ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2020;11(2):209-215

Optimization of the Production and Extraction of Phycocyanin from the *Anabaena doliolum* Wet Biomass

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Bahrami A.[1] *MSc,*
Zolghadri S.*[1] *PhD,*
Deilami E.[1] *PhD*

How to cite this article
Bahrami A, Zolghadri S, Deilami E. Optimization of the Production and Extraction of Phycocyanin from the *Anabaena doliolum* Wet Biomass. Modares Journal of Biotechnology. 2020;11(2):209-215.

[1]Biology Department, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

***Correspondence**
Address: Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. Postal code: 7414785318.
Phone: +98 (71) 54273000
Fax: -
zjahromi@ut.ac.ir

Article History
Received: August 11, 2019
Accepted: September 07, 2019
ePublished: June 10, 2020

ABSTRACT

Phycocyanine (PC) belongs to a group of light receptor proteins called phycobiliprotein. All of the phycobiliproteins are multi-chain proteins made up of apoproteins, which are covalently attached to the phycobilins. The present experimental study was carried out on the native strain of *Anabaena doliolum*, isolated from soils and waters of south Iran, Masjed Soleyman. The cyanobacteria were grown and stored in BG11 medium. Then, the amount of phycocyanin produced under different light treatment and the amount of phycocyanin extracted using different ratios of multi-buffer and at two different temperatures were evaluated. The results of this study showed that the highest growth rate is when the sample is exposed to the green light for 3-5 days. The best amount of extraction for distilled water and at a refrigerator temperature with a ratio of 3:1 biomass/solvent is equal to 15±0.03μg/ml. In addition, at the environment temperature, phosphate buffer is a more suitable solvent for extracting phycocyanine at a ratio of one to two with a value of 8±0.05μg/ml. In general, it can be said that the growth rate, pigment production, and optimum extraction conditions for each species are quite different, and the optimal extraction of phycocyanin in a species is also dependent on various factors such as time, temperature, solvent, and the ratio of biomass to solvent.

Keywords Phycobiliprotein; Cyanobacteria; *Anabaena doliolum*

CITATION LINKS

[1] Phototrophic prokaryotes: The ... [2] Life before the rise of ... [3] Algae: An introduction to ... [4] Applications of cyanobacteria in ... [5] Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological ... [6] C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga Spirulina ... [7] Phycobiliproteins as a commodity: Trends in applied research, patents and ... [8] Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and ... [9] Toxicity assessment of phycocyanin-A blue colorant from blue green alga Spirulina ... [10] ffects of CD59 on antitumoral activities of phycocyanin from Spirulina ... [11] Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid ... [12] Growth promoting substances of ... [13] Algal culturing ... [14] Method for isolation and purification of ... [15] Cyanophyta ... [16] PCR primers to amplify 16S rRNA genes from ... [17] Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga Porphyridium ... [18] The response of phycobiliproteins to light qualities in ... [19] lue light enhance the pigment synthesis in cyanobacterium Anabaena ... [20] Enhancement of phycobiliprotein production in nitrogen-fixing ... [21] Acclimation of photosynthetic pigments and photosynthesis of the cyanobacterium ... [22] Influence of environmental factors on accessory pigments ... [23] Blue light and UV-A radiation control the synthesis of mycosporine-like amino acids in Chondrus ... [24] Growth and pigment composition in the red alga Halymenia floresii cultured under ... [25] Studies on growth and phycobilin pigments of the cyanobacterium ... [26] Screening of cyanobacteria for phycobiliproteins and effect of different environmental ... [27] Chromatic adaptation of viable ancient cyanobacteria ... [28] Optimization of phycocyanin extraction from Spirulina platensis ... [29] Comparison of different extraction methods for phycocyanin ... [30] Optimization, purification and characterization of phycocyanin from ... [31] Extraction, purification and characterization of phycocyanin from Oscillatoria quadripunctulata-Isolated from the rocky [32] Phycocyanin from Spirulina sp: Influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction

Copyright© 2020, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

بهینه‌سازی تولید و استخراج فیکوسیانین از توده زیستی مرطوب *آنابنا دولیولوم*

آسیه بهرامی MSc
گروه زیست‌شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران
سمانه ذوالقدری* PhD
گروه زیست‌شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران
احترام دیلمی PhD
گروه زیست‌شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

چکیده
فیکوسیانین (PC) به گروهی از پروتئین‌های گیرنده نور با عنوان فیکوبیلی‌پروتئین‌ها تعلق دارد. تمامی فیکوبیلی‌پروتئین‌ها، پروتئین‌های چندزنجیره تشکیل‌شده از آپوپروتئین‌ها هستند که به‌طور کووالانسی به فیکوبیلین‌ها متصل شده‌اند. مطالعه حاضر به‌صورت تجربی روی سویه بومی *آنابنا دولیولوم* (*Anabaena doliolum*) جداشده از خاک‌ها و آب‌های جنوب ایران، مسجدسلیمان انجام شد. سیانوباکتری‌های مورد مطالعه در محیط کشت BG11 رشد و نگهداری شدند. سپس میزان فیکوسیانین تولیدشده تحت تیمار با نورهای متفاوت و میزان فیکوسیانین استخراج‌یافته با استفاده از نسبت‌های مختلف چند بافر و در دو دمای متفاوت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که بیشترین میزان رشد زمانی است که تیمار نمونه با نور سبز به مدت ۵-۳ روز انجام می‌شود. بهترین میزان استخراج مربوط به آب دو بار تقطیر، در دمای یخچال، با نسبت سه به یک بیومس به حلال برابر با ۰/۰۳±۱۵میکروگرم بر میلی‌لیتر است. همچنین در دمای محیط بافر فسفات حلال مناسب‌تری برای استخراج فیکوسیانین و با نسبت یک به دو با مقدار ۰/۰۵±۸میکروگرم بر میلی‌لیتر است. به‌طور کلی می‌توان گفت میزان رشد، میزان تولید رنگدانه و همچنین شرایط بهینه استخراج برای هر گونه نسبت به سایر گونه‌ها کاملاً متفاوت و استخراج بهینه فیکوسیانین در یک گونه نیز وابسته به عوامل مختلفی از جمله زمان، دما، حلال انتخابی و نسبت بیومس به حلال است.

