعی که از آن استخراج شده بین ۴/۱ و ۶/۴ متغیر است (Fernández-Rojas *et al.*, 2014). در نزدیکی نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌ها تعامل کمتری با آب دارند که موجب سخت‌تر شدن فرآیند استخراج می‌شود (Silveira *et al.*, 2007). علاوه بر این عصاره‌های به دست آمده در مقادیر pH پایین (زیر ۵) میزان خلوص کمتری دارند (G Patil *et al.*, 2007). برای کنترل pH محیط استخراج، معمولاً از محلول بافر آبی به‌عنوان حلال در محدوده‌ای از pH که رنگدانه در آن پایدار است، استفاده می‌شود. متداول‌ترین محلول بافر مورد استفاده، سدیم‌فسفات (pH 6-8) است. علاوه بر محلول‌های بافر، آب مقطر و سایر محلول‌های آبی مانند  $\text{CaCl}_2$  (1.5% w/v) و NaCl (۰/۱۵ مولار) نیز به‌عنوان حلال استفاده می‌شوند (Silveira *et al.*, 2018; İter *et al.*, 2007). طبق نتایج برخی از محققان، محلول آبی ۱/۵ درصد  $\text{CaCl}_2$  در مقایسه با آب مقطر و بافر سدیم‌فسفات (PH برابر ۷) منجر به بازده بالاتر استخراج می‌شود. سایر محققان با استفاده از بافر سدیم‌فسفات (PH برابر ۷)، آب مقطر، محلول NaCl (۰/۱۵ مولار) و محلول  $\text{CaCl}_2$  (10  $\text{g L}^{-1}$ ) بازده استخراج مشابهی را به دست آوردند. از سوی دیگر، طبق مطالعات در صورت استفاده از بافر استات (PH برابر ۵) بازده کمتری در استخراج PC شاهد خواهیم بود (Silveira *et al.*, 2007).

نسبت زیست‌توده به حلال: به‌طور کلی، هر چه نسبت زیست‌توده به حلال بیشتر باشد، بازده استخراج

ایجاد تغییراتی در فشار غشای سلولی و فشار اسمزی می‌شود که این فرآیند به دلیل تغییر در غلظت الکترولیت‌ها بوده و آسیب غشای سلولی را تسهیل می‌کند (Roquebert *et al.*, 1993; Acker *et al.*, 2003). تعداد کمی از محققان تأثیر تعداد دفعات این انجماد و رفع انجماد بر بازده فرآیند استخراج PC و خلوص آن را بررسی کرده‌اند. Tavanandi و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که تعداد ۴ انجماد و رفع انجماد شرایط بهینه‌ای را برای استخراج با بازدهی بالای PC آن هم در حالتی که میزان خلوص بالایی دارد فراهم می‌کند. افزایش بیشتر در تعداد چرخه‌ها (۵ و ۶ چرخه) باعث آزاد شدن دیگر ترکیبات غیرهدف شده و خلوص عصاره به دست آمده را کاهش می‌دهد. تعداد دیگری از محققان تأثیر تعداد ۱، ۲، ۳ و ۴ چرخه را بر بازده استخراج و خلوص عصاره ارزیابی کردند و در این بین استفاده از ۳ انجماد و رفع انجماد را به عنوان بهترین شرایط معرفی کردند (Saran *et al.*, 2016). استفاده از چرخه‌های انجماد و رفع انجماد علاوه بر تأثیری که بر میزان تخریب سلولی دارد، بر عملکرد استخراج و پایداری PC هم مؤثر است. به طور معمول، استفاده از روش‌های استخراج که سرعت فرایند در آن‌ها بالا است برای جلوگیری از واکنش‌هایی که باعث تخریب ترکیب هدف می‌شوند به دیگر روش‌هایی که سرعت استخراج در آن‌ها پایین‌تر است ترجیح داده می‌شوند. بنابراین، ممکن است تعداد چرخه‌های انجماد و رفع انجماد با هدف دستیابی به استخراج با بازده بالا و همچنین جلوگیری از تخریب احتمالی PC بهینه شوند.

**اختلاط و همگن‌سازی (Mixing and Homogenization):** اختلاط و همگن‌سازی روش‌های ساده‌ای برای استخراج هستند که شامل هم‌زدن زیست‌توده حل شده در حلال مورد استفاده برای استخراج می‌باشد. در فرآیند استخراج هنگامی که عمل هم‌زدن با شدت کم استفاده می‌شود، اختلاط نامیده می‌شود، که این عمل معمولاً با هم‌زن مغناطیسی صورت می‌گیرد اما در همگن‌سازی از

مرطوب و تازه در دسترس می‌باشد (Sarada *et al.*, 1999; G Patil *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2017; Jaeschke *et al.*, 2019). چندان مشخص نیست که آیا استفاده از زیست‌توده خشک یا تازه تفاوتی بر میزان موثر بودن بازده استخراج دارد یا خیر. با این حال طبق یکی از مطالعات صورت گرفته اگر زیست‌توده‌ای که از قبل خشک و پودر شده را با بافری که برای فرآیند استخراج مورد استفاده قرار می‌دهیم مجدداً به مدت ۲ ساعت آبدهی یا مرطوب کنیم، این عمل باعث بالا رفتن بازده استخراج می‌شود (Tavanandi *et al.*, 2020). خشک کردن زیست‌توده با روش‌های معمولی مثل پهن کردن در زیر نور آفتاب چندان توصیه نمی‌شود زیرا قرار گرفتن طولانی مدت آن در دمای بالا (تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد) ممکن است بر محتوای PC موجود و قابل استخراج در زیست‌توده تأثیر منفی داشته باشد (İlter *et al.*, 2018).

### استخراج

روش‌های مورد استفاده برای تخریب دیواره سلولی می‌تواند از مهم‌ترین عواملی باشد که بر عملکرد استخراج و خلوص عصاره‌ها تأثیر می‌گذارد. یک روش ایده‌آل برای استخراج روشی است که ترکیب هدف دلخواه ما را با حداقل صرف انرژی فراهم کند. در ادامه روش‌های مرسوم و نوظهور استخراج PC را بررسی خواهیم کرد و همچنین توضیحی از مکانیسم‌های آن‌ها و پارامترهای اصلی که بر استخراج تأثیر می‌گذارد، بیان می‌شود (Jaeschke *et al.*, 2021).

**چرخه‌های انجماد و رفع انجماد (Freezing and Thawing Cycles):** چرخه‌های انجماد و رفع انجماد اغلب در مقیاس آزمایشگاهی برای تخریب دیواره سلولی استفاده می‌شوند (Moraes *et al.*, 2011; Tavanandi *et al.*, 2018). هنگامی که مایع درون سلولی منجمد می‌شود، حجم سلول به دلیل تشکیل کریستال‌های یخ افزایش می‌یابد و به دنبال آن در هنگام رفع انجماد کریستال‌ها، افزایش حجم ایجاد شده کاهش پیدا می‌کند. علاوه بر این، انجماد باعث

زیرکونیوم، سرامیک و فولاد می‌باشند و استفاده از مهره‌های کوچک (۰/۲ تا ۰/۶ میلی‌متر) در فرآیند استخراج به دلیل تعداد دفعات برخورد بیشتری که ایجاد می‌کنند مطلوب‌تر است (Zinkoné *et al.*, 2019; Garcia *et al.*, 2018). گزارش شده است که اثر تراکم مهره‌ها بر تخریب سلولی ممکن است به ویسکوزیته مخلوط زیست‌توده مربوط باشد به این صورت که مهره‌های با چگالی کم (از جنس شیشه) برای مخلوطی با ویسکوزیته کم و مهره‌های با چگالی بالا (از جنس زیرکونیوم) برای مخلوط‌های با ویسکوزیته بالا بهتر هستند (Günerken *et al.*, 2015).

