مقاله پذیرفته شده

مروری بر تولید رنگدانه خوراکی آبی: فیکوسیانین

مهدیه قمری، مرضیه صالحی

JSCW-2311-1181
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲-۰۹-۰۷
تاریخ اصلاح: ۱۴۰۳-۰۱-۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳-۰۱-۲۵
خواهشمند است این مقاله به صورت زیر در مراجع قید شود:
م. قمری، م. صالحی،" مروری بر تولید رنگدانه خوراکی آبی: فیکوسیانین"، نشریه علمی مطالعات در دنیای رنگ JSCW-2311-1181 ، 1403. این فایل PDF مقاله ویرایش نشده است که برای چاپ پذیرفته شده است. ماکت مقاله توسط دفتر علوم و فناوری رنگ تهیه شده و قبل از چاپ ویرایش نهایی به نویسنده مسئول مقاله ارسال می‌شود.

مقاله پذیرفته شده

مقاله پذیرفته شده

مروری بر تولید رنگدانه خوراکی آبی: فیکوسیانین

مهدیه قمری *[1و2]، مرضیه صالحی [3]

۱- استادیار، گروه صنایع غذایی، موسسه آموزش عالی بصیر، آبیک، قزوین، کدپستی: ۳۴۴۱۳۵۶۶۱۱.

۲- دکترای صنایع غذایی، مرکز توسعه مکانیزاسیون و صنایع کشاورزی، وزارت جهاد کشاورزی، تهران، ایران، کد پستی: ۱۵۹۳۴۱۶۱۱۱.

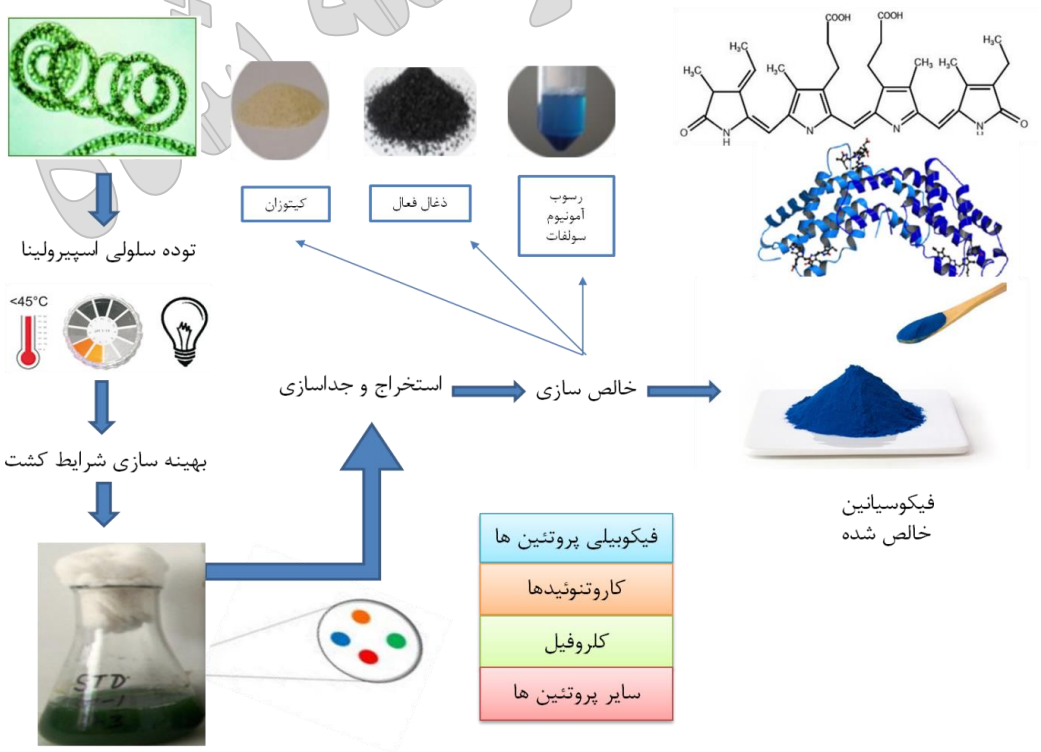
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، موسسه آموزش عالی بصیر، آبیک، قزوین، کدپستی: ۳۴۴۱۹۴۵۶۶۳.

چکیده

امروزه استفاده از مواد رنگزا طبیعی در صنایع غذایی و دارویی بسیار حائز اهمیت است. مواد رنگزا طبیعی به دست آمده از حیوانات، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها جایگزین امیدوارکننده‌ای برای مواد رنگزا خوراکی مصنوعی هستند زیرا مواد رنگزا سنتتیک در دراز مدت تاثیر منفی بر سلامت انسان دارد. فیکوسیانین به عنوان یک ماده رنگزا طبیعی آبی و محلول در آب به جای مواد رنگزا خوراکی آبی مصنوعی استفاده می‌شود که علاوه بر رنگ دادن به غذا، خواص مفید بالقوه‌ای به عنوان آنتی‌اکسیدان‌ها و عوامل ضدسرطانی نیز داشته و از این رو مورد توجه علمی و صنعتی قرار گرفته‌اند. فیکوسیانین از ریزجلبک ها مانند *اسپیرولینا* استخراج می‌گردد و نقش سلامت بخش در برابر شرایط مختلف مانند سرطان، کم خونی، التهاب، دیابت، چاقی و اختلالات عصبی دارد و به دلیل کاربردهای متنوع در صنایع مختلف غذایی و دارویی محبوبیت پیدا کرده است. در این تحقیق مروری بر تولید بیوتکنولوژیکی ماده رنگزا آبی خوراکی فیکوسیانین از ریزجلبک *اسپیرولینا*، کشت میکروبی، استخراج، خالص‌سازی، روش‌های پایداری و کاربردهای آن پرداخته شده است.

کلمات کلیدی: فیکوسیانین، *اسپیرولینا*، رنگ خوراکی، استخراج، خالص‌سازی.

چکیده تصویری:



مقاله پذیرفته شده

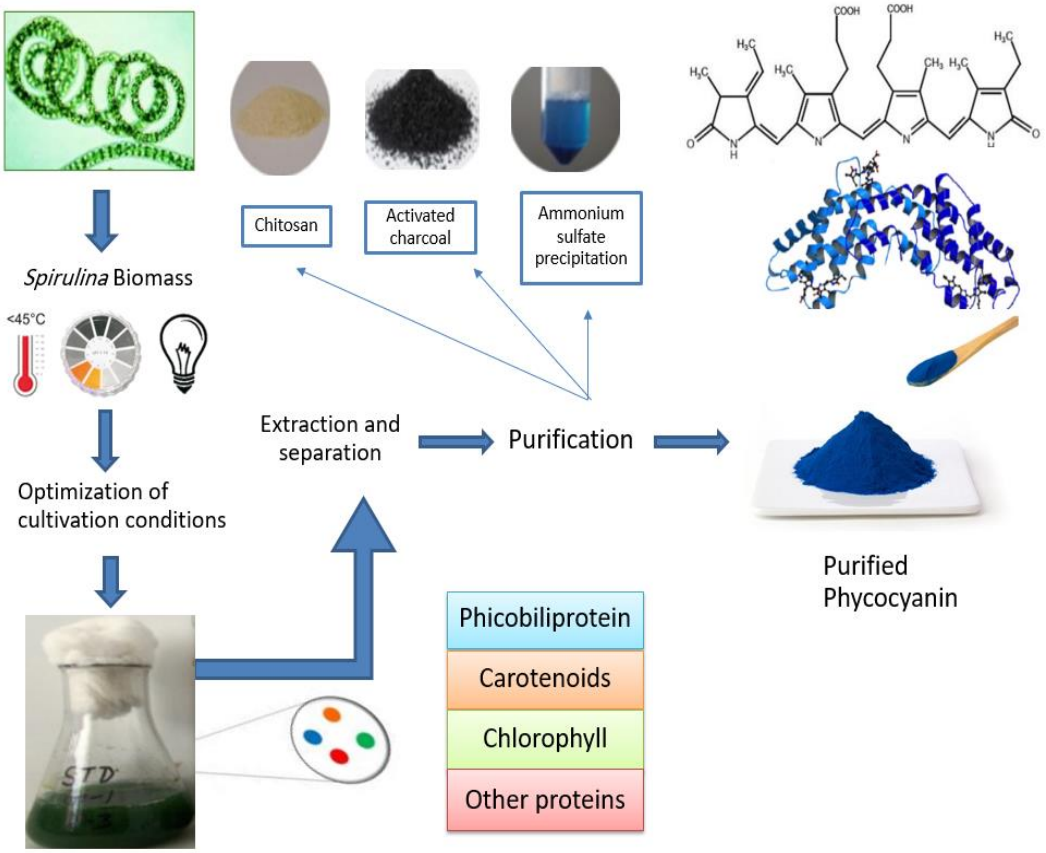
A Review on the Production of Blue Edible Pigment: Phycocyanin

Abstract

Nowadays, the use of natural colors in the food and pharmaceutical industries is very important. Natural pigments obtained from animals, plants and microorganisms are a promising alternative to artificial food colors because synthetic colors have a negative effect on human health in the long term. Phycocyanin is used as a natural blue and water-soluble pigment instead of artificial blue food dyes, which in addition to coloring food, have potential useful properties as antioxidants and anticancer agents, and therefore have received scientific and industrial attention. Phycocyanin is extracted from microalgae such as *spirulina* and has a health-giving role against various conditions such as cancer, anemia, inflammation, diabetes, obesity and neurological disorders, and has gained popularity due to its various applications in various food and pharmaceutical industries. In this research, an overview of the biotechnological production of phycocyanin edible blue dye from *spirulina* microalgae, microbial culture, extraction, purification, stability methods and its applications have been discussed.

Keywords: Phycocyanin, *Spirulina*, Food dye, Extraction, Purification.

Graphical abstract:



۱- مقدمه

رنگ، یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های غذا است و در میان افزودنی‌های موادغذایی، مواد رنگزا از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. مواد رنگزا ترکیبات طبیعی و یا مصنوعی هستند که در صنایع غذایی با هدف خوش‌منظرسازی، یکنواخت و متحدالشکل کردن فرآورده های تولید، زمینه لازم را برای عرضه رقابتی فرآورده‌های خوراکی در بازار فراهم می‌کنند (۱). به طور کلی مواد رنگزا خوراکی به ۴ دسته طبقه‌بندی می‌شوند: ۱) مواد رنگزا طبیعی، ۲) مواد رنگزا شبه طبیعی، ۳) مواد رنگزا مصنوعی، ۴) مواد رنگزا غیرآلی. مواد رنگزا طبیعی به وسیله موجودات زنده ساخته می‌شوند. مواد رنگزا شبه طبیعی عبارتند از رنگ‌های ساخت بشر که همانند آن‌ها نیز در طبیعت یافت می‌شوند مانند بتاکاروتن، کانتاگزانتین و ریبوفلاوین. مواد رنگزا مصنوعی (سنتتیک[1]) عبارتند از رنگ‌های ساخت بشر که مشابه آن‌ها در طبیعت یافت نمی‌شود که به این دسته از مواد رنگزا، رنگ‌های آزو نیز می‌گویند. از مواد رنگزا غیرآلی نیز می‌توان به دی‌اکسید تیتانیوم، طلا و نقره اشاره نمود. قسمت عمده مواد رنگزا خوراکی از شاخه گیاهان گلدار (Magnoliophyta) در فرمانرو گیاهان استخراج می‌شوند. در عین حال سایر منابع همچون پوسته حشرات (cochineal و lac)، قارچ ها (*Blakeslea trispora* و .*Monascus* spp) و جلبک‌ها و سیانوباکترها (.*Arthrospira* spp) و همچنین بسیاری از میکروارگانیسم‌ها، امروزه به عنوان منابع طبیعی حاوی ماده رنگزا خوراکی تلقی شده و مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲). تحقیقات نشان می‌دهد که مواد رنگزا سنتزی دارای اثر بیماری‌زایی مانند سرطان و غیره در بدن می‌باشند، به همین دلیل نگاه‌ها به سوی تولید ماده رنگزا از منابع طبیعی معطوف شده است که یکی از این منابع میکروارگانیسم‌ها می‌باشند. مواد رنگزا توسط انواع مختلفی از منابع میکروبی از جمله باکتری، مخمرها، قارچ ها و جلبک ها تولید می‌شود (۳). با بکارگیری میکروارگانیسم‌ها می‌توان مواد رنگزا طبیعی را تولید نمود که نه تنها برای بدن انسان و طبیعت مضر نیست، بلکه خواص دارویی بسیاری از آن‌ها شناخته شده است. از جنبه بیوتکنولوژیکی، میکروب‌ها مناسب‌ترین تولیدکنندگان رنگ می‌باشند زیرا تهیه، کشت، دستکاری ژنتیکی و... آن‌ها آسان‌تر است. استفاده از فرآیندهای تولید بیوتکنولوژیکی در تهیه مواد رنگزا خوراکی سبب ایجاد مزایای زیادی برای این رنگ‌ها شده است. مزایای مختلف مواد رنگزا تولید شده از میکروارگانیسم‌ها شامل مستقل بودن از شرایط آب و هوایی، رشد سریع و آسان، رنگ‌های متنوع تولیدی و رشد روی مواد ارزان قیمت است. فرآیند تولید شامل تخمیر، جداسازی سلول، تغلیظ و خالص‌سازی و در نهایت فرمولاسیون محصول می‌باشد. جهت کاهش هزینه‌های تولید بیوتکنولوژیکی نیز می‌توان به استفاده از ضایعات کشاورزی به عنوان محیط کشت، بهینه‌سازی فرآیند تولید با روش‌های آماری از جمله RSM اشاره نمود. استفاده از مواد رنگزا میکروبی گام مهمی در کاهش هزینه‌های تولید در کنار حفظ سلامت مصرف کننده می‌باشد (۴). به دلیل اهمیت و کاربرد صنعتی فیکوسیانین، در این مقاله به بررسی تحقیقات انجام شده و روش استخراج و خالص سازی فیکوسیانین و سپس به مروری بر کاربردهای آن پرداخته شده است.

