مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال هشتم، شماره چهارم، پیاپی سی و دوم، بهار ۱۳۹۹ (۶۶-۵۷)

بررسی فعالیت ضد قارچی فیکوسیانین خالص‌سازی‌شده از جلبک سبزآبی *اسپیرولینا پلاتنسیس* کشت داده‌شده در ایران در مقابل قارچ *کاندیدا آلبیکنس*

ندا زمانی[۱]، محمد فضیلتی[۲]، حسین صلواتی[۳]، مهرآنا کوهی‌دهکردی[٤*]
۱. دکتری بیوشیمی، گروه علوم پایه، دانشگاه پیام نور
۲. استاد، گروه علوم پایه، دانشگاه پیام نور
۳. دانشیار، گروه علوم پایه، دانشگاه پیام نور
٤. استادیار، گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۲۷ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۲)

چکیده
امروزه استفاده از رنگ‌های طبیعی در مواد غذایی و دارویی به‌دلیل اثرات سمی گزارش‌شده از رنگ‌های مصنوعی، اهمیت زیادی دارد. فیکوسیانین، یک رنگدانه آبی طبیعی است که علاوه بر کاربردهای تجاری گسترده در صنایع غذایی، آرایشی و دارویی، فعالیت‌های ضدقارچی، آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی آن نیز به اثبات رسیده است. در مطالعه حاضر، فعالیت ضدقارچی فیکوسیانین استخراج‌شده از *اسپیرولینا پلاتنسیس* روی قارچ *کاندیدا آلبیکنس* بررسی شد. فیکوسیانین از طریق روش سونیکاسیون استخراج شد و توسط رسوب‌گذاری آمونیوم‌سولفات و روش دیالیز، خالص‌سازی شد. نمونه تخلیص‌شده، از طریق جذب UV اسپکتروفتومتر و FT-IR، بررسی شد و فعالیت ضدقارچی غلظت‌های مختلف فیکوسیانین در مقابل *کاندیدا آلبیکنس* روی پلیت‌های سابارود دکستروز آگار تحت شرایط استریل، مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج UV اسپکتروفتومتر، پیک‌های وسیعی در طول موج‌های ۲۸۰، ٦۲۰ و ٦۵۲ نانومتر به‌دست آمد. ساختار و پیوندهای مولکولی فیکوسیانین، توسط روش FT-IR، مشخص شد. فعالیت ضدقارچی فیکوسیانین در مقابل قارچ کاندیدا *آلبیکنس* تأیید و بیشترین فعالیت ضدقارچی در غلظت‌های ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فیکوسیانین، مشاهده شد. در مطالعه حاضر کاربرد فیکوسیانین تأثیر ضد قارچی مناسبی علیه *کاندیدا آلبیکنس* نشان داد. به نظر می‌رسد این رنگدانه بتواند با مطالعات تکمیلی به‌عنوان جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی در درمان عفونت‌های کاندیدایی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: *اسپیرولینا پلاتنسیس*، سونیکاسیون، فعالیت ضدقارچی، فیکوسیانین، *کاندیدا آلبیکنس*.

Evaluation of antifungal activity of purified phycocyanin from *Spirulina platensis* cultured in Iran against *Candida albicans*

Neda Zamani[1], Mohamad Fazilati[2], Mohamad Salavati[3], Mehrana Koohi-Dehkordi[4*]
1. Ph.D., Department of Chemistry, Payame Noor University, 19395-3697, Tehran, Iran
2. Professor, Department of Chemistry, Payame Noor University, 19395-3697, Tehran, Iran
3. Associate Professor, Department of Chemistry, Payame Noor University, 19395-3697, Tehran, Iran
4. Assistant Professor, Department of Agricultural Sciences, Payame Noor University, 19395-3697, Tehran, Iran
(Received: Dec. 18, 2018 - Accepted: Dec. 23, 2019)

Abstract
Nowadays, use of natural colors in food and medicine, due to toxic effects of synthetic colors is so important. Phycocyanin (PC) is an innate blue pigment with many mercantile usages in foods, cosmetics and medicines extracted from S*pirulina platensis*. In addition, it has been proven that phycocyanin has antifungal, antioxidant and anticancer activities. The present study was undertaken to value the antifungal activity of phycocyanin which was separated from the blue green algae S*pirulina platensis* cultured in Iran. Phycocyanin extracted by sonication and centrifugation and purified by ammonium sulfate sedimentation and dialysis method. Purified sample was tested by UV Spectrophotometer absorption and FT-IR and antifungal activity of phycocyanin in different concentration was investigated against *Candida albicans*, on sabouraud dextrose (SD) agar plates, under sterile conditions. In UV Spectrophotometer, a wide peak range at 280, 615, 652 nm was gained. Also, structure and molecular bonds of phycocyanin was confirmed via FT-IR. An Anticandidal activity of phycocyanin was confirmed and maximum anti-fungal activity was observed in 20 and 25 mg/ml concentration of phycocyanin. In the present study, the use of phycocyanin has shown an antifungal effect against *Candida albicans*. This pigment seems to be a good alternative to chemical drugs in the treatment of Candidiasis.