**همگن‌سازی در فشار بالا (High Pressure Homogenization):** HPH یک روش مکانیکی برای تخریب دیواره سلولی است که در آن سوسپانسیون‌های زیستی (مخلوط ناهمگن زیست‌توده) به داخل یک محفظه باریک پمپ می‌شوند و در معرض نیروهای برشی شدید قرار می‌گیرند. در این روش فشار بالایی (تا ۲۰۰۰ اتمسفر) اعمال می‌شود که باعث افزایش سرعت سوسپانسیون در معابر کوچکی می‌شود که در آن‌ها حرکت می‌کند. علاوه بر نیروهای برشی، افت فشار بین نازل و محیط نیز موجب تخریب سلولی می‌شود (de Carvalho *et al.*, 2020; Koubaa *et al.*, 2020). پارامترهای اصلی HPH فشار اعمال شده و تعداد دفعات عبور سوسپانسیون از سیستم هستند (Akaberi *et al.*, 2021; Jaeschke *et al.*, 2020). با این حال با توجه به اینکه طبق برآوردها در سوسپانسیون‌های آبی، تغییرات ایجاد شده در فشار می‌تواند باعث افزایش دما شود، لذا دما نیز می‌تواند پارامتر مهمی تلقی شود که این مسئله اهمیت نگهداری نمونه در دمای پایین حین فرآیند را نشان می‌دهد. در این سیستم‌ها، افزایش دما ( $\Delta T$ ) را می‌توان با استفاده از فرمول زیر محاسبه نمود (de Carvalho *et al.*, 2020):

(۱)

$$\Delta T = P / cp \cdot \rho$$

دستگاه‌های مخصوص همگن‌کردن استفاده می‌شود که شدت عمل هم‌زدن در آن‌ها بسیار بالاست. در روش‌های اختلاط و همگن‌سازی تخریب سلولی بر اثر عواملی همچون تغییرات فشار اسمزی ناشی از اختلاط زیست‌توده با حلال و همچنین نیروهای برشی حاصل از عمل هم‌زدن ایجاد می‌شود. روش اختلاط اگرچه ساده است، اما به زمان زیادی نیاز دارد که از ۴ تا ۲۴ ساعت متغیر می‌باشد (Silveira *et al.*, 2007; Chaiklahan *et al.*, 2011). روش همگن‌سازی به دلیل نیروهای برشی شدیدی که ایجاد می‌کند، سریعتر از روش اختلاط است به طوری که امکان استخراج ترکیبات درون سلولی را در عرض چند دقیقه فراهم می‌کند. نقطه ضعف اصلی روش‌های اختلاط و همگن‌سازی عدم اختصاصی بودن آن‌ها برای استخراج ترکیب هدف است زیرا در این روش‌ها سایر ترکیبات نیز به‌عنوان بقایای سلولی به محیط آزاد می‌شوند (İlter *et al.*, 2018). افزایش دما در طول فرآیند اختلاط و همگن‌سازی، بازده استخراج را افزایش می‌دهد اما باعث کاهش خلوص عصاره می‌شود (Silveira *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2007).

**آسیاب مهره (Bead milling):** آسیاب مهره یک روش مکانیکی ساده برای تخریب دیواره سلولی است که از مهره‌هایی با سرعت بالا استفاده می‌کند و می‌توان از آن در مقیاس صنعتی استفاده کرد. در این روش، سلول‌ها به دلیل نیروهای برشی و اصطحاک ناشی از برخورد با مهره‌ها تخریب می‌شوند (Garcia *et al.*, 2019). این روش بازدهی بالایی در تخریب سلولی دارد (Pott, 2019; Jaeschke *et al.*, 2020; Käferböck *et al.*, 2019). در این روش شرایط بهینه استخراج با توجه به فاکتورهایی همچون ویژگی‌های سلولی زیست‌توده، ویسکوزیته زیست‌توده و سرعت جریان متفاوت است. بنابراین، پیش‌بینی تعامل بین پارامترهای دخیل در فرآیند استخراج دشوار است (Montalescot *et al.*, 2015). مهره‌های مورد استفاده معمولاً از جنس شیشه،



امواج اولتراسونیک (فرکانس‌های ۲۰ کیلوهرتز تا ۱۰ مگاهرتز) از مواد هدف است. انتشار امواج فراصوت در هر محیطی باعث پدیده‌های شیمیایی و فیزیکی مختلفی مانند هم زدن، کاویتاسیون (Cavitation) (پدیده‌ای است که در آن فشار استاتیک مایع به زیر فشار بخار مایع کاهش می‌یابد و منجر به تشکیل حفره‌های کوچک پر از بخار در مایع می‌شود)، نیروهای برشی، امواج ضربه‌ای و تشکیل رادیکال‌های آزاد می‌شود. هنگامی که از فراصوت برای افزایش استخراج ترکیبات درون‌سلولی استفاده می‌شود، کاویتاسیون صوتی به‌عنوان نیروی محرکه اصلی آن مطرح است. عبور امواج فراصوت باعث ایجاد مناطق فشرده و تشکیل حباب در مخلوط زیست‌توده و حلال می‌گردد. حجم این حباب‌ها در طول چرخه‌های ایجاد موج تا فروپاشی کاهش و افزایش می‌یابد. این پدیده به کاویتاسیون صوتی معروف است. فروپاشی حباب‌های کاویتاسیون باعث افزایش دما (تا ۵۰۰۰ درجه کلوین) و فشار (تا ۵۰ مگاپاسکال) در سطح میکروسکوپی می‌شود. تلاطم، برخورد و آشفتگی نیز از پیامدهای این پدیده است. از این رو، کاویتاسیون به نازک شدن غشای سلولی و از هم‌گسیختگی سلولی کمک می‌کند و نرخ استخراج را افزایش می‌دهد (Tiwari, 2015). در اکثر مطالعات استخراج با فراصوت از فرکانس پایین (۲۰-۱۰۰ کیلوهرتز) و شدت توان بالا ( $1 < W \text{ cm}^{-2}$ ) استفاده می‌شود (Tiwari, 2015; Ojha et al., 2020). این شرایط به نفع فرآیند کاویتاسیون بوده و بازده بالاتر فرآیند استخراج را سبب می‌شود. با این حال، شدت‌های توان بالا باعث تخریب شدید و سریع غشاء سلولی می‌شود که ممکن است بر خلوص عصاره تأثیر منفی بگذارد. بنابراین، زمان و شدت توان از پارامترهای اصلی در فرایند استخراج با فراصوت هستند که باید کنترل شوند. فرار گرفتن طولانی مدت در معرض فراصوت و شدت‌های توان بالای آن نیز ممکن است باعث افزایش دما شود که باید از آن اجتناب شود. به‌طور معمول در استخراج با فراصوت زمان کمی (۲/۵ - ۱۶/۲ دقیقه)

که در آن P فشار، cp گرمای ویژه و  $\rho$  چگالی محلول است.

HPH نیازی به خشک کردن زیست‌توده پیش از آغاز فرآیند ندارد و به‌راحتی قابل اعمال است (مثل روش آسیاب مهره). با این حال، این فناوری برای ایجاد شرایط فشار بالا به انرژی زیادی نیاز دارد. همچنین موجب آزاد شدن بقایای سلولی نیز در محیط که به دنبال آن سبب کاهش خلوص عصاره می‌شود و در این حالت تصفیه پس از فرآیند استخراج مورد نیاز است، این امر HPH را در گروه روش‌های استخراج غیرانتخابی قرار می‌دهد (Jaeschke et al., 2021).