۲- رنگ آبی خوراکی

از میان مواد رنگزا طبیعی، ماده رنگزا 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 مواد رنگزا شیمیایی چون برلیانت بلو استفاده می‌شود (۵). میزان مصرف قابل قبول روزانه رنگ شیمیایی بریلیانت بلو[2] که براساس آزمایشات حیوانی وانسانی به دست آمده است ۱۲/۵ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن انسان می‌باشد (۶). ماده رنگزا آبی تیره معمولا در میوه‌ها (کلم بنفش) و سبزیجات حاوی آنتوسیانین یا در سیانوباکتری که نوعی جلبک سبز-آبی است یافت می‌شود (۷). فیکوسیانین ماده رنگزا آبی رنگی است که توسط *اسپیرولینا* تولید می‌شود. در سال‌های اخیر استفاده از سایر منابع طبیعی چون سیانوباکتری ها موجب افزایش تقاضا برای ماده رنگزا آبی فیکوسیانین به دست آمده از باکتری *اسپیرولینا* شده است.

در حال حاضر آگاهی از اثرات مضر مواد رنگزا صنعتی و اقبال عمومی در استفاده از فرآورده‌های طبیعی موجب شده سیانوباکتری ها به عنوان منبع مهمی برای مواد رنگزا طبیعی مورد توجه قرار گیرد. از سال ۲۰۱۳ براساس تصمیم FDA به عنوان ماده رنگزا آبی طبیعی در حجم وسیعی در صنایع غذایی آمریکا مورد توجه قرار گرفته است (۵).

۳- رنگ‌های آبی طبیعی

درطبیعت، مواد رنگزا قرمز رنگ و مشتقات زرد یا نارنجی آن‌ها، مانندکورکومین یا کاروتنوئیدها، به مراتب بیش‌تر از مواد رنگزا آبی رایج

[1] synthetic
[2] Brilliant blue

هستند. این به ویژه در گیاهان صادق است، جایی که ماده رنگزا آبی تنها توسط آنتوسیانین‌ها در یک محیط قلیایی ایجاد می‌شود. علاوه بر این، ماده رنگزا آبی را می‌توان در باکتری ها (لکه نفتی آبی) و قارچ‌ها و همچنین در سیانوباکتری ها مشاهده کرد. مواد رنگزا آبی طبیعی اصلی فیکوسیانین جنیپین و آنتوسیانین هستند. آنتوسیانین‌ها را می توان از گیاهان مختلف، فیکوسیانین ها را از سیانوباکتری‌ها و جنیپین را می توان از گیاهان بازیابی کرد (۸).

۳-۱- گاردنیا آبی

گاردنیا آبی[1] از میوه گیاه *G.jasminoides* به دست می‌آید. میوه های *G. jasminoides* حاوی ۳ ماده رنگزا مختلف محلول در آب هستند: فلاونوئیدها، ایریدوئیدها و کروسین ها. این ماده رنگزا آبی پس از تبدیل جنیپوزید به جنیپین[2] (یک مونوترپنوئید ایریدوئیدی محلول در آب که حداکثر جذب آن (۴۹۶ نانومتر) است و با pH محیط تغییر نمی‌کند)، از طریق واکنش هیدرولیز شده توسط بتا-گلوکوزیداز تولید شد. سپس جنیپین با اسیدهای آمینه مانند گلیسین، لیزین یا فنیل آلانین واکنش می دهد تا رنگ را به دست آورد. گاردنیا بلو نزدیک به ۳۰ سال است که در شرق آسیا به عنوان یک ماده رنگزا طبیعی غذایی استفاده می‌شود. رنگ گاردنیا بلو را می‌توان برای رنگ‌آمیزی محصولات مایع مانند نوشیدنی ها و همچنین محصولات جامد مانند ژله ها و آب‌نبات‌ها استفاده کرد. با این حال، رنگ کردن ژله یا آب نبات با خود تغییر رنگ به سبز آبی را به همراه دارد. مطالعه‌ای در مورد سمیت ژنتیکی گاردنیا بلو و جنیپین نشان داد که این ترکیب باعث ایجاد ریزهسته در سلول های خون محیطی نمی‌شود و باعث آسیب DNA در بافت های کبد، دوازدهه یا معده در موش نیز نمی‌شود. جنیپین دارای خواص آنتی اکسیدانی، اثرات ضد سرطانی، ضد دیابتی و محافظت کننده عصبی است. به عنوان مثال، محققانی در یک مقاله تجربی دریافتند که جنیپین دارای پتانسیل درمانی برای بیماری های عصبی است و گاردنیا آبی به طور بالقوه دارای اثرات ضد افسردگی در مدل‌های استرس خفیف غیرقابل پیش‌بینی در موش ها است (۸).

۳-۲- نیل طبیعی

نیل طبیعی[3] یکی از قدیمی ترین مواد رنگزا طبیعی ایندیگوید است. این ماده به شکل یک گلوکوزید محلول در آب در گیاهان وجود دارد. اما وقتی در معرض هوا قرار می گیرد به نیل تبدیل می شود: یعنی نیل آبی. منابع خوب نیل طبیعی *Isatic tinctoira* و *Indigofera tincoria* هستند (۸).

۳-۳- آنتوسیانین

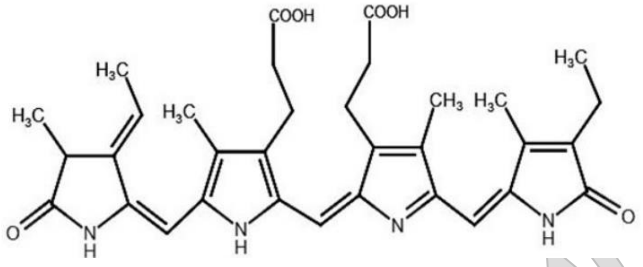
رایج‌ترین مواد رنگزا در دنیای طبیعی آنتوسیانین‌ها هستند. آن‌ها اغلب در میوه ها، به ویژه انواع توت‌ها، جایی که بیش‌تر در پوست آن‌ها متمرکز هستند، یافت می‌شوند. با این حال، آن‌ها را می‌توان آزادانه از کلم قرمز، سیب زمینی قرمز، سیب زمینی شیرین بنفش و تربچه نیز به دست آورد. آن‌ها به آسانی در آب حل می شوند و بسیاری از آن‌ها در طب سنتی سنتی مورد استفاده قرار گرفته اند. آنتوسیانین‌ها در بین تمام مواد رنگزا طبیعی کم‌ترین مقاومت را دربرابر عوامل محیطی دارند و مقاومت آن‌ها به سطح pH بستگی دارد. بنابراین، آنتوسیانین های آبی رنگ، که در pH قلیایی نگهداری می‌شوند، نسبت به آنتوسیانین‌های قرمز که در pH اسیدی نگهداری می‌شوند، بسیار کم‌تر مقاوم هستند. آنتوسیانین ها در دماهای بالا ماندگار نیستند، به ویژه هنگامی که در معرض تابش نورهستند. بنابراین، آنتوسیانین ها به عنوان ماده رنگزا آبی در صنعت کاربرد کمی دارند، آن‌ها مواد رنگزا بسیار بادوام نیستند و تعداد کمی از مواد غذایی در صنایع غذایی دارای pH شدید قلیایی هستندکه برای ماده رنگزا آبی مورد نیاز است. با این وجود، آن‌ها معمولا به عنوان بخشی از یک رژیم غذایی معمولی مصرف می‌شوند. مهم‌تر از همه، مطالعات سم‌شناسی این دیدگاه را تایید می‌کند که آنتوسیانین‌ها هیچ تهدیدی برای سلامت انسان ندارند و برای مصرف بی‌خطر هستند (۸).

۳-۴- ماده رنگزا آبی فیکوسیانین

رنگدانه فیکوسیانین[4] (آبی درخشان) با خواص فلورسنت و آنتی‌اکسیدانی از سیانوباکتری‌ها به ویژه *اسپیرولینا* به دست می‌آید و در سطح

[1] Blue gardenia
[2] Genipin
[3] Natural indigo
[4] phycocyanin

وسیعی در کشورهای مختلف به عنوان ماده رنگزا آبی طبیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد. میزان این ماده در حدود ۷ تا ۱۴درصد وزن خشک این ریزجلبک می‌باشد (۵). فرمول مولکولی فیکوسیانین $C_{33}H_{38}N_4O_6$ است و ساختار شیمیایی آن در شکل ۱ مشاهده می‌شود (۹). فیکوسیانین‌ها معمولاً به گروهی از پروتئین‌ها به نام فیکوبیلی‌پروتئین‌ها[1] اطلاق می‌شود که بزرگ و محلول در آب می‌باشند. گفته می‌شود که حدود ۳۰ الی ۵۰ درصد از پروتئین های محلول موجود در سلول‌های میکروجلبک‌ها، ترکیباتی از فیکوسیانین می‌باشند (۱۰). فیکوسیانین یک پپتید زیست فعال می‌باشد. همچنین فیکوسیانین *اسپیرولینا* یک پودر غیرسمی، بدون بو و به لحاظ مزه کمی شیرین می‌باشد (۱۱). در شکل ۲، شکل ظاهری رنگدانه فیکوسیانین خالص شده مشاهده می‌شود. این ماده رنگزا در آب سرد و گرم محلول است. علاوه بر این، قدرت یونی بالا، مقادیر زیاد pH ، الکل ها و دماهای بالا ممکن است بر ساختار آن تأثیر بگذارد. نکته مهم این است که در حالی که فیکوسیانین در دمای اتاق و در شرایط خنک کننده پایدار است، پس از گرم شدن بالای ۴۵ پایداری آن کاهش می یابد (۸).



شکل۱: ساختار شیمیایی فیکوسیانین (۸).

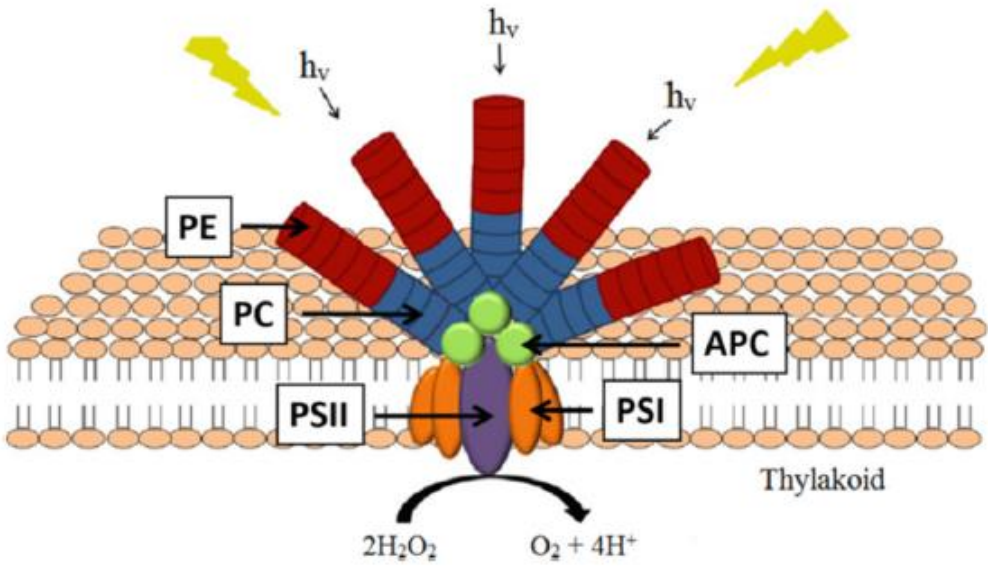
Figure 1: chemical structure of phycocyanin (8).

شکل۲: شکل ظاهری رنگدانه فیکوسیانین.

figure 2: Appearance of phycocyanin pigment.

