

مقاله پژوهشی

بررسی عملکرد و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی رنگدانه‌های فیکوبیلی پروتئینی استخراج شده از اسپیرولینا و گراسیلاریا

محمد رضا میرزاخواه^۱، محمود رضا آقامعالی^{۲*}، کورش جهانبان^۳، فاطمه مرادی^۴

DOI: 10.22124/japb.2026.31694.1578

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۴

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۴

چکیده

فیکوبیلی پروتئین‌ها، دسته‌ای از ترکیبات زیست‌فعال طبیعی مشتق شده از انواع جانداران مانند جلبک‌های قرمز و سیانوباکتری‌ها، به دلیل فعالیت‌های زیستی متنوع مورد توجه قرار گرفته‌اند. این پژوهش به بررسی ساختارهای دو رنگدانه فیکوسیانین و فیکواریترین، ویژگی‌های طیف نوری و توانایی آنها در مهار رادیکال آزاد و ایجاد خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی پرداخته است. این رنگدانه‌ها از جلبک‌های *Spirulina platensis* و *Gracilaria gracilis* استخراج شدند. فرایند استخراج شامل چرخه‌های انجماد-ذوب و سپس رسوب با سولفات آمونیوم و دیالیز، برای تخلیص نسبی بود. بررسی طیف‌سنجی، بیشینه جذب برای فیکوسیانین را در طول موج ۶۲۰ نانومتر و برای فیکواریترین را در طول موج‌های ۴۹۵ و ۵۴۵ نانومتر نشان داد. الگوی باندهای SDS-PAGE حضور زیر واحدهای α و β (۱۸-۲۰ کیلودالتون) و γ (۳۱ کیلودالتون) را تایید کرد. طیف FTIR نیز حضور گروه‌های عاملی زیستی از جمله آمید I در ۱۶۴۴ بر سانتی‌متر و ساختارهای تتراپیرولی را نشان داد. آزمون DPPH، فعالیت آنتی‌اکسیدانی هر دو رنگدانه را تایید کرد. درصد مهار رادیکال آزاد برای فیکواریترین و فیکوسیانین به ترتیب ۵۹ درصد و ۴۲ درصد گزارش شد. آزمون انتشار دیسک نشان داد که هر دو رنگدانه دارای اثر ضد میکروبی علیه *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* بودند. بیشترین فعالیت علیه باکتری گرم مثبت *S. aureus* توسط فیکواریترین بود و برای باکتری گرم منفی *E. coli*، فیکوسیانین بیشترین اثر مهار را داشت. این نتایج، پتانسیل بالای این رنگدانه‌ها را برای کاربردهای دارویی، صنعتی و غذایی نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: اسپیرولینا، فیکوبیلی پروتئین، فیکواریترین، فیکوسیانین، گراسیلاریا.

- ۱- کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
- ۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
- ۳- دانشجوی دکتری بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
- ۴- دکتری بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان.

* نویسنده مسئول: aghamaali@guilan.ac.ir

مقدمه

جانداران دریایی منبعی گسترده و ارزشمند از ترکیبات زیست‌فعال با کاربردهای بالقوه فراوان در حوزه‌های مختلف محسوب می‌شوند. از جمله این منابع، جلبک‌های دریایی هستند که در سال‌های اخیر، تمایل به بهره‌برداری از ترکیبات زیست‌فعال مشتق شده از آنها رشد چشم‌گیری یافته و جایگاه ویژه‌ای در صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی و مکمل‌های تغذیه‌ای پیدا کرده است. یکی از مهم‌ترین دلایل بررسی این جلبک‌ها و استفاده از این ترکیبات طبیعی به عنوان جایگزینی ایمن‌تر و موثرتر با ترکیبات شیمیایی، ویژگی‌هایی همچون تنوع ژنتیکی بالا، بازدهی فتوسنتزی مطلوب، رشد سریع و ظرفیت

مناسب آنها برای کاربردهای زیست‌فناورانه است (Coulombier et al., 2021). اسپیرولینا (*Spirulina*) یک ریزجلبک یا سیانوباکتر فتوسنتزکننده پلانکتونیک (Planktonic) است (شکل ۱- الف) که جمعیت‌های بزرگی را در آب‌های گرمسیری و نیمه‌گرمسیری تشکیل می‌دهد. خصوصیات ویژه این سیانوباکتر باعث شده تا به سرعت به عنوان پاسخی جامع به نیازهای متنوع صنعتی و درمانی در حال ظهور باشد و به دلیل ترکیبات مغذی برجسته آن می‌تواند برای کاربردهای درمانی مورد استفاده قرار گیرد.

الف

*Spirulina*

ب

*Gracilaria*

شکل ۱: تصویر جلبک‌های مورد مطالعه. الف) اسپیرولینا (بزرگنمایی $\times 100$). ب) گراسیلاریا جمع‌آوری شده از نواحی ساحلی دریای خزر (بزرگنمایی $\times 10$).

این جلبک‌های ماکروسکوپی منبعی غنی از ترکیبات زیست‌فعال متنوع هستند که شامل گروه‌هایی همچون رنگدانه‌های فیکوبیلی پروتئینی، کاروتنوئیدها، ترکیبات فنولی از جمله فلوروتانین‌ها و بروموفنول‌ها، ترکیبات نیتروژن‌دار مانند آلکالوئیدها، پلی‌ساکاریدهایی همچون آگران، کاراگینان و آلژینات و ترپنوئیدها هستند (Torres et al., 2019).

یکی از مهم‌ترین ترکیبات زیست‌فعال در این جلبک‌ها، فیکوبیلی پروتئین‌ها هستند. فیکوبیلی پروتئین‌ها که گروه‌های تتراپیرولی خطی باز شامل ۴ حلقه پیرول هستند، به عنوان یک خانواده از کمپلکس‌های پروتئینی فرعی در سیستم‌های جمع‌آوری نور شناخته می‌شوند و در سیانوباکتری‌ها، جلبک‌های قرمز و کریپتوموناداها وجود دارند. این پروتئین‌ها نقشی اساسی در جذب نور خورشید برای فرایند فتوسنتز ایفا می‌کنند (Kannaujiya et al., 2017). خواص طیفی جذب فیکوبیلی پروتئین‌ها عمدتاً توسط کروموفورهای متصل به آنها تعیین می‌شود که بر اساس این خواص به چهار گروه فیکوسیانیوبیلین، فیکواریتروبیلین، فیکوروبیلین و فیکوویولوبیلین تقسیم می‌شوند (Morya et al., 2023). این رنگدانه‌ها در یک زنجیره انتقال

در ترکیب شیمیایی اسپیرولینا بین ۶۰ تا ۷۰ درصد پروتئین، انواع کربوهیدرات‌ها و ویتامین‌هایی مثل پروویتامین A، ویتامین‌های C و E وجود دارد. اسیدهای چرب ضروری مانند گاما-لینولنیک اسید (GLA) و رنگدانه‌هایی مانند کلروفیل a، فیکوسیانیین و کاروتن‌ها نیز جزء اجزای مهم آن هستند (Soni et al., 2017). وجود این ترکیبات مفید و همچنین ایمنی مصرف انسانی آن، این ریزجلبک را به عنوان یک مکمل غذایی کامل برای مقابله با سوءتغذیه در کشورهای در حال توسعه تبدیل کرده و توجه گسترده‌ای را از سوی پژوهشگران و صنایع به عنوان منبعی نویدبخش در تولید مکمل‌های تغذیه‌ای و دارویی به خود جلب کرده است. گراسیلاریا (*Gracilaria*) متعلق به شاخه جلبک‌های قرمز و خانواده Gracilariaceae است (شکل ۱-ب). این جلبک در آب‌های شور و عمدتاً در اقیانوس‌های گرمسیری از جمله سواحل شرقی آسیا و خاورمیانه یافت می‌شود. همچنین به دلیل نرخ رشد سریع، توانایی تکثیر رویشی آسان، مقاومت مناسب در برابر نوسان‌های شوری، دما و کیفیت بالای آگار تولیدی، به یکی از گزینه‌های مطلوب برای مطالعات گسترده در حوزه‌های مختلف درمانی و صنعتی تبدیل شده است.

اساس مطالعات گذشته، جلبک‌های دریایی مانند اسپیرولینا و گراسیلاریا به دلیل داشتن ترکیبات زیست‌فعال از جمله رنگدانه‌های فیکوبیلی‌پروتئینی، پتانسیل بالایی برای پاسخ به این نیاز دارند.

