

مقاله پژوهشی

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

محمد رضا میرزاخواه<sup>۱</sup>، محمود رضا آقامعالی<sup>۲\*</sup>، کورش جهانبان<sup>۳</sup>، فاطمه مرادی<sup>۴</sup>

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 ارگانیزم‌ها مانند جلبک‌های قرمز و سیانوباکتری‌ها، به دلیل فعالیت‌های زیستی متنوع مورد توجه قرار گرفته‌اند. این پژوهش به بررسی ساختارهای این دو رنگدانه، ویژگی‌های طیف نوری و توانایی آن‌ها در مهار رادیکال آزاد و ایجاد خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی می‌پردازد. این رنگدانه‌ها به ترتیب از جلبک *Spirulina platensis* و *Gracilaria gracilis* استخراج شدند. فرآیند استخراج شامل چرخه‌های انجماد-ذوب و سپس رسوب با سولفات آمونیوم و دیالیز، جهت تخلیص نسبی بود. آنالیز طیف‌سنجی نشان داد بیشینه جذب برای فیکوسیانین در طول موج ۶۲۰ نانومتر و برای فیکواریتترین در طول موج ۴۹۵ و ۵۴۵ نانومتر است. الگوی باندهای SDS-PAGE حضور زیر واحدهای  $\alpha$  و  $\beta$  (۱۸-۲۰ کیلودالتون) و  $\gamma$  (۳۱ کیلودالتون) را تأیید کرد. طیف FTIR نیز حضور گروه‌های عاملی زیستی از جمله آمید I ( $1644 \text{ cm}^{-1}$ ) و ساختارهای تتراپیرولی را نشان داد. آزمون DPPH، فعالیت آنتی‌اکسیدانی هر دو رنگدانه را تأیید کرد. درصد مهار رادیکال آزاد برای فیکواریتترین و فیکوسیانین به ترتیب ۵۹٪ و ۴۲٪ گزارش شد. آزمون دیسک‌دیفیوژن نشان داد که هر دو رنگدانه دارای اثر ضد میکروبی علیه *S. aureus* و *E. coli* بودند. بیشترین فعالیت علیه باکتری‌های گرم مثبت توسط فیکواریتین بود. و در میان باکتری‌های گرم منفی، فیکوسیانین بیشترین اثر مهار را داشت. این نتایج، پتانسیل بالای این رنگدانه‌ها را برای کاربردهای دارویی، صنعتی و غذایی نشان می‌دهد.

**واژگان کلیدی:** آنتی‌اکسیدان، اسپیرولینا، فیکوبیلی پروتئین، فیکواریتترین، فیکوسیانین، گراسیلاریا.

۱- دانشجوی کارشناسی 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](mailto:aghamaali@guilan.ac.ir)

## مقدمه

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 اش می تواند برای کاربردهای درمانی مورد استفاده قرار گیرد. در ترکیب شیمیایی آن، بین ۶۰ تا ۷۰ درصد پروتئین، انواع کربوهیدرات ها و ویتامین هایی مثل پروویتامین A، ویتامین های C و E وجود دارد. اسیدهای چرب ضروری مانند گاما-لینولنیک اسید (GLA) و رنگدانه هایی نظیر کلروفیل A، فیکوسیانین و کاروتن ها 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 سوء تغذیه در کشورهای در حال توسعه تبدیل کرده و توجه گسترده ای از سوی محققان و صنایع به عنوان منبعی نویدبخش در تولید مکمل های تغذیه ای و دارویی را به خود جلب کرده است. گراسیلاریا متعلق به شاخه جلبک های قرمز خانواده Gracilariaceae می باشد. این جلبک در آب های شور و عمدتاً در مناطق ساحلی دریاها و اقیانوس ها و به طور گسترده ای در اقیانوس های گرمسیری از جمله سواحل شرقی

ارگانسیم های دریایی منبعی گسترده و ارزشمند از ترکیبات زیست فعال با کاربردهای بالقوه فراوان در حوزه های مختلف محسوب می شوند. امروزه ترکیبات طبیعی، به ویژه ترکیبات استخراج شده از منابع دریایی، به دلیل تنوع ساختاری و عملکردی، توجه گسترده ای را در حوزه های زیست پزشکی و صنایع دارویی به خود جلب کرده اند. از جمله این منابع جلبک های دریایی هستند که در سال های اخیر، تمایل به بهره برداری از ترکیبات زیست فعال مشتق شده از آن ها رشد چشم گیری یافته و جایگاه ویژه ای در صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی و مکمل های تغذیه ای پیدا کرده است. یکی از مهم ترین دلایل بررسی این جلبک ها و استفاده از این ترکیبات طبیعی به عنوان جایگزینی ایمن تر و مؤثرتر برای نمونه های سنتتیک، ویژگی هایی همچون تنوع ژنتیکی بالا، بازدهی فتوسنتزی مطلوب، رشد سریع و ظرفیت مناسب آن ها برای کاربردهای زیست فناوری می باشد (Coulombier et al., 2021). اسپیرولینا یک سیانوباکتر یا فتوسنتزکننده پلانکتونیک (Planktonic) است، که جمعیت های بزرگی را در آب های گرمسیری و نیمه گرمسیری تشکیل می دهد.

است 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 نظیر آلکالوئیدها، پلی‌ساکاریدهایی همچون آگران، کاراگینان و آلژینات، و تریپنوئیدها می‌باشند (Torres et al., 2019).

آسیا و خاورمیانه یافت می‌شود. گونه *Gracilaria gracilis* یکی از مهم‌ترین جلبک‌های قرمز شناخته شده است که رشد آن در آب‌های گرمسیری رایج تر است. همچنین به دلیل نرخ رشد سریع، توانایی تکثیر رویشی آسان، مقاومت مناسب در برابر نوسانات شوری، دما و کیفیت بالای آگار تولیدی، به یکی از گزینه‌های مطلوب برای مطالعات گسترده در حوزه‌های مختلف درمانی و صنعتی تبدیل شده



a) Spirulina



b) Gracilaria

شکل ۱. جلبک‌های (a) اسپیرولینا و (b) گراسیلاریا جمع‌آوری شده از نواحی ساحلی دریای خزر.

که در سیانوباکتری‌ها، جلبک‌های قرمز و کریپتومونادها وجود دارند. این پروتئین‌ها نقشی اساسی در جذب نور خورشید جهت فرایند فتوسنتز را ایفا می‌کنند (Kannaujiya et al., 2017). خواص طیفی جذب فیکوبیلی پروتئین‌ها عمدتاً توسط کروموفورهای متصل به

یکی از مهم‌ترین ترکیبات زیست‌فعال در این جلبک‌ها، فیکوبیلی پروتئین‌ها هستند؛ فیکوبیلی پروتئین‌ها به عنوان یک خانواده از کمپلکس‌های پروتئینی فرعی در سیستم‌های جمع‌آوری نور که گروه‌های تتراپیرول خطی باز که شامل ۴ حلقه پیرول است، شناخته می‌شوند،

نگرانی‌ها نسبت به مصرف گسترده افزودنی‌های شیمیایی سنتتیک در صنایع غذایی و ارتباط آن با بروز بیماری‌های مزمن نظیر سرطان، نیاز به جایگزین‌های طبیعی، ایمن و مؤثر بیش از پیش احساس می‌شود. براساس مطالعات گذشته، جلبک‌های دریایی مانند اسپیرولینا و گراسیلاریا، به دلیل دارا بودن 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 حاصل از منابع بومی و ارزیابی ویژگی‌های ساختاری و فعالیت‌های زیستی آن‌ها می‌باشد. با توجه به محدود بودن مطالعات انجام‌شده 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