فیکوسیانین‌ها، نوع سبز-آبی فیکوبیلی‌پروتئین‌ها، پپتیدها وپروتئین‌های محلول در آبی هستند که معمولاً در سیانوباکتری‌ها (به عنوان مثال جلبک سبز آبی)، جلبک‌های قرمز و کریپتوموناداها یافت می‌شوند. به جز فیکوسیانین، فیکواریترین[2] و آلوفیکوسیانین[3] نیز بر اساس خواص نوری در گروه فیکوبیلی‌پروتئین‌ها طبقه بندی می‌شوند (شکل ۳). فیکواریترین‌ها (λmax=۵۴۰-۵۷۰ nm)، فیکوسیانین ها (λmax= ۶۱۰-۶۲۰ nm) و آلوفیکوسیانین (λmax= ۶۵۰-۶۵۵ nm). همه این گروه‌ها، محتوای متنوع و متفاوتی از ساختارها، پروتئین‌ها و مواد رنگزا را دارا هستند. رنگ فیکواریترین‌ها قرمز است، فیکوسیانین‌ها از بنفش تا آبی تیره (R-PCY تا C-PCY) متغیر است، در حالی که رنگ آلوفیکوسیانین ها آبی متمایل به سبز است. فیکوسیانین‌ها شامل C-PCY (C-PC), R-PCY (R-PC) و R-PCY II هستند که عمدتاً به ترتیب در گونه‌های سیانوباکتری، جلبک قرمز Polysiphonia urceolata و سیانوباکتریوم دریایی Synechococcus مشاهده می‌شوند (۷).

[1] Phycobiliproteins
[2] phycoerythrin
[3] Allophycocyanin



شکل ۳: ساختار فیکوبیلیزوم ها (۱۲).

هر فیکوبیلیزوم از پروتئین‌های رنگی به نام فیکوبیلی‌پروتئین‌ها مانند فیکوسیانین آبی رنگ، فیکواریترین قرمز رنگ و آلوفیکوسیانین سبز رنگ تشکیل شده است که برای انتقال انرژی (hv) به صورت یک طرفه به مرکز واکنش به روشی بسیار کارآمد سازماندهی شده است. این مولکول ها به شکل آنتن مانند قرار گرفته اند، به گونه ای که انرژی جذب شده به مرکز واکنش فتوسیستم های II (بنفش) و I (نارنجی) با بازدهی بالاتر از ۹۵ درصد هدایت می‌شود (۱۲).

PBS=فیکوبیلیزوم، PE = فیکواریترین، PC = فیکوسیانین، APC = آلوفیکوسیانین، PSI = سیستم های نوری I، PSII = سیستم های نوری II.

Figure 3: Structure of phycobilisome (12)

Each phycobilisome is made up of colored proteins called phycobiliproteins, such as the blue-colored phycocyanin, the red-colored phycoerythrin, and the green-colored allophycocyanin, which is organized to transfer energy (hv) unidirectionally to the reaction center in a highly efficient way. These molecules are arranged in an antenna-like shape, in a way that the absorbed energy is funneled to the center of the reaction of photosystem II (purple) and I (orange) with an efficiency higher than 95%.

PBS = Phycobilisome; PE = phycoerythrin; PC = phycocyanin; APC = allophycocyanin; PSI = photosystems I; PSII = photosystems II (12).

۴- مواد رنگزا آبی مصنوعی

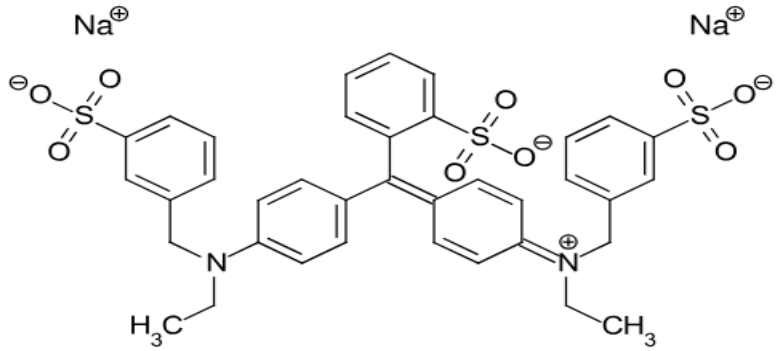
ایمنی استفاده از مواد رنگزا غذایی مصنوعی مدت هاست که بحث برانگیزبوده است. در حال حاضر، نگرانی هایی در مورد سلامتی دارند و باید با رنگ های ایمن جایگزین شوند. حداقل یک قرن است که درکشورهای صنعتی از مواد رنگزا مصنوعی برای رنگ آمیزی مواد غذایی استفاده می شود. رنگ آمیزی مصنوعی می تواند ظاهر مواد اولیه و افزودنی های غذایی را برای مصرف کنندگان بهبود بخشد و عدم وجود مواد طبیعی با رنگ روشن مانند میوه را بپوشاند. مواد رنگزا مصنوعی نیز اغلب به دلایلی انتخاب می شوند زیرا ارزان تر و بادوام تر از اکثر رنگ های طبیعی هستند (۸).

۴-۱- برلیانت بلو (آبی شماره یک)[1]

برلیانت بلو یکی از مواد رنگزا غذایی آبی که به طور گسترده مورد استفاده قرار می گیرد و ساختار شیمیایی آن در شکل ۴ اشاره شده است. و معمولاً با نام آبی درخشان (FCF) برای رنگ آمیزی غذا نیزشناخته می‌شود. این ترکیب معمولاً به صورت پودر خریداری می شود و حداکثر مصرف روزانه قابل قبول برلیانت بلو ۱۲ میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن در روز پیشنهاد شده است. اثرات آبی شماره ۱ بر متابولیسم و سمیت ژنتیکی آن، سمیت مزمن، سمیت عصبی و سرطان زایی به تفصیل مورد بحث قرار گرفته است و در بررسی متابولیسم این ماده رنگزا بر روی موش‌ها مشخص شد که ۹۶٪ آبی شماره ۱ به طور کلی بدون تغییر از طریق مدفوع در عرض ۳۶ ساعت پس از مصرف خوراکی دفع می شود و تقریبا ۵٪ از دوز رنگ از دستگاه گوارش جذب می شود. در مورد سمیت ژنتیکی اگرچه آبی شماره ۱ از نظر ایجاد آسیب DNA ، جهش های جفت باز، تعویض بازها یا جهش های فریم شیفت، ایجاد نمی‌کند، اما در ۲ مطالعه

[1] FD&C Blue No. 1

مشخص شد که باعث ایجاد ناهنجاری کروموزومی می شود و در مورد سمیت مزمن و سرطان‌زایی شواهدی ازسرطان زایی یا سمیت دیگر در موش ها پیدا نکردند (۸).

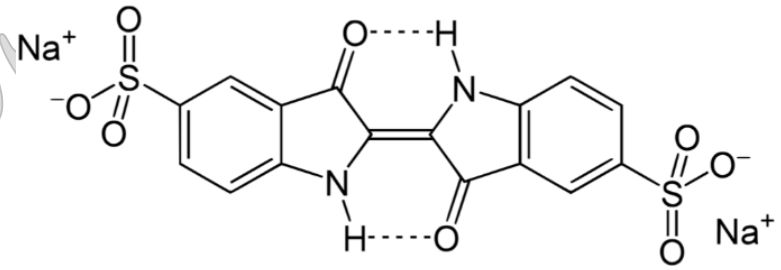


شکل ۴: ساختار شیمیایی ماده رنگزا مصنوعی برلیانت بلو (۸).

Figure 4: Chemical structure of Brilliant Blue synthetic dye (8).

۲-۴- ایندیگوکارمین (آبی شماره ۲)[1]

ایندیگو کارمین یا آبی شماره ۲ که ساختار شیمیایی آن در شکل ۵ مشاهده می‌شود. آبی شماره ۲ در پودرهای دسر، محصولات نانوایی، غلات، خوراکی ها، محصولات شیرینی سازی، گیلاس، سوسیس، بستنی، شربت و لبنیات و به عنوان رنگ نایلون، بخیه‌های جراحی، غذاها و داروها استفاده می شود و مصرف آن ۲/۵ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن در پیشنهاد می‌شود. ایندیگوکارمین در دستگاه گوارش شکسته می‌شود و محصول نهایی تجزیه آن اسید ۵-سولفوآنترانیلیک است. مطالعات متابولیسم در موش صحرایی نشان داد که اکثر مواد رنگزا و یا متابولیت های آن ها از طریق مدفوع دفع می شود و مقادیر کم‌تری در ادرار یافت می‌شود و مطالعات نشان می‌دهد که ۵-سولفوآنترانیلیک اسید بیشتر در ادرار جذب و دفع میشود. آبی شماره ۲ بر تولید مثل اثر نمی‌گذارد و یا باعث نقص هنگام تولد در موش یا خرگوش نمی‌شود. در دو مطالعه ی سمیت مزمن یا سرطان زایی در موش ها، این رنگ هیچ مشکلی ایجاد نکرد اما به دلیل این‌که مرحله فاز داخل رحمی را شامل نمی‌شدند و هر دو کوتاه تر از ۲ سال بود نقص داشتند. نگران‌کننده‌تر این بود که افزایش معنی‌دار آماری در گلیوماهای مغز و تومورهای بدخیم غدد پستانی در مدل موش مشاهده شد و با توجه به این افزایش بروز تومورها، به ویژه گلیوماهای مغزی، در موش، آبی شماره ۲ را نمی‌توان برای مصرف انسان ایمن در نظر گرفت (۸).



شکل ۵: ساختار شیمیایی ماده رنگزا مصنوعی ایندیگوکارمین (۸).

Figure 5: Chemical structure of indigo carmine synthetic dye (8).

مواد رنگزا مصنوعی آبی به طور گسترده در بسیاری از صنایع استفاده می شود. اگرچه آن‌ها برای استفاده به عنوان مواد رنگزا غذایی و در لوازم آرایشی و برخی داروها تایید شده اند، اما اثرات آنها بر سلامت مصرف کننده ناشناخته باقی مانده است. برخی از مطالعات نشان می دهد که ۲ مواد رنگزا مصنوعی، آبی شماره ۱ و آبی شماره۲ ممکن است اثرات سمی داشته باشند. بنابراین پیشنهاد شده است که این رنگ ها با مواد رنگزا طبیعی آبی از جمله فیکوسیانین جایگزین شوند (۸).

[1] FD&C Blue No. 2

۵- خواص فیکوسیانین

این ماده رنگزا طبیعی محلول در آب به علت خواص بی نظیری مانند تحریک سیستم ایمنی، فعالیت‌های آنتی اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد التهاب، ضد ویروسی، کاهش کلسترول و مارکر فلورسنت پتانسیل بالایی در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی و بیوتکنولوژی دارد. به طور کلی سیانوباکتری ها منابع بسیار غنی ترکیبات مغذی و مواد رنگزا طبیعی هستند که قابل افزودن به خوراک انسان می‌باشد (۱۳). خواص تغذیه‌ای و درمانی فیکوسیانین توجه جامعه صنعتی و محققان علمی را به خود جلب کرده است. ویژگی‌های فیکوسیانین مانند محافظت از کبد، آنتی اکسیدان و پتانسیل‌های ضد التهابی در بسیاری از مطالعات گزارش شده است. نویسندگان مختلف نتایج مرتبط با اثرات محافظتی کبدی فیکوسیانین را ارائه کردند و نشان داده شد که فیکوسیانین C دارای عملکرد پیشگیری در برابر سمیت کبدی ناشی از کادمیوم و در برابر آسیب سلول‌های کبدی ناشی ازتتراکلرید کربن است (۷). براساس درصد خلوص این ماده رنگزا، فرآورده ها یا زیست توده[1] *اسپیرولینا* کاربردهای متعددی به عنوان مکمل غذایی و دارویی پیدا می‌کند. بهبود تولید، استخراج و خالص سازی فیکوسیانین می‌تواند دامنه کاربرد آن را افزایش دهد (۵).

۶- منابع میکروبی

فیکوسیانین یک مجموعه ماده رنگزا پروتئین فتوسنتزی از خانواده فیکوبیلی پروتئین‌ها *(Phycobiliproteins)* موجود در جلبک‌های سبز آبی *(Cyanobacteria)* یا سیانوباکترها، جلبک‌های قرمز (*Rhodophyta*) یا رودوفیت ها و جلبک‌های خاکستری (*Cryptophytes*) یا کریپتوفیت ها است. بیش‌تر سیانوباکترها، مواد رنگزا فیکوبیلین و فیکوسیانین را تولید می‌کنند که غلظت بالای این مواد رنگزا باعث به وجود رنگ سبز- آبی در آن‌ها می‌گردد. سیانوباکترها به عنوان مهم‌ترین منابع طبیعی فیکوسیانین شناخته می‌شوند. ولی امروزه تمرکز زیاد بر استفاده از *اسپیرولینا* به عنوان منبع استخراج فیکوسیانین در مقیاس صنعتی است. اگرچه ارگانیسم های دیگر به عنوان منبع فیکوسیانین گزارش می‌شوند. مانند گیاهان دارای جلبک‌هایی از نژادها و خانواده های مختلف در Cyanophyceae و Rhodophyceae اما *اسپیرولینا* به دلیل پتانسیل تجاری آن، در میان سایر جنس های سیانوباکتریوم، به ویژه به دلیل ارزش غذایی بالا و تنوع استفاده، که بیش از ۳۰٪ از تولید بیومس جهان را به عهده دارد، مهم‌ترین تولید کننده فیکوسیانین است (زرندی میاندوآب و همکاران، ۱۴۰۱). فیکوسیانین توسط میکروارگانیسم‌های مختلفی مانند Spirulina sp. , Phormidium sp. , Lynghya sp. , Synechocystis sp. و Synechococcus sp تولید می‌شوند (۱۴) که در جدول ۱، نام این میکروارگانیسم‌ها و محققانی که این مواد رنگزا را مورد مطالعه قرار داده‌اند، مشاهده می‌شود. در میان این میکروارگانیسم‌ها، بیش‌ترین توجهات و مقالات منتشر شده، روی فیکوسیانین تولید شده توسط *اسپیرولینا* متمرکز است.