هدف از این مطالعه، استخراج رنگدانه‌های فیکوبیلی‌پروتئینی از ریزجلبک اسپیرولینا و جلبک قرمز گراسیلاریا به دست آمده از منابع بومی و ارزیابی ویژگی‌های ساختاری و فعالیت‌های زیستی آنها است. با توجه به محدود بودن مطالعات انجام شده بر روی گونه‌های بومی، به‌ویژه به دلیل دشواری استخراج این رنگدانه‌ها از جلبک‌های قرمز به دلیل محتوای بالای آگار، این پژوهش در پی بررسی پتانسیل عملکردی هر رنگدانه به صورت مستقل بوده است. همچنین، در حالی که رنگدانه فیکواریترین با توجه به مطالعات گذشته معمولاً از برخی سیانوباکترها استخراج می‌شد، فیکواریترین بررسی شده در این مطالعه از نوعی جلبک قرمز استخراج شده است که به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد آن، راه تازه‌ای را در مطالعات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی باز می‌کند. همچنین با وجود محدود بودن مطالعات ساختاری بر روی فیکواریترین، این پژوهش به طور خاص به شناسایی ساختار این

انرژی به صورت آبشاری از فیکواریترین به فیکوسیانین و سپس به آلفو فیکوسیانین متصل می‌شوند و در نهایت انرژی را به فتوسیستم‌های I و II منتقل می‌کنند (Jaeschke et al., 2021). این پروتئین‌ها به طور کلی از دو زیرواحد آلفا (α) و بتا (β) تشکیل شده‌اند که هر کدام حاوی کروموفور بیلین هستند و به ترتیب وزن‌های مولکولی ۱۲ تا ۱۹ و ۱۴ تا ۲۱ کیلودالتون دارند. هر زیرواحد α و β از ۱۶۰ تا ۱۸۰ آمینواسید تشکیل شده است و به طور معمول ساختارهای پایدار تریمر یا واحدهای عملکردی هگزامری به صورت دیسکی شکل می‌سازند (Chen et al., 2022). با این حال استخراج رنگدانه‌های فیکوبیلی‌پروتئینی و بررسی خواص جداگانه این رنگدانه‌ها در مقایسه با یکدیگر کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. امروزه یکی از چالش‌های اساسی در صنایع غذایی، استفاده گسترده از افزودنی‌های شیمیایی است که خطر افزایش ابتلا به بیماری‌هایی مانند سرطان را به دنبال دارد. با توجه به افزایش نگرانی‌ها نسبت به مصرف گسترده افزودنی‌های شیمیایی در صنایع غذایی و ارتباط آن با بروز بیماری‌های مزمن مانند سرطان، نیاز به جایگزین‌های طبیعی، ایمن و موثر بیش از پیش احساس می‌شود. بر

در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. نمونه‌ها سپس به وسیله فریزدرایر (Christ, LDplus 1-2 Alpha, آلمان) خشک شدند (۲۰ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و ۴ ساعت در دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد) (Zarrouk, 1966). جلبک *Gracilaria gracilis* از بسترهای سنگی سواحل جنوبی دریای خزر جمع‌آوری شد. نمونه‌ها پس از شستشو با آب مقطر به وسیله دستگاه فریزدرایر خشک و تا زمان انجام آزمایش‌ها در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

استخراج رنگدانه‌های فیکوبیلی پروتئینی

به منظور حذف نمک‌ها و تنظیم pH نمونه، ابتدا ۱۰ گرم از پودر خشک *S. platensis* و *G. gracilis* توسط ترازو (با دقت ۰/۰۰۱ گرم؛ AND, 200GF، ژاپن) وزن شد. در مرحله بعد نمونه‌ها با آب مقطر استریل شستشو داده شدند، تا pH به محدوده ۷/۰ تا ۸/۰ برسد. زیست‌توده به دست آمده، در حضور بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر با ۸/۶ و نسبت حجمی ۱ به ۳ (وزن نمونه به حجم بافر)، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط نور کم، به وسیله هموژنایزر مکانیکی به مدت ۲۰ دقیقه همگن

رنگدانه از طریق طیف‌سنجی FTIR پرداخته است. هدف اصلی این پژوهش، فراهم‌سازی درک دقیق‌تری از خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی فیکوسیانین و فیکواریترین استخراج شده از منابع بومی، به منظور ارزیابی قابلیت کاربرد آنها در صنایع غذایی، دارویی و مکمل‌های تغذیه‌ای به عنوان ترکیبات زیست‌فعال طبیعی است. نتایج این مطالعه می‌تواند، زمینه‌ساز بهره‌برداری هدفمندتر از این رنگدانه‌ها به عنوان جایگزین‌های بالقوه افزودنی‌های شیمیایی شود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و تهیه زیست‌توده جلبکی

ریزجلبک *Spirulina platensis* از شرکت گیل فوکا (رشت، گیلان) تهیه شد. منشا این ریزجلبک، مخازن آب شیرین منطقه بود. کشت در شرایط اتوتروفی و در محیط استاندارد زاروک (Zarrouk) با تنظیم pH در محدوده ۸/۵ تا ۹ و دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد انجام شد. شدت نور در طول دوره رشد ۲۵۰۰ لوکس و برنامه نوری شامل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود. هوادهی مداوم با استفاده از پمپ هوا به مدت ۲۰ روز اعمال شد. برداشت زیست‌توده از طریق سانتریفیوژ در ۷۰۰۰ دور

مدت یک شب انکوبه شد. رسوب به دست آمده، پس از سانتریفوژ در ۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد با بافر فسفات در pH برابر با ۶/۸ دیالیز شد (Bennett and Bogorad, 1973).

تعیین غلظت رنگدانه‌های فیکوبیلی پروتئینی برای اندازه‌گیری غلظت رنگدانه‌ها، جذب (A) فیکوسیانین (PC)، آلفوفیکوسیانین (APC) و فیکواریترین (PE) جدا شده از جلبک‌ها در طول موج‌های ۶۲۰، ۶۵۲ و ۵۶۲ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Pharmacia Biotech، سوئد) در سه تکرار خوانده شد و غلظت آنها با استفاده از رابطه‌های ۱ تا ۳ محاسبه شد (Bennett and Bogorad, 1973).

رابطه ۱:

$$PC \text{ (mg/mL)} = (A_{620} - 0.474A_{652}) / 5.34$$

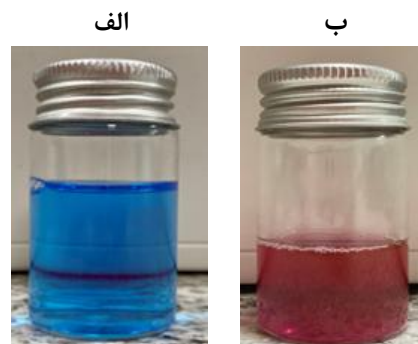
رابطه ۲:

$$APC \text{ (mg/mL)} = (A_{652} - 0.208A_{620}) / 5.09$$

رابطه ۳:

$$PE \text{ (mg/mL)} = (A_{562} - 2.41PC - 0.849APC) / 9.62$$

شد. سوسپانسیون به دست آمده به مدت سه روز تحت چرخه‌های متوالی انجماد و ذوب قرار گرفت. پس از اتمام این مرحله، نمونه‌ها ذوب شده و در ۵۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفیوژ (Sigma، آلمان) شدند. مایع رویی به دست آمده در نمونه *S. platensis* حاوی فیکوسیانین (شکل ۲-الف) و در نمونه *G. gracilis* حاوی فیکواریترین (شکل ۲-ب) بود (Lowry et al., 1951).



شکل ۲: رنگدانه‌های فیکوبیلی پروتئینی استخراج شده از اسپیرولینا و گراسیلاریا. الف) رنگدانه فیکوسیانین، ب) رنگدانه فیکواریترین.

خالص‌سازی رنگدانه‌ها

برای خالص‌سازی این رنگدانه‌ها پس از سانتریفوژ در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، به محلول به دست آمده سولفات آمونیوم ۵۰ درصد اضافه و در ۴ درجه سانتی‌گراد به

الکتروفورز SDS-PAGE

بررسی زیرواحدهای پپتیدی رنگدانه‌های فیکواریترین و فیکوسیانیین استخراج شده، با روش الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید با حضور سدیم دودسیل سولفات شد. برای این منظور، نمونه‌ها با نسبت مساوی (۱:۱) با بافر نمونه، حاوی ۲۰ میلی‌مولار Tris-HCl با pH ۶/۶۸، ۱۲/۵ درصد SDS و ۲۰ درصد گلیسرول مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه و مارکر پروتئین (Thermo, 26610, Fisher Scientific, آمریکا) در چاهک‌ها ژل ریخته شد. پس از اعمال جریان الکتریکی، حرکت پروتئین‌ها در ژل بر اساس وزن مولکولی آنها آغاز شد. در این فرایند، رنگ نشانگر بروموفنول بلو طی حدود ۱/۵ ساعت تا انتهای ژل حرکت کرد. در پایان، پس از قطع جریان، ژل با استفاده از رنگ کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد تا باندهای پروتئینی به طور واضح نمایان شوند (Kawsar et al., 2011).

مشخصه‌یابی رنگدانه‌ها

به منظور بررسی تغییرات ساختاری و شناسایی گروه‌های عاملی پروتئین‌های فیکواریترین و فیکوسیانیین، از طیف‌سنجی

مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) استفاده شد. نمونه‌های پروتئینی ابتدا به صورت پودر خشک تهیه و سپس طیف آنها در محدوده عدد موجی ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی‌متر با استفاده از دستگاه FTIR (JASCO, 4700)، ژاپن ثبت شد.