کلیدواژه‌ها: فیکوبیلی‌پروتئین، سیانوباکتری، *آنابنا دولیولوم*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۱۶
*نویسنده مسئول: zjahromi@ut.ac.ir

مقدمه

سیانوباکتری‌ها (ریزجلبک‌های سبز آبی) گروهی متنوع و گسترده از پروکاریوت‌های فتوسنتزکننده هستند که فتوسنتز اکسیژن را شبیه گیاهان انجام می‌دهند[1]. آنها قدیمی‌ترین اشکال حیات روی زمین هستند که حدود ۲/۴میلیارد سال پیش تکامل یافته‌اند و شامل حدود ۱۵۰ جنس با بیش از ۲۰۰۰ گونه هستند که تنوع قابل ملاحظه‌ای در مورفولوژی، اعم از ساده تک‌سلولی و کلونی‌های رشته‌ای پیچیده با انشعاب و یا بدون انشعاب نشان می‌دهند[2, 3].

سیانوباکتری‌ها دارای کاربردهای بیوتکنولوژیکی متنوعی از جمله کشاورزی، آبزی‌پروری، کنترل آلودگی (زیست‌پالایی)، انرژی زیستی و سوخت‌های زیستی هستند[4]. علاوه بر این، آنها به‌عنوان تولیدکننده طیف گسترده ای از ترکیبات دارویی مهم زیست‌فعال (مانند ترکیبات ضدباکتری، ضدقارچ، ضدویروس، شل‌کننده‌های عضلانی) و محصولات مهم تجاری با ارزش بالا مانند اسیدهای چرب (PUFA) و فیکوبیلی‌پروتئین‌ها شناخته شده‌اند[5].

فیکوبیلی‌پروتئین یکی از انواع پروتئین‌هایی است که در جلبک‌ها و سیانوباکتری‌ها به‌وفور یافت می‌شود. هرچند به نظر می‌رسد این پروتئین‌ها نقش ضروری ندارند، اما در حالتی که سلول در شرایط کمبود نیتروژن قرار می‌گیرد به‌طور انتخابی تخریب و مورد استفاده سلول واقع می‌شوند. بنابراین فیکوبیلی‌پروتئین‌ها نقش ثانویه‌ای به‌عنوان ذخیره‌کننده نیتروژن در شرایط کمبود نیتروژن پیدا می‌کنند[6].

فیکوسیانین C یکی از انواع فیکوبیلی‌پروتئین‌ها است. این رنگدانه آبی‌رنگ، به‌عنوان گیرنده نور با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و فلورسنت در سیانوباکتری‌ها و دو جنس رودوفیت‌ها و کریپتوفیت‌ها یافت می‌شود. فیکوسیانین به بسیاری از سیانوباکتری‌ها رنگ آبی می‌بخشد، به همین دلیل آنها با نام جلبک سبز آبی نیز شناخته می‌شوند. فیکوسیانین به همراه دیگر فیکوبیلی‌پروتئین‌ها، کاربرد فراوانی در صنایع غذایی، آرایشی-بهداشتی، زیست‌فناوری و تشخیص و درمان بیماری‌ها دارند. در حال حاضر ۱۱ کمپانی در حال تولید و فروش فیکوبیلی‌پروتئین‌ها و مشتقات آنها هستند[7]. همچنین فیکوسیانین توسط یک شرکت ژاپنی (شرکت Blue lina) تجاری شده است. این محصول به‌صورت پودر آبی‌رنگ غیرسمی، بدون بو و کمی شیرین است و هنگامی که در آب حل می‌شود، فلورسانس درخشان مایل به قرمز خفیفی دارد. همچنین از pH برابر ۴/۵ تا ۸ و تا دمای ۶۰°C پایدار، ولی مقاومت آن در مقابل نور ضعیف است[8].