Keywords: Antifungal activity, *Candida albicans*, Phycocyanin, Sonication, *Spirulina platensis*.

* نویسندل مسئول: مهرآنا کوهی‌دهکردی
Email: m.koohi@gmail.com

مقدمه

ریزجلبک‌ها گروه متنوعی از ارگانیسم‌ها به‌شمار می‌روند که در دو شکل پروکاریوت و یوکاریوت وجود دارند و از طریق دست‌کاری ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی محیط کشت، ترکیبات زیادی از آن‌ها تولید شده‌است (Muthulakshmi *et al*., 2012). اسپیرولینا، از جمله ریزجلبک‌های فتوسنتزکننده، رشته‌ای، مارپیچی، چندسلولی و سبزآبی محسوب می‌شود که متعلق به کلاس سیانوفیسه و خانواده اوسیلاتوریاسه می‌باشد. این ریزجلبک بیشترین منبع غذایی را دارد و غنی از پروتئین‌ها، ویتامین‌ها (مخصوصا ویتامین‌های B، K، E و پرووویتامین A) و اسیدهای چرب ضروری مثل گاما لینولنیک اسید (GLA) می‌باشد (Sudhir *et al*., 2005). اسپیرولینا که سلول‌های آن، به‌صورت رشته‌های مارپیچی محصور در یک غلاف نازک هستند، دارای کاروتنوئید، کلروفیل و رنگدانه اصلی فیکوسیانین می‌باشد (Reis *et al*., 1998). فیکوسیانین، یک رنگ آبی طبیعی است و کاربردهای تجاری متعددی در تهیه مواد غذایی، لوازم آرایشی و مواد دارویی دارد (Eriksen, 2008)، همچنین فعالیت‌های ضدالتهابی و ضدقارچی نیز برای آن گزارش شده است (Bhat & Madyastha, 2001; Estrada *et al*., 2001; Reddy *et al*., 2003; Romay *et al*., 2003). با توجه به توزیع محدود فیکوسیانین در طبیعت، این رنگدانه، از قیمت بالایی برخوردار است و حدود ۵۰ تا ۹۰ درصد از قیمت تولید فیکوسیانین، مربوط به مراحل خالص‌سازی است (Patil *et al*., 2006). از روش‌های معمول برای جداسازی و خالص‌سازی فیکوسیانین، می‌توان به تخریب سلول‌ها با استفاده از هوموژنایزر با فشار بالا، سونیکاسیون، سیکل انجماد و ذوب، رسوب آمونیوم سولفات، کروماتوگرافی هیدروکسی‌اپتایت و استخراج از طریق دو فاز آبی اشاره نمود (Eriksen, 2008; Stewart & Farmer, 1984). با این‌حال شناسایی روش‌های ساده، سریع و مؤثر جهت استخراج و خالص‌سازی فیکوسیانین، ضروری به نظر می‌رسد.

در سال‌های اخیر، توجه بیشتری به اثرات درمانی ریزجلبک‌ها معطوف شده است که شامل کاهش کلسترول، نفروتوکسیسیتی ایجادشده از طریق فلزات سنگین، ویژگی‌های ضدسرطانی، حفاظت درمقابل تشعشع و افزایش سیستم ایمنی می‌باشند (Qureshi *et al*., 1996). علاوه بر این، عملکردهای بیولوژیکی دیگری مانند فعالیت‌های ضدویروسی، ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدانگلی نیز برای اسپرولینا گزارش شده است (Khan *et al*., 2005). به‌عنوان نمونه، فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های متانولی، دی‌کلرومتان، اتیل‌استات و ترکیبات فرار اسپیرولینا روی چند میکروب (۵ باکتری گرم مثبت، ۶ باکتری گرم منفی و *کاندیدا آلبیکنس*) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد عصاره متانولی اسپیرولینا، نسبت به عصاره‌های اتیل‌استات و دی‌کلرومتان و ترکیبات فرار، فعالیت ضدمیکروبی بیشتری دارد (Ozdemir *et al*., 2004). همچنین، Soltani *et al*. (2015)، به بررسی تأثیر اسپیرولینا بر تولید نیتریک‌اکسید در ماکروفاژهای صفاقی موش‌های مبتلا به کاندیدیازیس سیستمیک، پرداختند و اثر اسپیرولینا، لیپوپلی‌ساکارید و اسپیرولینا+لیپوپلی‌ساکارید را با هم مقایسه کردند. در تحقیق آن‌ها، مشخص شد تولید NO، درحضور اسپیرولینا به‌همراه لیپوپلی‌ساکارید (۹/۶+۰/۳۸) درمقایسه با کشت کنترل، القا می‌شود. بنابراین، نتیجه گرفتند اسپیرولینا به‌همراه لیپوپلی‌ساکارید، تأثیر بیشتری روی تولید NO در مقایسه با اسپیرولینا به‌تنهایی دارد.