جدول ۱: میکروارگانیسم های تولیدکننده فیکوسیانین.

Table 1: Phycocyanin producing microorganisms.

Microorganism	Reference
Spirulina platensis	(15)
Calothrix sp.	(16)
Anabaena fertilissima PUPCCC 410.5	(17)
Galdieria sulphuraria	(18)
Arthrospira maxima	(19)
Geitlerinema sp. H8DM	(20)
Limnothrix sp. strain 37-2-1	(21)
Oscillatoria quadripunctulata	(22)
Pseudomonas spp.	(23)
Phormidium sp.	(24)
Lyngbya sp.	(24)
Aphanizomenon flos-aquae	(25)
Arthrospira platensis (Spirulina)	(26)

۷- کشت میکروبی

به دلیل اینکه بیشتر مقالات منتشر شده در تولید فیکوسیانین، روی تولید این ماده رنگزا از *اسپیرولینا* تمرکز یافته، در ادامه به بررسی تولید میکروبی فیکوسیانین در کشت *اسپیرولینا* می‌پردازیم. تولید موفق بیومس جلبک با فیکوسیانین بالا به عوامل متعددی از جمله شرایط رشد جلبک، قابلیت تجمع ماده رنگزا، تکنولوژی تولید و کارآیی فرآیند پایین‌دستی بستگی دارد (۵).

[1] Biomass

اسپیرولینا قادر به تولید مواد رنگزا مختلفی همچون کلروفیل، کاروتنوئید، فیکوسیانین، الوفیکوسیانین و فیکواریترین می‌باشد. جهت رسیدن به بیش‌ترین بازده تولید فیکوسیانین باید علاوه بر رشد میکروارگانیسم، شرایط را برای تولید بیش‌تر ماده رنگزا فیکوسیانین بهینه نمود. تنش‌های محیطی بر رشد و تجمع ماده رنگزا در سیانوباکتری ها اثر می‌گذارد که شامل دسترس بودن مواد مغذی، pH بالا، نور، شوری و دما تاثیر می‌گذارد. شرایط کشت می‌تواند بر مراحل رشد *اسپیرولینا پلاتنسیس* تاثیر بگذارد و باعث تغییر در ترکیب و نسبت فیکوبیلی‌پروتئین ها شود. مطالعات نشان داد که مقادیر ترکیب فنلی با تغییر شرایط کشت و افزایش پتانسیل آنتی‌اکسیدانی زیست توده *اسپیرولینا پلاتنسیس* به عنوان یک مکمل غذایی افزایش یافت (۲۷).

۱-۷- ترکیبات محیط کشت

محیط کشت باید دارای درشت مغذی ها و ریز مغذی ها به مقدار کافی باشد. درشت مغذی‌ها شامل شامل کربن، نیتروژن، فسفر، گوگرد، پتاسیم و عناصر کمیاب به عنوان مواد معدنی و ویتامین ها (سیانوکوبالامین، تیامین و بیوتین) می باشد. نیاز اساسی کشت یک منبع کربن و نیتروژن است که توسط بی کربنات سدیم و اوره تامین می‌شود (۲۸). به طور کلی، محیط کشت زاروک[1] برای کشت *اسپیرولینا* ترجیح داده می شود اما محیط های کشت دیگری نیز وجود دارد که به عنوان جایگزینی برای محیط کشت *اسپیرولینا* می‌باشد که در ادامه مورد بررسی قرار می گیرند. این واقعیت که محیط های *اسپیرولینا* دارای محتوای تغذیه ای قابل مقایسه با محیط کشت زاروک هستند، بر قیمت این محیط کشت ها تأثیر دارد. این امکان برای محیط های ارزان قیمت وجود دارد که سطوح رضایت‌بخشی از زیست‌توده، کلروفیل وپروتئین راتولید کنند. محیط کشت زاروک در مقایسه باسایر محیط کشت‌هایی که مورد ارزیابی قرار گرفتند، منجر به توسعه برتر می‌شود. با این حال مقدار بیش‌تری از موادشیمیایی را شامل می‌شود که منجر به افزایش قیمت آن مواد شیمیایی می‌شود. در تحقیقی با استفاده از مقایسه سه محیط کشت مختلف برای *اسپیرولینا* انجام نشان داده شد که محیط کشت زاروک حداکثر بهره‌وری زیست‌توده در حدود ۹۱/۵ میلی گرم بر لیتر بر روز را برای ۱۳روز را دارد، در حالی‌که محیط کشت هیری (Hiri) ۸۰/۵ میلی گرم بر لیتر بر روز و محیط جوردان (Jourdan) ۷۷/۹ میلی گرم در لیتر در روز زیست‌توده *اسپیرولینا* در مدت زمان مشابه تولید کرد، در نتیجه محیط کشت زاروک مناسب‌تر است (۲۹).

کومار و همکارانش آزمایش‌هایی برای ارزیابی شرایط کشت بهینه برای رشد *S.platensis* در محیط‌های مختلف از جمله محیط کشت زاروک، محیطBG11 ، محیط کشت کانوی، محیط F/2 و آب دریا انجام دادند. تجزیه و تحلیل رشد و وزن خشک به مدت ۳۰ روز به صورت روزانه کنترل شد. PH از ۹/۱ تا ۱۱ در محیط زاروک، ۸/۹ تا ۹/۲ کانوی در محیط F/2 و ۸/۵۷ تا ۸/۶۸ در محیط آب دریا یافت شد. وزن خشک (DW) به تدریج همراه با سن کشت افزایش یافت و مقدار ۱/۸۶ dw/L در محیط کشت زاروک به دست آمد. *S.platensis* تلقیح شده در محیط کانوی (Conway) و F/2 زنده ماندند اما رشد خوبی نداشت و در روز بیست و یکم کشت به حداکثر وزن خشک ۰/۵۲dw/L رسید. آب دریا غنی شده با مقادیر مختلف NaHCO3 و NaNO3 تأثیر معنی داری بر رشد *اسپیرولینا* نشان نداد. بنابراین این تحقیق نشان داد که محیط کشت زاروک در میان سایر محیط های کشت اشاره شده برای *اسپیرولینا* دارای پتانسیل رشد بیش‌تر و مناسب‌تر است (۳۰).

محیط کشت اختصاصی برای رشد جلبک *اسپرولینا*، محیط کشت زاروک می‌باشد. رشد و بازده زیست توده *اسپیرولینا* به در دسترس بودن مواد مغذی بستگی دارد. ترکیب محیط کشت زاروک در جدول ۲، مشاهده می‌شوند. ترکیب محیط کشت و هزینه آن عوامل چالش برانگیزی برای کشت انبوه سیانوباکتری‌ها هستند. محققان بررسی‌هایی را جهت بهینه‌سازی و اصلاح محیط کشت جهت کاهش هزینه-های محیط کشت و دستیابی به محیطی ساده، ارگانیک و ارزان انجام داده‌اند. از جمله سونی و همکاران در سال ۲۰۱۹، برای کشت *اسپیرولینا* در حوضچه باز و بسته از دو محیط کشت مختلف مانند محیط کشت زاروک و محیط اصلاح شده استفاده کردند. محیط کشت زاروک به عنوان محیط استاندارد برای کشت این باکتری بود و محیط آلی اصلاح شده با تغییر منبع نیتروژن تهیه شد. نرخ رشد بالاتر *اسپیرولینا* در هر دو محیط کشت مشاهده شد. در این بررسی، سرعت رشد *اسپیرولینا* در زیر حوضچه باز و راکتور بسته مشاهده شد و حداکثر رشد در پایان کشت در یک راکتور بسته با محیط اصلاح شده به دست آمد. به نظر می رسد اوره یک منبع جایگزین امیدوارکننده از نیتروژن، کم هزینه برای کشت های *اسپیرولینا* باشد. نتایج این محققین به وضوح نشان داد که محیط اصلاح شده جدید از نظر معیارهای ارزیابی عملکرد مانند بهره‌وری، نرخ رشد خاص، بهتر از محیط زاروک است که می توان از محیط های آلی اصلاح شده و سیستم راکتور بسته برای عملکرد بهتر زیست توده استفاده کرد (۳۱). شیخی نژاد و همکاران چند محیط کشت مختلف شامل محیط زاروک، جردن، اف۲، شولسر را جهت کشت *اسپیرولینا* مورد بررسی قرار دادند. *اسپیرولینا* در همه ی محیط های کشت رشد کرد و در هم زدن با چرخش محیط کشت، بیش‌ترین تولید زیست توده در محیط کشت زاروک گزارش شد (۳۲). بنابراین با توجه به توضیحات فوق زاروک می‌تواند به عنوان مناسب ترین محیط کشت برای *اسپیرولینا* باشد زیرا میزان تولید زیست توده در آن نسبت به سایر محیط کشت ها بیش‌تر است اما می‌توان گفت که محیط های دیگر نیز طبق توضیحاتی که در قسمت های بالاتر اشاره شد از لحاظ ارزان قیمت بودن

[1] Zarrouk medium

مقاله پذیرفته شده

مورد توجه قرار می‌گیرند.

جدول۲ : میزان ترکیبات محیط کشت زاروک (۳۳).

Table 2: The amount of Zarrouk culture medium compounds (28).

Zarrouk Medium	CO_3^{2-} : 12000 HCO_3^- : 12 203	Cl^- : 632.648	Na^+ :5675.28 K^+ : 763.1 Ca^{2+} : 14.4 Mg^{2+} : 19.7	Mn:0.61 Cu:0.02 Zn:0.005 Fe:2.01

در تحقیقی میزان رشد سویه *اسپیرولینا پلاتنسیس* و میزان فیکوسیانین آن در محیط‌های کشت مختلف با در نظر گرفتن ترکیبات اصلی کربن- نیتروژن- فسفر و ریز مواد موجود در آن ها و همچنین، شرایط استریلیزاسیون مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، محیط های پائولتی، شولسر و زاروک منتخب گردید و از هر محیط کشت ۲ تیمار با شرایط ترکیب شدن ریز مواد قبل از استریلیزاسیون با اتوکلاو و ترکیب شدن ریز مواد بعد از آن مورد نظر قرار گرفته شد. نتایج به دست آمده رفتارهای متفاوتی از این سویه در شرایط مختلف نشان داد که با توجه به تفاوت شرایط تاثیر مستقیم در میزان زیست توده داشت. تیمار محیط کشت زاروک که قبل از استریلیزاسیون تمامی ترکیبات از جمله ریز مواد ترکیب شده بودند بیش‌ترین میزان بیومس را دارا بود. همچنین میزان غلظت فیکوسیانین این محیط، از درصد مناسبی برخوردار بود و محیط های دیگر باتوجه به میزان حداقل کربنات موجود و همچنین تفاوت های فرآیند استریلیزاسیون در جایگاه‌های بعدی قرار گرفتند. بنابراین بر اساس نتایج می توان محیط زاروک و شرایط آماده سازی آن را برای رشد سویه سیانوباکتری *اسپیرولینا پلاتنسیس* و استخراج ماده رنگزا فیکوسیانین تعریف نمود (۱۰). تنش شوری رشد و بهره وری گیاه را که اغلب با کاهش فتوسنتز همراه است، مهار می‌کند. تعدادی از مطالعات برای بررسی اثر تنش شوری انجام شده است. تنش یونی در نتیجه ۰/۵ M نمک NaCl، مکانیسم فتوسنتز در گونه *Synechococcus* را متوقف می‌کند (۳۴).

۲-۷- شرایط کشت و بهینه‌سازی آن

افزایش تولید فیکوسیانین نه تنها تحت تأثیر کیفیت و کمیت نور استفاده شده است، بلکه تحت تأثیر شرایط کشت نیز قرار دارد. عوامل اصلی موثر بر کشت *اسپیرولینا* عبارتند از شدت نور، مواد مغذی، هوادهی، دما و PH (۳۵). بهینه‌سازی شرایط رشد و تولید زیست توده‌ی *اسپیرولینا* سبب می‌شود که فرآورده‌هایی با ارزش اقتصادی بیش‌تر و هزینه کم‌تر فراهم شود. مهم‌ترین اصل در توسعه فرآیند تولید تجاری سیانوباکتری ها در مقیاس وسیع، افزایش تولید بیومس و ماده خام است. رشدریزجلبک‌ها تحت تأثیر فاکتورهای فیزیکی (نور، دما و pH) و شیمیایی (عناصر ماکرو و میکرو به عنوان مواد مغذی) مختلفی قرار دارد (۳۶). توجه به این نکته مهم است که هر گونه و سویه باکتری دارای الزامات رشد خاصی است که باید قبل از تولید در مقیاس بزرگ بررسی شود (۳۵).

