JRIFST
مقالهٔ کامل پژوهشی

https://journals.rifst.ac.ir
ISSN: 2252-0937(print), 2538-2357(online)
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۴۰۱، جلد ۱۱، شماره ۲، صفحات ۲۲۲-۲۰۹
https://doi.org/10.22101/JRIFST.2022.340779.1356

تأثیر روش‌های استخراج پیوسته و مجزا بر بازده و کیفیت پروتئین و کلروفیل استخراجی از ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* (*Spirulina Platensis*)

ساناز اورجه[1*]، پرستو پورعاشوری[1]، بهاره شعبانپور[1]، سیدولی حسینی[2]

۱- گروه عمل‌آوری فراورده‌های محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
* نویسندهٔ مسئول (urajeh.s72@gmail.com)
۲- گروه عمل‌آوری فراورده‌های محصولات شیلاتی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۸
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۵/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۱۸
تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۱/۰۶/۱۵

واژه‌های کلیدی
استخراج ترکیبات زیست‌فعال
انجماد-انجمادزدایی
ریزجلبک *اسپیرولینا*
فراصوت

OPEN ACCESS
CC BY

چکیده

اسپیرولینا ریزجلبک سبزآبی به‌عنوان منبع عالی پروتئین و رنگ‌های طبیعی غذایی مانند فیکوبیلی‌پروتئین‌ها و کلروفیل‌هاست و ازاین‌رو استخراج این ترکیبات زیست‌فعال اهمیت زیادی دارد. در این تحقیق تیمار مکانیکی (انجماد-انجمادزدایی، همگن‌سازی، امواج فراصوت) و تیمار شیمیایی (خیساندن در حلال‌های اتانول و آب) برای استخراج و جداسازی پروتئین و کلروفیل از ریزجلبک *اسپیرولینا* به دو روش مجزا و پیوسته انجام شد. میزان کلروفیل و پروتئین استخراج‌شده، طیف جذبی نمونه‌ها (۲۰۰-۸۰۰ نانومتر)، ترکیب اسیدآمینهٔ ریزجلبک و پروتئین‌های استخراج‌شده در تیمارهای انتخابی موردبررسی قرار گرفتند. طبق نتایج استخراج کلروفیل در روش پیوسته بیشتر از روش مجزا و استخراج با اتانول در هر دو روش مجزا و پیوسته حلال مناسب با بازده بالاتر بود. استفاده از روش انجماد-انجمادزدایی نیز در استخراج کلروفیل مؤثر بود. درمورد استخراج پروتئین در بین تیمارها استفاده از همگن‌سازی و امواج فراصوت برای شکستن مکانیکی دیواره‌ها و کمک به استخراج ترکیبات روش مناسب‌تری بود و سبب افزایش بازده استخراج پروتئین شد. تحت شرایط یکسان برای تیمارها، روش پیوسته برای استخراج کلروفیل و پروتئین با بازده بالاتر و استفاده از تیمار همگن‌سازی دور بالا و امواج فراصوت پیشنهاد می‌گردد و حلال اتانول در استخراج کلروفیل حلال و روش انجماد و انجمادزدایی تیمار مکانیکی مناسب شکست دیوارهٔ سلولی بود.

مقدمه

محتوای پروتئین بالا در برخی از گونه‌های ریزجلبک یکی از دلایل اصلی درنظرگرفتن آنها به‌عنوان یک منبع پروتئین است (Hayes *et al.*, 2017). تعدادی از گونه‌های ریزجلبک‌ها برای اهداف مختلف ازجمله آرایشی، دارویی، غذای حیوانات، استخراج اسیدهای چرب، رنگدانه و سایر ترکیبات فعال‌زیستی، تصفیهٔ فاضلاب و تولید سوخت‌های زیستی به‌کارگرفته می‌شوند (Bleakley & Hayes, 2017; Ursu *et al.*, 2022; Sangian *et al.*, 2014). ریزجلبک‌ها منبعی مغذی و غنی از اسیدهای آمینهٔ ضروری، گاما-لینولنیک اسید، فیبرها، ویتامین‌های گروه B، کلسیم، فسفر، آهن، رنگدانه‌هایی مانند بتاکاروتن، کلروفیل و سایر ترکیبات فعال‌زیستی فیکوبیلی‌پروتئین‌ها[1] هستند (Hayes *et al.*, 2017). ریزجلبک *آرتروسپیرا پلاتنسیس*[2] حاوی ۷۰ درصد پروتئین، بسیاری از ویتامین‌ها، نمک‌های معدنی، اسیدهای چرب، بسیاری

[1] Phycobiliprotein
[2] *Arthrospira platensis*

از اسیدهای آمینه است و به یک منبع پروتئین کامل گیاهی منحصربه‌فرد تبدیل شده است (Boukhari *et al.*, 2018). ازسوی‌دیگر منبع عالی رنگ‌های طبیعی غذایی مانند فیکوبیلی‌پروتئین‌ها، کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدهاست. فیکوبیلی‌پروتئین‌ها باتوجه‌به کاربرد زیاد در داروسازی (نشانگر فلورسنت)، لوازم آرایشی و همچنین در صنایع غذایی (به‌عنوان رنگ طبیعی) توجه زیادی را به خود معطوف نموده است (Barkallah *et al.*, 2017; Tavanandi & Raghavarao, 2019). جلبک‌های دریایی و ریزجلبک‌ها منبع مناسبی از پروتئین محسوب می‌شوند. برخی از این گونه‌ها دارای مقدار پروتئین مشابه با منابع پروتئینی مرسوم مانند گوشت، تخم‌مرغ، سویا و شیر هستند (Bleakley & Hayes, 2017). *اسپیرولینا* دارای مقدار مناسبی کلروفیل نیز می‌باشد کلروفیل یک ترکیب زیست‌فعال با کاربرد وسیع در داروسازی، غذا و صنعت رنگ است. به‌طور عمده دو نوع رنگدانهٔ سبز، یعنی کلروفیل (a و b) وجود دارد. کلروفیل در برابر دمای بالا، نور یا هوا ناپایدار است و این موضوع کیفیت کلروفیل استخراجی را تنزل می‌دهد (Ursu *et al.*, 2014). جهت استخراج ترکیبات زیست‌فعال روش‌های مختلفی به‌کاررفته است شامل فراصوت، استخراج به کمک امواج مایکروویو، تیمارهای آنزیمی، تیمار با فشار بالا و استفاده از آسیاب است. *اسپیرولینا* به روش‌های ملایم‌تری برای شکستن دیواره‌های سلولی نیاز دارد (Zhao *et al.*, 2018). مطالعه‌های بسیاری دراین‌زمینه انجام شده است. Choi و Lee (۲۰۱۸) افزایش استخراج کلروفیل از *اسپیرولینا ماکسیما*[1] توسط فرایند استخراج با کمک فراصوت را موردبررسی قرار دادند. کلروفیل a تحت شرایط بهینهٔ استخراج با فراصوت و در دمای ۳۲/۵۹ درجهٔ سانتی‌گراد و ۴/۹۱ ساعت، (۱۷/۹۸ میلی‌گرم درگرم) به‌دست‌آمد. این میزان بیشتر از استخراج *کلرلا پیرونوئیدوزا*[2] با حلال اتانول ۷۰ درصد (۱۳/۸۱ میلی‌گرم در گرم) بود. مطالعهٔ این محققان بیشترین اهمیت را در فرکانس فراصوت و زمان فرایند و کمترین اهمیت را در دما نشان داد. در مطالعهٔ دیگر Zhang و همکاران (۲۰۱۸) استخراج پروتئین درون‌سلولی با استفاده از ترکیبی از خیساندن در اتانول، هضم آنزیمی، فراصوت و تکنیک‌های همگن‌سازی را بررسی کردند. مطالعهٔ آنها نشان داد در شرایط بهینهٔ استخراج، ترکیبی از روش‌های خیساندن در اتانول ۶۰ درصد، هضم آنزیمی، فراصوت و همگن‌سازی ۷۲/۴ درصد پروتئین از ریزجلبک *کلرلا پیرونوئیدوزا* استخراج شد. Tavanandi و همکاران (۲۰۱۸) روش ساده و کارآمد برای استخراج سی-فیکوسیانین[3] از *اسپیرولینا* را بررسی کردند و نتایج آنها نشان داد فراصوت-انجماد و انجمادزدایی منجربه بالاترین بازده استخراج معادل ۹۲ درصد می‌شود و همچنین فراصوت-مایکروویو ۸۳/۴۵ درصد بازده داشت. در اکثر این مطالعه‌ها از منبع ریزجلبک، فقط پروتئین و یا رنگدانه استخراج شد.