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی محتوای فیکوبیلی پروتئینی استخراج شده با استفاده از آزمون رادیکال آزاد DPPH (۱،۱-دی‌فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل) انجام شد. در این آزمون، ۲ میلی‌لیتر از محلول رنگدانه‌های فیکوسیانیین و فیکواریترین با غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با ۱ میلی‌لیتر محلول DPPH (به غلظت ۰/۰۰۴ درصد وزنی/حجمی در متانول) مخلوط شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط و در شرایط تاریک انکوبه شدند. میزان جذب محلول‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر هر کدام با سه بار تکرار توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و فعالیت مهارری رادیکال آزاد DPPH (SA_{DPPH}) با استفاده از رابطه ۴ محاسبه شد. در این بررسی از

سوسپانسیون باکتریایی در مقایسه با استاندارد ۰/۵ مک فارلند برای تخمین کدورت و میزان باکتری معلق در مایعات (به طور تقریبی برابر با $10^8 \times 1/5$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر) از سویه‌های باکتریایی *E. coli* و *S. aureus* تهیه و با سوآپ استریل به طور یکنواخت بر سطح محیط کشت پخش شد. دیسک‌های کاغذی استریل با قطر ۶ میلی‌متر، با ۲۰ میکرولیتر از محلول‌های رنگدانه آغشته شدند. سپس بر سطح محیط کشت قرار گرفتند. برای شاهد مثبت، از دیسک آنتی‌بیوتیکی استاندارد تجاری سیپروفلوکساسین (Ciprofloxacin) با غلظت ۵ میکروگرم استفاده شد. همچنین، از یک دیسک خالی بدون ماده فعال به عنوان شاهد منفی استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس، قطر هاله ممانعت رشد اندازه‌گیری شد.

نتایج

بررسی ویژگی‌های طیفی رنگدانه‌های استخراج شده

طبق شکل‌های ۳ و ۴ جذب نوری فیکوبیلی پروتئین‌های استخراج شده در محدوده طول موج ۲۸۰ تا ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

آسکوربیک اسید به عنوان شاهد مثبت استفاده شد (Pena-Medina et al., 2023).

رابطه ۴:

$$AS_{DPPH} (\%) = [A_C - (A_S - A_B) / A_C] \times 100$$

A_C : جذب شاهد؛ A_S : جذب نمونه؛ A_B : جذب بلانک.

در ادامه، نتایج به دست آمده توسط نرم‌افزار GraphPad Prism بررسی شد و غلظت IC_{50} برای هر نمونه به دست آمد.

بررسی خواص ضد میکروبی

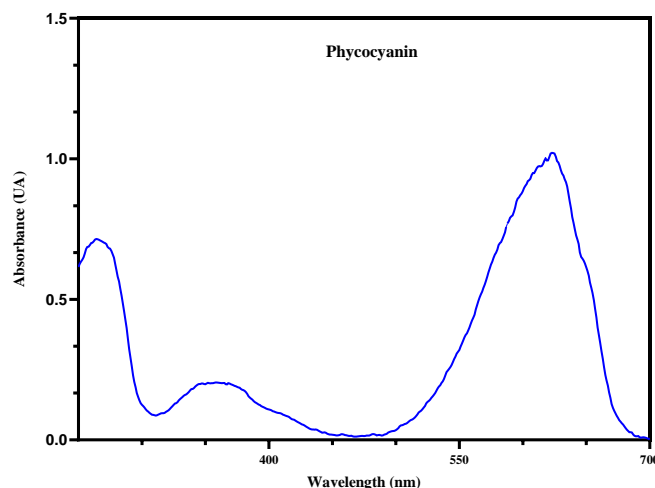
برای بررسی فعالیت ضد میکروبی رنگدانه‌های استخراج شده، از روش انتشار دیسک (Disk Diffusion)، مطابق با استاندارد Clinical and Laboratory (CLSI Standards Institute) علیه دو عامل بیماری‌زای بالینی رایج برای انسان، از باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* و باکتری گرم منفی *Escherichia coli* استفاده شد. ابتدا از رنگدانه‌های استخراج شده، محلول‌های استوک با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در آب مقطر استریل تهیه شد. برای انجام آزمون، ابتدا محیط کشت مولر-هینتون آگار (Muller-Hinton Agar) آماده و استریل شد و در پلیت‌های مخصوص ریخته شد. سپس

رنگدانه است. شدت نسبتا بالای جذب در این ناحیه می‌تواند ناشی از حضور پروتئین‌های همراه یا ناخالصی‌های استخراج شده در طی فرآیند رسوب‌دهی و دیالیز باشد. با این حال، وجود پیک‌های اختصاصی در ناحیه مرئی تاییدکننده استخراج موفق رنگدانه‌های هدف است.

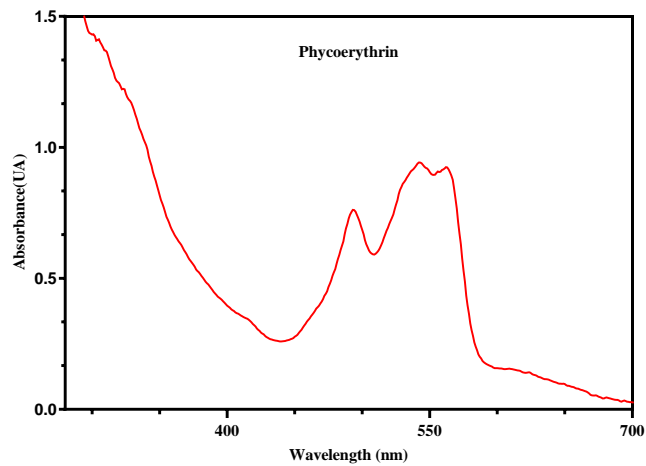
نتایج اندازه‌گیری مقدار جذب رنگدانه‌ها در طول موج‌های مربوطه در جدول‌های ۱ و ۲ آورده شده است. غلظت فیکوسیانین استخراج شده از اسپرولینا ۶/۰۸ و غلظت فیکواریترین استخراج شده از گراسیلاریا و ۴/۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود.

طیف جذب فیکوسیانین استخراج شده از اسپیرولینا طبق شکل ۳، پیک شاخصی را در محدوده ۶۲۰ نانومتر نشان داد که بیانگر وجود رنگدانه فیکوسیانین است. همچنین، پیک جذب در ۲۸۰ نانومتر نیز مشاهده شد که مربوط به سایر ناخالصی‌ها و آمینواسیدهای آروماتیک موجود در ساختار پروتئینی این رنگدانه است.

در مورد فیکواریترین استخراج شده از گراسیلاریا با توجه به شکل ۴، پیک‌های جذب مشخصی در حدود ۴۹۵ و ۵۴۵ نانومتر مشاهده شد که از ویژگی‌های طیفی این رنگدانه محسوب می‌شوند. همچنین یک پیک جذب قوی در ۲۸۰ نانومتر دیده شد که بیانگر ماهیت پروتئینی



شکل ۳: طیف جذب نوری رنگدانه فیکوسیانین استخراج شده از *Spirulina platensis*. بیشترین جذب نوری در طول موج حدود ۶۲۰ نانومتر مشاهده شد که مشخصه رنگدانه فیکوسیانین است.



شکل ۴: طیف جذب نوری رنگدانه فیکواریترین استخراج شده از *Gracilaria gracilis* پیک‌های مشخص در حدود ۴۹۵ و ۵۴۵ نانومتر از ویژگی‌های طیفی رنگدانه فیکواریترین است.

جدول ۱: نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری جذب نوری پروتئین فیکوسیانین استخراج شده از ریز جلبک *Spirulina platensis*

طول موج (nm)	تکرار اول	تکرار دوم	تکرار سوم	میانگین \pm انحراف معیار
۲۸۰	۰/۷۰۲	۰/۷۰۳	۰/۷۰۵	۰/۷۰۳ \pm ۰/۰۰۱۵
۵۶۵	۰/۳۷۲	۰/۳۷۴	۰/۳۷۲	۰/۳۷۳ \pm ۰/۰۰۱۲
۶۲۰	۰/۸۵۶	۰/۸۵۵	۰/۸۵۴	۰/۸۵۵ \pm ۰/۰۰۰۱
۶۵۲	۰/۴۳۲	۰/۴۳۳	۰/۴۳۴	۰/۴۳۳ \pm ۰/۰۰۱۲

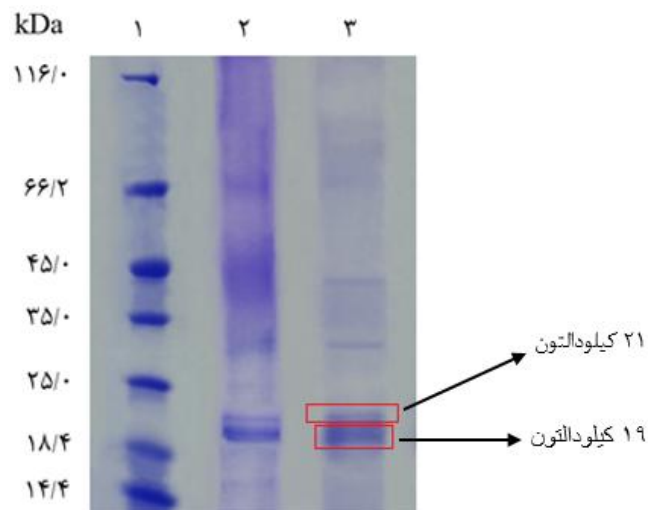
جدول ۲: نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری جذب نوری پروتئین فیکواریترین استخراج شده از جلبک *Gracilaria gracilis*