از این پروتئین در درمان بیماری‌های کلیه، فشار خون، بیمارهای سیستم عصبی مرکزی و ترکیبات داروهای مراقبت‌های پوستی استفاده می‌شود و اثرات درمانی آن به‌خوبی اثبات شده است [9, 10]. در رابطه با سمیت فیکوسیانین تاکنون تحقیقات زیادی انجام شده که در یکی از این مطالعات اثر غلظت‌های بالا و مختلف فیکوسیانین بر مرگ‌ومیر موش‌های نژاد آلینو بررسی شده است. نتایج این مطالعات نشان می‌دهند که فیکوسیانین در غلظت ۵-۰/۲گرم بر کیلوگرم وزن بدن هیچ نشانه‌ای از مسمومیت یا مرگ‌ومیر را در حیوانات ندارد[9]. همچنین بر پایه برخی مطالعات فیکوسیانین در درمان سرطان‌ها قادر به جایگزین‌شدن با داروهای شیمی‌درمانی با عوارض جانبی شدید است[11]. تاکنون استخراج این پروتئین از طریق روش‌های مختلف و با استفاده از گونه‌های مختلف سیانوباکتری‌ها انجام شده است. مطالعه حاضر نیز با هدف بررسی شرایط بهینه برای تولید فیکوسیانین در شرایط مشابه روی یک سویه بومی سیانوباکتری به نام *آنابنا دولیولوم* (*Anabaena doliolum*) انجام شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه خاک

جمع‌آوری نمونه‌های خاک و آب از جنوب ایران منطقه مسجدسلیمان انجام شد. نمونه‌ها از سطح خاک تا عمق ۲/۵سانتی‌متر از خاک برداشته و برای انتقال به آزمایشگاه درون کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شدند.

آماده‌سازی نمونه خاک

به‌منظور آماده‌سازی خاک بعد از نمونه‌برداری، نمونه‌ها روی یک سطح فاقد آلودگی در ضخامت کم در دمای اتاق خشک و سپس برای تقلیل خاک‌دانه‌ها به اندازه‌های کوچکتر کوبیده و از یک غربال ۲میلی‌متری برای جداکردن سنگریزه‌ها از خاک الک شدند. ۵گرم از خاک‌های صاف‌شده به درون پتری‌های استریل منتقل شدند. محیط کشت BG11 با توجه به بالاتربودن قابلیت رشد و انتشار این جلبک‌ها در محیط کشت به آنها افزوده شد. این ظروف پتری در قفسه‌های اتاق کشت در دمای ۲۵±۲°C قرار گرفتند و به آن روشنایی فلورسنت با شدت ٦میکرومول در انرژی فوتون بر مترمربع در ثانیه ($٦\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$) مناسب تابانده شد[12].

جداسازی و خالص‌سازی

پس از شکل‌گیری کلنی جلبک‌های سبز آبی بعد از یک ماه، در سطح خاک، کلنی‌ها با استفاده از لوپ استریل به سطح محیط کشت جامد منتقل شدند. از آنجا که انتقال زیگزاکی کلنی‌ها در سطح محیط کشت جامد طی چند مرحله واکشت، امکان جداسازی تک کلنی‌های مربوطه به نمونه‌های مختلف را فراهم می‌کند، به‌منظور جداسازی جلبک‌های سبز آبی از کشت زیگزاکی کلنی‌ها استفاده شد[12].

انتقال به محیط کشت جامد

به‌منظور اطمینان از خالص‌بودن نمونه‌ها خالص‌سازی توسط روش پلیت آگار انجام شد[13]. به این ترتیب که ابتدا محیط کشت مایع BG11 تهیه و پس از افزودن آگار و انجام عمل استریل‌کردن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰°C توسط دستگاه اتوکلاو، محیط کشت استریل‌شده به درون پلیت‌های استریل منتقل شد. پس از سردشدن محیط کشت جامد، جلبک‌ها روی آن تلقیح شدند. به این صورت که کلنی‌ها به‌صورت زیگزاک با زاویه ٤٥ درجه روی آگار کشت داده شدند. بعد از مدتی جلبک‌ها روی این محیط کشت جامد رشد کردند. این عمل چندین بار تکرار شد. به این صورت که کلنی‌ها پس از رشد از روی پلیت برداشته و در پلیت‌های دیگر تلقیح شدند[12].

انتقال به محیط کشت مایع

پس از خالص‌سازی و حصول اطمینان از عاری‌بودن کلنی‌ها از باکتری، کلنی‌ها به درون محیط مایع انتقال یافتند. به این منظور ابتدا pH محیط کشت مورد نیاز (که ترکیبات آن با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱گرم توزین شد) برابر ۷ تنظیم شد. محیط کشت به درون ارلن‌های متعددی منتقل شد و ارلن‌ها توسط پنبه و ورق آلومینیوم مسدود و در اتوکلاو استریل شدند. پس از اتمام این مرحله و با سردشدن کامل محیط، تلقیح جلبک‌ها از محیط جامد به مایع انجام شد[14]. ارلن‌ها به اتاق کشت با دمای ۲۵±۲°C تحت نور دایمی ٦میکرومول در انرژی فوتون بر مترمربع در ثانیه قرار داده شدند. هوادهی به کمک پمپ هوا به مدت ۲ ساعت در روز انجام گرفت.

شناسایی مورفولوژیکی

شناسایی نمونه‌های جداسازی‌شده پس از تهیه لام نیمه‌دایمی، با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر انجام شد[15]. به‌منظور شناسایی و بررسی لام‌ها از میکروسکوپ نوری Olympus (Olympus؛ ژاپن) استفاده شد. همچنین با توجه به اینکه سیانوباکتری‌ها در شرایط مختلف، مورفولوژی متفاوتی دارند، برای شناسایی دقیق مورفولوژی علاوه بر میکروسکوپ نوری از میکروسکوپ فلورسانس (Olympus؛ ژاپن) نیز استفاده شد تا شناسایی از دقت عمل بیشتری برخوردار شود. در این بخش، در قدم نخست صفات کلیدی و تعیین‌کننده مربوط به هر جنس مشخص و سپس شناسایی بر مبنای این صفات انجام شد. به این ترتیب مهم‌ترین صفات رویشی و زایشی شکل و رنگ کلنی‌ها، شکل، رنگ، و اندازه تال، شکل، اندازه و رنگ سلول‌های رویشی، هتروسیست‌ها، موقعیت هتروسیست، شکل سلول‌های راسی و وجود یا عدم وجود غلاف موسیلاژی مورد بررسی قرار گرفت.