هدف از مطالعهٔ حاضر تعیین روش مناسب با بازده بالا جهت استخراج پروتئین و کلروفیل از ریزجلبک *اسپیرولینا* در دو روش پیوسته و مجزا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق باتوجه‌به هدف، دو روش پیوسته و مجزا جهت استخراج ترکیبات از ریزجلبک *اسپیرولینا* موردبررسی قرار گرفته است. برای بررسی اثر استخراج از دو حلال (آب و اتانول ۶۰ درصد) و روش‌های مکانیکی (انجماد-انجمادزدایی، همگن‌سازی دور بالا و امواج فراصوت) استفاده شد و تمام آزمایش‌ها با سه تکرار صورت گرفت.

مواد آزمایش

پودر ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس*[4] گرید خوراکی از بانک ملی جلبک ایران، ترت-بوتانول، سولفات آمونیوم، اتر، هگزان (اپلیکم)، معرف بیورت، اسید سولفوریک (Merck، ساخت آلمان)، الکل اتیلیک طبی ۹۶ درصد (شرکت زکریای جهرم)، فویل آلومینیومی و آب‌مقطر تهیه شد.

استخراج پروتئین به روش پیوسته

در روش پیوسته از یک منبع ریزجلبک ابتدا پروتئین و سپس کلروفیل استخراج شد. جهت استخراج پروتئین با کمک حلال آب و اتانول ۶۰ درصد پودر ریزجلبک *اسپیرولینا* با نسبت ۱:۱۰ در حلال خیسانده و به دور از

[1] *Spirulina maxima*
[2] *Chlorella pyrenoidosa*
[3] C-phycocyanin
[4] *Spirulina platensis*

نور قرار داده شد و مخلوط حلال و ریزجلبک روی همزن به مدت ۲ ساعت گذاشته تا به‌خوبی عمل آب‌گیری (۲۴ درجهٔ سانتی‌گراد) انجام شود. پس از ۲۴ ساعت نمونه‌ها با ۱۱۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ (۵۸۱۰، Ependorf R، ساخت آلمان) شدند. برای اطمینان از استخراج پروتئین شست‌وشوی نمونه‌ها با حلال اولیه سه بار تکرار شدند. پس از جمع‌آوری سوپرناتانت و برای جداسازی پروتئین و پلی‌ساکارید ابتدا ترت-بوتانول با نسبت ۱:۲ اضافه شد و بعد سولفات آمونیوم ۴۰ (درصد/وزنی) به سوپرناتانت اضافه گردید و سپس برای جداسازی نمونه‌ها با ۱۱۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از این مرحله سه فاز تشکیل (فاز اول: ترت-بوتانول، فاز دوم: پروتئین و فاز سوم: پلی‌ساکاریدها) و پروتئین‌ها جدا شد، برای جداشدن پروتئین، از کل محلول پروتئین ۲۰ میلی‌لیتر برداشته و پس از رقیق‌سازی در طول موج‌های ۶۲۰، ۶۵۰ و ۲۸۰ نانومتر (Biochrom، Libra S12، ساخت انگلستان) خوانده شد و برای خشک‌کردن نمونه‌ها در دستگاه فریزدرایر (Labconco FreeZone 4.5 L، MO، ساخت آمریکا) قرار داده شدند.

تیمار انجماد-انجمادزدایی[1]

در روش استخراج پروتئین با کمک انجمن-انجمادزدایی (هیمالیا F305، ساخت ایران)، ابتدا پودر ریزجلبک *اسپیرولینا* با نسبت ۱:۱۰ در آب‌مقطر خیسانده شد و سپس در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت انجماد و ۲ ساعت انجمادزدایی در دمای محیط طی ۴ چرخه انجام شد. در جداسازی پروتئین و پلی‌ساکارید، ابتدا ترت-بوتانول با نسبت ۱:۲ اضافه شد و بعد سولفات آمونیوم ۴۰ (درصد/وزنی) به سوپرناتانت اضافه گردید و سپس برای جداسازی نمونه‌ها با ۱۱۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از این مرحله سه فاز تشکیل و پروتئین‌ها جدا شد، برای جداشدن پروتئین، از کل محلول پروتئین ۲۰ میلی‌لیتر برداشته و پس از رقیق‌سازی در طول موج‌های ۶۲۰، ۶۵۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و برای خشک‌کردن نمونه‌ها در دستگاه فریزدرایر قرار داده شدند.

استخراج با کمک امواج فراصوت[2]

در این روش؛ پس از ۲ ساعت آب‌گیری، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با توان ۴۰۰ وات (۲ ثانیه روشن، ۲ ثانیه خاموش) نمونه‌ها تحت امواج فراصوت (هموژنایزر التراسونیک ۴۰۰ وات، ساخت ایران) قرار گرفتند. پس از این مدت نمونه‌ها جهت جداسازی با ۱۱۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و برای اطمینان از استخراج پروتئین شست‌وشوی نمونه‌ها سه بار تکرار شد. پس از جمع‌آوری سوپرناتانت برای جداسازی پروتئین و پلی‌ساکارید ابتدا ترت-بوتانول با نسبت ۱:۲ اضافه شد و بعد سولفات آمونیوم ۴۰ (درصد/وزنی) به سوپرناتانت اضافه گردید و سپس برای جداسازی نمونه‌ها با ۱۱۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس مرحلهٔ سه فاز تشکیل و پروتئین‌ها جدا شد و برای جداشدن پروتئین، از کل محلول پروتئین ۲۰ میلی‌لیتر برداشته و پس از رقیق‌سازی در طول موج‌های ۶۲۰، ۶۵۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و برای خشک‌کردن نمونه‌ها در دستگاه فریزدرایر قرار داده شدند.

استخراج به کمک همگن‌سازی دور بالا[3]

در روش استخراج به کمک همگن‌سازی دور بالا، پودر آب‌گیری‌شدهٔ ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق در ۲۴۰۰۰ دور در دقیقه همگن شدند. پس از این مدت نمونه‌ها جهت جداسازی با ۱۱۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. ابتدا ترت-بوتانول با نسبت ۱:۲ اضافه شد و بعد سولفات آمونیوم ۴۰ (درصد/وزنی) به سوپرناتانت اضافه گردید و سپس برای جداسازی نمونه‌ها با ۱۱۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از این مرحله، سه فاز تشکیل و پروتئین‌ها جدا شد، برای جداشدن پروتئین، از کل محلول پروتئین ۲۰ میلی‌لیتر

[1] Freeze-Defreeze

[2] Ultrasonic

[3] Homogenization

برداشته و پس از رقیق‌سازی در طول موج‌های ۶۲۰، ۶۵۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و برای خشک‌کردن نمونه‌ها در دستگاه فریزدرایر قرار داده شدند (Tavanandi & Raghavarao, 2019).

استخراج کلروفیل

در روش پیوسته، پس از استخراج پروتئین، برای استخراج کلروفیل از رسوب باقی‌مانده از تیمارها استفاده شد. به‌این‌دلیل رسوب حاصل حاوی کلروفیل و چربی بود. برای جداسازی ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر مخلوط اتانول ۶۰ درصد و هگزان با نسبت (۱:۱ حجمی/حجمی) و ۱۰ میلی‌لیتر سولفوریک اسید اضافه شد و سپس نمونه‌ها در قیف جداکننده ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت به دور از نور و در دمای محیط (۲۰-۲۴ درجهٔ سانتی‌گراد) قرار داده شد. پس از این مدت ۳ لایه در قیف جداکننده تشکیل شد که فاز اول چربی، فاز دوم رسوب و فاز سوم کلروفیل بود. کلروفیل جدا و در پتری‌دیش ریخته شد و در این مرحله برای خواندن طیف جذبی در طول موج ۶۶۶ و ۶۵۳ نانو متر کلروفیل نمونه جدا شد (Tavanandi & Raghavarao, 2019).

استخراج پروتئین به روش مجزا

تیمار حمام آبی و استخراج با اتانول ۶۰ درصد

برای انجام این تیمار، ابتدا پودر ریزجلبک *اسپیرولینا* با نسبت ۱:۱۰ در حلال خیسانده و به دور از نور قرار داده شد و پس از آب‌گیری به مدت ۲۴ ساعت در حمام آبی با دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد/اتانول ۶۰ درصد گذاشته شد. پس از این مدت نمونه‌ها جهت جداسازی با ۱۱۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. برای اطمینان از استخراج پروتئین شست‌وشوی نمونه‌ها سه بار تکرار شد. سپس سوپرناتانت‌ها را جمع‌آوری و در پتری‌دیش ریخته شدند و در این مرحله برای خواندن طیف جذبی پروتئین، نمونه جدا شد. برای جداشدن پروتئین، از کل محلول پروتئین ۲۰ میلی‌لیتر برداشته و پس از رقیق‌سازی در طول موج‌های ۶۲۰، ۶۵۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و برای خشک‌کردن نمونه‌ها در دستگاه فریزدرایر قرار داده شدند.