**پردازش در فشار بالا (High Pressure Processing):** شامل اعمال فشارهای بالا به مایعی است که این فشار وارد شده را در یک سیستم بسته به ماتریس مورد نظر منتقل می‌کند. این تکنیک پیش‌تر در فرآوری مواد غذایی به‌عنوان یک فناوری غیرحرارتی مورد استفاده قرار گرفته است و اخیراً به‌عنوان یک روش استخراج مورد ارزیابی قرار گرفته. در شرایط فشار بالا، نشت هوا از واکنش سلولی رخ می‌دهد و موجب آسیب دیدن ساختار غشای سلولی شده و نفوذپذیری آن افزایش می‌یابد. بنابراین، بکار بردن HPP به‌طور معمول مدت زمان فرآیند استخراج را کاهش داده و عصاره‌هایی با غلظت بالا را فراهم می‌کند (Huang et al., 2013). اخیراً این فناوری برای استخراج PC از سیانوباکتری‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته (Li et al., 2020) است. در این مطالعه محدوده‌های مختلف فشار (۵۰ تا ۶۰۰ مگاپاسکال) را بر سیستم اعمال کردند و نتایج نشان داد که فشار تا ۲۰۰ مگاپاسکال باعث تخریب ساختار پروتئینی PC شده و فشاری ۶۰۰ مگاپاسکال موجب کاهش حدود ۵۰ درصد از توانایی ایجاد رنگ توسط PC می‌شود. این نتایج احتمالاً مربوط به تأثیر فشار بالا بر ساختار پروتئین است که باعث به تخریب PC می‌شود. با این حال، برای درک بهتر اثرات HPP بر ساختار PC باید تحقیقات عمیق‌تری انجام شود.

**فراصوت (Ultrasound):** فراصوت بر اساس عبور

است که ماکروویو باعث افزایش بیش از حد دمای سوسپانسیون‌ها می‌شود که ممکن است باعث تخریب PC شود (İlter *et al.*, 2018).

#### میدان‌های الکتریکی پالسی ( Pulsed Electric Fields):

استفاده از PEF برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال از میکروجلبک‌ها و سیانوباکتری‌ها در سال‌های گذشته توجه زیادی را به خود جلب کرده است. این فناوری شامل استفاده از پالس‌های کوتاه الکتریکی (نانو تا میکروثانیه) با شدت بالای میدان الکتریکی در ماتریس‌های زیستی است که بین دو الکترود قرار می‌گیرند. هنگامی که PEF روی یک ماده زیستی اعمال می‌شود، ممکن است تغییراتی را در ساختار غشای سلولی ایجاد کرده که باعث تغییر نفوذپذیری می‌شود، این تغییرات به تشکیل منافذ (مسیرهای آبی) در غشا نسبت داده می‌شود. این پدیده ایجاد شدن منافذ در ساختار غشا و تغییر در نفوذپذیری آن که به موجب PEF ایجاد می‌شود الکتروپوراسیون نامیده می‌شود. بسته به شدت میدان الکتریکی، زمان قرار گرفتن در معرض میدان الکتریکی، خواص سلول (اندازه و هدایت الکتریکی) و سرعت بازیابی غشا، الکتروپوراسیون ممکن است برگشت‌پذیر یا غیرقابل برگشت باشد. اگر شدت میدان از آستانه برگشت‌پذیری تجاوز نکند، الکتروپوراسیون برگشت‌پذیر رخ می‌دهد. در این حالت غشای سلولی برای مدتی نفوذپذیر می‌شود و پس از آن به حالت اولیه خود باز می‌گردد. اگر شدت میدان بیشتر از آستانه برگشت‌پذیری اعمال شود، غشا ممکن است به‌طور غیرقابل برگشتی الکتروپورت شود و در نتیجه حیات سلولی از بین برود (Vorobiev *et al.*, 2009). یکی از مزایای اصلی استفاده از PEF برای استخراج PC این است که کاربرد آن باعث افزایش استخراج انتخابی و در نتیجه خلوص بالای عصاره می‌شود. PEF احتمالاً باعث ایجاد تغییراتی در ساختار تریکوم می‌شود که در مقایسه با روش‌های تخریب مکانیکی سلول، باعث آسیب‌های سلولی و آزاد شدن ترکیبات داخل سلولی بدون از هم پاشیدگی کل

برای استخراج PC مورد نیاز است که یکی از مزایای اصلی این تکنیک در نظر گرفته می‌شود (İlter *et al.*, 2018; Tavanandi *et al.*, 2018; Pan-utai *et al.*, 2019).

**مایکروویو:** امواج مایکروویو تشعشعات غیریونیزه با فرکانس‌های ۳۰۰ مگاهرتز تا ۳۰۰ گیگاهرتز هستند. هنگامی که ماکروویو از ماتریس‌های زیستی عبور می‌کند، به دلیل هدایت یونی و چرخش دوقطبی ایجاد شده در ماتریس‌ها گرما تولید می‌شود. هدایت یونی بر اساس حرکت یون‌ها و تحت تأثیر میدان الکتریکی است. این فرآیند باعث ایجاد نوسان و اصطحکاک بین یون‌ها و محیط می‌شود که نتیجه آن گرم شدن است (Vinatoru *et al.*, 2017). فرآیندهای استخراج با کمک ماکروویو می‌تواند به‌صورت ترکیبی با حلال‌ها (معمولاً برای استخراج ترکیبات غیرفرار) یا بدون حلال (معمولاً برای استخراج ترکیبات فرار) انجام شود. در مورد PC، که یک ترکیب غیر فرار است، حلال باید با توجه به خواص دی‌الکتریک و حلالیت PC انتخاب شود (Vinatoru *et al.*, 2017). پارامترهای اصلی که بر بازدهی استخراج با ماکروویو تأثیر می‌گذارند، توان ماکروویو و زمان استخراج است. برخی از محققان گزارش کردند که شرایط بهینه برای استخراج PC ۱۳۳ وات انرژی و ۱۶۶ ثانیه زمان است (İlter *et al.*, 2018). این محققان بیان کردند که فرآیند استخراج با کمک مخلوط کردن (۷۰۰۰ دور در دقیقه، ۱۰ دقیقه) عصاره غلیظ‌تر و خالص‌تری را در مقایسه با استخراج‌های با ماکروویو و فراصوت فراهم می‌کند. سایر محققان بازده استخراج بالاتری را با ماکروویو (۱۴۰۰ وات، ۲/۵ گیگاهرتز، ۱۲۰ ثانیه)، در مقایسه با آسیاب مهره (با دانه‌های از جنس چینی، اشغال ۲۰ درصد حجم محفظه کل، مدت زمان ۲ ساعت و ۶۰ دور در دقیقه) و اتوکلاو (۳۰ دقیقه، و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۲۰۰ کیلو پاسکال) گزارش کردند (Larrosa *et al.*, 2018). استفاده از ماکروویو برای استخراج PC هنوز نیاز به کمی مطالعه بیشتر دارد، یکی از دلایل احتمالی این

جدول ۲- مزایا و معایب روش‌های مختلف استخراج PC.