شناسایی مولکولی

اگرچه شناسایی و رده‌بندی جلبک‌های سبز آبی هنوز با تکیه بر خصوصیات ساده مورفولوژیکی امکان‌پذیر است، اما باید در نظر داشت که در دهه‌های اخیر اطلاعات جدید حاصل از مطالعات فراساختاری و به‌خصوص بیولوژی مولکولی نقش بسیار مهمی در تحول رده‌بندی این گروه از جلبک‌ها ایفا کرده است. به همین منظور بخشی از روند شناسایی در این مطالعه بر پایه شناسایی مولکولی قرارداده شده است. برای استخراج DNA از کیت استخراج DNA ژنومی Ko512 (فرمنتاز؛ ایالات متحده) استفاده شد. بعد از استخراج DNA، از روش ذکرشده در مطالعه *نیبل* و همکاران برای انجام PCR استفاده شد[16]. پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ارایه شده است. محصول PCR برای تعیین توالی (ژن فناوران؛ ایران) ارسال شد. پس از تعیین توالی ژنی ناحیه مورد نظر، توالی ژنی حاصل با انجام عملیات بلاست (BLAST) با توالی ژن‌های ثبت‌شده در بانک‌های جهانی ژن مقایسه و درصد تشابه ژنی با نمونه‌های موجود در بانک ژن تعیین شد. با این روش صحت شناسایی نمونه‌های مورد نظر در سطح جنس تایید شد.

جدول ۱) توالی پرایمرهای مخصوص سیانوباکتری *آنابنا دولیولوم*

پرایمر	توالی (´۵ به ´۳)
رفت (CYA106F)	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA
برگشت (CYA781R)	GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT

تیماردهی با نورهای مختلف

نمونه بعد از پوترکردن در چهار ارلن کوچک به مقدار مساوی ریخته شد. سپس ارلن‌ها در زیر نورهای سفید، آبی، سبز و قرمز قرار گرفتند. این کار به مدت ۹ روز انجام شد و به‌منظور اندازه‌گیری میزان رشد، روزهای اول، سوم، پنجم، هفتم و نهم میزان جذب آنها در ۷۵۰نانومتر در نورهای مختلف اندازه‌گیری شد.

استخراج فیکوسیانین با استفاده از نسبت‌های متفاوت بافرها و حلال‌های مختلف در دو دمای محیط و یخچال

روش استخراج فیکوسیانین براساس مطالعات *برمجو* وهمکاران[17] انجام شد. برای انجام مراحل استخراج ابتدا نمونه به مدت ۴ روز زیر نور سبز قرار گرفت. تعداد روز و نور مورد نظر از بررسی میزان تولید فیکوسیانین در نورها و روزهای مختلف به دست آمد. سپس استخراج مطابق روش زیر انجام شد:

به ۵-۳میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی که محیط کشت آن از طریق سانتریفیوژ با سرعت ۱۴۰۰۰دور در دقیقه در مدت زمان ۵ دقیقه جدا شده بود، ۱۵۰میکرولیتر گلیسرول اضافه شد و در یخچال به مدت سه تا چهار روز قرار گرفت. پس از آن برای شکسته‌شدن سلول‌ها به آن ۱۳۵۰میکرولیتر آب و نسبت‌های مختلف (۱، ۲، ۳، ۱/۲ و ۱/۳) بافرهای آب مقطر، سدیم‌فسفات (pH= ۷)، سدیم‌استات (pH= ۵)، سدیم‌کلرید ۰/۱۵مولار و کلسیم‌کلرید (۱۰گرم بر لیتر) افزوده و این محلول هم به مدت دو روز در شرایط تاریکی و سرما و تاریکی و محیط قرار داده شد. با استفاده از سانتریفیوژ محلول رویی جدا و طیف جذبی نمونه مشخص شد. همچنین از طریق رابطه زیر میزان فیکوسیانین بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد[17]:

$$\text{C-PC (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)} = \frac{(OD620 - 0.7OD650)}{7.38}$$

C-PC غلظت فیکوسیانین، OD_{620} چگالی نوری نمونه در طول موج ۶۲۰نانومتر و OD_{650} چگالی نوری نمونه در طول موج ۶۵۰نانومتر است.