تیمار انجماد-انجمادزدایی

جهت انجام این استخراج، ابتدا ریزجلبک آب‌گیری‌شده به مدت ۴ ساعت منجمد و ۲ ساعت انجمادزدایی شد و این سیکل با ۴ بار تکرار صورت گرفت. پس از این مدت، نمونه‌ها جهت جداسازی با ۱۱۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. برای اطمینان از استخراج پروتئین شست‌وشوی نمونه‌ها سه بار تکرار شد. سپس سوپرناتانت‌ها را جمع‌آوری و در پتری‌دیش ریخته شدند و در این مرحله برای خواندن طیف جذبی پروتئین نمونه جدا شد. برای جداشدن پروتئین، از کل محلول پروتئین ۲۰ میلی‌لیتر برداشته و پس از رقیق‌سازی در طول موج‌های ۶۲۰، ۶۵۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و برای خشک‌کردن نمونه‌ها در دستگاه فریزدرایر قرار داده شدند.

استخراج با کمک امواج فراصوت

در این روش، ابتدا ریزجلبک آب‌گیری‌شده (۱:۱۰) به مدت ۱۰ دقیقه با ۴۰۰ وات (۲ ثانیه روشن، ۲ ثانیه خاموش) استخراج شد. پس از این مدت نمونه‌ها جهت جداسازی با ۱۱۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. برای اطمینان از استخراج پروتئین شست‌وشوی نمونه‌ها سه بار تکرار شد. سپس سوپرناتانت‌ها را جمع‌آوری و در پتری‌دیش ریخته شدند و در این مرحله برای خواندن طیف جذبی پروتئین نمونه جدا شد. برای جداشدن پروتئین، از کل محلول پروتئین ۲۰ میلی‌لیتر برداشته و پس از رقیق‌سازی در طول موج‌های ۶۲۰، ۶۵۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و برای خشک‌کردن نمونه‌ها در دستگاه فریزدرایر قرار داده شدند.

تیمار استخراج به کمک همگن‌سازی دور بالا

در این روش، ابتدا ریزجلبک آب‌گیری‌شده با ۲۴۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه هموژن گردید. پس از این مدت نمونه‌ها جهت جداسازی با ۱۱۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. برای اطمینان از استخراج پروتئین شست‌وشوی نمونه‌ها سه بار تکرار شد. سپس سوپرناتانت‌ها را جمع‌آوری و در پتری‌دیش ریخته شدند و در این مرحله برای خواندن طیف جذبی پروتئین نمونه جدا شد. برای جداشدن پروتئین، از کل محلول پروتئین ۲۰ میلی‌لیتر

برداشته و پس از رقیق‌سازی در طول موج‌های ۶۲۰، ۶۵۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و برای خشک‌کردن نمونه‌ها در دستگاه فریزدرایر قرار داده شدند (Zhang *et al.*, 2018).

استخراج کلروفیل

در این روش از منبع ریزجلبک جدید برای استخراج کلروفیل استفاده شد. در استخراج با حلال و اتانول ۶۰ درصد پودر ریزجلبک *اسپیرولینا* با نسبت ۱:۱۰ در آب یا اتانول ۶۰ درصد خیسانده شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در حلال آب با دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد/اتانول ۶۰ درصد گذاشته شد. پس از این مدت نمونه‌ها جهت جداسازی با ۱۱۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. برای اطمینان از استخراج کلروفیل شست‌وشوی نمونه‌ها سه بار تکرار شد. سپس سوپرناتانت‌ها را جمع‌آوری‌کرده و در پتری‌دیش ریخته شدند و در این مرحله برای خواندن طیف جذبی کلروفیل a و b نمونه جدا شد. برای خشک‌شدن نمونه‌ها در آون (WT-7200 biondder، ساخت آلمان) در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. در روش استخراج تیمار انجماد-انجمادزدایی، ابتدا پودر ریزجلبک *اسپیرولینا* با نسبت ۱:۱۰ در اتانول ۶۰ درصد خیسانده و در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت منجمد و ۲ ساعت انجمادزدایی شدند. این سیکل ۴ دفعه انجام شد و سایر مراحل طبق تیمارهای ذکرشده انجام شد. همچنین در روش استخراج با کمک امواج فراصوت، ابتدا نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با ۴۰۰ وات (۲ ثانیه روشن، ۲ ثانیه خاموش) تحت امواج فراصوت قرار گرفتند. در استخراج به کمک همگن‌سازی دور بالا نیز نمونه‌ها با ۲۴۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه هموژن شدند (Zhang *et al.*, 2018).

اندازه‌گیری میزان کلروفیل

برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل، نمونهٔ برداشته‌شده در طول موج‌های ۶۴۹، ۶۵۲، ۶۵۳، ۶۶۴ و ۶۶۶ نانومتر با استفاده از اسپکتوفتومتر قرائت شد (رابطهٔ ۱)، (Barkallah *et al.*, 2017).

رابطهٔ (۱)

میزان کلروفیل (a) (میلی‌گرم/لیتر)= ۱۵/۶۵ × A ۶۶۶ -۷/۳۴۰ × A۶۵۳

میزان کلروفیل(b) (میلی‌گرم/لیتر)= ۲۷/۰۵ × A۶۵۳ - ۱۱/۲۱ × A۶۶۶

میزان کلروفیل کل (میلی‌گرم/لیتر)= میزان کلروفیل(a)+میزان کلروفیل(b)

میزان پروتئین محلول

اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول، روشی برای تشخیص وجود پیوندهای پپتیدی در نمونه است. در حضور پپتیدها، یون مس (II) موجب تشکیل یک ترکیب کمپلکس بنفش-ارغوانی‌رنگ در محلول قلیایی می‌شود (Balti *et al.*, 2021). میزان پروتئین محلول استخراج‌شده در هر نمونه به کمک روش بیورت اندازه‌گیری شد. میزان جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده‌شده و به کمک منحنی استاندارد محاسبه گردید (Gornall *et al.*, 1949).

اندازه‌گیری میزان فیکوسیانین در نمونهٔ استخراجی

اندازه‌گیری میزان فیکوسیانین، نمونهٔ برداشته‌شده در طول موج ۶۲۰، ۶۵۰ و ۲۸۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر میزان جذب نمونه‌ها قرائت گردید (Tavanandi *et al.*, 2018). بیشترین جذب در فیکوسیانین در طول موج ۶۲۰ نانومتر بود (رابطهٔ ۲).

رابطهٔ (۲)

میزان فیکوسیانین استخراج‌شده (میلی‌گرم)=

(A۶۲۰) - (۰/۷) × (A۶۵۰) / (۷/۳۸)

اندازه‌گیری ترکیب اسیدآمینه

ابتدا ۰/۲ - ۰/۴ از نمونه را به دقت وزن‌کرده سپس ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۶ مولار اضافه‌شده و به‌خوبی هموژن گردید. آنگاه نمونه (مخلوط) در آون در دمای ۱۱۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون نمونه در دمای محیط سردشده و سپس صاف گردید. ۲۰ میکرولیتر از محلول صاف‌شده را با گاز ازت خشک‌کرده و سپس با ۱۰۰ میکرولیتر از بافر (شامل سدیم استات، استات مس و هگزان سولفانات) مخلوط شد و پس از سانتریفیوژ میزان ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC (Perkin-ekmer، ساخت آمریکا) تزریق گردید. جهت سنجش پروفایل اسیدآمینه از روش ایزوکراتیک[1] که برای نشان‌دادن تأثیر هریک از متغیرهای

[1] Isocratic

کروماتوگرافی، اسید آمینه‌های اسید آسپارتیک[1]، گلیسین[2]، هیستیدین[3]، لیزین[4]، آرژنین، والین، متیونین، ترئونین[5]، هیدروکسی‌پرولین[6]، اسپارژین[7] و تیروزین[8] به‌عنوان املاح نمونه انتخاب شدند. این اسیدهای آمینه طیف گسترده‌ای از متغیرها و آب‌گریزی را پوشش می‌دهد و آنها نشان‌دهندهٔ انواع زنجیره‌های جانبی هستند. محلول آبی استات مس، آلکیل سولفانات و بافر استات به‌عنوان فاز متحرک دررابطه‌با ستون فاز معکوس مدل استفاده شد (Levin & Grushka, 1985; Tavanandi *et al.*, 2018).

تجزیه‌وتحلیل آماری

نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش‌های انجام‌شده در قالب طرح کاملا تصادفی به کمک آزمون تجزیهٔ واریانس یک‌طرفه تجزیه‌وتحلیل شدند. جهت مقایسهٔ میانگین از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. نتایج به کمک نرم‌افزار SPSS نسخهٔ ۲۲ مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت.