آن‌ها تعیین می‌شود، که براساس این خواص به چهار گروه: فیکوسیانیوبیلین، فیکواریتروبیلین، فیکواریتروبیلین و فیکوویولوبیلین تقسیم می‌شوند (Morya et al., 2023). این رنگدانه‌ها در یک زنجیره انتقال انرژی به صورت آبشاری از فیکواریترین به فیکوسیانیین و سپس به آلفوفیکوسیانیین 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 ( $\alpha$ ) و بتا ( $\beta$ ) تشکیل شده‌اند که هرکدام حاوی کروموفور بیلین بوده و به ترتیب وزن‌های مولکولی ۱۲ تا ۱۹ و ۱۴ تا ۲۱ کیلوالتون دارند. هر زیرواحد  $\alpha$  و  $\beta$  از ۱۶۰ تا ۱۸۰ اسید آمینه تشکیل شده و به‌طور معمول ساختارهای پایدار تراپمر یا واحدهای عملکردی هگزامری به صورت اشکال 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 سنتتیک است که خطر افزایش ابتلا به بیماری‌هایی نظیر سرطان را بدنبال دارد. با توجه به افزایش

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 گردید. برداشت بیومس از طریق سانتریفیوژ با دور ۷۰۰۰ rpm 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- و ۴ ساعت در دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد) (Zarrouk., 1966). جلبک *G. gracilis* از بسترهای سنگی سواحل جنوبی دریای خزر جمع‌آوری گردید. 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 املاح و تنظیم pH نمونه، ابتدا ۱۰ گرم از پودر خشک *S. platensis* و *G. gracilis* توسط ترازو ((AND, 200GF (0.001), ژاپن) وزن شد. در مرحله بعد با آب مقطر استریل شستشو داده شدند، تا pH به محدوده ۷/۰ تا ۸/۰ برسد. زیست‌توده حاصل، در حضور بافر فسفات ۵۰

تحقیقات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی باز می‌کند. همچنین علاوه بر محدود بودن مطالعات ساختاری بر روی فیکواریترین، این تحقیق به طور خاص به شناسایی ساختار این رنگدانه از طریق طیف‌سنجی FTIR پرداخته است. هدف اصلی این تحقیق، فراهم‌سازی درک دقیق‌تری از خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی فیکوسیانیین و فیکواریترین استخراج‌شده از منابع بومی، به منظور ارزیابی قابلیت کاربرد آن‌ها در صنایع غذایی، دارویی و مکمل‌های تغذیه‌ای به عنوان ترکیبات زیست‌فعال طبیعی می‌باشد. نتایج این مطالعه می‌تواند، زمینه‌ساز بهره‌برداری هدفمندتر از این رنگدانه‌ها به عنوان جایگزین‌های بالقوه افزودنی‌های سنتزی گردد.

#### مواد و روش‌ها

##### جمع‌آوری و تهیه زیست‌توده جلبک *G.*

##### *S. platensis* و *gracilis*

ریز جلبک *S. platensis* از شرکت گیل فوکا (شهر رشت، استان گیلان) تهیه شد. منشأ این ریز جلبک، 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  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد انجام شد.

### خالص‌سازی رنگدانه‌ها

جهت خالص‌سازی این رنگدانه‌ها پس از سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه به محلول حاصل سولفات آمونیوم ۵۰٪ اضافه و در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب انکوبه شد. رسوب به دست آمده، پس از سانتریفوژ در ۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با بافر فسفات در pH برابر با ۶/۸ دیالیز شد (Bennett et al., 1973).

### تعیین مقدار کمی رنگدانه‌های فیکوبیلی پروتئینی

جهت اندازه‌گیری غلظت رنگدانه‌ها جذب فیکوسیانین و فیکواریترین جدا شده از جلبک‌ها در طول موج‌های (۶۲۰، ۶۵۲ و ۵۶۲) نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر در سه تکرار خوانده شد و با استفاده از فرمول جدول ۱ محاسبه گردید.

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 گردید. سوسپانسیون حاصل به مدت سه روز تحت چرخه‌های متوالی انجماد و ذوب قرار گرفت. پس از اتمام این مرحله، نمونه‌ها ذوب شده و در ۵۰۰۰ دور بر دقیقه، به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفیوژ (Sigma، آلمان) شدند. مایع رویی بدست 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.

جدول ۱. فرمول‌های محاسباتی فیکوبیلی پروتئین‌ها، فیکوسیانیین (PC)، آلفوفیکوسیانیین (APC) و فیکواریترین (PE) بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر (Bennett et al., 1973).

$$PC \text{ (mg/ml)} = (A620 - 0.474 \times A652) / 5.34$$

$$APC \text{ (mg/ml)} = (A652 - 0.208 \times A620) / 5.09$$

$$PE \text{ (mg/ml)} = (A562 - 2.41(PC) - 0.849(APC)) / 9.62$$

### الکتروفورز SDS-PAGE

زیرواحدهای پپتیدی رنگدانه‌های فیکواریترین و فیکوسیانیین استخراج شده، با روش الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید با حضور سدیم دودسیل سولفات بررسی شد. برای این منظور، نمونه‌ها با نسبت مساوی (۱:۱) با بافر نمونه، حاوی ۲۰ میلی‌مولار Tris-HCl با pH برابر با ۶/۶۸، ۲ درصد SDS و ۲۰ درصد گلیسرول مخلوط گردیدند. و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه و مارکر پروتئین (Scientific Thermo 26610) در چاهک‌ها ژل ریخته شد. پس از اعمال جریان الکتریکی، حرکت پروتئین‌ها در ژل بر اساس وزن مولکولی آن‌ها آغاز شد. در این فرآیند، 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

گردید تا باندهای پروتئینی به‌طور واضح نمایان شوند (Kawsar et al., 2011).

### مشخصه‌یابی رنگدانه‌ها

به‌منظور بررسی تغییرات ساختاری و شناسایی گروه‌های عاملی پروتئین‌های فیکواریترین و فیکوسیانیین، از طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) استفاده شد. نمونه‌های پروتئینی ابتدا به‌صورت پودر خشک تهیه و سپس طیف آن‌ها در محدوده‌ی عدد موجی ( $\text{cm}^{-1}$ ) ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ با استفاده از دستگاه FTIR (JASCO, 4700)، ژاپن) ثبت شد.

### بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی محتوای فیکوبیلی پروتئینی استخراج‌شده با استفاده از آزمون رادیکال آزاد (DPPH) ۱،۱-دی‌فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل ارزیابی شد. در این آزمون، ۲

آزمون، ابتدا محیط کشت مولر- هینتون آگار ۵ آماده، استریل شده و در پلیت‌های مخصوص ریخته شد. سپس سوسپانسیون باکتریایی در مقایسه با استاندارد ۵ / ۰ مک فارلند برای تخمین کدورت و میزان باکتری معلق در مایعات (به طور تقریبی برابر با  $10^8 \times 1/5$  CFU/mL) از سویه‌های باکتریایی اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس تهیه شد و با سواب استریل به‌طور یکنواخت بر سطح محیط کشت پخش گردید. دیسک‌های کاغذی استریل با قطر ۶ میلی‌متر، با ۲۰ میکرولیتر از محلول‌های رنگدانه آغشته شدند. سپس بر سطح محیط کشت قرار گرفتند. برای کنترل مثبت، از دیسک آنتی‌بیوتیکی استاندارد تجاری سیپروفلوکساسین ۶ با غلظت ۵ میکروگرم استفاده شد. همچنین، یک دیسک خالی بدون ماده فعال به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

### نتایج

بررسی ویژگی‌های طیفی رنگدانه‌های استخراج‌شده طبق شکل‌های ۳ و ۴، جذب نوری فیکوبیلی پروتئین‌های استخراج‌شده در محدوده

میلی‌لیتر از محلول رنگدانه‌های فیکوسیانیین و فیکواریترین با غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ۱ میلی‌لیتر محلول DPPH (به غلظت ۰/۰۰۴ درصد وزنی/حجمی در متانول) مخلوط گردید. نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط و در شرایط تاریک انکوبه شدند. میزان جذب محلول‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر هرکدام با سه بار تکرار توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. در این بررسی اسیدآسکوربیک به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (Pena-Medina et al., 2023).