یافته‌ها

شناسایی مورفولوژیکی *آنابنا دولیولوم*

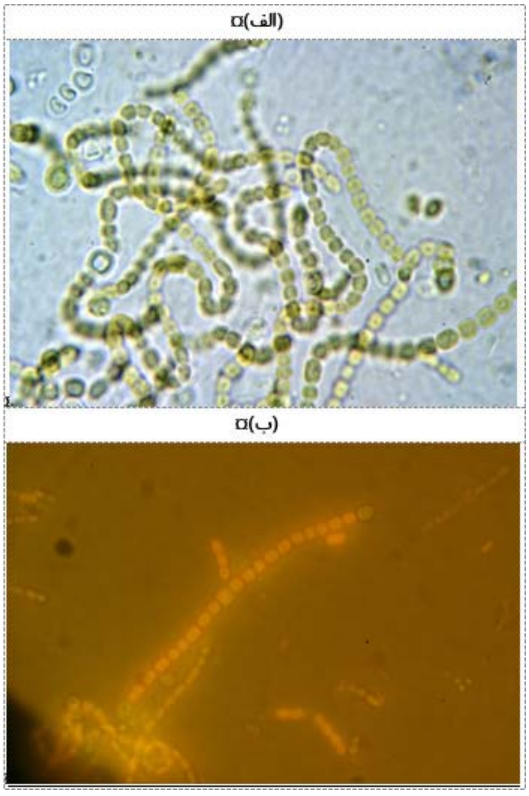
همان‌طور که در شکل ۱- الف مشاهده می‌شود نمونه *آنابنا دولیولوم* دارای اجتماعات کوپه‌ای و قهوه‌ای‌رنگ است که این کلنی‌ها به‌صورت مجزا از هم قرار دارند و به رنگ سبز و قهوه‌ای دیده می‌شوند. همچنین لایه موسیلاژی در اطراف کلنی‌ها مشاهده شد (شکل ۱- ب). سلول‌های رویشی در این سویه مربع-مستطیل‌شکل بودند. این نمونه دارای سلول‌های تخصص‌یافته هتروسیست بود که به‌صورت بیضوی یا مدور با موقعیت میانی یا راسی مشاهده شدند.

شناسایی مولکولی

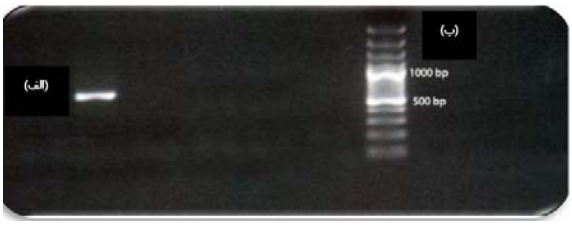
محصول PCR نمونه *آنابنا دولیولوم* روی ژل آگارز الکتروفورز و پس از تایید اولیه توالی‌یابی انجام شد (شکل ۲). نتایج حاصل از توالی‌یابی *16s* rRNA موید صحت نتایج مورفولوژیک در شناسایی جنس‌های مورد آزمایش بود. مقایسه توالی ژنی نمونه بررسی‌شده با توالی ژن‌های ثبت‌شده در بانک جهانی ژنی NCBI به واسطه انجام عملیات BLAST نشان‌دهنده وجود بالاترین سطح تشابه با *آنابنا دولیولوم* به میزان ۹۷% بود (شکل ۳).

بررسی میزان رشد

برای اندازه‌گیری میزان رشد، نمونه‌های *آنابنا دولیولوم* در زیر نورهای سفید، آبی، سبز و قرمز قرار داده شدند و در روزهای اول، سوم، پنجم، هفتم و نهم میزان جذب آنها در ۷۵۰نانومتر در نورهای مختلف اندازه‌گیری شد. براساس آنالیز واریانس اثر متقابل "نور" و "روز" برای نمونه *آنابنا دولیولوم* در سطح ۵% معنی‌دار است. در فاصله زمانی بین روزهای سوم تا پنجم و در نور سبز بیشترین میزان رشد برای این نمونه مشاهده شد. همچنین در همین شرایط (روز سوم تا پنجم و تیمار با نور سبز) بالاترین غلظت فیکوسیانین به دست آمد (نمودار ۱).

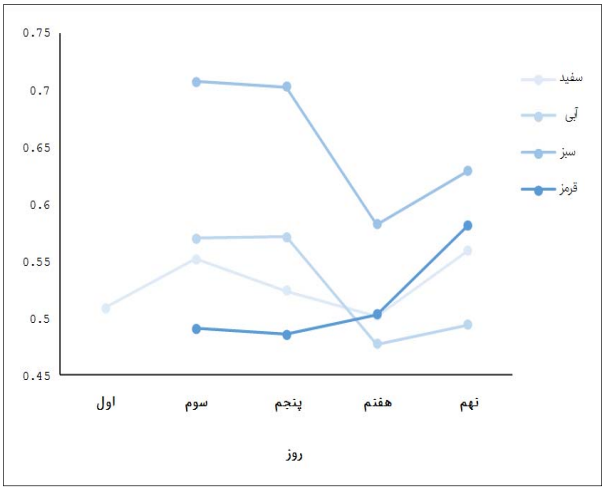


شکل ۱) الف) تصویر میکروسکوپ نوری؛ ب) تصویر میکروسکوپ فلورسانس *آنابنا دولیولوم*



شکل ۲) الف) الکتروفورز محصول PCR؛ ب) مارکر ۱۰۰جفت‌بازی (فرمنتاز؛ ایالات متحده)

شکل ۳) توالی مربوط به DNA استخراج‌شده از نمونه *آنابنا دولیولوم*



نمودار ۱) اثر متقابل "نور" و "روز" بر میزان رشد *آنابنا دولیولوم* در محیط کشت BG11 در دمای ۲۵±۲°C تحت نور دایمی ٦میکرومول در انرژی فوتون بر مترمربع در ثانیه؛ محور عمودی میانگین تخمین حاشیه‌ای از میزان رشد سیانوباکتری‌ها است که براساس جذب آنها در طول موج ۷۵۰نانومتر به دست آمده است.