نتایج و بحث

میزان کلروفیل استخراج‌شده در روش پیوسته و مجزا

از دو دسته تیمارهای شیمیایی و مکانیکی برای استخراج ترکیبات درون‌سلولی استفاده شد. در روش پیوسته، طبق نتایج مقدار کلروفیل استخراج‌شده در بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود داشت. در بین تیمارها به‌ترتیب تیمار اتانول ۶۰ درصد و تیمار انجماد-انجمادزدایی بالاترین میزان استخراج کلروفیل را نشان دادند (P<۰/۰۵). در روش پیوسته طبق جدول (۱)، بیشترین مقدار کلروفیل (a) استخراج‌شده و بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود داشت و در تیمار اتانول ۶۰ درصد بالاترین مقدار این نوع کلروفیل استخراج شد. مقدار کلروفیل (b) استخراج‌شده نیز در روش پیوسته در بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بیشترین مقدار این نوع کلروفیل نیز در تیمار حلال اتانول ۶۰ درصد بود. همچنین طبق نتایج جدول (۱)، مقدار کلروفیل کل استخراج‌شده در روش مجزا در بین تیمارهای انجماد-انجمادزدایی، امواج فراصوت، همگن‌سازی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در مقایسهٔ بین تیمارها مقدار کلروفیل کل در تیمار اتانول ۶۰ درصد بیشترین و در تیمارهای فراصوت و همگن‌سازی کمترین مقدار بود (P<۰/۰۵).

جدول ۱- میزان کلروفیل استخراج‌شده

	تیمار	کلروفیل کل	کلروفیل (a)	کلروفیل (b)
روش پیوسته (میلی‌گرم/لیتر)	حمام آبی	۵۱/۳۱±۰/۰۰^{c}	۲۰/۷۵±۰/۰۳^{c}	۳۰/۵۲±۰/۰۰^{c}
	اتانول ۶۰ درصد	۶۳/۸۱±۰/۵۰^{a}	۲۶/۷۵±۰/۰۰^{a}	۳۷/۵۵±۰/۰۰^{a}
	انجماد-انجمادزدایی	۵۸/۵۹±۰/۲۹^{b}	۲۲/۷۷±۰/۰۴^{b}	۳۵/۶۱±۰/۰۶^{b}
	امواج فراصوت	۳۲/۱۳±۰/۰۴^{e}	۱۰/۴۵±۰/۰۰^{e}	۲۱/۷۶±۰/۲۰^{e}
	هموژنیزاسیون	۳۶/۴۵±۰/۰۰^{d}	۹/۵۲±۰/۰۰^{d}	۲۶/۹۳±۰/۰۰^{d}
روش مجزا (میلی‌گرم/لیتر)	حمام آبی	۲۷/۶۵±۱/۰۵^{b}	۱۵/۴۴±۰/۰۶^{b}	۱۲/۲۱±۱/۴۲^{b}
	اتانول ۶۰ درصد	۴۲/۲۱±۰/۰۱^{a}	۲۷/۲۵±۰/۰۱^{a}	۱۴/۹۷±۰/۰۰^{a}
	انجماد-انجمادزدایی	۱۷/۸۱±۰/۰۶^{c}	۱۳/۷۳±۰/۱۴	۴/۱۵±۰/۰۰^{c}
	امواج فراصوت	۱۸/۵۱±۱/۹۵^{c}	۱۴/۳۳±۰/۰۰^{c}	۴/۱۸± ۰/۲۸^{c}
	هموژنیزاسیون	۱۹/۳۷±۰/۰۱^{c}	۱۵/۵۹±۰/۰۰^{b}	۳/۷۸±۰/۰۰^{c}

اعداد میانگین دو تکرار ± انحراف معیار می‌باشند.

حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۵) بین تیمارها می‌باشد.

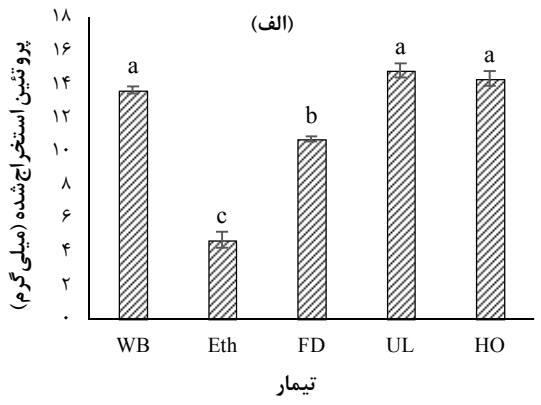
[1] Aspartate
[2] Glycine
[3] Histidine
[4] Lysine
[5] Threonine
[6] Hydroxyproline
[7] Aspargine
[8] Tyrosine

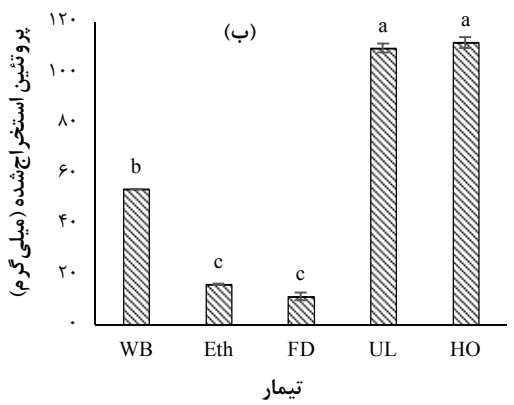
کلروفیل‌ها رنگدانه‌های سبزرنگ و لیپیدی هستند که در تمام جلبک‌ها، گیاهان عالی و سیانوباکترها یافت می‌شوند که فتوسنتز را انجام می‌دهند. کلروفیل یک مشتق پورفیرین[1] با منیزیم به‌عنوان اتم مرکزی دارد و ازاین‌رو، یک رنگ پیچیدهٔ فلزی است. کلروفیل در کلروپلاست‌ها و در تمام قسمت‌های سبز گیاهان وجود دارد. کلروفیل موجود در غذاهای گیاهی با مصرف انسان به فئوفیتین[2]، پیروفئوفیتین[3] و فئوفوربید[4] تبدیل می‌شوند (PÜNtener & Schlesinger, 2000). برای استخراج کلروفیل از ریزجلبک *اسپیرولینا* از دو دسته تیمارهای شیمیایی (خیساندن در آب و اتانول) و تیمارهای مکانیکی (انجماد-انجمادزدایی، امواج فراصوت و همگن‌سازی) استفاده شد و هرکدام به دو روش مجزا و پیوسته انجام شدند. مقایسهٔ بین تیمار شیمیایی (خیساندن در آب و اتانول) و تیمارهای مکانیکی (انجماد-انجمادزدایی، امواج فراصت و همگن‌سازی) نشان داد که تیمار شیمیایی (اتانول ۶۰ درصد) عملکرد بهتری در استخراج کلروفیل کل و کلروفیل (a و b) در دو روش پیوسته و مجزا دارد. این موضوع می‌تواند به‌دلیل محلول‌بودن کلروفیل در اتانول و خروج بهتر با خیساندن در اتانول باشد. اتانول مستقیم و در طول زمان باعث خروج کلروفیل شد. مطالعه‌ها نشان دادند که شکستگی دیوارهٔ سلولی قبل از استخراج به‌طور قابل‌توجهی سطح کلی مواد خام را افزایش می‌دهد که به‌نوبهٔ‌خود منجربه بازده استخراج بالاتر می‌شود (Tavanandi & Raghavarao, 2019). در روش مجزا طبق نتایج آنالیز آماری مقدار کلروفیل کل نشان داد که بیشترین مقدار کلروفیل کل استخراج‌شده در تیمار اتانول ۶۰ درصد بود. به‌دلیل اینکه کلروفیل ریزجلبک‌ها محلول در چربی بوده و با حلال‌های آلی مانند اتانول، متانول و استون بهتر استخراج می‌شود (Zhao *et al.*, 2018). حلال آلی ازطریق غشای سلولی به داخل سلول نفوذ پیدا نموده و لیپیدها و لیپوپروتئین‌های غشاهای کلروپلاست را حل کرده و خروج کلروفیل را تسهیل و آزاد می‌کند (Tavanandi *et al.*, 2018). بعد از تیمار اتانول ۶۰ درصد، تیمار حمام آبی بیشترین مقدار استخراج‌شدهٔ کلروفیل کل را در روش مجزا نشان داد که در مدت زمان ۲۴ ساعت در حمام آبی گذاشته شد و به‌دلیل خیساندن و زمان بالا سبب جذب آب و بادکردگی بهتر دیوارهٔ سلولی و آزادشدن کلروفیل از دیوارهٔ سلولی شد. تیمار انجماد-انجمادزدایی نیز بیشترین مقدار کلروفیل کل را بعد از تیمار اتانول در روش پیوسته نشان داد که مدت انجماد به مدت ۴ ساعت و در زمان انجماد تشکیل بلورهای یخ درون‌سلولی بیشتر و در زمان انجمادزدایی، باعث شکستن دیوارهٔ سلولی و کلروفیل آزاد شد (Tavanandi & Raghavarao, 2019). کمترین مقدار کلروفیل کل در تیمار امواج فراصوت بود. امواج فراصوت در هنگام فشار کم چرخه، حفره‌های کوچک یا حباب‌های خلأ در مایع ایجاد کرد. این حباب‌ها به حجم معین رسیدند و نتوانستند انرژی بیشتری جذب کنند و در چرخهٔ فشار بالا فرو ریختند که منجربه تشکیل جریان‌های بسیار قوی شدند و به سلول‌های آب برخورد کرده و باعث ایجاد تنش و به‌نوبهٔ‌خود پوشش سلول را شکستند. ازطرفی تولید گرما در طی امواج فراصوت ممکن است به‌دلیل فرکانس یا دامنهٔ بالا منجربه تخریب حرارتی مولکول‌های زیستی شود (Tavanandi *et al.*, 2018). طبق نتایج تحقیق حاضر، به‌دلیل تولید گرما در طول زمان اعمال تیمار فراصوت و یا دامنهٔ بالا و ازآنجایی‌که کلروفیل حساس به گرماست، مقدار کلروفیل کل در این روش کمتر از سایر تیمارها بود. اینطور به نظر می‌رسد که تیمار اتانول برای استخراج کلروفیل کل در روش مجزا مناسب می‌باشد. مقدار کلروفیل (a و b) در استخراج با اتانول ۶۰ درصد بیشتر از سایر تیمارها بود.