۱-۲-۷- هوادهی و هم زدن

هوادهی برای کشت ضروری است. و این دو پارامتر مهم در این زمینه هستند. هوادهی ناکافی می‌تواند منجر به ناکارآمدی در مصرف انرژی و تولید زیست توده شود. به همین ترتیب، فقدان هوادهی مناسب در محیط باعث شناوری سلول ها در بالای سطح می شود، زیرا واکوئل های پر از هوا وجود دارد، بنابراین برای اختلاط مناسب بدون ایجاد تنش برشی در سلول ها، هم زدن بایددر ۲۰ دور در دقیقه حفظ شود (۳۵).

۲-۲-۷- دما و PH

اسپیرولینا در شرایط آزمایشگاهی در دمای ۱۷ تا ۳۷ درجه سانتی گراد رشد دارد، دمای بین $^{\circ}C$ ۲۵ تا ۳۵ برای کشت سویه *اسپیرولینا پلاتنسیس* بهینه است (۳۶). دماهای بالاتر برای استخراج ترکیبات درون سلولی به محیط مهم هستند، اما فیکوسیانین پایداری خود رادر دماهای بالا از دست می‌دهد. علاوه بر این، قرار گرفتن در معرض نور شدید و pH پایین می‌تواند به تخریب فیکوسیانین کمک کند. اما از نظر برخی محققان دماهای بین ۲۵ تا ۴۷ درجه سانتی‌گراد نیز و pH ۶ نیز به عنوان شرایط مناسب توصیف شدند برخی محققان نشان دادند که فیکوسیانین تا دمای ۴۵ درجه سانتیگراد تجزیه نشد، اما تخریب بین ۴۷ درجه سانتی‌گراد و ۶۹ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و پس از ۷۰ درجه سانتی‌گراد بیش‌تر شد. بنابراین دمای تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد دمای مطلوب برای حفظ پایداری فیکوسیانین و جلوگیری از تخریب آن است (۳۵). pH نقش مهمی در فعالیت های متابولیکی ریزجلبک‌ها دارد و به شدت بر تولید زیست توده، تفکیک مواد شیمیایی و فیزیولوژی سلولی تاثیر می‌گذارد. pH یکی از عوامل محیطی است که بر رشد فیزیولوژیکی، فعالیت ها ی متابولیکی وتولید زیست‌توده *اسپیرولینا پلاتنسیس* تأثیر می‌گذارد. نتایج محققان مختلف نشان می‌دهد که *اسپیرولینا پلاتنسیس* می‌تواند با شرایط pHمتغیر سازگار شود (۳۷، ۳۸). پوزا-کاریون و همکاران نشان داد که افزایش pH (۷-۹) به طور قابل توجهی باعث افزایش محتوای

فیکوبیلی‌پروتئین ها Nastoc sp می‌شود (۳۹).

۳-۲-۷- شدت نور

شدت نور ایده آل برای کشت *اسپیرولینا* ۲۰۰ میکرومول بر متر است. شدت نور بالا باعث افزایش فاکتورهای رشد مانند حداکثرسرعت رشد ویژه می شود، اما شدت نور کم باعث تولید زیست توده غنی از مواد رنگزا و پروتئین می‌شود. کشت های جلبکی در فضای باز در معرض دو چرخه مختلف نور و تاریکی قرار می‌گیرند. یک مطالعه ثابت کرد که با افزایش شدت نور، تولید زیست توده نیز افزایش می یابد که ثابت می کند شدت نور و تولید زیست توده نسبت مستقیم دارند (۳۵). هنگامی که *اسپیرولینا* در تاریکی یا شدت نور زیر ۱۰۰۰ لوکس رشد کند، کشت جلبک مقدار بسیار کمی از زیست توده تولید می نماید. در مقابل، مقدار زیادی زیست توده با شدت نور بالاتر از ۱۵۰۰ تا ۳۵۰۰ لوکس تولید می‌شود. با شدت نور ۲۵۰۰ لوکس، بهترین نرخ رشد به دست می‌آید (۳۱).

۴-۲-۷- سیستم کشت در کشت *اسپیرولینا*

سه سیستم کشت وجود دارد که به طور گسترده برای کشت *اسپیرولینا* استفاده می شود که شامل سیستم های باز، سیستم های بسته و سیستم های ترکیبی است. با در نظر گرفتن مزایا و معایب کلیه سیستم های کشت *اسپیرولینا*، سیستم های باز و هیبرید به طور گسترده ای برای کشت اسپیرولینا در مقیاس بزرگ استفاده می‌شود. چندین مزیت از جمله سرمایه گذاری کم و سهولت در کار را می‌توان از استفاده ازاین سیستم ها به دست آورد (۳۵).

بهترین شرایط گزارش شده برای کشت *اسپیرولینا* برای تولید فیکوسیانین، ترکیبی از دمای حدود ۳۰ درجه سانتی‌گراد، شدت نور ۳۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه، pH ۱۰- ۱۰/۵، و محیطی حاوی آب شیرین، بی کربنات سدیم، نیترات، فسفات، سولفات ها و ریز عناصر می‌باشد. اگرچه منبع نیتروژن برای تولید فیکوسیانین اهمیت ویژه ای دارد، اما می‌توان از منابع دیگر مانند اوره، آمونیوم کلرید، سولفات آمونیوم و اسید آمونیوم فسفات نیز استفاده کرد (۳۵).

در تحقیقی توسط شهبازی و همکاران، از محیط غذایی متداول برای *اسپیرولینا* استفاده شد و بدیهی است بهینه سازی محیط و شرایط محیط کشت برروی نرخ رشد سویه های مورد استفاده و تولید فیکوسیانین تاثیر داشت. بهترین محیط کشت برای رشد جلبک *اسپیرولینا* محیط کشت زاروک، دمای ۲۸ °C، نور ۲۰۰-۴۰۰ $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ و pH =۹ با هوادهی کافی پیشنهاد شده است (۵). شارما و همکاران، در تحقیقی به بررسی محتوای کربن، نمک و pH روی تولید فیکوسیانین، الوفیکوسیانین و فیکواریترین توسط Spirulina platensis پرداختند. در این تحقیق اثر شرایط تنش بر رشد *اسپیرولینا پلاتنسیس* بر حسب چگالی نوری در طول موج ۶۷۰ نانومتر بیان شد. تجزیه و تحلیل بیوپیگمان به صورت هفتگی در طی ۳۰ روز کشت مورد ارزیابی قرار گرفت. مشاهده شد که زیست توده *اسپیرولینا پلاتنسیس* توسط تمام عوامل غیرزیستی مانند pH، شوری، کمبود کربن اعمال شده، مهار شد. در جدول ۳ توسط شارما و همکاران تیمارها و متغیرهای مورد بررسی اشاره شده است (۲۷).

جدول ۳: آزمایش هایی برای ارزیابی اثر شرایط مختلف استرس (۲۷).

Table 3: Experiments to evaluate the effect of different stress conditions (25).

Group	Treatment
G1.	Standard ($NaHCO_3$ – 18.0 g/l, 0.017 M salinity, pH 9)
G2.	-100% Carbon deficiency ($NaHCO_3$ – 0.0 g/l)
G3.	-75% Carbon deficiency($NaHCO_3$ – 4.5 g/l)
G4.	-50% Carbon dificiency ($NaHCO_3$ – 9.0 g/l)
G5.	0.2 M Salinity
G6.	0.4 M Salinity
G7.	0.6 M Salinity
G8.	0.8 M Salinity
G9.	PH 6
G10.	PH 7
G11.	PH 10
G12.	PH11

در میان تمام شرایط آزمایش شده کمبود ۱۰۰٪ کربن و بعد pH=۷، به ترتیب بیش‌ترین میزان کلروفیل a، را داشتند. حداقل این PH این ماده رنگزا مربوط به pH=۱۱، بود. کاهش محتوای کلروفیل-a عمدتاً به دلیل کاهش غلظت دی اکسید کربن آزاد در محیط با pH بالا (>10) است زیرا در این pH شکل کربناته غالب است و فرم بی کربنات همان است که توسط *اسپیرولینا پلاتنسیس* استفاده می‌شود. میزان کاروتنوئیدها در pH برابر با ۷ و ۶، به ترتیب بیش‌ترین میزان را داشتند و حداقل این مواد رنگزا مربوط به بیش‌ترین شوری محیط ۰/۶ M، به دست آمد. بیش‌ترین میزان فیکوسیانین با تفاوت بسیار قابل توجهی در شوری ۰/۴M به دست آمد. نتایج به دست آمده نشان داد که هر گونه تغییر در محتوای کربن منجر به تاثیر قابل توجهی بر رشد و تجمع فیکوبیلی‌پروتئین‌ها می‌شود، زیرا تنفس نوری که از غشای فتوسنتزی در برابر آسیب های ناشی از نور در مواقعی که جذب کربن محدود است سیانوباکتری ها به تجمع منابع کربن غیرآلی بستگی دارند(۲۷).

عبدالبکی گزارش داد که افزایش سطح شوری در محیط غذایی منجر به افزایش قابل توجه فیکوسیانین و سایر پروتئین های محلول در *Spirulina maxima* شد (۴۰).

۸- روش‌های بهبود پایداری فیکوسیانین

فیکوسیانین محلول در فاز آبی، نسبت به حرارت و نور ناپایدار می‌باشد. فیکوسیانین 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 می‌شود. فیکوسیانین در محلول‌های اسیدی و قلیایی شدید، ناپایدار است. محدوده pH بهینه برای فیکوسیانین بین ۵/۵ تا ۶ است و تا $45\ ^{o}C$ ثابت می‌ماند. این ترکیب در معرض دماهای نسبتاً بالا یا pH اسیدی، نیمه عمر آن را کاهش می‌دهد و ثابت جنبشی تخریب را افزایش می‌دهد. فیکوبیلی پروتئین‌ها به نور حساس هستند. نتایج پایداری فیکوسیانین در برابر اتانول نیز نشان داد که به طور کلی حدود ۵۰ درصد از فیکوسیانین در اتانول ۲۵ درصد تجزیه می‌شود (۵).

به نظر می‌رسد مواد نگهدارنده مانند مونو و دی‌ساکارید، اسیدسیتریک یا کلریدسدیم از عوامل تثبیت کننده موثر می‌باشند. روش‌های مختلف جداسازی و خالص‌سازی به عنوان یک مانع بزرگ با توجه به پایداری فیکوسیانین در طول فرآیندهای استخراج و خالص‌سازی در نظر گرفته می‌شوند. به نظر می‌رسد این مولکول به تنش‌های محیطی به ویژه دما، pH و نور بسیار حساس است. این ناپایداری همچنین استفاده از آن را در حوزه‌های غذایی و آرایشی برای توسعه محصولات، محدود می‌کند زیرا با تغییر رنگ آبی به سبز یا تغییر رنگ کامل باعث تغییر رنگ جزئی می‌شود. برای جلوگیری از تخریب فیکوسیانین و بهبود ماندگاری آن، استفاده از عوامل تثبیت کننده یا کپسوله کردن مستقیم در انواع مختلف ذرات برای حفظ رنگ و جلوگیری از دناتوره شدن آن مورد بررسی قرارگرفته است. افزودن عوامل تثبیت کننده مانند مونو یا دی ساکارید، کلریدسدیم یا اسیدسیتریک از تخریب این ماده رنگزا جلوگیری می‌کند (۴۱).

۸-۱- استفاده از مواد نگهدارنده

نگهدارنده‌ها برای افزایش پایداری فیکوسیانین استفاده می‌شوند. ساختارشیمیایی و غلظت مواد نگهدارنده مورد استفاده مهم است زیرا مخلوط حاصل باید برای انسان بی‌خطر بماند. آن‌ها نباید پروتئین را دناتوره کنند یا خواص نوری و آنتی‌اکسیدانی آن را تغییر دهند. بنابراین، برخی از مواد به دلایل ایمنی حذف می‌شوند به عنوان مثال آزید سدیم و دی تیوتریتول، یا به دلیل آن که القای رسوب پروتئین بسیار مهم است به عنوان مثال NaCl، ترکیبات انتخاب شده مونو یا دی ساکارید (گلوکز، فروکتوز، ساکاروز، ترهالوز، لاکتوز، مالتوز وسوربیتول)، نمک‌های معدنی (کلرید سدیم و کلرید کلسیم)، و اسیدهای آلی (اسیدسیتریک، اسید اسکوربیک و اسیدبنزوئیک) بودند. اسید سیتریک به عنوان نگهدارنده خوب، برای فیکوسیانین اعلام شده است (۴۲). در برخی از مطالعات، ترکیبات مرتبط هستند در برخی دیگر، ماتریس‌های طبیعی آزمایش شده‌اند (عسل معمولی و عسل مانوکا *(Leptospermom scoparium)*) و پلیمرها نیز مورد استفاده قرار گرفتند. رنگدانه Biopterin-α-glucoside نیز برای بهبود پایداری فیکوسیانین انتخاب شده است (۴۳). باتوجه به تجزیه نوری فیکوسیانین، وجود رنگدانه Biopterin-α-glucoside از تخریب و تغییر رنگ آن جلوگیری کرد (۴۱).