طول موج (nm)	تکرار اول	تکرار دوم	تکرار سوم	میانگین \pm انحراف معیار
۲۸۰	۱/۷۸	۱/۷۶	۱/۷۸	۱/۷۷ \pm ۰/۰۱۱۵
۵۶۵	۰/۹۰۵	۰/۹۰۲	۰/۹۰۴	۰/۹۰۴ \pm ۰/۰۰۱۲
۶۲۰	۰/۱۳۹	۰/۱۴۱	۰/۱۴۲	۰/۱۴۱ \pm ۰/۰۰۱۸
۶۵۲	۰/۰۸۶	۰/۰۸۹	۰/۰۹	۰/۰۸۹ \pm ۰/۰۰۲۵

بررسی با روش SDS-PAGE

پروتئین‌ها به کار رفت. در نمونه عصاره خام فیکوسیانین استخراج شده از اسپرولینا (ستون ۲)، باندهای متعدد پروتئینی مشاهده شد که نشان‌دهنده حضور مقادیر زیادی پروتئین‌های غیرمرتبط و خلوص پایین نمونه اولیه بود. پس از رسوب با آمونیوم سولفات ۵۰ درصد (ستون ۳)، شدت باندهای خارج از محدوده مورد نظر کاهش یافت و دو باند غالب در حدود ۱۹ تا ۲۰ کیلودالتون مشاهده شد که می‌توان آنها را به زیر واحدهای α و β نسبت داد (شکل ۵).

بررسی و ارزیابی الگوی ژل الکتروفورز SDS-PAGE رنگدانه‌های استخراج شده طبق شکل‌های ۵ و ۶ نشان داد که هر دو رنگدانه چندین باند مشخص که به احتمال زیاد بیانگر زیرواحدهای آلفا و بتا مربوط به ساختار پروتئین‌های فیکوبیلی پروتئینی هستند، را دارد. مارکر پروتئینی مورد استفاده شامل باندهای استاندارد در محدوده ۱۴/۴ تا ۱۱۶ کیلودالتون بود و به عنوان مرجع تخمین وزن مولکولی



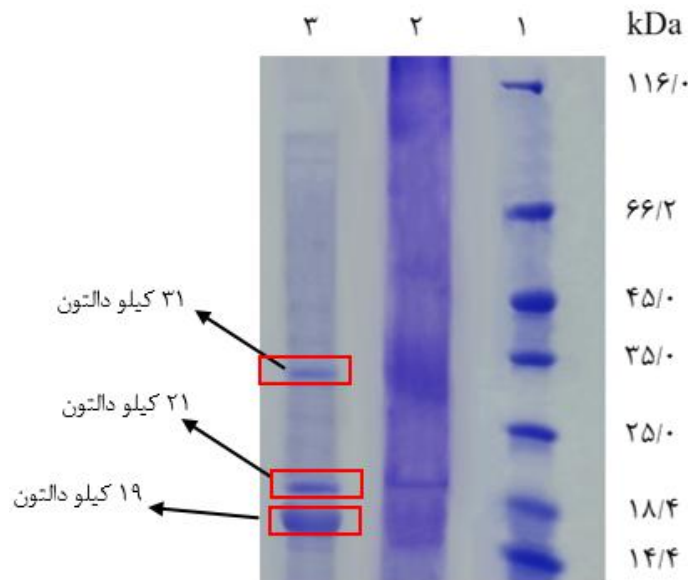
شکل ۵: بررسی SDS-PAGE فیکوسیانین استخراج شده از *Spirulina platensis*. ستون ۱: مارکر پروتئینی؛ ستون ۲: عصاره خام پروتئینی استخراج شده از اسپرولینا؛ ستون ۳: عصاره پروتئینی بعد از رسوب با آمونیوم سولفات ۵۰ درصد.

۳۳ کیلو دالتون که می‌توان آنها را مربوط به زیرواحدهای α و β و γ دانست، بیانگر دستیابی به آلودگی پروتئینی کمتر و جداسازی موفق‌تر از رنگدانه‌های دیگر است.

طیف‌سنجی FTIR

نتایج به دست آمده از طیف‌سنجی FTIR نمونه خام فیکوسیانین، ویژگی‌های کلیدی ساختاری و ترکیبی پروتئین را نشان می‌دهد که در شکل ۷ قابل مشاهده است.

ارزیابی وزن مولکولی و خلوص پروتئین فیکواریترین استخراج شده از گراسیلاریا نشان داد که طبق شکل ۶، در نمونه عصاره خام (ستون ۲)، حضور گسترده‌ای از باندهای ناهمگن پروتئینی مشاهده شد که نشان‌دهنده وجود پروتئین‌های متعدد و خلوص پایین نمونه اولیه بود. پس از رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات ۶۵ درصد (ستون ۳)، شدت باندهای خارج از محدوده مورد نظر به طور قابل توجهی کاهش یافت. در نهایت، در نمونه نسبتاً خالص شده (ستون ۳)، سه باند واضح‌تر در حدود ۱۹، ۲۱ و

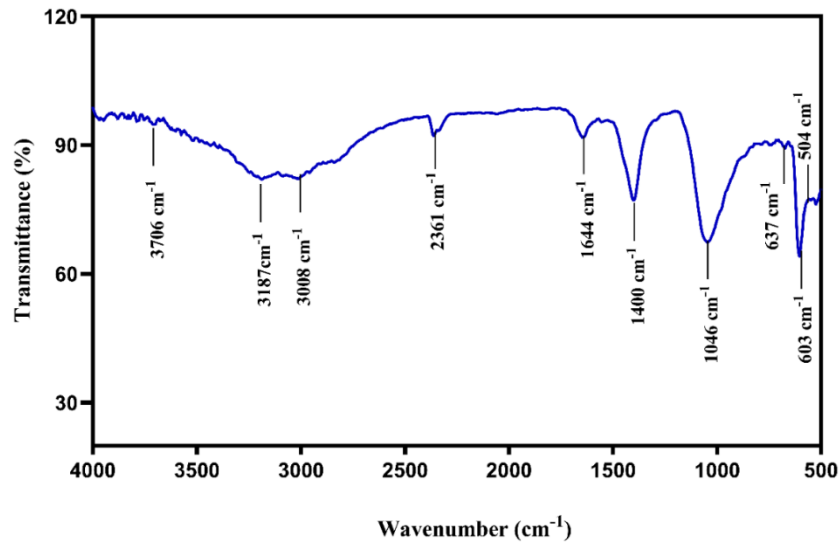


شکل ۶: بررسی الگوی ژل SDS-PAGE رنگدانه فیکواریترین استخراج شده از *Gracilaria gracilis*. ستون ۱: مارک‌پروتئینی؛ ستون ۲: عصاره خام پروتئینی استخراج شده از گراسیلاریا؛ ستون ۳: عصاره پروتئینی بعد از رسوب با آمونیوم سولفات ۶۵ درصد.

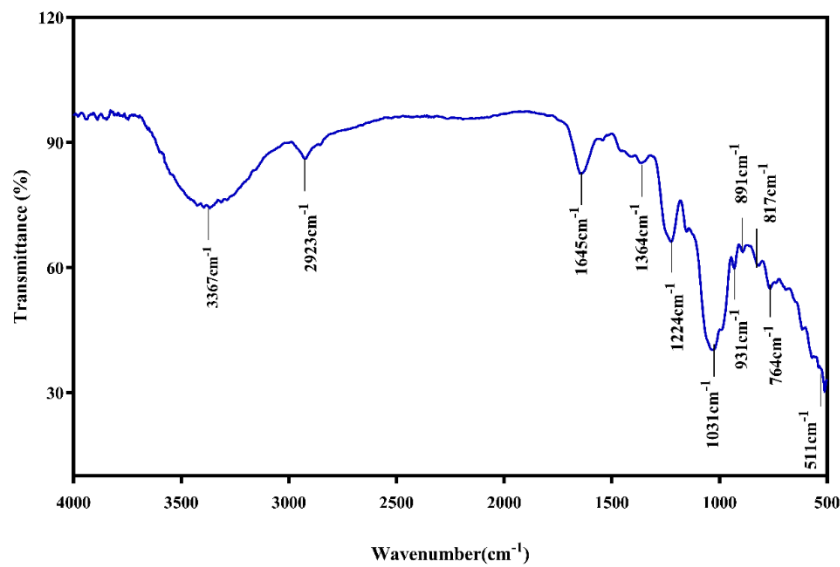
ضعیف ۲۳۶۱ بر سانتی‌متر معمولا به جذب کرین دی اکسید (CO_2) محیطی نسبت داده می‌شود. پیک واضح در ۱۴۰۰ بر سانتی‌متر نیز به ارتعاش کششی متقارن گروه‌های کربوکسیلات (COO^-) نسبت داده می‌شود و نمایانگر حضور آمینواسیدهای اسیدی یا بافرهای باقی‌مانده در نمونه است. باند ۱۰۴۶ بر سانتی‌متر می‌تواند به پیوندهای $\text{C}-\text{O}$ یا $\text{C}-\text{N}$ مربوط باشد که احتمالا ناشی از ناخالصی‌های پلی‌ساکاریدی یا پیوندهای پپتیدی است. همچنین باندهای مشخص در ۶۰۳، ۶۳۷ و ۵۰۴ بر سانتی‌متر معرف ارتعاشات گروه‌های تتراپیرولی کروموفور فیکوسیانبیلین هستند (Venkatesan et al., 2012).