مقدار پروتئین محلول

مقدار پروتئین محلول ریزجلبک *اسپیرولینا* در روش مجزا بین تیمارها در شکل (۱-الف) تعیین شد. تیمارهای حمام آبی، امواج فراصوت و همگن‌سازی مقدار پروتئین محلول اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. بیشترین مقدار برای تیمار امواج فراصوت و کمترین مقدار برای تیمار اتانول ۶۰ درصد بود ($P<۰/۰۵$). مطابق نتایج شکل (۱-ب) مقدار پروتئین محلول ریزجلبک *اسپیرولینا* در روش پیوسته بین تیمارها تعیین شد و اختلاف چشمگیری بین تیمارهای اتانول ۶۰ درصد و انجماد-انجمادزدایی و همچنین تیمارهای امواج فراصوت و همگن‌سازی وجود نداشت. بیشترین مقدار برای تیمار همگن‌سازی و کمترین مقدار در تیمار انجماد-انجمادزدایی بود ($P<۰/۰۵$).

[1] Porphyrin
[2] Pheophytin
[3] Pyropheophytin
[4] Pheophorbid





شکل ۱- میزان پروتئین محلول استخراج‌شده الف) روش مجزا و ب) پیوسته

WB: تیمار حمام آبی، Eth: تیمار اتانول ۶۰ درصد، FD: انجماد-انجمادزدایی، UL: تیمار امواج فراصوت، HO: تیمار همگن‌سازی

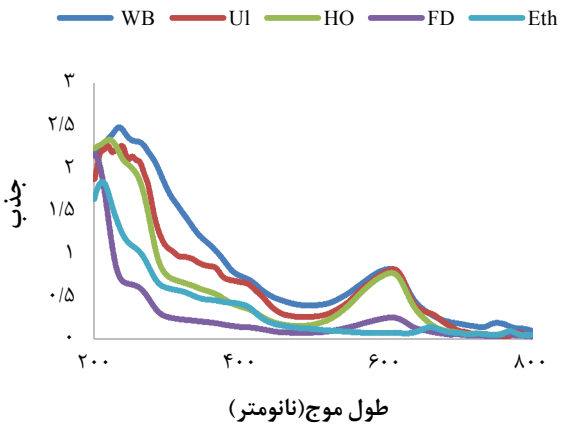
منابع رنگ فیکوآریترین‌ها (PE[1]) صورتی روشن، فیکوسیانین (PC[2]) آبی-کبالت تیره و آلوفیکوسیانین (APC[3]) آبی روشن‌تر هستند. حداکثر جذب به‌ترتیب ۵۷۰-۵۴۰، ۶۲۰-۶۱۰ و ۶۵۵-۶۵۰ نانومتر برای فیکوآریترین، فیکوسیانین و آلوفیکوسیانین هستند (Tavanandi *et al.*, 2018). از فراصوت می‌توان به‌عنوان یک روش کارآمد در اختلال سلولی استفاده کرد. مطالعه‌های انجام‌شده روی روش‌های استخراج مبتنی بر فراصوت می‌تواند به دو دسته طبقه‌بندی شود. دستهٔ نخست روش‌های فراصوت که در آن فراصوت به تنهایی برای اختلال در سلول‌ها و افزایش استخراج استفاده می‌شود و دستهٔ دوم روش‌های هم‌افزایی که فراصوت برای دستیابی به هم‌افزایی همراه با سایر روش‌های اختلال سلولی درنتیجهٔ افزایش عملکرد استفاده می‌شود. گزارش‌هایی درمورد استخراج به کمک فراصوت وجود دارد. استخراج فیکواریترین از *گراتلوپیا تورتورو*[4]، *ژلیدیم پوسیلوم*[5]، فیکوبیلی‌پروتئین و ترکیبات فنولی از *آرتروسپیرا پلاتنسیس* موردبررسی قرار گرفت. ازسوی‌دیگر، گزارش‌های مربوط به روش‌های هم‌افزایی استخراج فراصوت برای استخراج سی-فیکوسیانین کمتر موردمطالعه قرار گرفته است (Tavanandi *et al.*, 2018). مقدار پروتئین محلول ریزجلبک *اسپیرولینا* در روش مجزا در شکل (۱) نشان داده شد. بیشترین مقدار در تیمار امواج فراصوت بود. نتایج تحقیق حاضر مغایر با نتایج Zhang و همکاران (۲۰۱۸) درمورد استخراج پروتئین با استفاده از ترکیب تیمارهای خیساندن اتانول، هضم آنزیمی، امواج فراصوت و همگن‌سازی بود که نشان دادند تیمارهای شیمیایی (حمام آبی و اتانول) برای خروج پروتئین محلول بهتر از تیمارهای مکانیکی (انجماد-انجمادزدایی، امواج فراصوت و همگن‌سازی) بود. مقدار پروتئین محلول ریزجلبک *اسپیرولینا* در روش پیوسته بین تیمارها در شکل (۱-ب) تعیین شد که بین تیمارهای اتانول ۶۰ درصد و انجماد-انجمادزدایی و تیمارهای امواج فراصوت و همگن‌سازی اختلاف معنی‌دار وجود نداشت. بیشترین مقدار برای تیمار همگن‌سازی و کمترین مقدار در تیمار انجماد-انجمادزدایی بود ($P<۰/۰۵$). تیمارهای مکانیکی (امواج فراصوت و همگن‌سازی) در استخراج بهتر عمل نمودند و دیوارهٔ سلولی را بهتر شکسته و پروتئین را آزاد کردند.

در مقایسهٔ بین روش‌های مجزا و پیوسته، روش پیوسته با اضافه‌شدن ترت-بوتانول برای جداسازی پروتئین و پلی‌ساکارید، به‌خاطر آب‌گریزبودن پروتئین، با سرعت بیشتری حذف شد. ازطرف‌دیگر، ترت-بوتانول ممکن است به پروتئین رسوب‌شده متصل شود و رسوبات مشترکی را تشکیل دهد، که شناوری آن توسط ترت-بوتانول افزایش یافت و پروتئین راحت‌تر در لایهٔ بالای نمک‌های آبی شناور شد (Zhao *et al.*, 2018). از مقایسهٔ بین روش‌های پیوسته و مجزا در میزان پروتئین محلول، روش پیوسته میزان بیشتری را نشان داد و این افزایش به‌دلیل اضافه‌شدن ترت-بوتانول و سولفات آمونیوم ۴۰ درصد به محلول بود.

[1] Phycoerythrin
[2] Phycocyanin
[3] Allophycocyanin
[4] *Grateloupia turuturu*
[5] *Gelidium pusillum*

اسپکتروم در طول موج‌های مختلف (۲۰۰-۸۰۰ نانومتر)

نتایج اسپکتروم کامل جذب در طول موج‌های مختلف نمونه‌های استخراج‌شده با تیمارهای شیمیایی و فیزیکی در روش مجزا در شکل (۲) نشان داده شده است. طبق نتایج طیف جذبی اشعهٔ مادون‌بنفش تأیید کرد که محتوای بالایی از پروتئین‌ها/پپتیدها (پیک جذب در طول موج ۲۲۰-۲۸۰ نانومتر) وجود دارد، البته برخی رنگدانه‌ها نیز وجود داشتند (کلروفیل یا لوتئین، پیک جذب در طول موج ۴۱۰ یا ۶۴۰ نانومتر).



شکل ۲- اسپکتروم در طول موج‌های مختلف (۲۰۰-۸۰۰ نانومتر)
WB: تیمار حمام آبی، Eth: تیمار اتانول ۶۰ درصد، FD: انجماد -انجمادزدایی، UL: تیمار امواج فراصوت، HO: تیمار همگن‌سازی

به‌طورکلی پیک وجود پروتئین در سوپرناتانت‌های به‌دست‌آمده از استخراج، تیمارهای مکانیکی (انجماد -انجمادزدایی، همگن‌سازی و امواج فراصوت)، بهتر از تیمارهای شیمیایی (حمام آبی و اتانول ۶۰ درصد) بود. در تیمار مکانیکی، تیمارهای انجماد-انجمادزدایی، امواج فراصوت، همگن‌سازی بیشترین پیک جذب در طول موج ۲۲۰-۲۸۰ نانومتر بود و همچنین پیک جذب امواج فراصوت در طول موج ۳۸۰ نانومتر به‌دلیل وجود رنگدانه‌ها و پروتئین وجود داشت.