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{(\text{Acontrol} - (\text{Asample} - \text{Ablank}))}{\text{Acontrol}} \times 100$$

### بررسی خواص ضد میکروبی

برای بررسی فعالیت ضد میکروبی رنگدانه‌های استخراج‌شده، از روش انتشار دیسک دیفیوژن<sup>۱</sup>، مطابق با استاندارد (CLSI) ۲ علیه دو پاتوژن بالینی رایج و بیماری‌زا برای انسان، از باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس ۳ و اشریشیاکلی ۴ به‌عنوان یک باکتری گرم منفی استفاده شد. ابتدا از رنگدانه‌های استخراج‌شده، محلول‌های استوک با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در آب مقطر استریل تهیه گردید. برای انجام

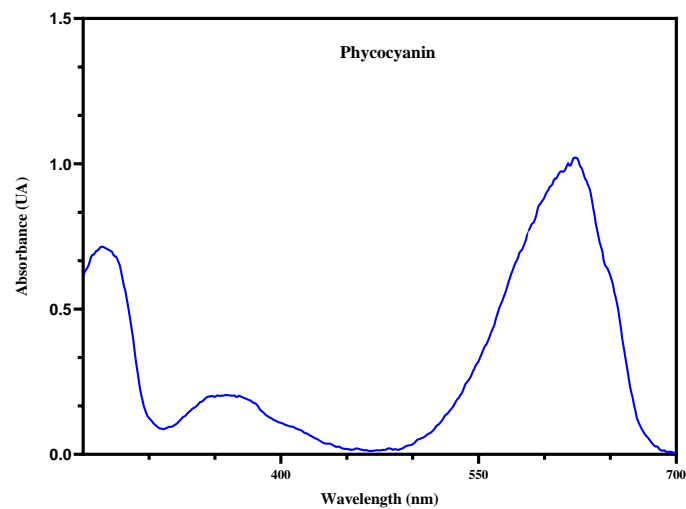
طول موج ۲۸۰ تا ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. طیف جذب فیکوسیانین استخراج شده از اسپیرولینا، طبق شکل ۳، پیک شاخصی را در محدوده ۶۲۰ نانومتر نشان داد، که بیانگر وجود رنگدانه فیکوسیانین می‌باشد. همچنین، پیک جذب در ۲۸۰ نانومتر نیز مشاهده گردید، که مربوط به سایر ناخالصی‌ها و اسیدهای آمینه آروماتیک موجود در ساختار 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 رنگدانه می‌باشد. شدت نسبتاً 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 تأییدکننده استخراج موفق رنگدانه‌های هدف است، هرچند نتایج نشان می‌دهد، که نمونه‌ها از خلوص نسبی برخوردار بوده و برای دستیابی به درجه خلوص بالاتر، مراحل خالص‌سازی تکمیلی می‌تواند مؤثر باشد. جهت تعیین غلظت رنگدانه‌ها براساس فرمول‌های جدول ۱، مقدار جذب در طول موج‌های مربوطه اندازه‌گیری شد، که این نتایج در جدول‌های ۲ و ۳ قابل مشاهده است.

جدول ۲. نتایج حاصل از جذب نوری پروتئین فیکوسیانین استخراج شده از ریز جلبک *S. platensis* (برحسب میانگین  $\pm$  انحراف معیار،  $n=3$ ).

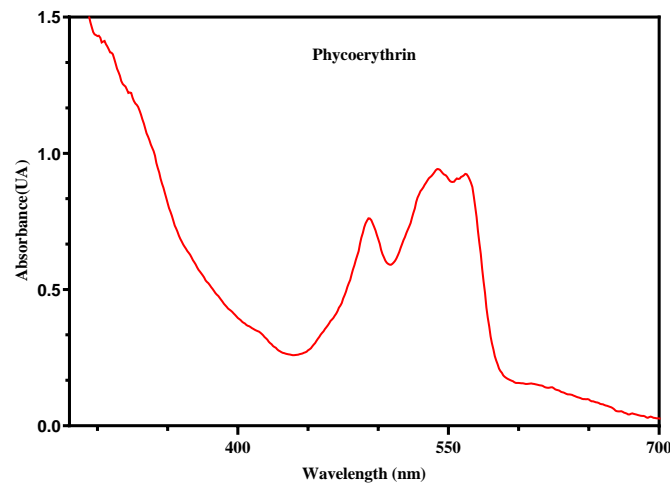
طول موج (nm)	تکرار اول	تکرار دوم	تکرار سوم	میانگین $\pm$ انحراف معیار
۲۸۰	۰/۷۰۲	۰/۷۰۳	۰/۷۰۵	۰/۷۰۳ $\pm$ ۰/۰۰۱۵
۵۶۵	۰/۳۷۲	۰/۳۷۴	۰/۳۷۲	۰/۳۷۳ $\pm$ ۰/۰۰۱۲
۶۲۰	۰/۸۵۶	۰/۸۵۵	۰/۸۵۴	۰/۸۵۵ $\pm$ ۰/۰۰۱
۶۵۲	۰/۴۳۲	۰/۴۳۳	۰/۴۳۴	۰/۴۳۳ $\pm$ ۰/۰۰۱۲

جدول ۳. نتایج حاصل از استخراج پروتئین فیکواریترین از جلبک *G. gracilis* (بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار، n=3).

طول موج (nm)	تکرار اول	تکرار دوم	تکرار سوم	میانگین $\pm$ انحراف معیار
۲۸۰	۱/۷۸	۱/۷۶	۱/۷۸	۱/۷۷ $\pm$ ۰/۱۱۵
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



شکل ۳. طیف جذب نوری رنگدانه فیکوسیانیین استخراج شده از *S. platensis*. بیشترین جذب نوری در طول موج حدود ۶۲۰ نانومتر مشاهده شد که مشخصه رنگدانه فیکوسیانیین می باشد.

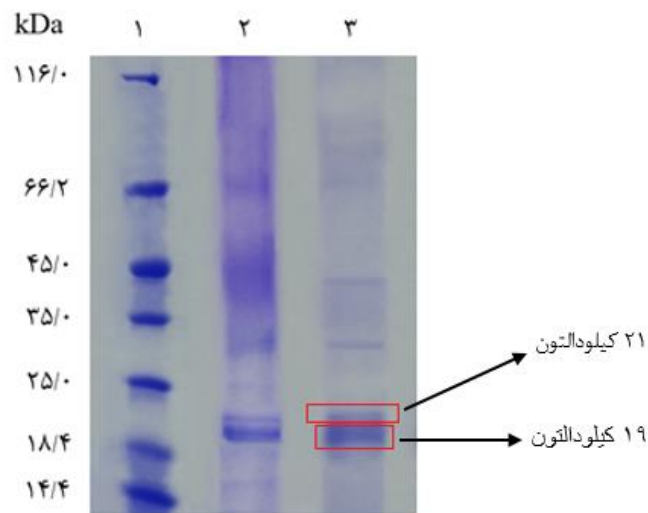


شکل ۴. طیف جذب نوری رنگدانه فیکواریترین استخراج شده از *G.gracilis*. قله‌های مشخص در حدود ۴۹۵ و ۵۴۵ نانومتر از ویژگی‌های طیفی رنگدانه فیکواریترین می‌باشد.

مولکولی پروتئین‌ها به کار رفت. در نمونه عصاره خام (ردیف 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 (ردیف ۳)، شدت باندهای خارج از محدوده موردنظر کاهش یافت و دو باند غالب در حدود ۱۹ الی ۲۰ کیلودالتون مشاهده شد، که می‌توان آن‌ها را به زیر واحدهای  $\alpha$  و  $\beta$  نسبت داد.