معایب	مزایا	روش استخراج
نسبتاً زمان زیادی برای انجام فرایند نیاز دارد، برای مقیاس آزمایشگاهی مناسب است و به راحتی در مقیاس صنعتی از آن استفاده نمی‌شود.	میتوان با بهره بردن از تعداد چرخه‌های مناسب، PC با خلوص بالایی بدست آورد.	چرخه‌های انجماد و رفع انجماد
زمان نسبتاً زیادی برای انجام فرایند مورد نیاز است، قابلیت استخراج اختصاصی ندارد و باعث کاهش خلوص عصاره می‌شود.	ساده و کم‌هزینه است.	اختلاط
قابلیت استخراج اختصاصی ندارد و باعث کاهش خلوص عصاره می‌شود.	ساده و کم‌هزینه است، در زمان کوتاهی انجام می‌شود.	همگن‌سازی
قابلیت استخراج اختصاصی ندارد و باعث کاهش خلوص عصاره می‌شود.	دارای راندمان بالایی است، ساده بوده و قابل استفاده در مقیاس صنعتی است	آسیاب مهره
به انرژی زیادی برای ایجاد شرایط فشار بالا نیاز دارد، همچنین باعث آزاد شدن دیگر بقایای سلولی به محیط می‌شود که سبب کاهش خلوص عصاره شده و به دنبال آن تصفیه پس از فرایند استخراج مورد نیاز است.	به سادگی قابل انجام بوده و نیازی به خشک کردن زیست‌توده در این روش نیست.	همگن‌سازی در فشار بالا (HPH)
PC تحت تأثیر فشار بالا آسیب می‌بیند و همچنان به بهینه‌سازی و مطالعه بیشتری در خصوص این روش نیاز است.	غیر حرارتی بوده و عصاره با غلظت بالا با این روش به دست می‌آید.	پردازش در فشار بالا (HPP)
در شدت‌های بالا و مدت زمان طولانی انجام فرایند احتمال افزایش ناخالصی وجود دارد، همچنین در چنین شرایطی احتمال افزایش دما و آسیب به ساختار پروتئینی PC وجود دارد.	مدت زمان کمی برای انجام فرایند نیاز است، بازده فرایند در آن بالاست.	فراصوت
در توان‌های بالا احتمال افزایش بیش از حد دما و آسیب به ساختار PC وجود دارد، نیاز به مطالعه بیشتر برای بهینه‌سازی دارد.	در صورت استفاده از شدن توان مناسب در آن می‌توان عصاره با غلظت و خلوص مناسب بدست آورد.	ماکروویو
نیاز به هزینه اولیه بالایی برای تامین تجهیزات مورد نیاز دارد.	موجب استحصال عصاره با خلوص بالا می‌شود.	میدان الکتریکی پالسی (PEF)
در صورت افزایش دمای فرایند در سیستم، میتواند به ساختار PC آسیب برساند.	فرایند استخراج را با راندمان و بازده بالا انجام می‌دهد.	میدان الکتریکی متوسط (MEF)

**میدان الکتریکی متوسط (Moderate Electric Field):** فناوری مبتنی بر عبور جریان الکتریکی متناوب از یک ماده زیستی است که بین دو الکترود قرار گرفته‌اند. به دلیل اثر ژول، گرما به صورت حجمی در مواد تولید شده و در نتیجه آن حرارت یکنواخت و سریع را شاهد خواهیم بود. هنگامی که میدان الکتریکی با هدف ایجاد گرما اعمال می‌شود، گرمایش اهمی نام دارد.

ساختار سلولی می‌شود. این اثرات مربوط به تشکیل منافذی است که باعث از هم‌پاشیدگی تدریجی سلول می‌شود. در نتیجه، برخی از ترکیبات داخلی به بیرون از سلول ریخته می‌شوند در حالی که برخی دیگر در داخل ساختار سلولی نگهداری می‌شوند (Käferböck et al., 2020). در طی استخراج PC به کمک PEF عصاره خارج شده رنگ آبی دارد زیرا کلروفیل به راحتی PC استخراج نمی‌شود و در سلول باقی می‌ماند (Jaeschke et al., 2021).

جدول ۳- بازده فرآیند استخراج PC در روش‌های مختلف استخراج.

منبع	میزان خلوص PC	غلظت PC	حلال	نسبت ریست- توده به حلال	زمان	روش
Tavanandi <i>et al.</i> , 2018	۰/۶۶	۱ ± ۷۳/۷۳ mg g <sup>-1</sup>	بافر فسفات ۰/۱ مولار (۸/۶ pH)	۱ : ۶	۵، ۳، ۱، ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت ۱ ساعت رفع (انجماد)	چرخه‌های انجماد و رفع انجماد
Ores <i>et al.</i> , 2016	مشخص نشده	۰/۲ ± ۱۰۱ g <sup>-1</sup> mg	بافر ۱۰ میلی مولار Tris-HCl با (۸/۳pH)	۱ : ۲۰۰	تعداد ۲ و ۴ چرخه	چرخه‌های انجماد و رفع انجماد
Chaiklahan <i>et al.</i> , 2011	۱/۰۴ ± ۰/۰۷	۰/۳۲ ± ۱/۰۹ mg mL <sup>-1</sup>	بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار (pH ۷)	۱ : ۱۰۰	۴ ساعت	اختلاط
Silveira <i>et al.</i> , 2007	۰/۴۶	۳/۶۸ mg mL <sup>-1</sup>	بافر فسفات سدیم ۱۰ میلی مولار (۷ pH) ؛ میلی مولار بافر استات سدیم (۵ pH) ؛ کلرید ۰/۱۵ مولار ؛ کلسیم کلرید ۱۰ g L <sup>-1</sup> ؛ آب مقطر**	۱:۱۰۰ ۲:۱۰۰ ۴:۵:۱۰۰ ۷:۱۰۰ ۸:۱۰۰**	۲۴، ۱۰، ۴، ۰، ۳۰ و ۴ ساعت**	اختلاط
Tavanandi <i>et al.</i> , 2018	۰/۳۸	۵۳/۸۴ mg g <sup>-1</sup>	بافر فسفات ۰/۱ مولار (۶/۸ pH)	۱:۸، ۱:۶ ۱:۱۰**	۴، ۲، ۰، ۱۲ و ۱۰، دقیقه.	همگن‌سازی
Pan-utai <i>et al.</i> , 2019	۰/۶۷ ± ۰/۰۳	± ۱۰۳/۰۷ mg g <sup>-1</sup> ۹/۲۲	بافر فسفات ۰/۱ و ۰/۱** (۷pH)	۱:۲۵، ۱:۵۰ ۳:۵۰	۱۰ دقیقه همگن سازی + تا ۲۴ ساعت** استخراج	همگن‌سازی
Martínez <i>et al.</i> , 2017	۰/۲۱ ± ۰/۰۲	۲۱۷/۱۴ g <sup>-1</sup>	آب مقطر	مشخص نشده	۱۰ سیکل ثانیه ای	آسیاب مهره
Larrosa <i>et al.</i> , 2018	مشخص نشده	± ۷۴/۹۸ mg g <sup>-1</sup> ۱۰/۳۷	آب مقطر	۱۶ : ۱۰۰	۲ ساعت	آسیاب مهره
Akaberi <i>et al.</i> , 2020	۰/۳۲	۷ ± ۱۱۳/۵ mg g <sup>-1</sup>	بافر فسفات سدیم (۷/۲ pH)	۱/۳ : ۵۰۰	۵ پاس (گذر)	همگن‌سازی در فشار بالا (HPH)
Li <i>et al.</i> , 2020	مشخص نشده	۰/۳ (جذب در ۶۲۰ نانومتر)؛ بازده مشخص نشده است	بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار (pH ۶ و ۸)**	۶ : ۱۰۰	۳/۵ دقیقه	پردازش در فشار بالا (HPP)
Tavanandi <i>et al.</i> , 2018	۰/۶۲	۲ ± ۵۱/۵۱ mg g <sup>-1</sup>	بافر فسفات ۰،۱ مولار (۶/۸ pH)	۱:۸، ۱:۶ ۱:۱۰**	۱، ۰، ۰، ۵، ۰، ۱/۵، ۲، ۰، ۳ و ۳ دقیقه**	فراصوت
İlter <i>et al.</i> , 2018	پایین	۹۸/۸۴ mg g <sup>-1</sup>	آب مقطر، بافر سدیم فسفات (۷/۴ pH) و کلسیم کلرید ۱/۵ ٪ (w/v)**	۳۲:۱۰۰ ۲:۱، ۱:۱** ۳:۱ و ۳۶۸:۱۰۰	۱۰، ۴/۸۹ ، ۲۵، ۱۷/۵ ۱۶/۲۳ و ۳۰/۱۱ دقیقه**	فراصوت

ادامه جدول ۳.