کاندیدا، یک سرده از قارچ‌ها بوده و معمول‌ترین عامل عفونت قارچی در دنیای پزشکی محسوب می‌شود. بسیاری از گونه‌های *کاندیدا*، جزو قارچ‌های همسفره بی‌خطر در بدن میزبان ازجمله انسان بوده، با این حال، هنگامی‌که دفاع مخاطی یا سیستم ایمنی بدن دچار کاستی شوند، این گونه می‌تواند با فرصت‌طلبی، باعث

بیماری شود. *کاندیدا البیکنس*، معمول‌ترین گونه از این *کاندیدا* بوده که به‌صورت ساپروفیت روی پوست و در دهان، دستگاه گوارش و دستگاه تناسلی، رشد می‌کند. این قارچ میکروسکوپی، جزو میکروارگانیسم‌های تشکیل‌دهنده فلور میکروبی بدن است و بطور طبیعی، به‌صورت همزیستی مسالمت‌آمیز با انسان زندگی می‌کند و ایجاد بیماری نمی‌کند. به‌هم‌خوردن تعادل محیط زیست فلور میکروبی بدن، سبب رشد بی‌رویه این قارچ می‌شود که در مواردی باعث ایجاد عفونت‌های شدید مخاطی و جلدی، کاندیدیازیس واژن، برفک دهان و سایر بیماری‌های قارچی می‌گردد (Constanta & Ansaf, 2016; Gavanji & Larki, 2017; Manolakaki *et al*., 2010).

باتوجه به خواص و کاربرد فراوان اسپیرولینا و وجود رنگدانه‌های طبیعی در این ریزجلبک، تحقیق حاضر با هدف استخراج و خالص‌سازی فیکوسیانین از *اسپیرولینا پلاتنسیس* کشت‌شده در ایران و بررسی اثرات ضدقارچی این رنگدانه روی قارچ *کاندیدا آلبیکنس* در مقایسه با فلوکونازول انجام شد.

مواد و روش‌ها

استخراج فیکوسیانین از ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس*

پودر خشک *اسپیرولینا پلاتنسیس*، از شرکت گوهر سبز سپاهان خریداری شد و فیکوسیانین با استفاده از روش اولتراسونیک، از پودر خشک *اسپیرولینا پلاتنسیس* استخراج گردید. به این منظور، اسپیرولینا در آب مقطر به نسبت ۱:۲۵(w/v) حل شد، محلول اسپیرولینا پنج مرتبه منجمد و ذوب گردید. بیومس در روش اولتراسونیک به یک حمام اولتراسونیک در ۴۰ kHZ به‌مدت ۶۰ دقیقه اضافه شد. بعد از آن، نمونه‌ها در دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و محلول رویی جمع‌آوری گردید. عصاره خام در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در pH=۷، نگهداری شد (Izadi & Fazilati, 2018).

خالص‌سازی فیکوسیانین

فیکوسیانین خام با استفاده از آمونیوم‌سولفات ۵۰ درصد اشباع رسوب‌گذاری گردید. این محلول برای حدود یک ساعت شیک شد و سپس در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی، انکوبه گردید. بعد از آن، این محلول در دور ۱۰۰۰۰ rpm برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. محلول رویی، دور ریخته شده و رسوب آبی که شامل فیکوسیانین است، در حجم کمی از بافر سدیم‌فسفات (سدیم‌فسفات ۰/۰۰۵ مولار) حل شد و در تاریکی در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. فیکوسیانین خام به‌دست‌آمده از مرحله رسوب‌گذاری آمونیوم‌سولفات، در بافر سدیم‌فسفات (pH=۷) برای ۲۴ ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، دیالیز شد. نمونه دیالیزشده، دوباره با آمونیوم‌سولفات ۳۵ درصد اشباع، رسوب‌گذاری شد و در بافر سدیم‌فسفات، دیالیز گردید. فیکوسیانین به‌دست‌آمده در بافر سدیم‌فسفات (pH=۷) حل شد و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد برای استفاده بعدی، ذخیره گردید (Izadi & Fazilati, 2018).