تیمار شیمیایی (حمام آبی و اتانول ۶۰ درصد) بیشترین پیک جذب در طول موج ۲۲۰-۲۸۰ نانومتر را داشت. تیمارهای امواج فراصوت، همگن‌سازی، حمام آبی و اتانول ۶۰ درصد در طول موج ۴۱۰-۶۴۰ نانومتر دارای پیک جذب بودند. این نتایج همسو با نتایج Zhang و همکاران (۲۰۱۸) درمورد بررسی طیف جذبی از ۲۰۰-۸۰۰ نانومتر در استخراج ترکیبات زیست‌فعال از ریزجلبک *کلرلا پیرونوئیدوزا* بود. این محققان نشان دادند در استخراج پروتئین با تیمارهای مکانیکی، شیمیایی و آنزیمی بیشترین طیف جذبی حضور پروتئین و پپتید در طول موج ۲۲۰-۲۸۰ نانومتر در تیمارهای خیسانده‌شده در اتانول و آب‌مقطر بود. آنها نیز در طول موج‌های ۶۴۰ و ۴۱۰ پیک‌های جذب که نشان از وجود رنگدانه بود را مشاهده کردند (Zhang *et al.*, 2018). همچنین نتایج تحقیق حاضر همسو با مطالعهٔ Kannaujiya و همکاران (۲۰۱۹) طیف جذب فیکوسیانین (A) و فیکواریترین (B) استخراج‌شده از گونهٔ *نوستوک*[1] و *آنابائنا*[2]، که پیک جذب برای فیکوسیانین در طول موج ۶۱۰-۶۲۰ نانومتر و فیکواریترین در طول موج ۵۴۰-۵۷۰ نانومتر است. همچنین پیک جذب در این روش در طول موج ۶۱۰ نانومتر بود که به‌دلیل حضور فیکوسیانین می‌باشد. به‌نظرمی‌رسد پیش‌تیمار فراصوت به‌طور قابل‌توجهی سطح زیست‌توده را افزایش داد که سبب بازده استخراج بالاتر می‌شود (Tavanandi & Raghavarao, 2019).

ترکیب اسیدآمینهٔ ریزجلبک *اسپیرولینا* در روش مجزا و پیوسته

اسیدهای آمینه زیرواحدهایی هستند که پروتئین‌ها را می‌سازند و بنابراین کیفیت تغذیه‌ای یک پروتئین براساس محتوا، نسبت و دردسترس‌بودن این ترکیبات آلی تعیین می‌شود. مطابق نتایج جدول (۲) ترکیب اسیدآمینهٔ ضروری و غیرضروری ریزجلبک *اسپیرولینا* در تیمارهای انجماد -انجمادزدایی و امواج فراصوت را نشان داده است. بیشترین مقدار اسیدآمینهٔ غیرضروری در تیمار انجماد-انجمادزدایی به‌ترتیب در اسید گلوتامیک[3] (۵۷/۱۲ میلی‌گرم بر گرم)، آلانین[4] (۲۴/۳۷ میلی‌گرم بر گرم)، آرژنین[5] (۲۰/۹۷ میلی‌گرم بر گرم) و اسید آسپارتیک[6] (۲۰/۲۶ میلی‌گرم بر گرم) بود. در تیمار امواج فراصوت اسیدآمینهٔ غیرضروری بیشترین مقدار به‌ترتیب در اسید گلوتامیک (۵۴/۷۶ میلی‌گرم بر گرم)، اسید آسپارتیک (۲۶/۰۳ میلی‌گرم بر گرم)، گلیسین[7] (۲۲/۰۴ میلی‌گرم بر گرم) و آرژنین (۲۱/۴۹ میلی‌گرم بر گرم) بود.

[1] *Nostoc* sp.
[2] *Anabaena*
[3] Glutamic acid
[4] Alanine
[5] Arginine
[6] Aspartic acid
[7] Glysine

بیشترین مقدار اسیدآمینهٔ ضروری در تیمار انجماد-انجمادزدایی به‌ترتیب در لوسین[1] (۲۷/۷۵ میلی‌گرم بر گرم)، والین[2] (۱۵/۷۷ میلی‌گرم بر گرم)، تریپتوفان[3] (۱۲/۰۱ میلی‌گرم بر گرم) و لیزین[4] (۱۱/۹۹ میلی‌گرم بر گرم) بود. مقدار اسیدآمینهٔ ضروری در تیمار امواج فراصوت به‌ترتیب در لوسین (۲۴/۴۷ میلی‌گرم بر گرم)، تریپتوفان (۱۲/۵۵ میلی‌گرم بر گرم)، والین (۱۱/۰۴ میلی‌گرم بر گرم) و لیزین (۹/۲۲ میلی‌گرم بر گرم) بود.

جدول ۲- میزان اسیدآمینهٔ ریزجلبک *اسپیرولینا* در روش مجزا (میلی‌گرم/گرم نمونه)

اسیدآمینه	تیمار	
	امواج فراصوت	انجماد-انجمادزدایی
اسید آسپارتیک	۲۶/۰۳	۲۰/۲۶
اسید گلوتامیک	۵۴/۷۶	۵۷/۱۲
گلیسین	۲۲/۰۴	۱۷/۵۶
پرولین	۱۶/۱۹	۱۴/۵۲
سیستئین	۱/۸۴	۱/۱۳
تیروزین	۱۲/۵۵	۱۲/۰۱
آلانین	۱۹/۳۷	۲۴/۳۷
آرژنین	۲۱/۴۹	۲۰/۹۷
سرین	۱۴/۶۱	۱۴/۴۹
مجموع اسیدآمینهٔ غیرضروری	۱۸۸/۸۸	۱۸۲/۳۳
فنیل‌آلانین	۶/۵۰	۹/۳۹
متیونین	۱/۷۱	۳/۲۳
ترئونین	۷/۳۵	۶/۳۷
والین	۱۱/۰۴	۱۵/۷۷
ایزولوسین	۷/۲۱	۹/۳۵
لوسین	۲۴/۴۷	۲۷/۷۵
لیزین	۹/۲۲	۱۱/۹۹
هیستیدین	۱/۵۵	۳/۰۰
تریپتوفان	۱۲/۵۵	۱۲/۰۱
مجموع اسیدآمینهٔ ضروری	۸۱/۶	۹۸/۷۶

[1] Leucine
[2] Valine
[3] Tryptophan
[4] Lysine

مقایسهٔ بین اسیدآمینهٔ *اسپیرولینا* و تخم‌مرغ نشان داد که اسیدآمینهٔ ضروری لوسین، آرژنین، ترئونین[5] و تریپتوفان بیشتر از تخم‌مرغ است. در بین اسیدهای آمینهٔ غیرضروری بیشترین مقدار آسپارتیک اسید، آلانین، گلیسین و تیروزین[6] بود (Lupatini *et al.*, 2017). در مطالعهٔ Aljobair و همکاران (۲۰۲۱) خواص فیزیکوشیمیایی، ارزش غذایی و ویژگی‌های حسی نوشیدنی با استفاده از پورهٔ خرما و *اسپیرولینا* نشان دادند که شهدهای غنی‌شده با ۱۰ درصد *اسپیرولینا* حاوی سطوح بالایی از اسیدهای آمینهٔ ضروری هستند. افزودن *اسپیرولینا* به‌طور قابل‌توجهی سطح اسیدآمینهٔ ضروری شهد خرما را افزایش داد. به‌طورکلی، افزایش در غلظت اسیدآمینهٔ ضروری شهد خرما به‌دنبال افزودن ۱۰ درصد *اسپیرولینا* می‌تواند به‌دلیل برخورداری کمیت و کیفیت بالای پروتئین *اسپیرولینا* در مقایسه با پروتئین خرما باشد. *اسپیرولینا* حاوی سطوح بالایی از کل اسیدهای آمینهٔ غیرضروری (۶۱/۵۴ درصد) است.