#### آنالیز با روش SDS-PAGE

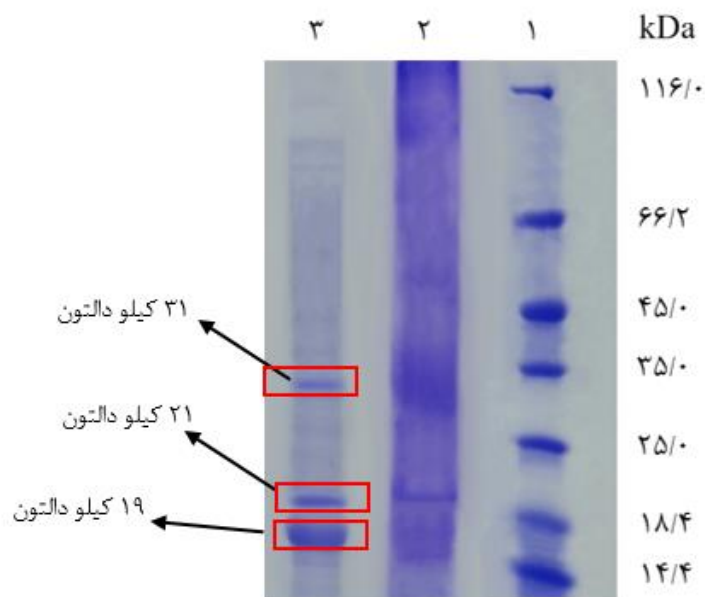
بررسی و ارزیابی الگوی ژل الکتروفورز SDS-PAGE رنگدانه‌های استخراج شده طبق شکل ۵ نشان داد، که هر دو رنگدانه چندین باند مشخص که به احتمال زیاد بیانگر زیرواحدهای آلفا و بتا مربوط به ساختار پروتئین‌های فیکوبیلی پروتئینی هستند، را دارا می‌باشند. مارکر پروتئینی مورد استفاده شامل باندهای استاندارد در محدوده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



شکل ۵. آنالیز SDS-PAGE فیکوسیترین استخراج شده از *S. platensis* (۱) مارکر پروتئینی، (۲) عصاره خام پروتئینی استخراج شده از اسپیرولینا، (۳) عصاره پروتئینی بعد از رسوب با آمونیوم سولفات ۵۰ درصد.

محدوده مورد نظر به طور قابل توجهی کاهش یافت. دو باند اصلی در حدود ۲۱ و ۱۹ کیلو دالتون واضح تر شدند؛ در نهایت، در نمونه نسبتاً خالص شده (ردیف ۴)، سه باند واضح تر در حدود ۱۹، ۲۱ و ۳۳ کیلو دالتون که می توان آن ها را مربوط به زیرواحدهای  $\alpha$  و  $\beta$  و  $\gamma$  دانست. که بیانگر دستیابی به آلودگی پروتئینی کمتر و جداسازی موفق تر از سایر رنگدانه ها می باشد.

در ادامه ارزیابی وزن مولکولی و خلوص پروتئین فیکواریترین استخراج شده نیز مانند مرحله قبل بررسی شد. طبق شکل ۶، در نمونه عصاره خام (ردیف ۲)، اسمیر گسترده ای از باندهای پروتئینی مشاهده شد، که نشان دهنده وجود پروتئین های متعدد و خلوص پایین نمونه اولیه بود. پس از رسوب دهی با آمونیوم سولفات ۶۵ درصد (ردیف ۳)، شدت باندهای خارج از



شکل ۶. آنالیز SDS-PAGE ۱۲/۵ درصد فیکواریترین استخراج شده از *G.gracilis* (۱) مارکر پروتئینی، (۲) عصاره خام پروتئینی استخراج شده از گراسیلاریا، (۳) عصاره پروتئینی بعد از رسوب با آمونیوم سولفات ۶۵ درصد.

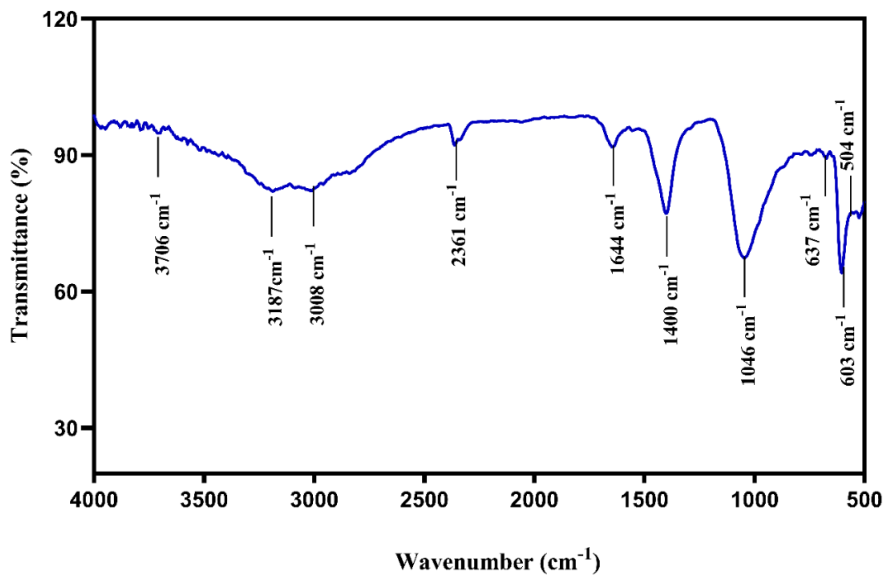
#### طیف سنجی FTIR

نسبی ساختار طبیعی در اثر عدم تخلیص کامل است. عدم مشاهده واضح باند آمید II در ناحیه  $1540 \text{ (cm}^{-1}\text{)}$  نیز این اختلال ساختاری را تأیید می‌کند (Prabakaran et al., 2020). در نواحی با فرکانس بالا، باندهای پهن در  $3706 \text{ (cm}^{-1}\text{)}$  و  $3187$  مربوط به ارتعاشات کششی گروه‌های هیدروکسیل (OH) و آمین (NH) هستند. که احتمالاً از گروه‌های هیدروکسیل و آمینی هیدروژنی شده یا حضور آب ساختاری و ترکیبات فنولی ناشی می‌شوند. باند  $\text{(cm}^{-1}\text{)}$

نتایج حاصل از طیف‌سنجی FTIR نمونه خام فیکوسیاینین، ویژگی‌های کلیدی ساختاری و ترکیبی پروتئین را نشان می‌دهد، که در شکل ۷ قابل مشاهده می‌باشد. حضور پیک غالب در ناحیه  $1644 \text{ (cm}^{-1}\text{)}$ ، بیانگر باند کششی آمید I ناشی از ارتعاش پیوند C=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

۳۰۰۸ احتمالاً ناشی از ارتعاش کششی پیوندهای C-H ساختار آلیفاتیک یا آروماتیک است، که می‌تواند مربوط به زنجیره‌های جانبی آمینواسیدهای آب‌گریز یا کروموفورهای متصل باشد (Duygu et al., 2012). همچنین پیک ضعیف ( $2361\text{ cm}^{-1}$ ) معمولاً به جذب کربن دی‌اکسید ( $\text{CO}_2$ ) محیطی نسبت داده می‌شود. پیک واضح در ( $1400\text{ cm}^{-1}$ ) نیز به ارتعاش کششی متقارن گروه‌های کربوکسیلات ( $\text{COO}^-$ ) نسبت داده شده و نمایانگر حضور