منبع	میزان خلوص PC	غلظت PC mg g <sup>-1</sup>	حلال	نسبت ریست- توده به حلال	زمان	روش
İlter <i>et al.</i> , 2018	مشخص نشده	۱۲۸/۹	آب مقطر، بافر فسفات سدیم (۷/۴pH)، کلسیم کلرید w/v) %۱،۵ (آب)**	۱:۱، ۳۲:۱۰۰، ۳:۱، ۲:۱ و ۳۶۸:۱۰۰ و %۲۳۴:۱۰۰**	۶۰، ۱۹/۰۹، ۱۸۰، ۱۲۰ و ۲۲۰/۹۱ و ۱۶۵/۹۶ ثانیه**	ماکروویو
Larrosa <i>et al.</i> , 2018	مشخص نشده	۰/۶ ± ۸۵/۴۳ 1 <sup>g mg</sup>	آب مقطر	۱۶:۱۰۰	۱۲۰ ثانیه	ماکروویو
Martínez <i>et al.</i> , 2017	۰/۴۶ ± ۰/۰۲	±۱۵۱/۹۴ 1 <sup>mg g</sup>	آب مقطر	مشخص نشده	تا ۳۶۰ دقیقه پس از پیش تیمار PEF	میدان الکتریکی پالسی (PEF)
Akaberi <i>et al.</i> , 2020	۰/۵۱	۶ ± ۱۲۶/۵ 1 <sup>mg g</sup>	بافر فسفات سدیم (۷/۲ pH) (تیمار PEF)؛ بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار (pH 6) و (۸) (پس از تیمار PEF)	۱/۳:۵۰۰	تا ۲۴ ساعت پس از پیش تیمار PEF در مدت ۲۴ ساعت**	میدان الکتریکی پالسی (PEF)
Ferreira-Santos <i>et al.</i> , 2020	مشخص نشده	± ۴۵/۵۴ 1 <sup>mg g</sup>	آب	۱:۲۰	۱۲۰ الی ۳۰ دقیقه، ۳۰ دقیقه**	میدان الکتریکی متوسط (MEF)

استفاده برای استخراج PC، مزایا و معایب هر کدام را می‌توان به صورت جدول ۲ جمع‌بندی نمود. همچنین غلظت و خلوص PC به دست آمده از روش‌های مختلف در مطالعات پیشین در جدول ۳ ارائه شده است.

### خلوص فایکوسیانین

خلوص PC یک عامل اساسی برای تعیین کاربرد آن را می‌باشد. خلوص بر اساس نسبت A<sub>620</sub>/A<sub>280</sub> است که به جذب PC در ۶۲۰ نانومتر (A<sub>620</sub>) و جذب سایر پروتئین‌ها در ۲۸۰ نانومتر (A<sub>280</sub>) مربوط می‌شود. در تعیین میزان خلوص PC هنگامی که A<sub>620</sub>/A<sub>280</sub> بزرگتر یا مساوی ۰/۷ باشد، PC در درجه افزودنی غذایی در نظر گرفته می‌شود، زمانی که A<sub>620</sub>/A<sub>280</sub> بین ۰/۷ تا ۳/۹ باشد، درجه معرف (واکنش‌پذیری) و زمانی که A<sub>620</sub>/A<sub>280</sub> بزرگتر یا مساوی ۴ باشد، درجه تحلیلی در نظر گرفته می‌شود (Fernández-Rojas *et al.*, 2014). ارزش تجاری PC متفاوت است و به نرخ خلوص بستگی دارد: PC با درجه افزودنی غذایی

از سوی دیگر، زمانی که اثرات الکتریکی (غیر حرارتی) اهمیت بیشتری داشته باشد، فناوری MEF نامیده می‌شود. اثرات غیر حرارتی با ایجاد الکتروپوراسیون همراه است که قبلاً توضیح داده شد. با این حال، با اعمال MEF، احتمال تشکیل منافذ در غشا سلولی در مقایسه با PEF کمتر است. به تازگی، این فناوری برای استخراج PC از *Spirulina platensis* مورد ارزیابی قرار گرفته است که در آن بازده استخراج بالاتری در دمای ۴۴ درجه سانتی‌گراد پس از ۳۰ دقیقه تیمار در مقایسه با روش انجماد و رفع انجماد به دست آمد، از سوی دیگر، در دمای ۵۱ درجه سانتی‌گراد، کاهشی در بازده استخراج مشاهده شد که به تخریب PC بر اثر حرارت بالا نسبت داده می‌شود (Ferreira-Santos *et al.*, 2020). بنابراین، دما، مدت زمان اعمال و میزان ولتاژ ممکن است پارامترهای اصلی باشند که هنگام استفاده از MEF برای استخراج PC باید در نظر گرفته شوند. با توجه مطالب ذکر شده در بخش روش‌های مختلف قابل

حدود ۰/۱۳ دلار آمریکا به ازای هر  $\text{mg}^{-1}$  هزینه دارد، در حالی که درجه PC با درجه معرف (واکنش‌پذیری) با خلوص ۳/۹ بین ۱ تا ۵ دلار آمریکا به ازای هر  $\text{mg}^{-1}$  هزینه دارد و PC با درجه تحلیلی با خلوص ۴<sup>۱</sup> می‌تواند تا ۱۵ دلار آمریکا به ازای هر  $\text{mg}^{-1}$  برسد (Cisneros et al., 2004). دست‌یابی بالای PC با اهداف تجاری با مشکلاتی در مراحل استخراج و خالص‌سازی مرتبط است که در نهایت آن را به یک رنگدانه پروتئینی گران‌قیمت تبدیل می‌کند.