در مورد مونو و دی‌ساکاریدها، چندین مطالعه نشان داد که این ترکیبات می‌توانند پایداری پروتئین را بهبود بخشند (۴۲، ۴۴، ۴۵، ۴۶، ۴۷). بعضی از این ترکیبات بهتر از بقیه بودند. به عنوان مثال گلوکز ۲۰٪ یا سوربیتول ۵۰٪ منجر به افزایش ۲ برابری پایداری نسبت به نمونه کنترل شد (۴۶). سایر محققان اهمیت غلظت مونو یا دی‌ساکاریدها را به جای خود ترکیب بیان کردند (۴۸).

۹- تولید ماده رنگزا فیکوسیانین

روش‌های مختلف تولید فیکوسیانین شامل تولید فتواتوتروف، میکسوتروف، هتروتروف و تولید نوترکیب است (۴۹).

۹-۱- تولید فوتواتوتروفیک

این یک روش در فضای باز برای تولید فیکوسیانین توسط کشت های فوتواتوتروفیک سیانوباکتری است که در حوضچه‌های باز عمدتاً در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری رشد می‌کند. *اسپیرولینا پلاتنسیس* به دلیل در دسترس بودن آن معمولاً به عنوان میزبان برای تولید انتخاب شده است، این یکی از معدود میکروارگانیسم های فوتواتوتروف است که می‌توانندر حوضچه های باز رشد کنند، بدون اینکه با ارگانیسم های آلوده رقابت کنند (۴۹).

۹-۲- تولید میکسوتروفیک

در روش تولید میکسوتروف، کشت *اسپیرولینا پلاتنسیس* قرار است در یک راکتور بسته که دارای منبع کربن آلی مانند گلوکز است انجام شود. کشت میکسوتروف درمقایسه با کشت های فوتواتوتروفیک باعث رشد سریع‌تر و افزایش حداکثر غلظت زیست توده می‌شود. بهره‌وری تولید فیکوسیانین در محیط کشت‌های درونی میکسوتروفیک نسبت به محیط‌کشت‌های بیرونی فوتواتوتروفیک *اسپیرولینا* بیش‌تر است (۴۹).

۹-۳- تولید هتروتروف

فرآیندهای میکروبی هتروتروف محدود به شدت نور تابشی نیستند و پتانسیل تولید بسیار بالاتری نسبت به فرآیندهای وابسته به نور دارند. بنابراین رعایت نسبت سطح به حجم اجباری نیست. جلبک قرمز تک‌سلولی، *Galdieria sulphuraria*، گزینه مناسب برای تولید هتروتروف فیکوسیانین است. *G. sulphuraria* حاوی مقدار زیادی فیکوسیانین و مقدار جزئی آلوفیکوسیانین است. زیستگاه طبیعی آن چشمه‌های آب گرم و اسیدی است، بنابراین شرایط رشد بهینه در دمای بالاتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد را دارد و قادر است از منابع مختلف کربن استفاده کند. سویه‌هایی از *اسپیرولینا* هم می‌توانند در تاریکی روی گلوکز و فروکتوز به‌صورت هتروتروفی رشد کنند (۵۰).

۹-۴- تولید نوترکیب

در روش تولید نوترکیب تولید پروتئین نوترکیب گزینه‌ای برای سنتز هتروتروف فیکوسیانین است. تولید هولوپروتئین چند زنجیره فیکوبیلی پروتئین، چالش برانگیزتر از تولید سایر پروتئین‌های نوترکیب است. سنتز کامل فیکوبیلی پروتئین به بیان همزمان زنجیره‌های a و b و همچنین سنتز موازی و درج صحیح فیکوبیلین‌ها بستگی دارد. به منظوربهره‌برداری از این ماده رنگزا طبیعی، فیکوسیانین باید از فیکوبیلیزوم استخراج و تصفیه شود. استخراج فیکوبیلی‌زوم‌ها از سیانوباکترها به‌دلیل دیواره سلول بسیار مقاوم و اندازه کوچک باکتری‌ها، عمل بسیارسختی است اما روش‌های متعددی برای انجام آن وجود دارد که نسبت به هر رنگدانه متفاوت است (۵۰).

۱۰- استخراج رنگدانه فیکوسیانین

استخراج فیکوسیانین عمدتا تحت پارامترهای فیزیکی شیمیایی زیر است: دما، PH، نوع حلال، نسبت زیست توده به حلال، شکل زیست توده (خشک یا تازه)، زمان استخراج و روش تخریب سلولی می‌باشد. استخراج فیکوسیانین از نظر غلظت فیکوسیانین با استفاده از حلال های مختلف از جمله آب مقطر، فسفات سدیم و بافرهای استات سدیم، $CaCl_2$، NaCl انجام می‌شود. درمورد PHو نوع حلال، PH به طور مستقیم بر حلالیت فیکوسیانین به دلیل تأثیر قدرت یونی حلال بر ساختار پروتئین تأثیر می‌گذارد. بهترین شرایط pH بین ۶ و ۷ گزارش شده است زیرا فیکوسیانین در pH های زیر ۵ و بالاتر از ۸ ناپایدار بود. برای کنترل pH محیط استخراج، معمولاً از محلول بافر آبی به عنوان حلال در محدوده pH پایداری ماده رنگزا استفاده می‌شود. متداول‌ترین محلول بافر سدیم فسفات است. علاوه بر محلول‌های بافر، آب مقطر و سایر محلول‌های آبی مانند CaCl2 ۱/۵٪ و NaCl ۰/۱۵ مولار نیز به عنوان حلال استفاده شد. برخی از محققان دریافتند که محلول آبی $CaCl_2$ ۱/۵٪ در مقایسه با آب مقطر و بافر سدیم فسفات منجر به بازده استخراج بالاتری می‌شود. سایر محققان با استفاده از بافر فسفات سدیم، آب مقطر، محلول NaCl ۰/۱۵مولار و محلول $CaCl_2$ بازده استخراج مشابهی را به دست آوردند. از طرف دیگر، بازده کم‌تری با استفاده از بافر استات مشاهده شد. در مورد نسبت زیست توده به حلال به طور کلی، هرچه نسبت زیست توده به حلال بیش‌تر باشد، بازده استخراج بالاتر است. با این حال، نسبت زیست توده به حلال بالا، منجر به کاهش خلوص عصاره می‌شود. تعداد کمی از محققان نسبت زیست توده به حلال را برای استخراج فیکوسیانیناز *اسپیرولینا* ارزیابی کرده اند و نتایج مبهم هستند (۵۱). به منظور استخراج فیکوسیانین از باکتری *اسپیرولینا* می‌بایست ابتدا دیواره سلولی میکروارگانیسم شکسته شود. استخراج ماده رنگزا از سیانوباکتری های سبزآبی به دلیل دیواره سلولی مقاوم و اندازه کوچک سلول تا حدودی دشوار است. جهت شکستن دیواره سلولی و آزادسازی فیکوسیانین از سلول، روش‌های گوناگونی وجود دارد. در مقیاس تجاری و بزرگ نیاز به روش‌های ساده، کارآمد، موثر و مقرون به صرفه در جداسازی فیکوسیانین می‌باشد. برای استخراج این ماده رنگزا روش‌های گوناگونی وجود دارد، یکی از در دسترس‌ترین روش‌ها انجماد و ذوب است، به این صورت که مقداری جلبک مرطوب *اسپیرولینا* را درون فریزر قرار داده تا کامل منجمد شود سپس آن را گرم می‌کنند تا

به حالت مایع برگردد، این فرآیند را سه یا چهار بار انجام می‌دهند تا فیکوسیانین در محیط آزاد شود. البته همراه این ماده رنگزا مواد زیاد دیگری نیز وجود دارد. برای خالص‌سازی فیکوسیانین ابتدا محلول را سانتریفیوژ یا فیلتر می‌کنند. سپس آن را با آمونیوم سولفات رسوب می‌دهند و از ستون کروماتوگرافی استفاده کرده و در نهایت آن را خشک می‌کنند (۱۳).

به طور خلاصه، روش‌های مختلف استخراج برای فیکوسیانین شامل استخراج با حلال متعارف مانند خیساندن، مالش و تراوش و فرآیندهای دیگری که برای استخراج گزارش شده شامل فرآیند انجماد-ذوب مکرر، استخراج به کمک آنزیم و تکنیک‌های استخراج جدید مانند استخراج با کمک اولتراسوند[1]، استخراج به کمک مایکروویو[2]، پردازش فشار بالا[3] (HPP)، میدان‌های الکتریکی پالسی[4] (PEF) و استخراج سیال فوق‌بحرانی[5] است. همچنین می‌توان از تیمارهای شیمیایی (اسید آلی و معدنی)، تیمارهای فیزیکی (انجماد و ذوب، فراصوت، همگن‌سازی و میدان الکتریکی‌پالسی)، تیمار آنزیمی (لیزوزیم) وترکیب‌های آن‌ها استفاده کرد (۵۲). فرآیند جداسازی فیکوسیانین شامل مراحل مختلف تخریب سلولی، استخراج اولیه و خالص‌سازی است. برخی از فرآیندها به امکانات و تجهیزات بزرگ، و زمان پردازش طولانی نیاز دارند. با این حال، بازده فیکوسیانین کم است (۱۹).

فیکوسیانین را می‌توان از زیست‌توده مرطوب و خشک استخراج کرد، اگرچه دومی عملکرد بسیاربالاتری را ارائه می‌دهد و دمای بالای مورد استفاده در فرآیند خشک کردن نه تنها بر وضعیت فیکوبیلیسوم تأثیر می‌گذارد، بلکه به از دست دادن فیکوسیانین نیز کمک می‌کند (۵۳). روش استخراج، حلال‌ها، نسبت حلال به زیست‌توده و زمان استخراج بر بازده به دست آمده تأثیر می‌گذارد (۵۴). در میان روش‌های مورد استفاده به منظور بهینه‌سازی استخراج فیکوسیانین روش سطح پاسخ (RSM) به عنوان یک ابزار جالب برای تعیین دقیق تاثیر چندین عامل بر فیکوسیانین و تعیین شرایط استخراج بهینه گزارش شد (۲۶).

۱-۱۰- تخریب سلولی و جداسازی

برای شکستن دیواره سلولی روش های متنوعی نظیر استفاده از فرآیندهای فیزیکی مانند شوک اسمزی، انجماد در ۲۰°C- و بازگشت به دمای ۴ °C در چند مرحله، سونیکاسیون یا استفاده ازدستگاه پرس و یا روش‌های شیمیایی مانند استفاده از آنزیم‌ها، شوینده‌ها (Detergents)، اسیدها و بافرها وجود دارند. طبق مشاهدات در بین روش‌های مزبور، استفاده از بافر در استخراج به دلیل حفظ ماهیت پروتئینی فیکوسیانین و تخریب کم‌تر آن تحت این شرایط، نتایج بهتری به دست داد. در روش استخراج با بافر، ابتدا به منظور تعیین نوع بافر آزمایشی طراحی شد که در آن بافر پتاسیم فسفات در مقایسه با بافرهای سدیم سیترات و سدیم فسفات نتایج بهتری از نظر خلوص و میزان فیکوسیانین نشان داد. لذا این بافر به عنوان بهترین محلول استخراج کننده انتخاب گردید. غلظت های متفاوت بافر با نسبت مشخصی از بیومس اختلاط گردید و فرآیند استخراج در مدت زمان‌های مختلف به مدت ۴ ساعت در همزن با دور ۲۲۰ rpm انجام گردید. سپس نمونه ها در دور ۱۸۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانترفیوژ شده و پس از این مرحله، قسمت رویی (فیکوسیانین ناخالص) جدا شد (۵).

۲-۱۰- خالص سازی اول

مرحله خالص‌سازی یکی از مهم ترین مراحل تولید فیکوسیانین به شمار می‌رود. ۵۰ تا ۹۰ درصد هزینه‌های مربوط به تولید این رنگ مربوط به مراحل خالص‌سازی آن می‌باشد. براساس درصد خلوص، این ماده رنگزا کاربردهای متعددی به عنوان رنگ خوراکی، مکمل غذایی و دارویی پیدا می‌کند (۵). روش‌های کروماتوگرافی از جمله کروماتوگرافی[6] تبادل یونی، کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، کروماتوگرافی غشایی و کروماتوگرافی برهم کنش آب گریز(غشایی) تکنیک های بسیار مستندی هستند که معمولا برای خالص سازی فیکوسیانین استفاده می‌شوند (۷). برای خالص‌سازی فیکوسیانین از موادی چون آمونیوم سولفات، کیتوزان، زغال فعال و پلی‌اتیلن گلایکول استفاده می شود. پلی‌اتیلن گلایکول و آمونیوم سولفات هر دو جزو مواد سمی بوده و زمان فرآیند دراین روش بسیار زیاد بوده و باتوجه به اینکه این مواد با فیکوسیانین ترکیب می‌شوند جداسازی آن‌ها ازهم بسیار دشوار می‌باشد. هم‌چنین استفاده ازآمونیوم سولفات به مدت طولانی یک یا دو روز نیاز دارد که این فرآیند موجب دناتوره شدن پروتئین فیکوسیانین و کاهش میزان فعالیت آن می‌گردد (۵). به منظور غلبه بر این نقیصه ها، در طرح پیشنهادی ترکیبات دوستدار محیط زیست، سالم و ایمن همچون کیتوزان (غیرسمی) و ذغال فعال جهت خالص‌سازی فیکوسیانین مورد استفاده قرار گرفتند که علاوه بر تسریع امر خالص‌سازی، سبب حفظ خصوصیات کمی و کیفی محصول مورد نظر نیز می‌شوند (۵۵).