استخراج فیکوسیانین

با توجه به نتایج حاصل از مرحله قبل، مشخص شد که بهترین میزان رشد *آنابنا دولیولوم* و بیشترین میزان تولید فیکوسیانین در شرایطی حاصل می‌شود که نمونه‌ها به مدت حداقل ۴-۳ روز تحت تیمار با نور سبز قرار گیرند. بنابراین پس از این مرحله، استخراج فیکوسیانین در دو دمای متفاوت محیط و ۴°C و با استفاده از نسبت‌های متفاوت پنج حلال مختلف انجام شد. مقدار بیومس در این روش ثابت است و مقدار حلال در هر نسبت تغییر می‌کند. به این ترتیب که در نسبت ۱ به ۱ مقدار حلال ۱۰۰میکرولیتر در نسبت ۲ به ۱ مقدار حلال ۲۰۰ و در نسبت ۳ به ۱ مقدار حلال ۳۰۰میکرولیتر است. همچنین در نسبت‌های ۱ به ۲ و ۱ به ۳ به ترتیب ۵۰میکرولیتر و ۳۳/۳میکرولیتر حلال مورد استفاده قرار گرفت. بهترین میزان استخراج مربوط به آب دو بار تقطیر و در دمای یخچال و با نسبت سه به یک حلال به بیومس و کمترین میزان استخراج مربوط به نسبت یک به یک حلال‌های مختلف و در هر دو دما است (جدول‌های ۲ و ۳). همچنین در دمای محیط بافر فسفات حلال مناسب‌تری برای استخراج فیکوسیانین است.

جدول ۲) غلظت فیکوسیانین استخراج‌شده از *آنابنا دولیولوم* بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر با حلال‌های مختلف در نسبت‌های مختلف بیومس به حلال در دمای صفر درجه سانتیگراد

بیومس	نسبت حلال به حلال				
	۱:۱	۲:۱	۳:۱	۱:۲	۱:۳
آب دوبار تقطیر	۳±۰/۰۳	۳±۰/۰۱	۱۵±۰/۰۳	۱۰±۰/۰۳	۵±۰/۰۳
محلول کلریدسدیم	٤±۰/۰۳	۸±۰/۰۴	٤±۰/۰۲	۳±۰/۰۵	٤±۰/۰۲
محلول کلریدکلسیم	۵±۰/۰۱	۷±۰/۰۱	۷±۰/۰۳	۹±۰/۰۱	۳±۰/۰۳
بافر فسفات‌سدیم	۵±۰/۰۸	٤±۰/۰۲	٤±۰/۰۶	۷±۰/۰۷	۵±۰/۰۵
بافر استات‌سدیم	۵±۰/۰۱	٤±۰/۰۳	٤±۰/۰۳	۵±۰/۰۳	۳±۰/۰۱

جدول ۳) غلظت فیکوسیانین استخراج‌شده از *آنابنا دولیولوم* بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر با حلال‌های مختلف در نسبت‌های مختلف بیومس به حلال در دمای محیط

بیومس	نسبت حلال به حلال				
	۱:۱	۲:۱	۳:۱	۱:۲	۱:۳
آب دوبار تقطیر	۳±۰/۰۳	٤±۰/۰۸	۲±۰/۰۵	۳±۰/۰۳	۵±۰/۰۸
کلریدسدیم	۳±۰/۰۲	۴±۰/۰۵	۴±۰/۰۴	۳±۰/۰۱	۳±۰/۰۵
کلریدکلسیم	۳±۰/۰۵	۴±۰/۰۸	۵±۰/۰۶	۴±۰/۰۳	۴±۰/۰۳
بافر فسفات‌سدیم	۵±۰/۰۸	۷±۰/۰۳	۷±۰/۰۱	۸±۰/۰۵	۷±۰/۰۸
بافر استات‌سدیم	۴±۰/۰۱	۳±۰/۰۳	۵±۰/۰۲	۵±۰/۰۴	۵±۰/۰۱

بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه حاضر، نشان می‌دهند که نمونه *آنابنا دولیولوم* تحت تیمار با نور سبز بهترین میزان رشد و تولید فیکوسیانین را دارد. ضمن اینکه براساس آنالیز واریانس نیز تنها نور سبز با سایر نورها تفاوت معنی‌دار دارد و از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین سایر نورها از نظر میزان رشد وجود ندارد.

در مطالعه *اوجیت* و همکاران روی گونه *آنابنا سیرسینالیس*، غلظت فیکوسیانین در نمونه تحت تیمار با نور سفید به‌طور معنی‌داری بیشتر از سه نور دیگر طی دوره مطالعه بود[18]. در حالی که یافته‌های *ویجایا* و *اناند* نشان داد که سنتز رنگدانه در سیانوباکتریوم *آنابنا امبیگوآ* در نور آبی افزایش یافته است[19]. *رودریگز* و همکاران نشان دادند که نور سفید برای آنابنا و نور سبز برای نوستوک، امیدوارکننده‌ترین تیمارها برای سنتز فیکوبیلی‌پروتئین‌ها هستند[20]. همچنین براساس گزارش‌ها، نور قرمز باعث تولید فیکوبیلی‌پروتئین بیشتر در *Nostoc* sp. Strain UAM 206 و *Nostoc muscorum* می‌شود[21, 22]. در حالی که تیمار با نور آبی در جلبک قرمز *Chondrus crispus* و *Porphyra leucosticta* تاثیر مثبتی بر تولید فیکوبیلی‌پروتئین‌ها دارد[23, 24]. همچنین زمانی که *Westiellopsis iyengarii* تحت تاثیر کیفیت‌های مختلف نور قرار گرفت، بیشترین غلظت رنگدانه‌های آلوفیکوسیانین، فیکوسیانین و فیکواریترین در نور قرمز به دست آمد[25].