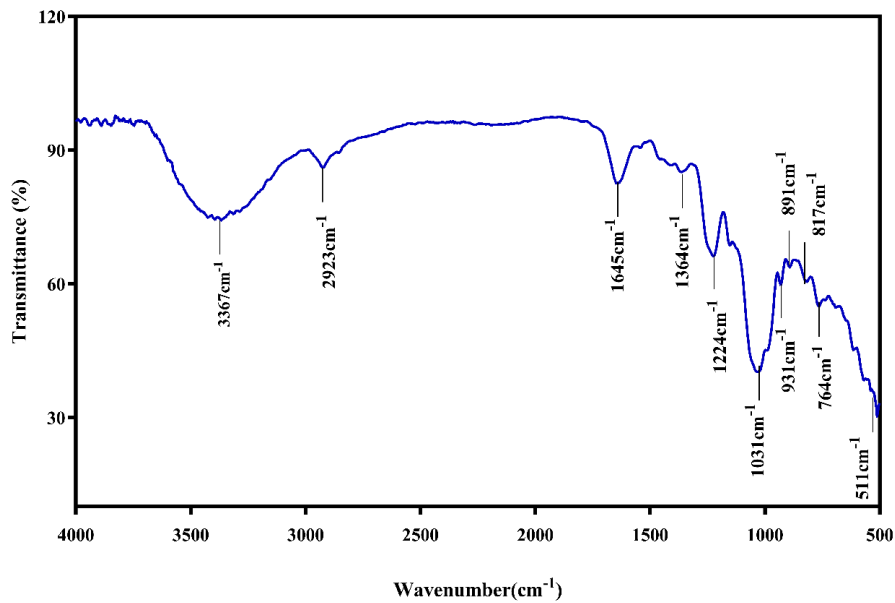
آمینواسیدهای اسیدی یا بافرهای باقی‌مانده در نمونه است. باند ( $1046\text{ cm}^{-1}$ ) می‌تواند به پیوندهای C-O یا C-N مربوط باشد که احتمالاً ناشی از ناخالصی‌های پلی‌ساکاریدی یا پیوندهای پپتیدی است. همچنین باندهای مشخص در ( $637\text{ cm}^{-1}$ ،  $603\text{ cm}^{-1}$ ،  $504\text{ cm}^{-1}$ ) ارتعاشات گروه‌های تتراپیرولی کروموفور فیکوسیانیوبیلین هستند (Venkatesan et al., 2012).



شکل ۷. نمودار حاصل از طیف سنجی FTIR نمونه فیکوسیانیین.

زنجره‌های 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 می‌باشد. قابل توجه است، که باندهای مشخص در نواحی  $(\text{cm}^{-1})$  ۹۳۱، ۸۹۱، ۸۱۷ و ۷۶۴ 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، هرچند در بستری از ناخالصی‌ها می‌باشد. در نهایت، باند ضعیف‌تر در  $(\text{cm}^{-1})$  ۵۱۱ می‌تواند به گروه‌های گوگرددار (C-S) یا خمشی حلقوی در ساختار پیگمنت مربوط باشد (Mishra et al., 2011).

طیف‌سنجی (FTIR) پروتئین فیکواریترین که در شکل ۸، نشان داده شده، بازتابی از ساختار پروتئینی همراه با ناخالصی‌های زیستی و ترکیبات همراه سلولی می‌باشد. باند مشخص در ناحیه  $(\text{cm}^{-1})$  ۱۶۴۴، که به ارتعاش کششی پیوند C=O در گروه آمید I مربوط است. همچنین باند پهن مشاهده شده در  $(\text{cm}^{-1})$  ۳۳۶۷ نیز ناشی از پیوندهای هیدروژنی گروه‌های هیدروکسیل (OH) و آمین (NH) که می‌تواند به حضور آب در ساختار پروتئین، گروه‌های هیدروکسیل آزاد یا آمین‌های پروتئینی مرتبط باشد. همچنین، باند  $(\text{cm}^{-1})$  ۲۹۲۳ بیانگر ارتعاش کششی گروه‌های C-H آلیفاتیک است، که احتمالاً از بقایای لیپیدی یا غشایی منشاء می‌گیرد. در ناحیه  $(\text{cm}^{-1})$  ۱۰۳۱ تا ۱۲۲۴ باندهایی مشاهده می‌شود، که می‌توانند به ارتعاشات کششی پیوندهای C-N (در

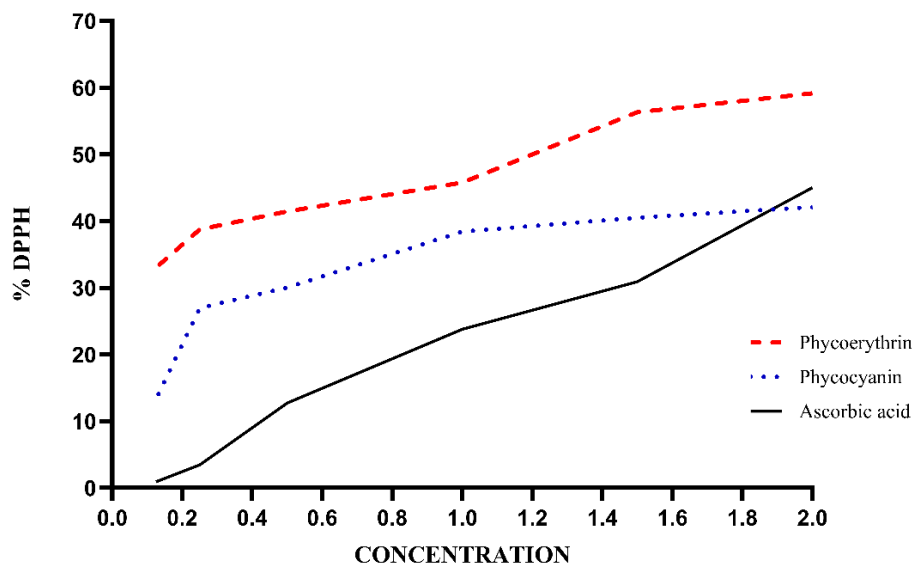


شکل ۸. نمودار حاصل از طیف سنجی FTIR نمونه پروتئین فیکواریترین.

#### خواص آنتی اکسیدانی

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 بوده است. مقادیر غلظت  $IC_{50}$  به دست آمده برای رنگدانه‌های فیکواریترین (۰/۹۹ میلی گرم بر میلی لیتر) و فیکوسیانیین (۲/۲۳ میلی گرم بر میلی لیتر) و همچنین برای آسکوربیک اسید (۲/۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر) بود.

آزمون DPPH برای ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی رنگدانه‌های فیکوسیانیین و فیکواریترین در مقایسه با آسکوربیک اسید به عنوان کنترل مثبت انجام شد. نتایج نشان داد، که هر دو رنگدانه دارای توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH هستند، اما شدت فعالیت آنها با یکدیگر متفاوت است. در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر، درصد مهار رادیکال DPPH توسط



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

#### خواص ضد میکروبی

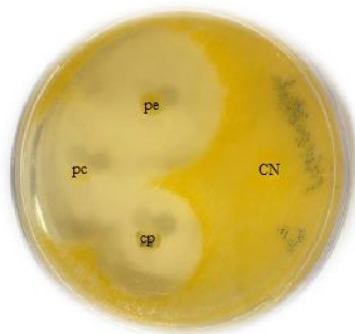
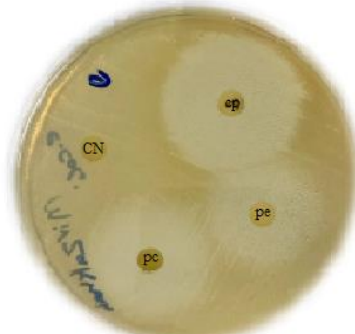
حاوی آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین، بزرگ‌ترین قطر هاله ممانعت از رشد را نشان داد، که به‌عنوان شرایط کنترل مثبت، صحت این آزمون را تأیید نمود. در پلیت حاوی باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس قطر هاله در دیسک حاوی نمونه فیکواریترین نسبت به فیکوسیانیین بزرگ‌تر بود، که نشان‌دهنده فعالیت قوی‌تر این رنگدانه نسبت به فیکوسیانیین است. دیسک‌های کنترل منفی فاقد هرگونه هاله ممانعت از رشد بودند که نشان‌دهنده اختصاصی

فعالیت ضدباکتریالی رنگدانه‌های فیکواریترین و فیکوسیانیین با استفاده از روش انتشار دیسک دیفیوژن و مطابق با دستورالعمل CLSI ارزیابی شد. نتایج حاصل از قطر هاله‌های مهار رشد در جدول ۴ ارائه شده است. این یافته‌ها نشان داد، که هر دو رنگدانه دارای اثر بازدارندگی در برابر رشد باکتری‌های گرم منفی اش‌ریشیا کلی و گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس بودند. در هر دو گروه باکتری‌ها، دیسک

بودن اثر رنگدانه‌ها می‌باشد. همچنین، نتایج فیکواریترین داشت. مشاهدات این مطالعه، نشان برای باکتری اش‌ریشیاکلی حاکی از کاهش شدت مه‌ر نسبت به باکتری گرم‌مثبت بود. علاوه بر این، فیکوسیاینین عملکرد بهتری نسبت به فیکواریترین داشت. مشاهده‌های این مطالعه، نشان دهنده پتانسیل قابل توجه رنگدانه‌های مورد بررسی به‌عنوان ترکیبات زیست‌فعال با خاصیت ضد میکروبی هستند.