طیف‌سنجی (FTIR) پروتئین فیکواریترین که در شکل ۸ نشان داده شده، بازتابی از ساختار پروتئینی همراه با ناخالصی‌های زیستی و ترکیبات همراه سلولی است. باند مشخص در ناحیه ۱۶۴۴ بر سانتی‌متر به ارتعاش کششی پیوند $\text{C}=\text{O}$ در گروه آمید I مربوط است.

حضور پیک غالب در ناحیه ۱۶۴۴ بر سانتی‌متر بیانگر باند کششی آمید I ناشی از ارتعاش پیوند $\text{C}=\text{O}$ در ساختار پپتیدی است. این باند با ساختارهای ثانویه از نوع صفحات بتا و یا ساختارهای بی‌نظم در پروتئین‌ها مرتبط بوده و نشان‌دهنده تخریب نسبی ساختار طبیعی در اثر عدم تخلیص کامل است. عدم مشاهده واضح باند آمید II در ناحیه ۱۵۴۰ بر سانتی‌متر نیز این اختلال ساختاری را تایید می‌کند (Prabakaran et al., 2020). در نواحی با فرکانس بالا، باندهای پهن در ۳۷۰۶ و ۳۱۸۷ بر سانتی‌متر مربوط به ارتعاشات کششی گروه‌های هیدروکسیل (OH) و آمین (NH) هستند که احتمالا از گروه‌های هیدروکسیل و آمینی هیدروژنی شده یا حضور آب ساختاری و ترکیبات فنولی ناشی می‌شوند. باند ۳۰۰۸ بر سانتی‌متر احتمالا ناشی از ارتعاش کششی پیوندهای $\text{C}-\text{H}$ ساختار آلیفاتیک یا آروماتیک است که می‌تواند مربوط به زنجیره‌های جانبی آمینواسیدهای آب‌گریز یا کروموفورهای متصل باشد (Duygu et al., 2012). همچنین پیک



شکل ۷: نمودار به دست آمده از طیف‌سنجی FTIR نمونه فیکوسیانین استخراج شده از *Spirulina platensis*



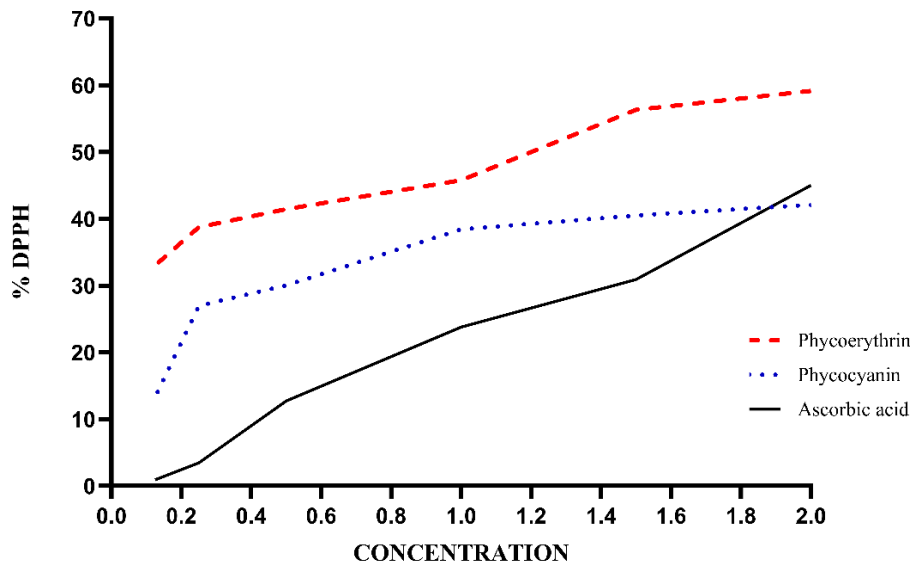
شکل ۸: نمودار به دست آمده از طیف‌سنجی FTIR نمونه پروتئین فیکواریترین استخراج شده از *Gracilaria gracilis*

هرچند در بستری از ناخالصی‌ها است. در نهایت، باند ضعیف‌تر در ۵۱۱ بر سانتی‌متر می‌تواند به گروه‌های گوگرددار (C-S) یا خمشی حلقوی در ساختار پیگمنت مربوط باشد (Mishra et al., 2011).

خواص آنتی‌اکسیدانی

نتایج آزمون DPPH که برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه‌های فیکوسیانیین و فیکواریترین در مقایسه با آسکوربیک اسید به عنوان شاهد مثبت انجام شد (شکل ۹)، نشان داد که هر دو رنگدانه دارای توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH بودند، اما شدت فعالیت آنها با یکدیگر متفاوت بود. در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، درصد مهار رادیکال DPPH توسط رنگدانه فیکواریترین، بیشترین مقدار و حدود ۵۹ درصد بود، در حالی که این مقدار برای فیکوسیانیین و آسکوربیک اسید به ترتیب ۴۲ و ۴۵ درصد بود. مقادیر غلظت IC_{50} به دست آمده برای رنگدانه‌های فیکواریترین ۰/۹۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، فیکوسیانیین ۲/۲۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و آسکوربیک اسید (۲/۳۰) میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود.

باند پهن مشاهده شده در ۳۳۶۷ بر سانتی‌متر نیز ناشی از پیوندهای هیدروژنی گروه‌های هیدروکسیل (OH) و آمین (NH) است که می‌تواند به حضور آب در ساختار پروتئین، گروه‌های هیدروکسیل آزاد یا آمین‌های پروتئینی مرتبط باشد. همچنین باند ۲۹۲۳ بر سانتی‌متر بیانگر ارتعاش کششی گروه‌های C-H آلیفاتیک است که احتمالاً از بقایای لیپیدی یا غشایی منشا می‌گیرد. در ناحیه ۱۰۳۱ تا ۱۲۲۴ بر سانتی‌متر باندهایی مشاهده می‌شود که می‌تواند به ارتعاشات کششی پیوندهای C-N (در زنجیره‌های پپتیدی)، C-O (در پلی‌ساکاریدها) یا حتی P=O (در نوکلئیک‌اسیدها و فسفولیپیدها) مرتبط باشند. حضور این باندها حاکی از وجود ناخالصی‌های سلولی مانند پلی‌ساکاریدها، فسفات‌ها و دیگر ترکیبات در نمونه خام است. قابل توجه است که باندهای مشخص در نواحی ۹۳۱، ۸۹۱، ۸۱۷ و ۷۶۴ بر سانتی‌متر نیز حضور دارند که به ساختارهای تتراپیرولی کروموفور فیکواریترین، به‌ویژه مولکول فیکواریتروبیلین نسبت داده می‌شوند. مشاهده این باندها، حاکی از حفظ نسبی رنگدانه فعال در نمونه خام،



شکل ۹: فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH برای فیکواریترین، فیکوسیانین و آسکوربیک اسید. فیکواریترین در تمامی غلظت‌ها بیشترین توان آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان داد و پس از آن فیکوسیانین و آسکوربیک اسید قرار گرفتند.

خواص ضد میکروبی

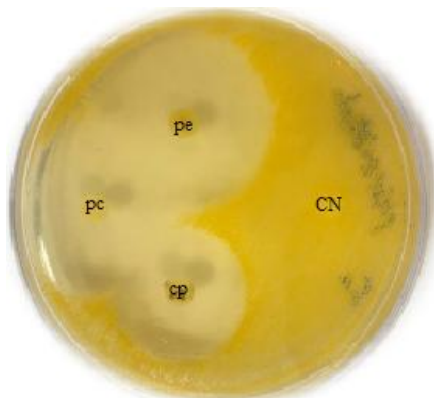
بزرگ‌ترین قطر هاله ممانعت از رشد را نشان داد که به عنوان شرایط شاهد مثبت، صحت این آزمون را تایید کرد (شکل ۱۰). در پلیت حاوی باکتری‌های گرم مثبت *S. aureus* قطر هاله در دیسک حاوی نمونه فیکواریترین نسبت به فیکوسیانین بزرگتر بود که نشان‌دهنده فعالیت قوی‌تر این رنگدانه نسبت به فیکوسیانین است. دیسک‌های شاهد منفی فاقد هرگونه هاله ممانعت از رشد بودند که نشان‌دهنده اختصاصی بودن اثر رنگدانه‌ها است.