در مطالعه حاضر نیز نور سبز تیمار مناسب‌تری برای رشد *آنابنا*

دولیولوم بود. وجود این اختلافات می‌تواند به دلایل متفاوتی باشد. به‌عنوان مثال تفاوت در گونه‌ها، سن فیزیولوژیکی، کیفیت نور و میزان سازگاری کروماتیک و القای سنتز فیکوبیلی‌پروتئین‌ها از عوامل موثر در تولید رنگدانه و رشد هستند[26].

سازگاری کروماتیک سیانوباکتری‌ها شامل تنظیم سنتز فیکوبیلین‌های اصلی سلولی، C- فیکواریترین و فیکوسیانین توسط نور قرمز و سبز است[27]. به این ترتیب می‌توان گفت که بهترین شرایط برای تولید رنگدانه برای هر گونه با سازگاری‌های زیست‌محیطی مختلف می‌تواند متفاوت باشد.

به علاوه نتایج این مطالعه برای استخراج بهینه فیکوسیانین نشان داد که نوع حلال انتخابی برای استخراج دما و نسبت بیومس به حلال می‌تواند بر میزان استخراج اثرگذار باشد. به‌عنوان مثال آب مقطر در نسبت سه به یک و در دمای یخچال بیشترین میزان استخراج فیکوسیانین را نشان داد، در حالی که در همین نسبت و در دمای محیط تغییر چشمگیری در میزان استخراج توسط این حلال مشاهده شد. همچنین برای بهینه‌سازی شرایط استخراج، نسبت بیومس به حلال و دما بستگی به نوع حلال انتخابی دارد. در مطالعه *سیلویرا* و همکاران روی *اسپیرولینا پلاتنسیس* گزارش شد که خلوص عصاره به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر دما قرار دارد. درجه حرارت بالا سبب کاهش خلوص می‌شود، زیرا استخراج پروتئین‌های دیگر را تسهیل می‌کند[28]. در مطالعه *سیواسانکاری* و همکاران روی *اسپیرولینا پلاتنسیس*، سدیم‌فسفات با pH برابر ۷، بازده نسبتاً خوبی را برای استخراج فیکوسیانین ۰/۲۵میلی‌گرم بر گرم نشان داد[29]. براساس نتایج، غلظت فیکوسیانین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بعد از ۲٤ ساعت ۰/۱۷ و بعد از ٤۸ ساعت ۰/۲۵ و بعد از ۷۲ ساعت ۰/۲۵ گزارش شد. همچنین، در پژوهش *ساران* و همکاران روی *اسپیرولینا پلاتنسیس* از بافرهای مختلفی برای بهینه‌سازی و خالص‌سازی فیکوسیانین استفاده شده است که از میان آنها سدیم‌فسفات با pH برابر ۷، بالاترین بازده را نشان داد، در حالی که آب دو بار تقطیر پایین‌ترین بازده را داشت[30]. *سانی* و همکاران نیز بافر سدیم‌فسفات با pH= ۷ را برای استخراج فیکوسیانین در اسپیرولینا مناسب دیدند[31]. در مطالعه *هملاتا* و *فاتما* روی گونه دیگری از آنابنا، در مقایسه بافرهای مختلف، بافر فسفات‌سدیم به‌عنوان بهترین بافر برای استخراج انتخاب شد، در حالی که در همین مطالعه آب مقطر منجر به استخراج کمترین میزان فیکوسیانین (۰/۱۷±۸۳/٦میلی‌گرم بر گرم) شد[26]. *ساردا* و همکاران نیز کمترین میزان استخراج فیکوسیانین از اسپرولینا را با آب مقطر گزارش کردند[32]. پایین‌ترین عملکرد در آب مقطر ممکن است ناشی از عدم توانایی آن در لیز دیواره سلولی و کاهش نفوذ رنگدانه فیکوبیلی‌پروتئین باشد. نتایج این مطالعات با یافته‌های مطالعه حاضر در دمای محیط همخوانی دارد. هر چند در دمای یخچال نتایج حاصل از این مطالعه کاملاً متفاوت با دمای محیط است و آب مقطر در دمای یخچال بهترین میزان استخراج را نشان می‌دهد.

به‌طور کلی میزان رشد، میزان تولید رنگدانه و همچنین شرایط بهینه استخراج برای هر گونه نسبت به سایر گونه‌ها کاملاً متفاوت است. همچنین استخراج بهینه فیکوسیانین در یک گونه نیز وابسته به عوامل مختلفی از جمله زمان، دما، حلال انتخابی و نسبت بیومس به حلال است.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت علمی دانشگاه آزاد جهرم و کارشناسان آزمایشگاه تحصیلات تکمیلی ابراز می‌کنند.

تاییدیه اخلاقی: مطالعه حاضر توسط همه نویسندگان تایید شده است. همچنین این مطالعه در مجله دیگری منتشر نشده و به‌صورت همزمان برای مجله دیگری نیز ارسال نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافع مالی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: آسیه بهرامی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (٤۰%)؛ سمانه ذوالقدری (نویسنده دوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (٤۰%)؛ احترام دیلمی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۲۰%)

منابع مالی: منابع مالی از محل اعتبار پژوهشی پایان‌نامه نویسنده اول تامین شده است.