جدول ۴. یافته‌های حاصل از فعالیت ضد میکروبی رنگدانه‌های فیکواریترین و فیکوسیاینین به روش دیسک دیفیوژن، قطر منطقه بازدارندگی بر حسب میلی‌متر، و به صورت (Means  $\pm$  SD) نشان داده شده است.

قطر منطقه بازدارندگی (mm)			
نوع باکتری	فیکوسیاینین	فیکواریترین	سیپروفلوکسازین
استافیلوکوکوس اورئوس	۳۰ $\pm$ ۲	۳۵ $\pm$ ۱	۳۷ $\pm$ ۱/۳
اش‌ریشیاکلی	۲۷/۷ $\pm$ ۱/۳	۲۴/۳ $\pm$ ۱/۵	۲۹ $\pm$ ۲

a) *Staphylococcus aureus*b) *Escherichia coli*

شکل ۱۰. فعالیت ضد میکروبی رنگدانه‌های فیکوبیلی پروتئینی با استفاده از روش انتشار دیسک دیفیوژن. (a) نواحی ممانعت رشد بر روی پلیت حاوی باکتری گرم‌مثبت استافیلوکوکوس اورئوس. (b) نواحی ممانعت روی محیط کشت باکتری گرم‌منفی اش‌ریشیاکلی. دیسک‌ها: PE - (فیکواریترین ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، PC - (فیکوسیاینین ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، CP - سیپروفلوکسازین (کنترل مثبت)، CN - دیسک خالی (کنترل منفی).

## بحث

نشان دهند استخراج صحیح در طول این مطالعه بوده است. این نتایج نشان داد که هر دو رنگدانه دارای باندهایی در محدوده وزنی مشخص شامل ۱۹ الی ۲۱ کیلو دالتون هستند (شکل ۵)؛ که می‌توان آن‌ها را به زیر واحد های 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 که طبق (شکل ۶) باعث پدید آمدن باند در محدوده ۳۰ کیلودالتون گردید که نشانه‌ای از خالص‌سازی موفق است (Nowruzzi et al., 2020). طیف‌سنجی FTIR روشی برای آنالیز سریع و غیر مخرب 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 محققان از این روش برای ارزیابی گروه‌های عاملی و بررسی ساختارمولکول‌ها استفاده می‌کنند (Swann et al., 2011). نتایج بدست آمده از بررسی طیف سنجی پروتئین فیکوسیانین و فیکواریتین استخراج شده در این مطالعه، با مطالعات پیشین، شباهت‌های قابل توجهی از جمله حضور گروه‌های آمیدی، هیدروکسیلی، کربوکسیلات و کروموفورهای

بررسی طیف جذب نوری نشان داد که فیکوسیانین استخراج‌شده دارای بیشینه جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر بود (شکل ۳)، که این نتایج، یافته‌های گزارش‌شده در مطالعات پیشین را تایید می‌کند (Hsieh-Lo et al., 2023). از سوی دیگر، فیکواریتین استخراج‌شده دارای دو پیک مشخص در محدوده ۴۹۵ و ۵۴۵ نانومتر (شکل ۴) بود که به درستی نشان دهنده ویژگی اختصاصی طیف نوری این رنگدانه می‌باشد (Nguyen et al., 2020). بر اساس گزارش‌های پیشین، فیکوبیلی پروتئین‌ها دارای ساختاری چندزیرواحدی هستند. که از زیرواحدهای آلفا و بتا تشکیل شده که کمپلکس‌های ( $\alpha\beta$ ) به صورت واحدهای سه‌تایی یا شش‌تایی وجود دارند. که عملکرد نوری خود را از طریق این ساختارها ایفا می‌کنند (Contreras-Martel et al., 2007). همچنین زیرواحد گاما ( $\gamma$ ) به طور اختصاصی به عنوان یک اتصال دهنده بین ساختارهای سه‌تایی  $3(\alpha\beta)$  و تشکیل اجسام دیسکی شکل به صورت شش واحدی یا هگزامر را در رنگدانه فیکواریتین ایجاد می‌کند (Sonani et al., 2018). الگوی الکتروفورز SDS-PAGE رنگدانه‌های استخراج شده در این مطالعه، حاکی از وجود این زیرواحد ها و

تتراپیرولی دارد. طبق شکل‌های ۶ و ۷، در هر دو نمونه باند مشخص در ناحیه آمید I، ( $\text{cm}^{-1}$ ) ۱۶۴۴ و ۱۶۴۵ حضور دارد که معرف ساختار پپتیدی پروتئین‌هاست. با این حال، عدم وجود وضوح کافی در باند آمید II و ممکن است، به علت عدم خالص‌سازی کامل یا 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 مربوط باشد (Venkatesan et al., 2012). در ادامه فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه‌های فیکوبیلی پروتئینی به روش DPPH مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های حاصل از این آزمون نشان داد که فیکواریترین در تمامی غلظت‌ها دارای بالاترین توان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH بوده و در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حدود ۵۹ درصد فعالیت مهاری از خود نشان داد. این مقدار برای فیکوسیانیین و آسکوربیک اسید به ترتیب ۴۲٪ و ۴۵٪ گزارش شد. بر این اساس، مقدار  $\text{IC}_{50}$  برای فیکواریترین (۰/۹۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، برای فیکوسیانیین (۲/۲۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و برای آسکوربیک اسید (۲/۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به دست آمد که نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تر فیکواریترین نسبت به سایر نمونه‌هاست. در پژوهشی مشابه 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 مذکور با تست DPPH می‌پرداخت. حاکی از توانایی ۲۵/۲۱ درصدی این رنگدانه در مهار رادیکال آزاد DPPH بود (Jerley and Prabu, 2015). 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 توانایی این مطالعات بر روی گونه‌های مختلف از باکتری‌ها تا انواع گوناگون جلبک‌ها وجود دارد. به طور مثال غربالگری و بررسی ویژگی‌های فتوشیمیایی رنگدانه فیکواریترین استخراج شده از جلبک قرمز هالیمناپورفیریفورمیس ۱ نشان دهنده توانایی آنتی‌اکسیدانی این رنگدانه بود. به طوری که غلظت  $\text{IC}_{50}$  در این پژوهش برابر با

ضدمیکروبی رنگدانه‌ها از آزمون انتشار دیسک دیفیوژن استفاده شد، که در آن هردو رنگدانه استخراج شده دارای خاصیت زیاد ضد میکروبی در مقابل باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و گرم منفی اشیشیاکلی بود. از منظر فعالیت ضدمیکروبی، هر دو رنگدانه توانایی بازدارندگی رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را نشان دادند. در این میان، فیکواریترین قطر هاله بازدارندگی بزرگ‌تری نسبت به فیکوسیانیین بر روی باکتری‌های گرم مثبت ایجاد کرد، که نشان‌دهنده اثرگذاری قوی‌تر آن است. یافته‌های حاصل از ارزیابی و بررسی هاله عدم رشد ایجاد شده بر هردو گروه باکتری‌ها نشان داد، که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به اشیشیاکلی، در مواجهه با رنگدانه‌های فیکوسیانیین و فیکواریترین حساس‌تر هستند. 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 رنگدانه‌ها از آن‌ها بدست آمده‌اند تاثیر بسیار زیادی بر فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها دارد. تفاوت مشاهده شده میان دو گونه باکتریایی می‌تواند، ناشی از اختلاف در ساختار دیواره سلولی، وجود غشای