### نتیجه‌گیری

هدف از این مطالعه بررسی ویژگی‌ها و ساختار PC و همچنین روش‌های استخراج و پارامترهایی موثر بر آن بود. PC را می‌توان از منابع مختلف جلبکی و سیانوباکتری‌ها به‌دست آورد. استخراج PC در دماهای متوسط (۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد)، شرایط pH خنثی (۶-۸) و به دور از تابش مستقیم نور انجام می‌گیرد. برای انتخاب روش استخراج، باید با توجه به مقیاس کار (آزمایشگاهی یا صنعتی) نسبت به انتخاب روش مناسب اقدام نمود. به‌طور معمول چرخه‌های انجماد و ذوب گزینه مطلوبی برای مقیاس آزمایشگاهی می‌باشد. دیگر روش‌ها همچون PEF، ماکروویو، فراصوت، MEF نیازمند به هزینه اولیه برای تأمین تجهیزات مورد نیاز هستند، با این وجود بعد از تأمین تجهیزات هزینه جانبی خاصی به غیر از تأمین حلال (در صورت نیاز) و هزینه‌های مصرف انرژی ندارد که با توجه به بزرگی مقیاس کار و سنجیدن همه جوانب می‌توان نسبت به انتخاب روش مناسب اقدام نمود. با استفاده از چرخه‌های انجماد و رفع انجماد می‌توان به عصاره با خلوص بالایی در مقیاس آزمایشگاهی رسید، با این حال این روش نیازمند مطالعات بیشتر برای بهینه‌سازی هرچه بهتر می‌باشد اگرچه در برخی مطالعات در مقیاس بزرگ نیز از این روش برای استخراج PC استفاده شده، به‌عنوان مثال در مطالعه Hadiyanto و همکاران (۲۰۱۹)، از روش انجماد و رفع انجماد به‌همراه آب مقطر در نقش حلال

استفاده کردند که در نسبت ۱:۵۰ زیست‌توده به حلال، PC با غلظت ۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بازده ۱۹ میلی‌گرم بر گرم به‌دست آمد. در مطالعه‌های دیگر از روش هم‌زدن با همزن مغناطیسی به‌همراه ترکیبی از آب و محلول بافر به عنوان حلال برای استخراج PC استفاده شد، سپس روش کروماتوگرافی برای خالص‌سازی PC مورد استفاده قرار گرفت که طبق نتایج آن اعلام شد. روش پیشنهادی امکان بازیابی بیش از ۶۲ درصد از PC موجود در زیست‌توده را به شکل کنسانتره PC خالص می‌دهد (Ramos et al., 2010). در مطالعه‌های دیگر از روش HPH برای استخراج PC در مقیاس بزرگ استفاده شد، سپس روش کروماتوگرافی برای فرآیند خالص‌سازی مورد استفاده قرار گرفت، در این روش، میزان بازیابی نهایی PC حدود ۴۲/۰۳٪ و خلوص آن (A620/A280) حدود ۵/۳۲ بود (Wenjun et al., 2013). سایر روش‌های مکانیکی که برای تخریب دیواره و ساختار سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرند، مثل استخراج با آسیاب مهره‌ها و فراصوت، روند استخراج را ساده‌تر و مدت زمان انجام فرآیند را کم می‌کنند با این حال عصاره به‌دست آمده از آن‌ها خلوص پایینی دارد و لازم است بعد از استخراج با استفاده از روش‌های مختلف مورد تصفیه و خالص‌سازی قرار گیرد. در خصوص روش MEF مطالعات بیشتری مورد نیاز است. سایر روش‌ها همچون اختلاط و هم‌گن‌سازی زمان‌بر هستند و علاوه بر آن عصاره استخراج شده با این روش‌ها خلوص نسبتاً پایینی دارد. روش HPP نیز همچنان نیازمند مطالعات و بهینه‌سازی‌های بیشتری است. از بین روش‌هایی که در این مطالعه معرفی شد روش PEF گزینه مطلوب‌تری به نظر می‌رسد چراکه عصاره به‌دست آمده از این روش دارای خلوص نسبتاً بالایی است و نیاز به فرآیند تصفیه بعدی وجود ندارد و اینکه فرآیند در مدت زمان کوتاهی انجام می‌شود. همان‌طور که بیان شد خلوص PC به‌دست آمده فاکتور مهمی در کاربرد و قیمت نهایی آن دارد و بدیهی است هرچه درصد خلوص بیشتر باشد قیمت نهایی محصول نیز

- Chaiklahan R., Chirasuwan N., Bunnag B. 2012. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochemistry* 47(4), 659-664.
- Chaiklahan R., Chirasuwan N., Loha V., Tia S., Bunnag B. 2011. Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process. *Bioresource Technology* 102(14), 7159-7164.
- Chapman D.J., Cole W.J., Siegelman H.W. 1968. Phylogenetic implications of phycocyanobilin and C- phycocyanin. *American Journal of Botany* 55(3), 314-316.
- Chattopadhyay P.K., Gaylord B., Palmer A., Jiang N., Raven M.A., Lewis G., Reuter M.A., Nur-ur Rahman A.K.M., Price D.A., Betts M.R., Roederer M. 2012. Brilliant violet fluorophores: a new class of ultrabright fluorescent compounds for immunofluorescence experiments. *Cytometry Part A* 81(6), 456-466.
- Chittapun S., Jonjaroen V., Khumrangsee K., Charoenrat T. 2020. C-phycocyanin extraction from two freshwater cyanobacteria by freeze thaw and pulsed electric field techniques to improve extraction efficiency and purity. *Algal Research* 46, 101789.
- Cisneros M., Rito-Palomares M. 2004. A simplified strategy for the release and primary recovery of c-phycocyanin produced by *Spirulina maxima*. *Chemical Biochemistry Eng Q* 18(4), 385-90.
- Cisneros M., Rito-Palomares M. 2004. A Simplified Strategy for the Release and Primary Recovery of c-phycocyanin Produced by *Spirulina maxima*. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 18(4), 385-390.
- de Carvalho J.C., Magalhães A.I., de Melo Pereira G.V., Medeiros A.B.P., Sydney E.B., Rodrigues C., Aulestia D.T.M., de Souza Vandenberghe L.P., Soccol V.T., Soccol C.R. 2020. Microalgal biomass pretreatment for integrated processing into biofuels, Food, and Feed. *Bioresource Technology* 300, 122719.
- Estrada J.P., Bescós P.B., Del Fresno A.V.J. 2001. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Il Farmaco* 56(5-7), 497-500.
- Fernández-Rojas B., Hernández-Juárez J., بالاتر می‌رود. بنابراین ضروری است با توجه و به اهداف استخراج PC و درصد خلوصی که نیاز داریم روش‌های مناسب برای استخراج انتخاب شود.
- منابع**
- عبادی گل تپه خ. ن، شادی ا. ۱۳۹۸. ترکیبات زیست فعال ثانویه میکروارگانیسم‌های دریایی و کاربرد آن‌ها. فصلنامه علوم و فناوری دریا، ۲۴(۹۳): ۵۶-۷۰.
- Abeliovich A., Shilo M. 1972. Photooxidative reactions of c-phycocyanin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 283(3), 483-491.
- Acker J.P., McGann L.E. 2003. Protective effect of intracellular ice during freezing? *Cryobiology* 46(2), 197-202.
- Akaberi S., Krust D., Müller G., Frey W., Gusbeth, C. 2020. Impact of incubation conditions on protein and C-Phycocyanin recovery from *Arthrospira platensis* post-pulsed electric field treatment. *Bioresource Technology* 306, 123099.
- Amaro H.M., Guedes A.C., Malcata F.X. 2011. Antimicrobial activities of microalgae: an invited review. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances* 3, 1272-1284.
- Antelo F.S., Anschau A., Costa J.A., 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(5), 921-926.
- Batista A.P., Raymundo A., Sousa I., Empis J. 2006. Rheological characterization of coloured oil-in-water food emulsions with lutein and phycocyanin added to the oil and aqueous phases. *Food Hydrocolloids* 20(1), 44-52.
- Benedetti S., Rinalducci S., Benvenuti F., Francogli S., Pagliarani S., Giorgi L., Micheloni M., D'Amici G. M., Zolla L., Canestrari F. 2006. Purification and characterization of phycocyanin from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Journal of Chromatography B* 833(1), 12-18.
- Borowitzka M.A. 1995. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology* 7(1), 3-15.