منابع

1- Stanier RY, Cohen-Bazire G. Phototrophic prokaryotes: The cyanobacteria. Annu Rev Microbiol. 1977;31(1):225-74.
2- Fischer WW. Life before the rise of oxygen. Nature. 2008;455(7216):1051-2.
3- Hoek Ch, Van Den HC, Mann D, Jahns HM, Jahns M. Algae: An introduction to phycology. Cambridge: Cambridge University Press; 1995.
4- Abed RM, Dobretsov S, Sudesh K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. J Appl Microbiol. 2009;106(1):1-12.
5- Saini DK, Pabbi S, Shukla P. Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological approaches. Food Chem Toxicol. 2018;120:616-24.
6- Boussiba S, Richmond AE. C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga Spirulina platensis. Arch Microbiol. 1980;125(1-2):143-7.
7- Sekar S, Chandramohan M. Phycobiliproteins as a commodity: Trends in applied research, patents and commercialization. J Appl Phycol. 2008;20(2):113-36.
8- Vonshak A. Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology. Boca Raton: CRC Press; 2002.
9- Naidu KA, Sarada R, Manoj G, Khan MY, Swamy MM, Viswanatha S, et al. Toxicity assessment of phycocyanin-A blue colorant from blue green alga Spirulina platensis. Food Biotechnol. 1999;13(1):51-66.
10- Li B, Zhang X, Gao M, Chu X. Effects of CD59 on antitumoral activities of phycocyanin from Spirulina platensis. Biomed Pharmacother. 2005;59(10):551-60.
11- Subhashini J, Mahipal SV, Reddy MC, Reddy MM, Rachamallu A, Reddanna P. Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. Biochem Pharmacol. 2004;68(3):453-62.
12- Misra S, Kaushik BD. Growth promoting substances

24- Godínez-Ortega JL, Snoeijs P, Robledo D, Freile-Pelegrín Y, Pedersén M. Growth and pigment composition in the red alga Halymenia floresii cultured under different light qualities. J Appl Phycol. 2008;20(3):253-60.
25- Ashokkumar P, Anand N. Studies on growth and phycobilin pigments of the cyanobacterium Westiellopsis iyengarii. Int J Biotechnol Biochem. 2010;6(2):315-24.
26- Hemlata FT, Fatma T. Screening of cyanobacteria for phycobiliproteins and effect of different environmental stress on its yield. Bull Environ Contam Toxicol. 2009;83(4):509-15.
27- Erokhina LG, Spirina EV, Shatilovich AV, Gilichinskii DA. Chromatic adaptation of viable ancient cyanobacteria from arctic permafrost. Microbiology. 2000;69(6):730-1.
28- Silveira ST, Burkert JD, Costa JA, Burkert CA, Kalil SJ. Optimization of phycocyanin extraction from Spirulina platensis using factorial design. Bioresour Technol. 2007;98(8):1629-34.
29- Sivasankari S, Ravindran D. Comparison of different extraction methods for phycocyanin extraction and yield from Spirulina platensis. Int J Curr Microbiol Appl Sci. 2014;3(8):904-9.
30- Saran S, Puri N, Jasuja ND, Kumar M, Sharma G. Optimization, purification and characterization of phycocyanin from Spirulina platensis. Int J Appl Pure Sci Ag. 2016;2:15-21.
31- 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):2017-23.
32- 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.
of cyanobacteria. I: Vitamins and their influence on rice plant. Proc Indian Natl Sci Acad. 1989;55(4):295-300.
13- Andersen RA, editor. Algal culturing techniques. Amsterdam: Elsevier; 2005.
14- Ferris MJ, Hirsch CF. Method for isolation and purification of cyanobacteria. Appl Environ Microbiol. 1991;57(5):1448-52.
15- Desikachary TV. Cyanophyta ICAR. New Delhi: Indian Council of Agricultural Research; 1959.
16- Nübel U, Garcia-Pichel F, Muyzer G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. Appl Environ Microbiol. 1997;63(8):3327-32.
17- Román RB, Alvarez-Pez JM, Fernández FA, Grima EM. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga Porphyridium cruentum. J Biotechnol. 2002;93(1):73-85.
18- Ojit SK, Indrama T, Gunapati O, Avijeet SO, Subhalaxmi SA, Silvia Ch, et al. The response of phycobiliproteins to light qualities in Anabaena circinalis. J Appl Biol Biotechnol. 2015;3:1-6.
19- Vijaya V, Anand N. Blue light enhance the pigment synthesis in cyanobacterium Anabaena ambigua rao (nostacales). ARPN J. Agricul. Biol. Sci. 2009;4(3):36-43.
20- Rodríguez H, Rivas J, Guerrero MG, Losada M. Enhancement of phycobiliprotein production in nitrogen-fixing cyanobacteria. J Biotechnol. 1991;20(3):263-70.
21- 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):1455-61.
22- Kozhummal R, Kaushik B. Influence of environmental factors on accessory pigments of Nostoc muscorum. Indian J Microbiol. 2005;45(1):67-9.
23- Franklin LA, Kräbs G, Kuhlenkamp R. Blue light and UV-A radiation control the synthesis of mycosporine-like amino acids in Chondrus crispus (Florideophyceae). J Phycol. 2001;37(2):257-70.