۳۹/۲۵۳۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است (Mantiri et al., 2021). اما در بررسی دیگر بر روی این پروتئین که از جلبک قرمز اسپیریدیا فیلامنتوزا ۲ بدست آمد. عصاره حاصل از این گیاه خواص مهارری رادیکال آزاد DPPH با غلظت  $IC_{50}$  برابر با ۱۲۸/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از خود نشان داد (Brabakaran et al., 2020). در تحقیقی دیگر در ارتباط با پروتئین بدست آمده از گونه‌ای از سیانو باکتر خاکزی *Nostoc sp. FA1*، نشان داد که این رنگدانه توانسته درصد مهارری خود را به ۸۰ درصد برساند (نوروزی و همکاران، ۱۳۹۹). با بررسی ما بر روی گونه *G. gracilis*، و با توجه به مقادیر  $IC_{50}$  بدست‌آمده می‌توان مشاهده کرد که فیکواریترین عملکرد بهتری از فیکوسیانیین داشت. با اینکه، هر دو رنگدانه از خانواده فیکوبیلی پروتئین‌ها بوده و دارای مکانیسم آنتی‌اکسیدانی مشابهی هستند. بنابراین تفاوت مشاهده شده را می‌توان به اختلافات 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. در ادامه برای ارزیابی فعالیت

2015). همچنین، یافته‌های تحقیقی حاصل از مطالعه بر روی خواص آنتی‌باکتریال فیکوسیانیین استخراج‌شده از *Sp.Spirulina*، و بررسی فعالیت مهارکنندگی این رنگدانه علیه باکتری‌های گرم مثبت، استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوک فکالیس ۱ و گرم منفی، آئروموناس هیدروفیلا ۲، سالمونلا انتریتیدیس ۳ با استفاده از روش انتشار در چاهک آگار در بازه غلظتی ۰ تا ۳۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، نشان داد که فیکوسیانیین در غلظت‌های پایین‌تر از ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر به مهار رشد باکتری‌های *S. aureus*، *A. hydrophila* و *S. enteritidis* بوده، اما علیه *E. faecalis* در همین بازه غلظتی غیرفعال باقی مانده است. قطر هاله‌های ممانعت از رشد در این آزمون به صورت وابسته به غلظت افزایش یافته و در بازه‌ای بین ۷ تا ۱۳ میلی‌متر گزارش شد (Mohamed et al., 2018). همچنین در یافته‌ای دیگر، عصاره خام *Oscillatoria* sp، بیشترین فعالیت آنتی‌باکتریال را در برابر باکتری‌های گرم مثبت نشان داده است، که این عملکرد حتی نسبت به آنتی‌بیوتیک استاندارد استرپتومایسین نیز برجسته‌تر گزارش شده است. این موضوع نشان‌دهنده‌ی پتانسیل بالای ترکیبات زیست‌فعال موجود در عصاره خام،

خارجی در باکتری‌های گرم‌منفی و تفاوت در نفوذ ترکیبات پروتئینی بر اثر متفاوت بودن ساختار و دسترسی پذیر بودن گروه‌های مهم دارای فعالیت زیستی باشد. همچنین در مطالعه‌ای بر روی بررسی اثرات ضد میکروبی فیکواریترین بدست آمده از جلبک *H.durvillae*، علیه دو پاتوژن گرم منفی و گرم مثبت به ترتیب: اشیشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس، مشاهده شد که خاصیت ضد میکروبی این رنگدانه علیه باکتری گرم مثبت شدیدتر بوده (Mantiri et al., 2021).

همچنین ارزیابی فعالیت ضد میکروبی فیکواریترین بدست آمده از سیانوباکترگونه *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 باسیلوس سوبتیلیس و کاندیدا آلبیکنس بود (نوروزی و همکاران، ۱۳۹۹). در پژوهشی دیگر، فیکوسیانیین استخراج شده از جلبک سبز-آبی آناپنا اثرات ضد میکروبی وابسته به غلظتی را بر انواع گونه‌های گرم مثبت و گرم منفی از خود نشان داد. نتایج در این تحقیق حاکی از آن بودند که اثرات این پروتئین بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به سایر باکتری‌ها حساس‌تر می‌باشد (Sitohy et al.,

زیر واحد گامای اختصاصی در فیکواریترین، تطابق خوبی با نتایج گزارش شده در منابع معتبر داشت. در آزمون DPPH، رنگدانه فیکواریترین عملکرد آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری نسبت به فیکوسیانیین و حتی اسید آسکوربیک از خود نشان داد، که با مقدار IC<sub>50</sub> پایین‌تر همراه بود و نشان‌دهنده پتانسیل بالای آن در مهار رادیکال‌های آزاد است.

این نتایج در مقایسه با مطالعات پیشین از که فعالیت متوسط تا بالا برای این رنگدانه‌ها گزارش کرده بودند، نویدبخش استفاده از این ترکیبات به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در محصولات دارویی و غذایی است. همچنین نتایج حاصل از بررسی‌های فعالیت ضد میکروبی این رنگدانه‌ها که از منابع بومی تهیه گردید، مؤید آن است، که فیکوبیلی پروتئین‌ها، به‌ویژه فیکواریترین، می‌توانند به‌عنوان عوامل آنتی‌باکتریال 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 بیوتکنولوژی هستند. به‌ویژه فیکواریترین به‌دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریال قوی‌تر، می‌تواند گزینه‌ای مناسب برای توسعه ترکیبات

به‌ویژه رنگدانه‌های فیکوبیلی پروتئینی مانند فیکوسیانیین است. در ادامه، به‌طور خاص ذکر شده که رنگدانه فیکوسیانیین فعالیت آنتی‌باکتریال بالایی در برابر *Klebsiella sp*. از خود نشان داده است؛ به‌طوری‌که این فعالیت از استرپتومایسین نیز مؤثرتر بوده و در مقایسه با دو باکتری پاتوژن دیگر نیز قوی‌تر ظاهر شده است. این یافته‌ها اهمیت فیکوسیانیین را به‌عنوان یک عامل آنتی‌باکتریال 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 این پژوهش نشان داد که رنگدانه‌های فیکوبیلی پروتئینی فیکوسیانیین و فیکواریترین استخراج‌شده به‌ترتیب از *S. platensis* و *G. gracilis*، دارای ویژگی‌های زیستی قابل توجهی از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریال هستند. استخراج و خالص‌سازی این رنگدانه‌ها با موفقیت انجام شد و نتایج طیف‌سنجی FTIR و آنالیز SDS-PAGE صحت ساختار پروتئینی آن‌ها را تأیید کرد. پیک‌های مشخص آمید I و گروه‌های تتراپیرولی کروموفور در هر دو طیف نشان از حضور رنگدانه‌های فعال داشتند. حضور زیر واحدهای آلفا و بتا در هر دو رنگدانه و

زیست‌فعال طبیعی محسوب شود. پیشنهاد مصرفی این رنگدانه‌ها در سامانه‌های دارورسانی می‌شود در مطالعات آینده، مسیرهای افزایش خوراکی نیز مورد بررسی قرار گیرد. خلوص، پایداری ساختاری و بهینه‌سازی مقدار