مطالعه‌های متعددی نشان داده است که *اسپیرولینا پلاتنسیس* حاوی اسیدهای آمینهٔ ضروری نسبت به مقادیر توصیه‌شده توسط FAO است که می‌تواند با استانداردهای پروتئینی مانند گوشت، تخم‌مرغ یا شیر و با کیفیت برتر در مقایسه با پروتئین‌های سبزی‌ها مقایسه شود (Lupatini *et al.*, 2017). مطالعهٔ Bashir و همکاران (۲۰۱۶) ویژگی‌های عملکردی و مشخصات اسیدآمینهٔ ایزوله‌های پروتئینی *اسپیرولینا پلاتنسیس* را نشان دادند که در اسیدهای آمینهٔ ضروری موجود در ایزوله‌های پروتئین *اسپیرولینا*؛ لوسین به نسبت زیاد (۶/۸۱ گرم در ۱۰۰ گرم) و سپس والین (۴/۷۲ گرم در ۱۰۰ گرم) و درحالی‌که کمترین مقدار تریپتوفان در ایزوله‌های پروتئین *اسپیرولینا* مشاهده شد. به‌همین‌ترتیب، لوسین (۶/۱۷ گرم در ۱۰۰ گرم) و والین (۴/۲۱ گرم در ۱۰۰ گرم) اسیدهای آمینهٔ ضروری اصلی در *اسپیرولینا* بودند. سهم کل اسیدآمینهٔ ضروری در ایزوله‌های پروتئین *اسپیرولینا* (۳۱/۱ گرم در ۱۰۰ گرم) به نسبت پروتئین *اسپیرولینا* (۲۷/۷۵ گرم در ۱۰۰ گرم)

[5] Threonine
[6] Tyrosine

زیاد بود. نتایج اسیدهای آمینهٔ غیرضروری در *اسپیرولینا* و ایزوله‌های پروتئین *اسپیرولینا* نشان داد اسید گلوتامیک به‌عنوان اسیدآمینهٔ اصلی (۹/۷۵ گرم در ۱۰۰ گرم) و سپس اسید آسپارتیک (۷/۱۴ گرم در ۱۰۰ گرم) و درحالی‌که کمترین مقدار سیستئین[1] (۲۰/۷۲ گرم در ۱۰۰ گرم) مشاهده شد. به‌طور مشابه، اسید گلوتامیک (۸/۴۷ گرم در ۱۰۰ گرم) و اسید آسپارتیک (۶/۳۱ گرم در ۱۰۰ گرم) مقادیر قابل‌توجهی بودند. نتایج نشان داد که هر دو ایزولهٔ *اسپیرولینا* و پروتئین *اسپیرولینا* منبع خوبی از لوسین، والین، ایزولوسین[2]، لیزین، اسید گلوتامیک، اسید آسپارتیک، آلانین و آرژنین هستند. سطوح متیونین[3] و آلانین در *اسپیرولینا* با رایج‌ترین منبع پروتئین گیاهی یعنی سویا به نسبت بالاست.

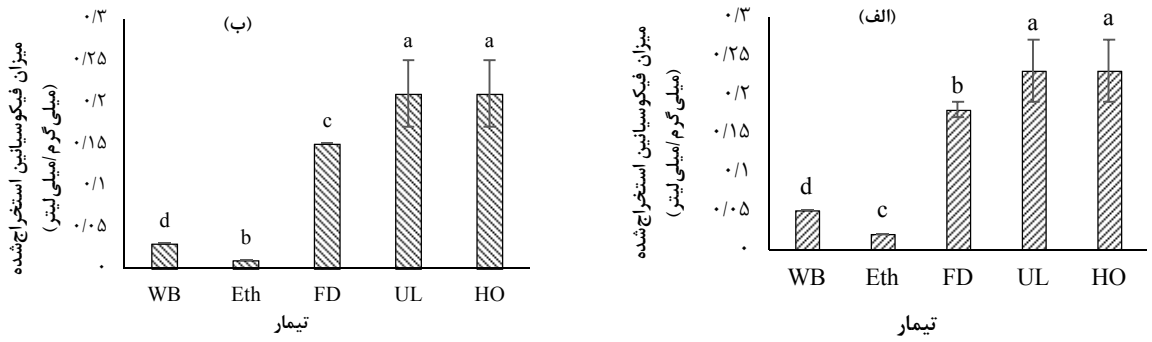
میزان فیکوسیانین استخراج‌شده

مقدار فیکوسیانین استخراج‌شده در دو روش مجزا و پیوسته در شکل (۳) نشان داده شده است. در روش مجزا میزان فیکوسیانین استخراج‌شده در بین تیمارها به‌جزء تیمار امواج فراصوت و همگن‌سازی اختلاف معنی‌داری وجود داشت. در بین تیمارها به‌ترتیب امواج فراصوت، همگن‌سازی و انجماد-انجمادزدایی بالاترین میزان فیکوسیانین استخراج‌شده را نشان دادند ($P<۰/۰۵$).

مقایسهٔ بین تیمارهای شیمیایی و مکانیکی نشان داد که بیشترین مقدار فیکوسیانین استخراج‌شده با استفاده از تیمارهای مکانیکی بود. مقایسهٔ تیمارها نشان داد که تیمارهای مکانیکی در شکست دیواره مؤثرتر از خیساندن در حلال آبی عمل نمودند. امواج فراصوت توانست دیواره‌های سلولی را در دماهای پایین تخریب کند و درنتیجه باعث دناتوره‌شدن حرارتی ترکیبات پروتئین و کاهش رنگدانه‌ها شد (Dianursanti & Hafidzah, 2021).

فرایند استخراج در روش انجماد-انجمادزدایی فرایندی ساده است و استفاده از دماهای پایین به خواص پروتئین و رنگدانه آسیب نمی‌زند. بااین‌حال، این روش دارای یک نقطهٔ ضعف است که به زمان طولانی برای فرایند استخراج نیاز دارد. نتایج تحقیق حاضر با نتایج (Zhang *et al.*, 2018) مغایر بود، در مطالعهٔ آنها بازده استخراج فیکوسیانین از ریزجلبک *کلرلا پیرونوئیدوزا* با استفاده از حلال، بهتر از نتایج حاصل از روش‌های مکانیکی بود. در مطالعهٔ Saefurahman و همکاران (۲۰۲۱) از روش انجماد-انجمادزدایی برای استخراج فیکوسیانین استفاده کردند و میزان فیکوسیانین استخراج‌شده را ۰/۰۲ (میلی‌گرم/لیتر) به‌دست آوردند و این مقدار کمتر از نتایج تیمار انجماد-انجمادزدایی در این روش بود. در روش پیوسته نیز تیمارهای همگن‌سازی و امواج فراصوت با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند. بیشترین میزان فیکوسیانین استخراج‌شده به‌ترتیب در تیمارهای امواج فراصوت، همگن‌سازی و انجماد-انجمادزدایی بود. مقایسهٔ بین روش مجزا و پیوسته نشان می‌دهد که روش مجزا میزان فیکوسیانین نسبتا بالاتری داشت. مقدار فیکوسیانین استخراج‌شده در تیمارهای فرصاوت و همگن‌سازی ۰/۲۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بود و این مقدار کمتر از مقدار به‌دست‌آمده (۱۱/۷۸ گرم/لیتر) در مطالعهٔ Balti و همکاران (۲۰۲۱) بود. طبق مطالعه‌های انجام‌شده، استفاده از تیمار امواج فراصوت باعث افزایش استخراج پروتئین و رنگدانه می‌شود. این مطالعه‌ها تأثیر مثبت زمان و انرژی فراصوت را بر بازده استخراج پروتئین بازیابی نشان دادند (Boukhari *et al.*, 2018). در مطالعهٔ Maali و همکاران (۲۰۲۱) تأثیر زمان فراصوت بر استخراج فیکوبیلی‌پروتئین‌ها از ریزجلبک *اسپیرولینا* طی زمان ۳ دقیقه استفاده از امواج فراصوت را بیان کردند و میزان فیکوبیلی‌پروتئین‌های استخراج‌شده ۱۱۴/۸۴ میلی‌گرم/گرم و میزان فیکوسیانین استخراج‌شده ۷۹/۶۹ میلی‌گرم/گرم به‌دست آوردند.

[1] Cysteine
[2] Isoleucine
[3] Methionine



شکل ۳- میزان فیکوسیانین استخراج‌شده به روش الف) مجزا و ب) پیوسته

WB: تیمار حمام آبی، Eth: تیمار اتانول ۶۰ درصد، FD: انجماد-انجمادزدایی، UL: تیمار امواج فراصوت، HO: تیمار همگن‌سازی

نتیجه‌گیری

در این تحقیق استخراج کلروفیل و پروتئین از ریزجلبک *اسپیرولینا* با دو روش مجزا و پیوسته که هرکدام با تیمارهای مکانیکی (امواج فراصوت، همگن‌سازی و انجماد -انجمادزدایی) و تیمار شیمیایی (حمام آبی و اتانول ۶۰ درصد) انجام شد. مقایسهٔ بین تیمارهای مکانیکی و شیمیایی نشان داد که تیمارهای مکانیکی بهتر از تیمارهای شیمیایی دیوارهٔ سلولی را شکسته و ترکیبات را آزادسازی کرده است. در بین تیمارها، تیمار اتانول ۶۰ درصد برای استخراج کلروفیل در دو روش مجزا و پیوسته بازده بالاتری را نشان داد و روش پیوسته با تیمار اتانول ۶۰ درصد بالاترین بازده برای کلروفیل را داشته است. برای استخراج پروتئین تیمار مکانیکی روش مناسب‌تری بود. در بین تیمارها، استفاده از امواج فراصوت و همگن‌سازی در دور بالا بیشترین بازده پروتئین را نشان دادند. بنابراین با بررسی کل داده‌ها ازنظر اقتصادی استخراج ترکیبات زیست‌فعال از ریزجلبک *اسپیرولینا* به‌صورت پیوسته بهتر است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل پروژهٔ تحقیقاتی با استفاده از اعتبار پژوهشی (گرنت) دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی است و از همکاری صمیمانهٔ آزمایشگاه شیمی فراوری محصولات شیلاتی که در مراحل انجام پروژه ما را یاری نمودند، قدردانی به عمل می‌آید.