---

[1] Ultrasound-assisted extraction (UAE)
[2] Microwave-assisted extraction (MAE)
[3] High pressure processing
[4] Pulsed electric field (PEF)
[5] Supercritical fluid extraction (SFE)
[6] Chromatography

۳-۱۰- خالص سازی دوم و تغلیظ

خلوص فیکوسیانین قبل ازمرحله خالص‌سازی به دلیل حساسیت بالای آن به نور، اکسیژن و رطوبت و همچنین میزان بالای دیگر پروتئین‌ها پایین است. لذا خالص‌سازی بیش‌تر و تغلیظ امری مهم در فرآیند تولید فیکوسیانین به شمار می‌رود. روش های متنوعی به منظورحذف پروتئین‌های دیگر، خالص‌سازی و تغلیظ فیکوسیانین وجود دارند. یکی از بهترین و ارزان‌ترین روش‌ها جهت بهبود کیفیت رنگ و بالا بردن خلوص، استفاده از فناوری فیلتراسیون غشایی می‌باشد. فناوری‌های غشایی که مواد را به صورت فیزیکی و براساس وزن مولکولی جدا می‌کنند، یکی از کارآمدترین روش ها برای جداسازی پروتئین ها به شمار می‌روند. استفاده ازغشای اولترافیلتراسیون باعث افزایش خلوص و تغلیظ رنگ شده و قدرت رنگ را افزایش داد. رنگ جداسازی شده به روش خشک کن پاششی[1] خشک می‌شود (۵).

ارزیابی کمی رنگ استحصالی با استفاده از دستگاه رنگ سنج هانترلب 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 ماده رنگزا سبز و مقادیر مثبت *a توصیف کننده ماده رنگزا قرمز می‌باشد. همچنین مقادیر منفی *b نشان دهنده میزان ماده رنگزا آبی و مقادیر مثبت *b نشان دهنده میزان ماده رنگزا زرد می‌باشد. در جدول ۴، مقایسه این پارامترها در عصاره خام، ماده رنگزا خالص‌شده به روش مرسوم، ماده رنگزا استحصالی با استفاده از کیتوزان/ زغال فعال، ماده رنگزا شرکت Hansen و ماده رنگزا بریلیانت بلو را نشان داده شد. نتایج بیانگر آن بود که در میان پارامترهای رنگ سنجی، پارامتر *b (توصیف کننده رماده رنگزا آبی) در نمونه خارجی و نمونه استحصالی به روش کیتوزان/ زغال فعال مشابه می‌باشد (۵).

جدول۴: مقایسه نمونه‌های رنگ آبی به وسیله دستگاه هانترلب (۵).

Table 4: Comparison of blue color samples by Hunterlab device (5).

Amounts	Brilliant Blue (chemical dye)	Foreign sample Hansen) Company)	Color purified with chitosan/activated charcoal	Purified color in the conventional way	crude extract
L*	42.93	21.55	42.99	48.47	56.36
a*	-6.82	14.74	-1.26	3.11	-11.92
b*	-23.56	-39.08	-31.96	-20.15	-17.16

۴-۱۰- فیلتراسیون غشایی (میکرو فیلتراسیون و اولترافیلتراسیون)

اگرچه رسوب نمک آمونیوم یک روش متداول برای خالص‌سازی فیکوسیانین است، اما این فرآیند زمان زیادی می‌برد و خالص شدن کامل از نمک پس از رسوب دشوار است (۷). بنابراین، سینگ و همکاران اولترافیلتراسیون را برای تغلیظ عصاره خام فیکوسیانین و افزایش شاخص خلوص انجام دادند (۵۶). بعدها، گارسیا لوپز و دیگران تکنیک های میکروفیلتراسیون و اولترافیلتراسیون را برای خالص‌سازی فیکوسیانین انجام دادند. در ابتدا، میکروفیلتراسیون برای جداسازی عصاره خام فیکوسیانین از بقایای سلولی استفاده شد. سپس فیکوسیانین استخراج شده به یک محلول تبدیل شد، غلیظ شده و با اولترافیلتراسیون خالص شد (۵۷). از سوی دیگر، فیگویرا و همکاران تنها کاربرد فرآیند اولترافیلتراسیون را برای زمان بر است و دشواری حذف کامل نمک پس از رسوب، تکنیک های میکرو و اولترافیلتراسیون را گزینه های جالبی برای شفاف سازی عصاره خام فیکوسیانین برای به دست آوردن شاخص خلوص ۰/۷۵-۱/۵ (مناسب برای استفاده به عنوان رنگ خوراکی) پیشنهاد کرد. تکنیک‌های میکروفیلتراسیون و اولترافیلتراسیون برای انجام عملیات های بزرگ آسان است. علاوه بر این، آن‌ها یک فرآیند ارزان‌تر و صرفه جویی در انرژی را برای غلظت و خالص‌سازی فیکوسیانین پیشنهاد می‌کنند (۵۸). تکنیک های فیلتراسیون غشایی همچنین اثرات نامطلوب گرما بر ساختار پروتئین را حذف می‌کند. اگرچه رسوب سولفات آمونیوم یکی دیگر از روش های رایج برای خالص‌سازی فیکوسیانین‌ها است، اما فرآیندی خالص‌سازی c-phycocyanin می‌کند (۷). در نتیجه به طور کلی، فیکوسیانین با استفاده از رسوب سولفات آمونیوم، کیتوزان، زغال فعال، کروماتوگرافی و فیلتراسیون غشایی خالص‌سازی می‌شود. روش خالص‌سازی اخیرا توسعه یافته با استفاده از زغال فعال یک جایگزین ارزان تر و جایگزین پایدار برای تکنیک های خالص سازی موجود است.

۱۱- کاربردها

۱-۱۱- کاربردهای فیکوسیانین

[1] Spray dryer

کاربرد فیکوسیانین به طور کلی به عنوان یک ماده رنگزا طبیعی در صنایع غذایی و آرایشی برای جایگزینی رنگ های مصنوعی دیده می شود. فیکوبیلی پروتئین ها همچنین به عنوان نشانگرهای فلورسنت در مطالعات بیوشیمیایی و مهندسی زیستی با سنجش های ایمونولوژیکی مختلف به دلیل جذب مولی بالا و طول موج انتشار مرئی، حلالیت بالا در آب، بازده کوانتومی فلورسانس بالا و ضریب خاموشی زیاد استفاده شده‌اند. با توجه به همه این ویژگی ها، فیکوسیانین‌ها به طور گسترده به عنوان نشانگرهای مناسب در انواع تکنیک های فلورسانس بسیار حساس مانند تمرکز ایزوالکتریک، برچسب گذاری سلولی و ماکرومولکول ها، کروماتوگرافی، حذف ژل، الکتروفورز ژل و میکروسکوپ فلورسانس استفاده می‌شوند. تقاضاهای زیادی برای این ماده رنگزا فلورسنت طبیعی در صنعت داروسازی و تشخیصی فعلی وجود دارد. همچنین ماده رنگزا فیکوسیانین می‌تواند به عنوان یک نشانگر فلورسنت برای تشخیص حضور سیانوباکتری استفاده شود. کاربرد این ماده رنگزا در غذاها، محصولات آرایشی و بهداشتی از جمله نوشیدنی ها، آدامس ها، محصولات لبنی تخمیر شده و حتی خوراک ماهی کپورکوی استفاده می شود. همچنین از فیکوسیانین در رنگ آمیزی شیرینی جات مانند صمغ و آب نبات، مایه های یخ زده، روکش ها و رویه های دسر، نوشیدنی ها، پودرها، مخلوط ها، پودینگ ها، ژلاتین، غلات (غیر از انواع اکسترود شده) و پوشش استفاده می شود (۷). فیکوسیانین به تصفیه خون، غلبه بر آنمی(کم خونی)، یبوست، ترمیم زخم ها، تنظیم سوخت و ساز بدن و سم‌زدایی کمک می‌کند. این ماده حاوی گلیکوژن است که قادر به تولید سریع انرژی می‌باشد بدون این‌که موجب کاهش قند خون گردد (۱۱). نقش ضد سرطانی فیکوسیانین در بهبود سرطان هایی مثل سرطان پستان، کبد، ریه، روده بزرگ، لوسمی و سرطان مغز استخوان هم در in vitro و هم در in vivo ثابت شده است. ویژگی سایتوتوکسیکی فیکوسیانین باعث کشته شدن تومورهای سرطانی می‌شود و در عین حال، بافت تا جای ممکن سالم می‌ماند. نحوه مهار سلول سرطانی توسط فیکوسیانین به گونه ای است که فیکوسیانین می‌تواند روی چرخه سلول و باعث جلوگیری پیش رفتن چرخه سلولی می شود و سپس مسیر آپوپتوتیک سلول را فعال می‌کند و در نهایت سلول سرطانی از بین می‌رود. رنگدانه فیکوسیاین غیرسمی و غیرکارسینوژنیک است و در بعضی کشورها مثل ژاپن مورد تایید برای استفاده در لوازم آرایشی، خوراکی هایی مثل بستنی و نوشیدنی ها است و ماده رنگزا آبی به این فرآورده ها می‌دهد. اما برای مثال بعضی کشورهای اتحادیه اروپا این ماده رنگزا طبیعی را برای استفاده در محصولات تایید نمی‌کنند. در ایالات متحده آمریکا از فیکوبیلین های استخراج شده از *اسپیرولینا پالتنسیس* برای رنگی کردن خوراکی هایی مثل آدامس جویدنی استفاده می‌کنند (۱۰).

۲-۱۱- کاربرد در نانو فناوری

نانوتکنولوژی چندین دهه است که به سرعت بهبود یافته و در انواع محصولات زیستی و زمینه ها مانند پزشکی، مهندسی، بیوشیمی و فیزیک و علم مواد کاربرد دارد. نانوذرات نقره (Ag NPs) به دلیل پتانسیل ضد میکروبی خود، به عنوان نگهدارنده مواد غذایی توسعه یافته اند. فیکوسیانین استخراج شده از ریزجلبک *اسپیرولینا* می‌تواند در بیوسنتز نانو ذرات نقره استفاده شود. برای درمان سرطان‌زایی، از فیکوسیانین برای سنتز NPs در طول درمان فوتودینامیک و فتوترمال استفاده شد. اخیراً، فیکوسیانین ترکیب شده در آلبومین سرم گاوی برای پلیمریزاسیون و تثبیت نانوذرات پلی‌پیرول مورد استفاده قرار گرفت. گروه دیگری از محققان همچنین کاربرد نانویی قوی فیکوسیانین را برای درمان سرطان با ترکیب فیکوسیانین با نانوالیاف الکتروریسی نشان داده‌اند (۷).

۱۲- نتیجه گیری

مواد رنگزا آبی یکی از رنگ‌های پرمصرف در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی و دارویی است. امروزه از رنگ های مصنوعی مانند بریلیانت بلو در صنعت غذا استفاده می‌شود که عوارض زیادی برای مصرف‌کننده دارد. فیکوسیانین یک ماده رنگزای طبیعی خوراکی با خاصیت آنتی اکسیدانی است که می‌تواند جایگزین بسیار خوبی برای رنگ های شیمیایی باشد. این ماده رنگزا توسط ریزجلبک‌ها از جمله *اسپیرولینا* تولید می‌شود. تحقیقات مختلف در تولید و استخراج این محصول به صورت بیوتکنولوژیکی به صورت موفقیت آمیز انجام شده است. شرایط کشت، ترکیبات محیط کشت و PH عواملی هستند که در میزان تولید این ماده رنگزا تاثیرگذار هستند. روش‌های خالص‌سازی مورد استفاده برای تهیه فیکوسیانین شامل شکستن سلول، استخراج و خالص‌سازی آن است. از جمله روش‌های خالص‌سازی فیکوسیانین شامل ترسیب با سولفات آمونیوم، تغلیظ فیکوسیانین و استفاده از فیلتراسیون غشایی (میکروفیلتراسیون و اولترافیلتراسیون) می‌باشد. فیکوسیانین کاربردهای بسیار زیادی به عنوان ماده رنگزا در غذاها، محصولات آرایشی و بهداشتی، ترکیبات آنتی اکسیدانی و کاربرد در نانو فناوری نیز دارد و نه تنها برای مصرف انسان هیچ‌گونه خطری ندارد بلکه فواید بسیار زیادی دارد.

تعارض منافع

در این مقاله هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل تحقیق در گروه صنایع غذایی موسسه آموزش عالی بصیر توسط استاد و دانشجو است.