## منابع

- سیانوباکتری خاکزی *Nostoc* sp. FA1 مجله دنیای میکروب، جلد سیزدهم، شماره ۲، ص: ۱۳۸-۱۵۳.
- Bennett A, Bogorad L. 1973.** Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J Cell Biol*, 58(2): 419-435.
- Brabakaran A, Venkatesan S, Jayappriyan KR, Roselin LS, Thangaraju N. 2020.** Antioxidant Properties of R-Phycocerythrin from Red Alga *Spyridia filamentosa* (Wulfen) Harvey Collected on the Pudumadam Coast. *Adv Sci Eng Med*, 12(4): 489-498.
- Chen H, Qi H, Xiong P. 2022.** Phycobiliproteins – a family of algae-derived biliproteins: productions, characterization and pharmaceutical potentials. *Marine Drugs*, 20(7): 450.
- Contreras-Martel C, Matamala A, Bruna C, Poo-Caamaño G, Almonacid D, Figueroa M, Martínez-Oyanedel J, Bunster M. 2007.** The structure at 2 Å resolution of phycocyanin from *Gracilaria chilensis* and the energy transfer network in a PC-PC complex. *Biophysical Chemistry*, 125(2-3): 388-396.
- Coulombier N, Jauffrais T, Lebouvier N. 2021.** Antioxidant compounds from microalgae: A review. *Marine Drugs*, 19(10): 549.
- Duygu DY, Udoh AU, Ozer TB, Akbulut A, Erkaya IA, Yildiz K, Guler D. 2012.** Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identification of *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 and *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing 1833. *Afr J Biotechnol*, 11: 3817-3824.
- Estrada, J. P., Bescós, P. B. and Del Fresno, A. V. (2001).** Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *II Farmaco*, 56(5-7): 497-500.
- Hsieh-Lo M, Castillo G, Ochoa-Becerra MA, Mojica L. 2023.** Phycocyanin and phycocerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability. *Algal Research*, 69: 103068.
- Jaeschke DP, Teixeira IR, Marczak LDF, Mercali GD. 2021.** Phycocyanin from *Spirulina*: A review of extraction methods and stability. *Food Research International*, 143: 110314.
- Jerley AA, Prabu DM. 2015.** Purification, characterization and

- antioxidant properties of C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Scrutiny International Research Journal of Agriculture, Plant Biotechnology and Bio Products*, 2(1): 7–15.
- Kannaujiya VK, Sundaram S, Sinha RP. 2017.** Phycobiliproteins: recent developments and future applications. Springer.
- Kawsar SM, Fujii Y, Matsumoto R, Yasumitsu H, Ozeki Y. 2011.** Protein R-phycoerythrin from marine red alga *Amphiroa anceps*: extraction, purification and characterization. *Phytologia Balcanica*, 17(3): 347–354.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1): 265–275.
- Mantiri DMH, Kepel RC, Boneka FB, Sumilat DA. 2021.** Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial tests on red algae, *Halymenia durvillaei*, and phycoerythrin pigments. *AACL Bioflux*, 14(6): 3358–3365.
- Mishra SK, Shrivastav A, Mishra S. 2011.** Preparation of highly purified C-phycoerythrin from marine cyanobacterium *Pseudanabaena* sp. *Protein Expr Purif*, 80: 234–238.
- Mohamed SA, Osman A, Abo Eita A, Sitohy MZ. 2018.** Estimation of antibacterial and antioxidant activities of phycocyanin isolated from *Spirulina*. *Zagazig Journal of Agricultural Research*, 45(2): 657–66.
- Morya S, Kumar Chattu V, Khalid W, Khalid MZ, Siddeeg A. 2023.** Potential protein phycocyanin: an overview on its properties, extraction, and utilization. *International Journal of Food Properties*, 26(2): 3160–3176.
- Nguyen HPT, Moranças M, Délérís P, Fleurence J, Nguyen-Le CT, Vo KH, Dumay J. 2020.** Purification of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Gracilaria gracilis* by anion-exchange chromatography. *J Appl Phycol*, 32: 553–561.
- Nowruzi B, Anvar SA, Ahari H. 2020.** Extraction, purification and evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of phycoerythrin from terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. FA1. *J Microbial World*, 13(2): 138–153.
- Patil G, Chethana S, Sridevi AS, Raghavarao KSMS. 2006.** Method to obtain C-phycocyanin of high purity. *J Chromatogr A*, 1127(1–2): 76–8.
- Pema-Medina RL, Fimbres-Olivarria D, Enríquez-Ocana LF, Martínez-Cordova LR, Del-Toro-Sanchez CL, Lopez-Elias JA, Gonzalez-Vega RI. 2023.** Erythroprotective potential of

- phycobiliproteins extracted from *Porphyridium cruentum*. *Metabolites*, 13(3): 366.
- Prabakaran G, Sampathkumar P, Kavisri M, Moovendhan M. 2020.** Extraction and characterization of phycocyanin from *Spirulina platensis* and evaluation of its anticancer, antidiabetic and antiinflammatory effect. *Int J Biol Macromol*, 153: 256–263.
- Shanmugam A, Sigamani S, Venkatachalam H, Jayaraman JD, Ramamurthy D. 2017.** Antibacterial activity of extracted phycocyanin from *Oscillatoria* sp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(3): 62–67.
- 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.
- Sonani RR, Roszak AW, Ortmann de Percin Northumberland C, Madamwar D, Cogdell RJ. 2018.** An improved crystal structure of C-phycoerythrin from the marine cyanobacterium *Phormidium* sp. A09DM. *Photosynthesis Research*, 135(1): 65–78.
- Soni RA, Sudhakar K, Rana R. 2017.** Spirulina – From growth to nutritional product: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 69: 157–171.
- Torres P, Santos JP, Chow F, dos Santos DY. 2019.** A comprehensive review of traditional uses, bioactivity potential, and chemical diversity of the genus *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta). *Algal Research*, 37: 288–306.
- Venkatesan S, Pugazhendy K, Sangeetha D, Vasantharaja C, Prabakaran S, Meenambal M. 2012.** Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic analysis of *Spirulina*. *Int J Pharm Biol Arch*, 3(4): 969–972.
- Zarrouk C. 1966.** Contribution to the study of cyanobacteria: influence of various physical and chemical factors on growth and photosynthesis in *Spirulina maxima*. PhD thesis, University of Paris.



Research Paper

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

Mohammadreza Mirzakhah<sup>1</sup>, Mahmoud Reza Aghamaali<sup>2\*</sup>, Kourosh Jahanban<sup>3</sup>, Fatemeh Moradi<sup>4</sup>

DOI: 10.22124/japb.2026.31694.1578

Received: September 2025

Accepted: March 2026

**Abstract**

Phycobiliproteins, a class of naturally occurring bioactive compounds derived from organisms such as red algae and cyanobacteria, have attracted considerable attention due to their diverse biological activities. The present study aimed to investigate the structural characteristics, spectral properties, and the free radical scavenging, antioxidant, and antimicrobial activities of two major phycobilipigments. These pigments were extracted from *Spirulina platensis* and *Gracilaria gracilis*, respectively. The extraction procedure involved repeated freeze–thaw cycles followed by ammonium sulfate precipitation and dialysis for partial purification. spectrophotometric analysis revealed maximum absorption peaks at 620 nm for phycocyanin and at 495 and 545 nm for phycoerythrin. SDS–PAGE analysis confirmed the presence of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits (18–20 kDa) and a  $\gamma$  subunit (31kDa). FTIR spectroscopy demonstrated the presence of characteristic biological functional groups, including the (amide I) band at 1644  $\text{cm}^{-1}$  and tetrapyrrolic structures. The DPPH assay verified the antioxidant capacity of both pigments. The free radical scavenging activity was 59% for phycoerythrin and 42% for phycocyanin. Disk diffusion assays demonstrated that both pigments exhibited antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Phycoerythrin showed the highest activity against Gram-positive bacteria, whereas phycocyanin exhibited greater inhibitory effects against Gram-negative bacteria. These findings highlight the significant potential of these pigments for pharmaceutical, industrial, and food applications.

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

1- M.Sc. Student 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](mailto:aghamaali@guilan.ac.ir)