مشارکت نویسندگان

ساناز اورجه: جمع‌آوری داده، تجزیه‌وتحلیل و تفسیر داده‌ها، نوشتن پیش‌نویس مقاله، بازبینی و اصلاح مقاله؛ **پرستو پورعاشوری**: ارائهٔ ایدهٔ پژوهشی و طراحی مطالعه، تجزیه‌وتحلیل و تفسیر داده‌ها، تأیید نسخهٔ نهایی؛ **بهاره شعبانپور**: تجزیه‌وتحلیل و تفسیر داده‌ها، نظارت بر مطالعه؛ **سیدولی حسینی**: آنالیز داده‌ها.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

منابع

Aljobair, M. O., Albaridi, N. A., Alkuraieef, A. N., & AlKehayez, N. M. (2021). Physicochemical properties, nutritional value, and sensory attributes of a nectar developed using date palm puree and spirulina. *International Journal of Food Properties*, *24*(1), 845-858. https://doi.org/10.1080/10942912.2021.1938604

Balti, R., Zayoud, N., Hubert, F., Beaulieu, L., & Massé, A. (2021). Fractionation of Arthrospira platensis (Spirulina) water soluble proteins by membrane diafiltration. *Separation and Purification Technology*, *256*, 117756. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117756

Barkallah, M., Dammak, M., Louati, I., Hentati, F., Hadrich, B., Mechichi, T., . . . Abdelkafi, S. (2017). Effect of Spirulina platensis fortification on physicochemical, textural, antioxidant and sensory properties of yogurt during fermentation and storage. *LWT*, *84*, 323-330. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.071

Bashir, S., Sharif, M. K., Butt, M. S., & Shahid, M. (2016). Functional Properties and Amino acid Profile of Spirulina platensis Protein Isolates. *Biological Sciences - PJSIR*, *59*(1), 12-19. https://doi.org/10.52763/PJSIR.BIOL.SCI.59.1.2016.12.19

Bleakley, S., & Hayes, M. (2017). Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods (Basel, Switzerland)*, *6*(5), 33. https://doi.org/10.3390/foods6050033

Boukhari, N., Doumandji, A., & Ferradji, A. (2018). Effect of ultrasound treatment on protein content and functional properties of Spirulina powder grown in Algeria. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, *11*(3), 235-249. https://doi.org/10.3233/MNM-180220

Choi, W. Y., & Lee, H. Y. (2018). Enhancement of Chlorophyll a Production from Marine Spirulina maxima by an Optimized Ultrasonic Extraction Process. *Applied Sciences*, *8*(1), 26. https://doi.org/10.3390/app8010026

Dianursanti, & Hafidzah, M. A. (2021). The enhancement of phycocyanin yield and purity from Spirulina platensis using freeze-thawing method on various solvents. *AIP Conference Proceedings*, *2344*(1), 020015. https://doi.org/10.1063/5.0047581

Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, *177*(2), 751-766. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)57021-6

Hayes, M., Skomedal, H., Skjånes, K., Mazur-Marzec, H., Toruńska-Sitarz, A., Catala, M., . . . García-Vaquero, M. (2017). 15 - Microalgal proteins for feed, food and health. In C. Gonzalez-Fernandez & R. Muñoz (Eds.), *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts* (pp. 347-368). Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00015-7

Kannaujiya, V. K., Kumar, D., Pathak, J., & Sinha, R. P. (2019). Chapter 10 - Phycobiliproteins and Their Commercial Significance. In A. K. Mishra, D. N. Tiwari, & A. N. Rai (Eds.), *Cyanobacteria* (pp. 207-216). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00010-6

Levin, S., & Grushka, E. (1985). Reversed-phase liquid chromatographic separation of amino acids with aqueous mobile phases containing copper ions and alkylsulfonates. *Analytical Chemistry*, *57*(9), 1830-1835. https://doi.org/10.1021/ac00286a011

Lupatini, A. L., Colla, L. M., Canan, C., & Colla, E. (2017). Potential application of microalga Spirulina platensis as a protein source. *J Sci Food Agric*, *97*(3), 724-732. https://doi.org/10.1002/jsfa.7987

Maali, A., Gheshlaghi, R., & Mahdavi, M. A. (2021, November, November 9-11, 2021). *The effect of sonication time on phycobiliproteins extraction from spirulina platensis* 17th National Congress of Chemical Engineering of Iran, https://civilica.com/doc/1378447

PÜNtener, A. G., & Schlesinger, U. (2000). 9 - Natural Dyes. In H. S. Freeman & A. T. Peters (Eds.), *Colorants for Non-Textile Applications* (pp. 382-455). Elsevier Science. https://doi.org/10.1016/B978-044482888-0/50040-4

Saefurahman, G., Rahman, A. A., Hidayatuloh, S., Farobie, O., & Abidin, Z. (2021). Continuous extraction of Spirulina platensis biopigments using different extraction sequences. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *749*(1), 012005. https://doi.org/10.1088/1755-1315/749/1/012005

Sangian, M., Soltani, M., Hanifi, H., & Abdali, N. (2022). Investigation of The effect of Phycocyanin Extracted From Spirulina platensis and Persimmon Powder on Physicochemical and Sensory Characteristics of Yogurt. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*, *53*(1), 75-86. https://dx.doi.org/10.21608/ejvs.2021.95209.1293

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 Arthospira platensis. *Algal Research*, *31*, 239-251. https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.008

Tavanandi, H. A., & Raghavarao, K. S. M. S. (2019). Recovery of chlorophylls from spent biomass of Arthrospira platensis obtained after extraction of phycobiliproteins. *Bioresource Technology*, *271*, 391-401. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.141

Ursu, A.-V., Marcati, A., Sayd, T., Sante-Lhoutellier, V., Djelveh, G., & Michaud, P. (2014). Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae Chlorella vulgaris. *Bioresource Technology*, *157*, 134-139. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.071

Zhang, R., Chen, J., & Zhang, X. (2018). Extraction of intracellular protein from Chlorella pyrenoidosa using a combination of ethanol soaking, enzyme digest, ultrasonication and homogenization techniques. *Bioresour Technol*, *247*, 267-272. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.087

Zhao, W., Duan, M., Zhang, X., & Tan, T. (2018). A mild extraction and separation procedure of polysaccharide, lipid, chlorophyll and protein from Chlorella spp. *Renewable Energy*, *118*, 701-708. https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.11.046

The Effect of Continuous and Separate Extraction Methods on the Yield and Quality of Extracted Protein and Chlorophyll from *Spirulina platensis*

Sanaz Urajeh[1]*, Parastoo Pourashouri[1], Bahareh Shabanpour[1], Seyed Vali Hoseini[2]

1- Department of Seafood Science and Technology, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran
* Corresponding author (Urajeh.s72@gmail.com)
2- Department of Seafood Processing Group, University of Tehran, Tehran, Iran

Abstract

Spirulina is blue-green microalgae as an excellent source of protein and natural food colors such as phycobiliproteins, chlorophylls. So, extraction of these bioactive compounds is important. In this study, the mechanical treatments (freeze-defreeze, homogenization, ultrasonic), and chemical treatment (soaking in ethanol and water) were performed and extraction and separation of protein and chlorophyll from *Spirulina* microalgae were done in the separate and continuous way of *Spirulina* mass. The yield of extracted chlorophyll and protein, the absorption spectrum of the samples (200-800 nm), and the amino acid profile of the extracted proteins by the selected treatments were tested. According to the results, the extraction yield of chlorophyll in a continuous way was higher than in a separate method, and extraction with ethanol in both separate and continuous ways was a suitable solvent and showed higher efficiency ($P<0.05$). The freeze-defreeze cycle was also effective in chlorophyll extraction. The protein extraction, homogenization, and ultrasound treatments were acted more appropriately to mechanically break down cell walls and increased extraction efficiency ($P<0.05$). In the same conditions, the continuous way of extracting chlorophyll and protein showed higher efficiency than the separate way, and homogenization and ultrasound are recommended and ethanol was suitable solvent in chlorophyll extraction and the freeze-defreeze treatment was appropriate at split the cell wall.

Keywords: Bioactive compounds, Extraction, Freeze-defreeze, Microalgae, Ultrasound

© 2022, Research Institute of Food Science and Technology. All rights reserved.
This is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0). To view a copy of this license, visit (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).