- Aji R. W. 2019, October. Production of antioxidant C-phycoerythrin using extraction process of *Spirulina platensis* in large scale industry. In IOP conference series: Materials Science and Engineering Vol. 633, No. 1. IOP Publishing. p. 012025.
- Hsieh-Lo M., Castillo G., Ochoa-Becerra M.A., Mojica L. 2019. Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability. *Algal Research* 42, 101600.
- Huang H.W., Hsu C.-P., Yang B.B., Wang C.-Y. 2013. Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology. *Trends in Food Science & Technology* 33(1), 54-62.
- Ibañez E., Herrero M., Mendiola J. A., Castro-Puyana M. 2012. Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: macro and micro algae, cyanobacteria, and invertebrates. in marine bioactive compounds. Boston, MA: Springer US. pp. 55-98.
- İlter I., Akyıl S., Demirel Z., Koç M., Conk-Dalay M., Kaymak-Ertekin F. 2018. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. *Journal of Food Composition and Analysis* 70, 78-88.
- Jaeschke D.P., Mercali G. D., Marczak L.D.F., Müller G., Frey W., Gusbeth C. 2019. Extraction of valuable compounds from *Arthrospira platensis* using pulsed electric field treatment. *Bioresource Technology* 283, 207-212.
- Jaeschke D.P., Teixeira I.R., Marczak L.D.F., Mercali G.D. 2021. Phycocyanin from *Spirulina*: A review of extraction methods and stability. *Food Research International* 143, 110314.
- Jespersen L., Strømdahl L.D., Olsen K., Skibsted L.H. 2005. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. *European Food Research and Technology* 220(3), 261-266.
- Jian-Feng N.I.U., Guang-Ce W.A.N. G., Lin X.Z., Zhou B.C. 2007. Large-scale recovery of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B* 850(1-2), 267-276.
- Käferböck A., Smetana S., de Vos R., Schwarz Pedraza-Chaverri J. 2014. Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of Functional Foods* 11, 275-392.
- Ferraro G., Imbimbo P., Marseglia A., Lucignano R., Monti D.M., Merlino, A. 2020. X-ray structure of C-phycoerythrin from *Galdieria phlegrea* : Determinants of thermostability and comparison with a C-phycoerythrin in the entire phycobilisome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1861(9), 148236.
- Ferreira-Santos P., Nunes R., de Biasio F., Spigno G., Gorgoglione D., Teixeira J.A., Rocha C.M.R. 2020. Influence of thermal and electrical effects of ohmic heating on C-phycoerythrin properties and biocompounds recovery from *Spirulina platensis*. *LWT* 128, 109491.
- Galland-Irmouli A.V., Pons L., Luçon M., Villaume C., Mrabet N.T., Guéant J.L., Fleurence J. 2000. One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 739(1), 117-123.
- Gantar M., Simović D., Djilas S., Gonzalez W.W., Mikšovska J. 2012. Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycoerythrin from *Limnothrix* sp. strain 37-2-1. *Journal of Biotechnology* 159(1-2), 21-26.
- Garcia E.S., Lo, C., Eppink M.H., Wijffels R.H., Van den Berg C. 2019. Understanding mild cell disintegration of microalgae in bead mills for the release of biomolecules. *Chemical Engineering Science* 203, 380-390.
- Glazer A.N. 1984. Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics* 768(1), 29-51.
- Glazer A.N., Stryer L.U.B.E.R.T. 1983. Fluorescent tandem phycobiliprotein conjugates. Emission wavelength shifting by energy transfer. *Biophysical Journal* 43(3), 383-386.
- Günerken E., D'Hondt E., Eppink M.H.M., Garcia-Gonzalez L., Elst K., Wijffels R.H. 2015. Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances* 33(2), 243-260.
- Hadiyanto H., Harjanto G. D., Huzain M. L.,



- characterization of thermostable phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*. *Korean Journal of Chemical Engineering* 31(3), 490-495.
- Moraes C.C., Sala L., Cerveira G.P., Kalil S. J. 2011. C-phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 28(1), 45-49.
- Muller P. 1994. Glossary of terms used in physical organic chemistry (IUPAC Recommendations 1994). *Pure and Applied Chemistry* 66(5), 1077-1184.
- Ojha K.S., Aznar R., O'Donnell C., Tiwari B.K. 2020. Ultrasound technology for the extraction of biologically active molecules from plant, animal and marine sources. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 122, 115663.
- Oliveira E.G., Rosa G.S., Moraes M.A., Pinto L.A.A. 2009. Characterization of thin layer drying of *Spirulina platensis* utilizing perpendicular air flow. *Bioresource Technology* 100(3), 1297-1303.
- Ores J. da C., Amarante M.C.A. de Kalil, S. J. 2016. Co-production of carbonic anhydrase and phycobiliproteins by *Spirulina* sp. and *Synechococcus nidulans*. *Bioresource Technology* 219, 219-271.
- Pan-utai W., Iamtham S. 2019. Extraction, purification and antioxidant activity of phycobiliprotein from *Arthrospira platensis*. *Process Biochemistry* 82, 189-198.
- Patel A., Mishra S., Pawar R., Ghosh P.K. 2005. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expression and Purification* 40(2), 248-255.
- Patil G., Chethana S., Madhusudhan M.C., Raghavarao K.S.M. S. 2008. Fractionation and purification of the phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology* 99(15), 7393-7396.
- Patil G., Raghavarao K.S.M.S. 2007. Queous two phase extraction for purification of C-phycocyanin. *Biochemical Engineering Journal* 34(2), 156-164.
- Pott R.W. 2019. The release of the blue biological pigment C-phycocyanin through calcium-aided cytolysis of live *Spirulina* sp. *Coloration Technology* 135(1), 17-21.
- C., Toepfl S., Parniakov O. 2020. Sustainable extraction of valuable components from *Spirulina* assisted by pulsed electric fields technology. *Algal Research* 48, 101914.
- Kim S.-K., Ravichandran Y.D., Khan S.B., Kim Y.T. 2008. Prospective of the cosmeceuticals derived from marine organisms. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 13(5), 511-523.
- Koubaa M., Imatoukene N., Drévillon L., Vorobiev E. 2020. Current insights in yeast cell disruption technologies for oil recovery: A review. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification* 150, 107868.
- Kuddus M., Singh P., Thomas G., Al-Hazimi A. 2013. Recent developments in production and biotechnological applications of c-phycocyanin. *BioMed Research International* 2013.
- Kumari R.P., Anbarasu K. 2014. Protective Role of C-Phycocyanin Against Secondary Changes During Sodium Selenite Mediated Cataractogenesis. *Natural Products and Bioprospecting* 4(2), 81-89.
- Larrosa A.P.Q., Camara Á. S., Moura J.M., Pinto L. A. A. 2018. *Spirulina* sp. biomass dried/disrupted by different methods and their application in biofilms production. *Food Science and Biotechnology* 27(6), 1659-1665.
- Li Y., Zhang Z., Paciulli M., Abbaspourrad A. 2020. Extraction of phycocyanin-A natural blue colorant from dried spirulina biomass: Influence of processing parameters and extraction techniques. *Journal of Food Science* 85(3), 727-735.
- Martínez J.M., Luengo E., Saldaña G., Álvarez I., Raso J. 2017. C-phycocyanin extraction assisted by pulsed electric field from *Arthrospira platensis*. *Food Research International* 99, 1042-1047.
- Montalescot V., Rinaldi T., Touchard R., Jubeau S., Frappart M., Jaouen P., Bourseau P., Marchal L. 2015. Optimization of bead milling parameters for the cell disruption of microalgae: Process modeling and application to *Porphyridium cruentum* and *Nannochloropsis oculata*. *Bioresource Technology* 196, 339-346.
- Moon M., Mishra S.K., Kim C.W., Suh W. I., Park M.S., Yang J.-W. 2014. Isolation and

- Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Enzyme and Microbial Technology* 38(1-2), 168-175.
- Sørensen L., Hantke A., Eriksen N.T. 2013. Purification of the photosynthetic pigment C-phycocyanin from heterotrophic *Galdieria sulphuraria*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93(12), 2933-2938.
- Sousa I., Gouveia L., Batista A. P., Raymundo A., Bandarra N. M. 2008. Microalgae in novel food products. *Food Chemistry Research Developments* 75-112.
- Stanek M., Grubmayr K. 1998. Protonated 2,3-Dihydrobilindiones-Models for the Chromophores of Phycocyanin and the Red-Absorbing Form of Phytochrome. *Chemistry - A European Journal* 4(9), 1653-1659.
- Su C.H., Liu C.S., Yang P.C., Syu K.S., Chiuh C.C. 2014. Solid-liquid extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis*: Kinetic modeling of influential factors. *Separation and Purification Technology* 123, 64-68.
- Su H.N., Wang Q.M., Li C.Y., Li K., Luo W., Chen B., Zhang X.-Y., Qin Q.L., Zhou B.C., Chen X.L., Zhang Y.Z., Xie B.B. 2017. Structural insights into the cold adaptation of the photosynthetic pigment-protein C-phycocyanin from an Arctic cyanobacterium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Bioenergetics* 1858(4), 325-335.
- Sun L., Wang S., Gong X., Chen L. 2004. A rod-linker-contained R-phycoerythrin complex from the intact phycobilisome of the marine red alga *Polysiphonia urceolata*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 76(1-3), 1-11.
- Sun L., Wang S., Zhao M., Fu, X., Gong X., Chen M., Wang L. 2009. Phycobilisomes from cyanobacteria. *Handbook on Cyanobacteria: Biochemistry, Biotechnology and Application*. New York: Nova Science Publishers 105-160.
- Tavanandi H.A., Mittal R., Chandrasekhar J., Raghavarao K.S.M.S. 2018. Simple and efficient method for extraction of C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*. *Algal Research* 31, 239-251.
- Tavanandi H.A., Raghavarao K.S.M. S. 2020. Ramos A., Acien F.G., Fernández-Sevilla J.M., González C.V., Bermejo R. 2010. Large-scale isolation and purification of C-phycocyanin from the cyanobacteria *Anabaena marina* using expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 85(6), 783-792.
- Roquebert M.F., Bury E. 1993. Effect of freezing and thawing on cell membranes of *Lentinus edodes*, the shiitake mushroom. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 9(6), 641-647.
- Samsonoff W., MacColl R. 2001. Biliproteins and phycobilisomes from cyanobacteria and red algae at the extremes of habitat. *Archives of Microbiology* 176(6), 400-405.
- Sarada R., Pillai M.G., 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(8), 795-801.
- Saran S., Puri N., Jasuja N. D., Kumar M., Sharma G. 2016. Optimization purification and characterization of Phycocyanin from *Spirulina platensis*. *International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture* 2(3), 15-21.
- Sekar S., Chandramohan M. 2008. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology* 20(2), 113-136.
- Shanab S.M., Mostafa S.S., Shalaby E.A., Mahmoud G.I. 2012. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(8), 608-615.
- 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.
- Silveira S.T., de Menezes Quines L.K., Burkert C.A.V., Kalil S.J. 2008. Separation of phycocyanin from *Spirulina platensis* using ion exchange chromatography. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31(5), 447-482.
- Sloth J.K., Wiebe M.G., Eriksen N.T. 2006.

- the Main Component of Spirulina Color in Foods. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 60(1), 57-60.
- Zhang Z., Cho S., Dadmohammadi Y., Li Y., Abbaspourrad A. 2021. Improvement of the storage stability of C-phycoerythrin in beverages by high-pressure processing. *Food Hydrocolloids* 110, 106055.
- Zinkoné T. R., Gifuni I., Lavenant L., Pruvost J., Marchal L. 2018. Bead milling disruption kinetics of microalgae: Process modeling, optimization and application to biomolecules recovery from *Chlorella sorokiniana*. *Bioresource Technology* 267, 458-465.
- Ultrasound-assisted enzymatic extraction of natural food colorant C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*. *LWT* 118, 108802.
- Thangam R., Suresh V., Asenath Princy W., Rajkumar M., SenthilKumar N., Gunasekaran P., Rengasamy R., Anbazhagan C., Kaveri K., Kannan S. 2013. C-Phycocyanin from *Oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest. *Food Chemistry* 140(1-2), 262-272.
- Tiwari B.K. 2015. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 71, 100-109.
- Vali Aftari R., Rezaei K., Mortazavi A., Bandani A. R. 2015. The Optimized Concentration and Purity of *Spirulina platensis* C-Phycocyanin: A Comparative Study on Microwave-Assisted and Ultrasound-Assisted Extraction Methods. *Journal of Food Processing and Preservation* 39(6), 3080-3091.
- Vinatoru M., Mason T.J., Calinescu I. 2017. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compound from plant materials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 97, 159-178.
- Vorobiev E., Lebovka N. 2009. Pulsed-electric-fields-induced effects in plant tissues: fundamental aspects and perspectives of applications. In *Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials*. Springer, New York, NY. pp. 39-81.
- Vorobiev E., Lebovka N. 2016. Extraction from foods and biomaterials enhanced by pulsed electric energy. In *Innovative Food Processing Technologies*. Woodhead Publishing. pp. 31-56.
- Wang L., Qu Y., Fu X., Zhao M., Wang S., Sun L. 2014. Isolation, purification and properties of an R-phycoerythrin from the phycobilisomes of a marine red macroalga *Polysiphonia urceolata*. *PloS one* 9(2), e87833.
- Wenjun S., Cuijuan Z., Suying W. 2013. A Large-Scale Preparation Method of High Purity C-Phycocyanin. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 3(4), 293-297.
- Yoshida A., Takagaki Y., Nishimune T. 1996. Enzyme Immunoassay for Phycocyanin as

---

**Review Article****Phycocyanin: a novel marine bioactive compound, structure and extraction methods****Seyed Mehrdad Hasani-Azhdari<sup>1</sup>, Zahra Hoseinabadi<sup>2</sup>, Seyed Vali Hoseini<sup>1\*</sup>**<sup>1</sup>Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.<sup>2</sup>Department of Health and Food Safety, Faculty of Health, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.

\*Corresponding author: hosseinisv@ut.ac.ir

Received: 2022/6/17

Accepted: 2022/7/26

**Abstract**

Oceans and seas cover more than 70% of the Earth. They are habitat to many micro and macro organisms those have the ability to produce different bioactive compounds with different applications for obviating human needs. Many pigments, especially phycocyanins, are among bioactive compounds could be extracted from aquatic organisms. Phycocyanin is a protein from the family of phycobiliproteins, which is characterized by its blue color and antioxidant properties. This protein is one of the main pigments in cyanobacteria and many seaweed, including red algae. The antioxidant properties of this pigment make it a good choice for using as a food additive. In addition, phycocyanin is widely used in many sectors such as cosmetics as well as medicine. There are several ways to extract phycocyanin, each of them has advantages and disadvantages. The present study tries to introduce and review phycocyanin and its structure as well as different extraction methods and the effect of factors on this process.

**Keywords:** Phacocyanin, Phacobiliprotein, Pigment, Marine bioactive compounds.