فعالیت ضدباکتریایی رنگدانه‌های فیکواریترین و فیکوسیانین با استفاده از روش انتشار دیسک ارزیابی شد و نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری قطر هاله‌های مهار رشد در جدول ۳ ارائه شده است. این یافته‌ها نشان داد که هر دو رنگدانه دارای اثر بازدارندگی در برابر رشد باکتری‌های گرم منفی *E. coli* و گرم مثبت *S. aureus* بودند. در هر دو گروه باکتری‌ها، دیسک حاوی آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین

جدول ۳: یافته‌های به دست آمده از فعالیت ضد میکروبی رنگدانه‌های فیکواریترین و فیکوسیاینین به روش انتشار دیسک (میانگین \pm انحراف معیار)

بakteri	قطر منطقه بازدارندگی (mm)		
	فیکواریترین	سیپروفلوکسازین	فیکوسیاینین
<i>Staphylococcus aureus</i>	۳۵/۰ \pm ۱/۰	۳۷/۰ \pm ۱/۳	۳۰/۰ \pm ۲/۰
<i>Escherichia coli</i>	۲۴/۳ \pm ۱/۵	۲۹/۰ \pm ۲/۰	۲۷/۷ \pm ۱/۳

الف

*Staphylococcus aureus*

ب

*Escherichia coli*

شکل ۱۰: فعالیت ضد میکروبی رنگدانه‌های فیکوبیلی پروتئینی با استفاده از روش انتشار دیسک. الف) نواحی ممانعت رشد بر روی پلیت حاوی باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus*. ب) نواحی ممانعت روی محیط کشت باکتری گرم منفی *Escherichia coli*. PE: دیسک فیکواریترین (۱/۵ میلی گرم در میلی لیتر)؛ PC: دیسک فیکوسیاینین (۱/۵ میلی گرم در میلی لیتر)؛ CP: دیسک سیپروفلوکسازین (شاهد مثبت)؛ CN: دیسک بدون هیچ گونه افزودنی (شاهد منفی).

نشان‌دهنده پتانسیل قابل توجه رنگدانه‌های مورد بررسی به عنوان ترکیبات زیست‌فعال با خاصیت ضد میکروبی هستند.

نتایج برای باکتری *E. coli* حاکی از کاهش شدت مهار نسبت به باکتری گرم مثبت بود. علاوه بر این، فیکوسیاینین عملکرد بهتری نسبت به فیکواریترین داشت. مشاهدات این مطالعه،

بحث

واحدی یا هگزامر در رنگدانه فیکواریتین ایجاد می‌کند (Sonani et al., 2018). الگوی الکتروفورز SDS-PAGE رنگدانه‌های استخراج شده در این مطالعه، حاکی از وجود این زیرواحدها و نشان‌دهنده استخراج صحیح در طول این مطالعه است. این نتایج نشان داد که هر دو رنگدانه دارای باندهایی در محدوده وزنی مشخص شامل ۱۹ تا ۲۱ کیلودالتون هستند (شکل‌های ۵ و ۶) که می‌توان آنها را به زیر واحدهای آلفا و بتا نسبت داد (Patil et al., 2006). همچنین حذف تدریجی ناخالصی‌ها پس از رسوب با سولفات آمونیوم و دیالیز، منجر به باندهای واضح‌تر و کاهش پروتئین‌های مزاحم شد و طبق شکل‌های ۵ و ۶ باعث پدید آمدن باند در محدوده ۳۰ کیلودالتون شد که نشانه‌ای از خالص‌سازی موفق است (Nowruzi et al., 2020). طیف‌سنجی FTIR روشی برای بررسی سریع و غیرمخرب نمونه‌های مختلف از جمله پروتئین‌ها است. در این روش پیوندهای شیمیایی با فرکانس مشخصی از ساختار، زاویه پیوند و طول آن ارتعاش می‌کنند. به طور کلی پژوهشگران از این روش برای ارزیابی گروه‌های عاملی و بررسی ساختار مولکول‌ها استفاده می‌کنند (Valand et al., 2020). نتایج به دست آمده از بررسی طیف‌سنجی پروتئین

ارزیابی دقیق ویژگی‌های نوری و ساختاری رنگدانه‌های استخراج شده، گامی کلیدی در راستای تعیین خلوص و پایداری آنها برای کاربردهای بعدی در صنایع غذایی و دارویی محسوب می‌شود. بررسی طیف جذب نوری نشان داد که فیکوسیانیین استخراج شده دارای بیشینه جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر بود (شکل ۳) که این نتایج، یافته‌های گزارش شده در مطالعات پیشین را تایید می‌کند (Hsieh-Lo et al., 2023). از سوی دیگر، فیکواریترین استخراج شده دارای دو پیک مشخص در محدوده ۴۹۵ و ۵۴۵ نانومتر (شکل ۴) بود که به درستی نشان‌دهنده ویژگی اختصاصی طیف نوری این رنگدانه است (Nguyen et al., 2020). بر اساس گزارش‌های پیشین، فیکوبیلی‌پروتئین‌ها ساختاری چندزیرواحدی دارند و از زیرواحدهای آلفا و بتا تشکیل شده‌اند که کمپلکس‌های $\alpha\beta$ به صورت واحدهای سه‌تایی یا شش‌تایی وجود دارند و عملکرد نوری خود را از طریق این ساختارها ایفا می‌کنند (Contreras-Martel et al., 2007). همچنین زیرواحد گاما (γ) به طور اختصاصی به عنوان یک اتصال‌دهنده بین ساختارهای سه‌تایی $(\alpha\beta)_3$ ، اجسام دیسکی شکل را به صورت شش

آسکوربیک اسید به ترتیب ۴۲ و ۴۵ درصد گزارش شد. بر این اساس، مقدار IC_{50} برای فیکواریترین ۰/۹۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، برای فیکوسیانیین ۲/۲۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای آسکوربیک اسید ۲/۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد که نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تر فیکواریترین نسبت به نمونه‌های دیگر است. در پژوهشی مشابه که در سال ۲۰۰۱ فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه فیکوسیانیین استخراج شده از عصاره پروتئینی اسپیرولینا انجام گرفت، نتایج حاکی از آن بودند که این رنگدانه توانست ۴۶/۴۰ درصد مهار رادیکال آزاد DPPH را از خود نشان دهد (Estrada et al., 2001). در مطالعه‌ای دیگر که به بررسی خواص فیکوسیانیین از جمله توانایی آن در مهار رادیکال DPPH پرداخته است، نتایج حاکی از توانایی ۲۵/۲۱ درصدی این رنگدانه در مهار رادیکال آزاد DPPH بود (Safari and Reyhani, 2023). این مطالعات و بررسی خواص گوناگون برای رنگدانه فیکواریترین به علت استخراج دشوارتر و پیچیده‌تر آن به مراتب کمتر مورد توجه قرار گرفته است و عمدتاً پراکندگی نتایج در این مطالعات بر روی گونه‌های مختلف از باکتری‌ها تا انواع گوناگون جلبک‌ها وجود دارد. به طور مثال غربالگری و بررسی

فیکوسیانیین و فیکواریترین استخراج شده در این مطالعه، با مطالعات پیشین، شباهت‌های قابل توجهی از جمله حضور گروه‌های آمیدی، هیدروکسیلی، کربوکسیلات و کروموفورهای تتراپیرولی دارد. طبق شکل‌های ۷ و ۸، در هر دو نمونه باند مشخص در ناحیه آمید I، ۱۶۴۴ و ۱۶۴۵ بر سانتی‌متر وجود دارد که معرف ساختار پپتیدی پروتئین‌ها است. با این حال، عدم وجود وضوح کافی در باند آمید II ممکن است به علت عدم خالص‌سازی کامل باشد یا به حضور باقی‌مانده‌هایی از بافر یا پلی‌ساکاریدهای سلولی مرتبط باشد (Prabakaran et al., 2020). برخلاف برخی مطالعات، پیک‌های کششی مربوط به ترکیبات گوگردی (S-O) در نمونه مورد مطالعه مشاهده نشد که می‌تواند به تفاوت در شرایط رشد، استخراج یا گونه مورد مطالعه مربوط باشد (Venkatesan et al., 2012).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه‌های فیکوبیلی پروتئینی به روش DPPH مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های به دست آمده از این آزمون نشان داد که فیکواریترین در تمامی غلظت‌ها دارای بالاترین توان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH بود و در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حدود ۵۹ درصد فعالیت مهارری را از خود نشان داد. این مقدار برای فیکوسیانیین و

کمی در آرایش کروموفورها و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نسبت داد، تا به تفاوت بنیادی در مکانیسم عمل آنها. در نتیجه، از نظر زیستی این دو ترکیب قابل مقایسه بوده و هر دو دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجه هستند.

برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی رنگدانه‌ها از آزمون انتشار دیسک استفاده شد که در آن هر دو رنگدانه استخراج شده دارای خاصیت زیاد ضد میکروبی در مقابل باکتری‌های گرم مثبت *S. aureus* و گرم منفی *E. coli* بود. از منظر فعالیت ضد میکروبی، هر دو رنگدانه توانایی بازدارندگی رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی منتخب را نشان دادند. در این میان، فیکواریترین قطر هاله بازدارندگی بزرگ‌تری نسبت به فیکوسیانیین بر روی باکتری‌های گرم مثبت *S. aureus* ایجاد کرد که نشان‌دهنده اثرگذاری قوی‌تر آن است. یافته‌های به دست آمده از ارزیابی و بررسی هاله عدم رشد ایجاد شده بر هر دو گروه باکتری‌ها نشان داد که باکتری *S. aureus* نسبت به *E. coli*، در مواجهه با رنگدانه‌های فیکوسیانیین و فیکواریترین حساس‌تر بودند. تحلیل و بررسی مطالعات پیشین حاکی از آن است که درصد خلوص و روش استخراج رنگدانه‌ها که ارتباط مستقیمی با حفظ ساختار آنها دارد و همچنین گونه‌ای که

ویژگی‌های فتوشیمیایی رنگدانه فیکواریترین استخراج شده از جلبک قرمز *Halymenia porphyraeformis* نشان دهنده توانایی آنتی‌اکسیدانی این رنگدانه بود. به طوری که غلظت IC_{50} در این پژوهش برابر با ۳۹/۲۵۳۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شده است (Mantiri et al., 2021). اما در بررسی دیگر بر روی این پروتئین که از جلبک قرمز *Spyridia filamentosa* استخراج شد، عصاره به دست آمده از این گیاه خواص مهاری رادیکال آزاد DPPH با غلظت IC_{50} برابر با ۱۲۸/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از خود نشان داد (Brabakaran et al., 2020). در مطالعه‌ای دیگر، در ارتباط با پروتئین به دست آمده از گونه‌ای از سیانوباکتری خاکزی *Nostoc sp.* FA1، نشان داده شد که این رنگدانه توانست درصد مهاری خود را به ۸۰ درصد برساند (Nowruzi et al., 2020). با بررسی بر روی گونه *G. gracilis* و با توجه به مقادیر IC_{50} به دست آمده می‌توان مشاهده کرد که فیکواریترین عملکرد بهتری از فیکوسیانیین داشت، در حالی که هر دو رنگدانه از خانواده فیکوبیلی‌پروتئین‌ها بوده و دارای مکانیسم آنتی‌اکسیدانی مشابهی هستند. بنابراین تفاوت مشاهده شده را می‌توان به اختلافات

نشان داد. نتایج این مطالعه حاکی از آن بود که اثرات این پروتئین بر روی باکتری *S. aureus* نسبت به باکتری‌های دیگر شدیدتر بود (Sitohy et al., 2015). همچنین، یافته‌های مطالعه‌ای بر روی خواص ضدباکتریایی فیکوسیانیین استخراج شده از *Spirulina sp.* و بررسی فعالیت مهارکنندگی این رنگدانه علیه باکتری‌های گرم مثبت *S. aureus* و *Enterococcus faecalis* و گرم منفی *Salmonella enteritidis* و *Aeromonas hydrophila* با استفاده از روش انتشار در چاهک آگار در بازه غلظتی ۰ تا ۳۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان داد که فیکوسیانیین در غلظت‌های پایین‌تر از ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر قادر به مهار رشد باکتری‌های *S. aureus*، *A. hydrophila* و *S. enteritidis* بود، اما علیه *E. faecalis* در همین بازه غلظتی غیرفعال باقی ماند. قطر هاله‌های ممانعت از رشد در این آزمون به صورت وابسته به غلظت افزایش یافت و در بازه‌ای بین ۷ تا ۱۳ میلی‌متر گزارش شد (Mohamed, 2018). همچنین در یافته‌ای دیگر، عصاره خام *Oscillatoria sp.* بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را در برابر باکتری‌های گرم مثبت نشان داد که این عملکرد حتی نسبت به آنتی‌بیوتیک استاندارد استرپتومایسین نیز

رنگدانه‌ها از آنها به دست آمده‌اند، تاثیر بسیار زیادی بر فعالیت ضد میکروبی آنها دارد. تفاوت مشاهده شده میان دو گونه باکتریایی می‌تواند ناشی از اختلاف در ساختار دیواره سلولی، وجود غشای خارجی در باکتری‌های گرم منفی و تفاوت در نفوذ ترکیبات پروتئینی بر اثر تفاوت بودن ساختار و دسترسی پذیر بودن گروه‌های مهم دارای فعالیت زیستی باشد. همچنین در مطالعه‌ای بر روی بررسی اثرات ضد میکروبی فیکواریترین به دست آمده از جلبک *Durvillaea antarctica* علیه دو عامل بیماری‌زای گرم منفی *E. coli* و گرم مثبت *S. aureus* مشاهده شد که خاصیت ضد میکروبی این رنگدانه علیه باکتری گرم مثبت شدیدتر بود (Mantiri et al., 2021). همچنین ارزیابی فعالیت ضد میکروبی فیکواریترین به دست آمده از سیانوباکتری گونه *Nostoc sp.* FA1، فعالیت قابل توجهی را در برابر گروه‌های گرم مثبت و منفی نشان داد. در این ارزیابی بیشترین ممانعت از رشد باکتری مربوط به *Candida albicans* و *Bacillus subtilis* بود (Nowruzi et al., 2020). در پژوهشی دیگر، فیکوسیانیین استخراج شده از جلبک سبز-آبی آنابنا اثرات ضد میکروبی وابسته به غلظتی را بر انواع گونه‌های گرم مثبت و گرم منفی از خود

کروموفور در هر دو طیف نشان از حضور رنگدانه‌های فعال داشتند. حضور زیرواحدهای آلفا و بتا در هر دو رنگدانه و زیرواحد گامای اختصاصی در فیکواریترین، تطابق خوبی با نتایج گزارش شده در منابع معتبر داشت (Sonani et al., 2018). در آزمون DPPH، رنگدانه فیکواریترین عملکرد آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری نسبت به فیکوسیانیین و حتی آسکوربیک اسید از خود نشان داد که با مقدار IC_{50} پایین‌تر همراه بود و نشان‌دهنده پتانسیل بالای آن در مهار رادیکال‌های آزاد است.

در مجموع، در مقایسه با مطالعات پیشین از که فعالیت متوسط تا بالا برای این رنگدانه‌ها گزارش کرده بودند، نویدبخش استفاده از این ترکیبات به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در محصولات دارویی و غذایی است. همچنین نتایج به دست آمده از بررسی‌های فعالیت ضد میکروبی این رنگدانه‌ها که از منابع بومی تهیه شد، موید آن است که فیکوبیلی‌پروتئین‌ها، به‌ویژه فیکواریترین، می‌توانند به عنوان عوامل ضدباکتریایی طبیعی در محصولات دارویی، آرایشی و غذایی مورد توجه قرار گیرند. در نهایت، این مطالعه نشان داد که هر دو رنگدانه مورد بررسی، دارای خواص زیستی مطلوب و پتانسیل استفاده در حوزه‌های دارویی، غذایی و

برجسته‌تر گزارش شد. این موضوع نشان‌دهنده پتانسیل بالای ترکیبات زیست‌فعال موجود در عصاره خام، به‌ویژه رنگدانه‌های فیکوبیلی‌پروتئینی مانند فیکوسیانیین است. در ادامه، به‌طور خاص ذکر شده که رنگدانه فیکوسیانیین فعالیت ضدباکتریایی بالایی در برابر *Klebsiella sp.* از خود نشان داد، به طوری که این فعالیت از استرپتومایسین نیز موثرتر بود و در مقایسه با دو باکتری دیگر نیز قوی‌تر ظاهر شد. این یافته‌ها اهمیت فیکوسیانیین را به عنوان یک عامل ضدباکتریایی طبیعی برجسته می‌کند و نشان می‌دهد که این رنگدانه، به‌ویژه در برابر باکتری‌های گرم منفی مقاوم مانند *Klebsiella sp.* نیز توان مهارکنندگی بالایی دارد (Shanmugam et al., 2017). سرانجام، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که رنگدانه‌های فیکوبیلی‌پروتئینی فیکوسیانیین و فیکواریترین استخراج شده به ترتیب از *S. platensis* و *G. gracilis* دارای ویژگی‌های زیستی قابل توجهی از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی هستند. استخراج و خالص‌سازی این رنگدانه‌ها با موفقیت انجام شد و نتایج طیف‌سنجی FTIR و بررسی SDS-PAGE صحت ساختار پروتئینی آنها را تایید کرد. پیک‌های مشخص آمید I و گروه‌های تتراپیرولی

بیوتکنولوژی هستند. به‌ویژه فیکواریترین به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی قوی‌تر، می‌تواند گزینه‌ای مناسب برای توسعه ترکیبات زیست‌فعال طبیعی محسوب شود. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، مسیرهای افزایش خلوص، پایداری ساختاری و بهینه‌سازی مقدار مصرفی این رنگدانه‌ها در سامانه‌های دارورسانی یا فرمولاسیون‌های خوراکی نیز مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