۱۳- منابع

1. Pourasad M, Akbari Adergani B, Baghaei H. Edible colors in the food industry, connections and attractiveness. 23rd National Congress of Food Science and Industry of Iran. 2014; Quchan. [In Persion].
2. Bahremand M, Abayi A, Soleimani Rad A. Evaluation of the potential of using carotenoids and other natural pigments as food colorings. the first national conference on snacks. 2013; Mashhad. [In Persion].
3. Mokhtarian M, Tavakoli Sh, Types of natural food colors produced by microorganisms and their application in food industry. 10th National Conference on Sustainable Agriculture and Natural Resources, 2019; Tehran. [In Persion].
4. Ghamari M, Rezagholi Y. A review of the biotechnological production of edible colors. the 6th International Conference on Agricultural and Environmental Engineering with a sustainable development approach. 2019. [In Persion].
5. Shahbazi M, Fekrat F, Nami B, Ghaffari A, Extraction and purification of phycocyanin pigment from *Spirulina* microalgae. Agricultural Biotechnology Research Institute. 2018; (30). [In Persion].
6. Tanaka T, Takahashi O, Inomata A, Ogata A, Nakae D. Reproductive and neurobehavioral effects of brilliant blue FCF in mice. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2012;95(6):395-409. https://doi.org/10.1002/bdrb.21029.
7. Ashaolu TJ, Samborska K, Lee CC, Tomas M, Capanoglu E, Tarhan Ö, et al. Phycocyanin, a super functional ingredient from algae; properties, purification characterization, and applications. Int J Biol Macromol. 2021;193:2320-2331. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.064.
8. Olas B, Białecki J, Urbańska K, Bryś M. The effects of natural and synthetic blue dyes on human health: A review of current knowledge and therapeutic perspectives. Adv Nutr. 2021;12(6):2301-2311. https://doi.org/10.1093/advances/nmab081.
9. Ramesh C, Vinithkumar NV, Kirubagaran R, Venil CK, Dufossé L. Multifaceted applications of microbial pigments: current knowledge, challenges and future directions for public health implications. Microorganisms. 2019;7(7):186. https://doi.org/10.3390/microorganisms7070186.
10. Ashharshanjani N, Sheikhinejad A, Hosseinpour N. Investigation of phycocyanin pigment extraction according to *spirulina* strain growth variables in different culture environments. 10th International Conference on Food Industry Science, Organic Agriculture and Food Security. 1401. https://civilica.com/doc/1489330. [In Persion].
11. Faraji D, Rezaei K, Golmakani MT, Hashemi Ravan M. Optimization of phycocyanin production from *spirulina* algae under different cultivation conditions, 20th National Congress of Food Science and Industry, 2018; Tehran. https://civilica.com/doc/148729. [In Persion].
12. Hsieh-Lo M, Castillo G, Ochoa-Becerra MA, Mojica L. Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability. Algal Res. 2019;42:101600. https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101600.
13. Rasmi Mamaghani H, vaghari H, Ahmadi O, Jafarizadeh Malmiri H. Phycocyanin pigment: its importance, application and extraction method. 6th International Conference on Food Industry Science, Organic Agriculture and Food Security. 2019; https://civilica.com/doc/1195959. [In Persion].
14. Jiang L, Wang Y, Yin Q, Liu G, Liu H, Huang Y, et al. Phycocyanin: a potential drug for cancer treatment. J. Cancer. 2017;8(17):3416. https://doi.org/10.7150%2Fjca.21058.
15. Eriksen NT. Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. Appl Microbiol Biotechnol. 2008;80(1):1-14. https://doi.org/10.1007/s00253-008-1542-y.
16. Santiago-Santos MC, Ponce-Noyola T, Olvera-Ramírez R, Ortega-López J, Cañizares-Villanueva RO. Extraction and purification of phycocyanin from Calothrix sp. Process Biochem. 2004;39(12):2047-2052. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.10.007.
17. Kaur S, Khattar JI, Singh Y, Singh DP, Ahluwalia AS. Extraction, purification and characterisation of phycocyanin from Anabaena fertilissima PUPCCC 410.5: as a natural and food grade stable pigment. J. Appl. Phycol. 2019;31(3):1685-1696. https://doi.org/10.1007/s10811-018-1722-9.
18. Moon M, Mishra SK, Kim CW, Suh WI, Park MS, Yang JW. Isolation and characterization of thermostable phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*. Korean J Chem Eng. 2014;31(3):490-495. https:/doi.org/10.1007/s11814-013-0239-9.
19. Choi WY, Lee HY. Effect of ultrasonic extraction on production and structural changes of C-phycocyanin from marine *Spirulina maxima*. Int. J. Mol. Sci. 2018;19(1):220. https://doi.org/10.3390/ijms19010220.
20. Patel V, Berthold D, Puranik P, Gantar M. Screening of cyanobacteria and microalgae for their ability to synthesize silver nanoparticles with antibacterial activity. Biotechnol. Rep. 2015;5:112-119. https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.12.001.
21. Gantar M, Simović D, Djilas S, Gonzalez WW, Miksovska J. Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycocyanin from *Limnothrix* sp. strain 37-2-1. J. Biotechnol. 2012;159(1-2):21-26. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.02.004.
22. Soni B, Kalavadia B, Trivedi U, Madamwar D. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*—Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. Process Biochem. 2006;41(9):2017-2023. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.04.018.
23. Cuellar- Bermudez SP, Aguilar- Hernandez I, Cardenas- Chavez DL, Ornelas- Soto N, Romero- Ogawa MA, Parra-Saldivar R. Extraction and purification of high- value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. Microb Biotechnol. 2015;8(2):190-209. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12167.
24. Patel A, Mishra S, Pawar R, Ghosh P.K. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. Protein Expr. Purif. 2005;40(2):248-255. https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.10.028.
25. Barsanti L, Coltelli P, Evangelista V, Frassanito AM, Passarelli V, Vesentini N, et al. Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection. Oddities and curiosities in the algal world. NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology. (pp. 353-391). Springer, Dordrecht; 2008. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8480-5_17.
26. Benchikh Y, Filali A, Rebai S. Modeling and optimizing the phycocyanins extraction from *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) algae and preliminary supplementation assays in soft beverage as natural colorants and antioxidants. J. Food Process. Preserv. 2021;45(2):e15170. https://doi.org/10.1111/jfpp.15170.
27. Sharma G, Kumar M, Ali MI, Jasuja ND. Effect of carbon content, salinity and pH on *Spirulina platensis* for

phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrin accumulation. J Microb Biochem Technol. 2014;6(4):202-206. https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000144.
28. Athiyappan KD, Routray W, Paramasivan B. Phycocyanin from *Spirulina*: A comprehensive review on cultivation, extraction, purification, and its application in food and allied industries. Food and Humanity. 2024;2:100235. https://doi.org/10.1016/j.foohum.2024.100235.
29. AlFadhly NK, Alhelfi N, Altemimi AB, Verma DK, Cacciola F. Tendencies affecting the growth and cultivation of genus *Spirulina*: An investigative review on current trends. Plants. 2022;11(22):3063. https://doi.org/10.3390/plants11223063.
30. Dineshkumar R, Narendran R, Sampathkumar P. Cultivation of *Spirulina platensis* in different selective media. INDIAN J. MAR. SCI. 2016; 45(12):1749-1754.
31. Soni RA, Sudhakar K, Rana RS. Comparative study on the growth performance of *Spirulina platensis* on modifying culture media. Energy Rep. 2019;5:327-336. https://doi.org/10.1016/j.egyr.2019.02.009.
32. Sheykhi Nejad A, Lababpour A.M, Moazami N. Increasing Cyanobacteria *Spirulina* Production with Mixing and Chemical Composition of Culture Medium. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology). 2015; 28(2): 344-353. https://dorl.net/dor/20.1001.1.23832592.1394.28.2.12.9 [In Persion].
33. Rahim A, Çakir C, Ozturk M, Şahin B, Soulaimani A, Sibaoueih M, et al. Chemical characterization and nutritional value of *Spirulina platensis* cultivated in natural conditions of Chichaoua region (Morocco). S. Afr. J. Bot. 2021;141:235-242. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.05.006.
34. Allakhverdiev SI, Sakamoto A, Nishiyama Y, Inaba M, Murata N. Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. Plant Physiol. 2000;123(3):1047-1056. https://doi.org/10.1104/pp.123.3.1047.
35. Fernandes R, Campos J, Serra M, Fidalgo J, Almeida H, Casas A, et al. Exploring the Benefits of Phycocyanin: From *Spirulina* Cultivation to Its Widespread Applications. Pharmaceuticals. 2023;16(4):592. https://doi.org/10.3390/ph16040592.
36. Soni RA, Sudhakar K, Rana RS. Comparative study on the growth performance of *Spirulina platensis* on modifying culture media. Energy Rep. 2019;5:327-336. https://doi.org/10.1016/j.egyr.2019.02.009.
37. Çelekli A, Yavuzatmaca M, Bozkurt H. Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. Bioresour. Technol. 2009;100(14):3625-3629. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.055.
38. Ogbonda KH, Aminigo RE, Abu GO. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. Bioresour. Technol. 2007;98(11):2207-2211. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.08.028.
39. Poza-Carrión C, Fernández-Valiente E, Piñas FF, Leganés F. Acclimation of photosynthetic pigments and photosynthesis of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain UAM206 to combined fluctuations of irradiance, pH, and inorganic carbon availability. J. Plant Physiol. 2001;158(11):1455-1461. https://doi.org/10.1078/0176-1617-00555.
40. Abd El-Baky HH. Over Production of Phycocyanin Pigment in Blue Green Alga *Spirulina* sp. and lt's Inhibitory Effect on. J. Med. Sci. 2003;3(4):314-324. https://doi.org/10.3923/jms.2003.314.324.
41. Adjali A, Clarot I, Chen Z, Marchioni E, Boudier A. Physicochemical degradation of phycocyanin and means to improve its stability: A short review. J. Pharm. Anal. 2022;12(3):406-414. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.12.005.
42. Mishra SK, Shrivastav A, Mishra S. Effect of preservatives for food grade C-PC from *Spirulina platensis*. Process Biochem. 2008;43(4):339-345. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.12.012.
43. Saito T, Ishikura H, Hada Y, Fukui K, Kodera Y, Matsushim A, et al. Photostabilization of phycocyanin and anthocyanin in the presence of biopterin-α-glucoside from *Spirulina platensis* under ultraviolet ray. Dyes and pigments. 2003;56(3):203-207. https://doi.org/10.1016/S0143-7208(02)00163-8.
44. Antelo FS, Costa JA, Kalil SJ. Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. Biochem. Eng. J. 2008;41(1):43-47. https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.03.012.
45. Faieta M, Neri L, Sacchetti G, Di Michele A, Pittia P. Role of saccharides on thermal stability of phycocyanin in aqueous solutions. Food Res. Int. 2020;132:109093. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109093.
46. Braga ARC, Figueira FD, Silveira JT, Morais MG, Costa JA, Kalil SJ. Improvement of thermal stability of c-phycocyanin by nanofiber and preservative agents. J. Food Process. Preserv. 2016;40(6):1264-1269. https://doi.org/10.1111/jfpp.12711.
47. Martelli G, Folli C, Visai L, Daglia M, Ferrari D. Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. Process Biochem. 2014;49(1):154-159. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.10.008.
48. Chaiklahan R, Chirasuwan N, Bunnag B. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. Process Biochem. 2012;47(4):659-664. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.010.
49. Kuddus M, Singh P, Thomas G, Al-Hazimi A. Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycocyanin. Biomed Res Int. 2013. https://doi.org/10.1155/2013/742859.
50. Zarandi-Miandoab L, Pouryousef F, Razavi S F, Chaparzadeh N. Phycocyanin, as a cyanobacterial antioxidant: structure, function and applications. Plant Proc and Function 2022; 0(1) :1-22. http://dorl.net/dor/20.1001.1.23222727.1401.0.1.1.5. [In Persion].
51. Jaeschke DP, Teixeira IR, Marczak LD, Mercali GD. Phycocyanin from *Spirulina*: A review of extraction methods and stability. Food Res. Int. 2021;143:110314. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110314.
52. Chittapun S, Jonjaroen V, Khumrangsee K, Charoenrat T. C-phycocyanin extraction from two freshwater cyanobacteria by freeze thaw and pulsed electric field techniques to improve extraction efficiency and purity. Algal Res. 2020;46:101789. https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101789.
53. Sarada RM, Pillai MG, Ravishankar GA. Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. Process biochem. 1999;34(8):795-801. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00153-8.
54. Abalde J, Betancourt L, Torres E, Cid A, Barwell C. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. Plant Sci. 1998;136(1):109-120. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00113-7.
55. Rigi M, Zarifjo M, Review on phycocyanin extraction from *spirulina* algae. 6th international conference on modern

مقاله پذیرفته شده

research in agricultural Engineering, environment, and natural resources. 2022; Tehran. https://civilica.com/doc/1504073. [In Persion].
56. Singh NK, Parmar A, Madamwar D. Optimization of medium components for increased production of C-phycocyanin from *Phormidium ceylanicum* and its purification by single step process. Bioresour. Technol. 2009;100(4):1663-1669. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.021.
57. García-López DA, Olguín EJ, González-Portela RE, Sánchez-Galván G, De Philippis R, Lovitt RW, et al. A novel two-phase bioprocess for the production of *Arthrospira (Spirulina) maxima* LJGR1 at pilot plant scale during different seasons and for phycocyanin induction under controlled conditions. Bioresour. Technol. 2020;298:122548. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122548.
58. Figueira FDS, Moraes CC, Kalil SJ. C-phycocyanin purification: Multiple processes for different applications. Braz. J. Chem. Eng. 2018;35(3):1117-1128. https://doi.org/10.1590/0104-6632.20180353s20170160.

مقاله پذیرفته شده