- Bennett A. and Bogorad L. 1973.** Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *Journal of Cell Biology*, 58(2): 419–435. doi: 10.1083/jcb.58.2.419
- Brabakaran A., Venkatesan S., Jayappriyan K.R., Roselin L.S. and Thangaraju N. 2020.** Antioxidant properties of R-phycoerythrin from red alga *Spyridia filamentosa* (Wulfen) Harvey collected on the Pudumadam Coast. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 12(4): 489–498. doi: 10.1166/asem.2020.2542
- Chen H., Qi H. and Xiong P. 2022.** Phycobiliproteins- a family of algae-derived biliproteins: Productions, characterization and pharmaceutical potentials. *Marine Drugs*, 20(7): 1–21 (450). doi: 10.3390/md20070450
- Contreras-Martel C., Matamala A., Bruna C., Poo-Caamano G., Almonacid D., Figueroa M., Martinez-Oyanedel J. and Bunster M. 2007.** The structure at 2Å resolution of phycocyanin from *Gracilaria chilensis* and the energy transfer network in a PC–PC complex. *Biophysical Chemistry*, 125(2–3): 388–396. doi: 10.1016/j.bpc.2006.09.014
- Coulombier N., Jauffrais T. and Lebouvier N. 2021.** Antioxidant compounds from microalgae: A review. *Marine Drugs*, 19(10): 1–22 (549). doi: 10.3390/md19100549
- Duygu D.Y., Udoh A.U., Ozer T.B., Akbulut A., Erkaya I.A., Yildiz K. and Guler D. 2012.** Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identification of *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 and *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützting 1833. *African Journal of Biotechnology*, 11: 3817–3824. doi: 10.5897/ajb11.1863
- Estrada J.P., Bescos P.B. and Del Fresno A.V. 2001.** Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Il Farmaco*, 56(5-7): 497–500. doi: 10.1016/S0014-827X(01)01084-9
- Hsieh-Lo M., Castillo G., Ochoa-Becerra M.A. and Mojica L. 2023.** Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability. *Algal Research*, 69: 1–18 (103068). doi: 10.1016/j.algal.2019.101600
- Jaeschke D.P., Teixeira I.R., Marczak L.D.F. and Mercali G.D. 2021.** Phycocyanin from *Spirulina*: A review of extraction methods and stability. *Food Research International*, 143: 1–14 (110314). doi: 10.1016/j.foodres.2021.110314
- Kannaujiya V.K., Sundaram S. and Sinha R.P. 2017.** Phycobili-

- proteins: Recent Developments and Future Applications. Springer, Singapore. 151P. doi: 10.1007/978-981-10-6460-9
- Kawsar S.M., Fujii Y., Matsumoto R., Yasumitsu H. and Ozeki Y. 2011.** Protein R-phycoerythrin from marine red alga *Amphiroa anceps*: Extraction, purification and characterization. *Phytologia Balcanica*, 17(3): 347–354.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265–275. doi: 10.1016/s0021-9258(19)52451-6
- Mantiri D.M.H., Kepel R.C., Boneka F.B. and Sumilat D.A. 2021.** Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial tests on red algae, *Halymenia durvillaei*, and phycoerythrin pigments. *Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation Bioflux*, 14(6): 3358–3365.
- Mishra S.K., Shrivastav A. and Mishra S. 2011.** Preparation of highly purified C-phycoerythrin from marine cyanobacterium *Pseudanabaena* sp. *Protein Expression and Purification*, 80: 234–238. doi: 10.1016/j.pep.2011.06.016
- Mohamed S.A. 2018.** Biotechnology Research. Retrieved January 1, 2018, Zagazig University, from <http://www.journals.zu.edu.eg>
- Morya S., Kumar Chattu V., Khalid W., Khalid M.Z. and Siddeeg A. 2023.** Potential protein phycoerythrin: An overview on its properties, extraction, and utilization. *International Journal of Food Properties*, 26(2): 3160–3176. doi: 10.1080/10942912.2023.2271686
- Nguyen H.P.T., Morançais M., Deleris P., Fleurence J., Nguyen-Le C.T., Vo K.H. and Dumay J. 2020.** Purification of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Gracilaria gracilis* by anion-exchange chromatography. *Journal of Applied Phycology*, 32: 553–561. doi: 10.1007/s10811-019-01947-x
- Nowruzi B., Anvar S.A. and Ahari H. 2020.** Extraction, purification and evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of phycoerythrin from terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. FA1. *Journal of Microbial World*, 13(2): 138–153.
- Patil G., Chethana S., Sridevi A.S. and Raghavarao K.S.M.S. 2006.** Method to obtain C-phycoerythrin of high purity. *Journal of Chromatography A*, 1127(1-2): 76–78. doi: 10.1016/j.chroma.2006.05.073
- Pena-Medina R.L., Fimbres-Olivarria D., Enriquez-Ocana L.F., Martinez-Cordova L.R., Del-Toro-Sanchez C.L., Lopez-Elias J.A. and Gonzalez-Vega**

- R.I. 2023.** Erythroprotective potential of phycobiliproteins extracted from *Porphyridium cruentum*. *Metabolites*, 13(3): 1–29 (366). doi: 10.3390/metabo13030366
- Prabakaran G., Sampathkumar P., Kavisri M. and Moovendhan M. 2020.** Extraction and characterization of phycocyanin from *Spirulina platensis* and evaluation of its anticancer, antidiabetic and antiinflammatory effect. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153: 256–263. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.009
- Safari R. and Reyhani Poul S. 2023.** Cell culture of *Spirulina* microalgae (*Spirulina platensis*) and comparison the efficiency of enzymatic, ultrasound, freeze-defrosting and mineral solvent methods in extraction of phycocyanin pigment. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(5): 649–661. doi: 10.22067/ifstrj.2023.78800.1204
- Shanmugam A., Sigamani S., Venkatachalam H., Jayaraman J.D. and Ramamurthy D. 2017.** Antibacterial activity of extracted phycocyanin from *Oscillatoria* sp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(3): 62–67. doi: 10.7324/JAPS.2017.70310
- Sitohy M., Osman A., Ghany A.G. A. and Salama A. 2015.** Antibacterial phycocyanin from *Anabaena oryzae* SOS13. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 8(4): 27–36. doi: 10.59295/sum1(171)2024_10
- Sonani R.R., Roszak A.W., Ortmann De Percin Northumberland C., Madamwar D. and Cogdell R.J. 2018.** An improved crystal structure of C-phycoerythrin from the marine cyanobacterium *Phormidium* sp. A09DM. *Photosynthesis Research*, 135(1): 65–78. doi: 10.1007/s11120-017-0443-2
- Soni R.A., Sudhakar K. and Rana R. 2017.** *Spirulina*- From growth to nutritional product: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 69: 157–171. doi: 10.1016/j.tifs.2017.09.010
- Torres P., Santos J.P., Chow F. and Dos Santos D.Y. 2019.** A comprehensive review of traditional uses, bioactivity potential, and chemical diversity of the genus *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta). *Algal Research*, 37: 288–306. doi: 10.1016/j.algal.2018.12.009
- Valand R., Tanna S., Lawson G. and Bengtstrom L. 2020.** A review of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy used in food adulteration and authenticity investigations. *Food Additives and Contaminants (A)*, 37(1): 19–38. doi: 10.1080/19440049.2019.1675909
- Venkatesan S., Pugazhendy K., Sangeetha D., Vasantharaja C., Prabakaran S. and Meenambal**

M. 2012. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic analysis of *Spirulina*. International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive, 3(4): 969–972. doi: 10.31254/pharm.2012.3401

Zarrouk C. 1966. Contribution to the study of cyanobacteria: Influence

of various physical and chemical factors on growth and photosynthesis in *Spirulina maxima*. Ph.D. Thesis, University of Paris, France. 22P. doi: 10.1201/9781482272970-3



Research Paper

Investigation of the functions and antioxidant and antibacterial properties of phycobiliprotein pigments extracted from *Spirulina* and *Gracilaria*

Mohammad Reza Mirzakhah¹, Mahmoud Reza Aghamaali^{2*}, Kourosh Jahanban³, Fatemeh Moradi⁴

DOI: 10.22124/japb.2026.31694.1578

Received: September 2025

Accepted: March 2026

Abstract

Phycobiliproteins, a class of natural bioactive compounds derived from various organisms such as red algae and cyanobacteria, have gained significant attention due to their diverse biological activities. This study investigated the structures of two pigments, phycocyanin and phycoerythrin, their optical spectral characteristics, ability to scavenge free radicals, exert antioxidant and antimicrobial properties. These pigments were extracted from *Spirulina platensis* and *Gracilaria gracilis*. The extraction process involved freeze-thaw cycles followed by ammonium sulfate precipitation and dialysis for partial purification. Spectroscopic analysis revealed maximum absorption for phycocyanin at 620nm and for phycoerythrin at 495 and 545nm. The SDS-PAGE band pattern confirmed the presence of α and β subunits (18–20kDa) and the γ subunit (31kDa). FTIR spectra also indicated the presence of biological functional groups, including amide I at 1644cm⁻¹ and tetrapyrrole structures. The DPPH assay confirmed the antioxidant activity of both pigments. The free radical scavenging percentages were reported as 59% for phycoerythrin and 42% for phycocyanin. The disc diffusion assay demonstrated that both pigments possessed antimicrobial effects against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The highest activity against the Gram-positive bacterium, *S. aureus*, was observed with phycoerythrin, while phycocyanin showed the highest inhibitory effect against the Gram-negative bacterium, *E. coli*. These results demonstrate the high potential of these pigments for pharmaceutical, industrial and food applications.

Key words: *Spirulina*, *Phycobiliprotein*, *Phycoerythrin*, *Phycocyanin*, *Gracilaria*.

1- M.Sc. in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

2- Associate Professor in Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

3- Ph.D. Student in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

4- PhD in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Guilan.

*Corresponding Author: aghamaali@guilan.ac.ir