آنالیز فیکوسیانین

اسپکتروفتومتر UV-visible (Shimadzu-Japan model: UV-2550) برای بررسی جذب UV فیکوسیانین، مورد استفاده قرار گرفت. بعد از آن، غلظت فیکوسیانین (CPC) بر حسب mg/ml از جذب‌های (OD) مختلف در طول موج‌های ۶۵۲ و ۶۲۰ نانومتر، با استفاده از رابطه (۱)، محاسبه شد (Muthulakshmi *et al*., 2012):

رابطه ۱)

$$CPC\ (mg/ml) = (OD620 - 0.747 \times OD652)/5.34$$

در این معادله، OD_{620}، جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر و OD_{652}، جذب در طول موج ۶۵۲ نانومتر است و ۵/۳۴، یک عدد ثابت می‌باشد. سپس غلظت‌های مختلف فیکوسیانین، تولید شد. ازآنجایی‌که در غلظت کم

فیکوسیانین، قطر هاله عدم رشد بسیار ناچیز بود، از دستگاه روتاری (Rotary, HAHN SHIN-2005-N) استفاده شد تا فیکوسیانین غلیظ‌تر شود.

خلوص فیکوسیانین نیز با استفاده از رابطه‌های (۲) و (۳) به‌دست آمدند (Muthulakshmi *et al.*, 2012):

رابطه ۲) $purtiy1 = OD_{620}/OD_{280}$

رابطه ۳) $purity2 = OD_{652}/OD_{280}$

میزان خلوص، رابطه مستقیم با هزینه‌های فرآیند خالص‌سازی دارد و هرچه ماده‌ای خالص‌تر باشد، گران‌تر نیز خواهد بود.

ساختار شیمیایی و پیوندهای مولکولی فیکوسیانین، توسط اسپکتروسکوپی FT-IR، مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌ها، با KBr (پتاسیم‌بروماید) مخلوط شدند و بعد از آن، آنالیز اسپکترال IR در یک اسپکتروفتومتر FT-IR (JASCO-4200) انجام گرفت.

بررسی فعالیت ضدقارچی فیکوسیانین روی *کاندیدا آلبیکنس* در مقایسه با فلوکونازول

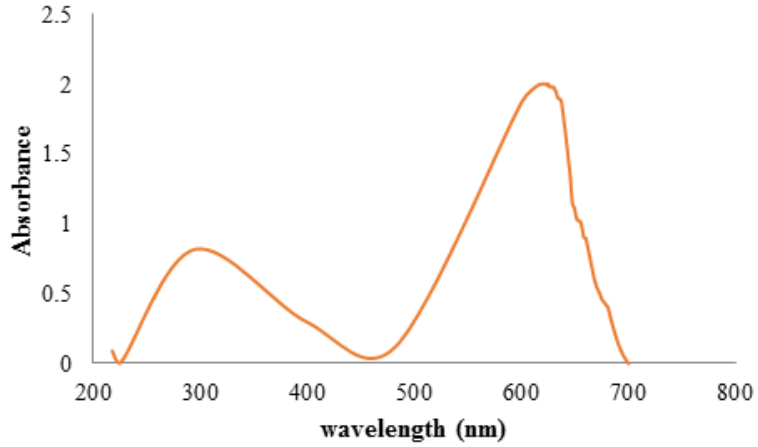
گونه قارچی *کاندیدا آلبیکنس*، برای بررسی فعالیت ضدقارچی فیکوسیانین، مورد استفاده قرار گرفت و از دیسک فلوکونازول (Neo-sensitabs, Rosco) نیز به‌عنوان شاهد استفاده شد. *کاندیدا آلبیکنس* روی پلیت‌های سابارود دکستروز آگار تحت شرایط استریل، کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت، انکوبه شد. دیسک کاغذی به قطر شش میلی‌متر با ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف فیکوسیانین (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، اشباع شد. سپس، دیسک‌ها، روی پلیت‌های سابارود دکستروز آگار حاوی قارچ، قرار گرفتند. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوبه شدند. علاوه بر این، چاهک‌هایی با قطر ۳ میلی‌متر نیز ایجاد شدند. سپس، ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف فیکوسیانین (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، در هر چاهکی ریخته شد (Mishra & Prasad, 2015). پلیت‌ها برای مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، انکوبه شدند و بعد از آن، قطر هاله عدم رشد، اندازه‌گیری شد. آزمون‌ها سه‌بار تکرار شدند.

نتایج

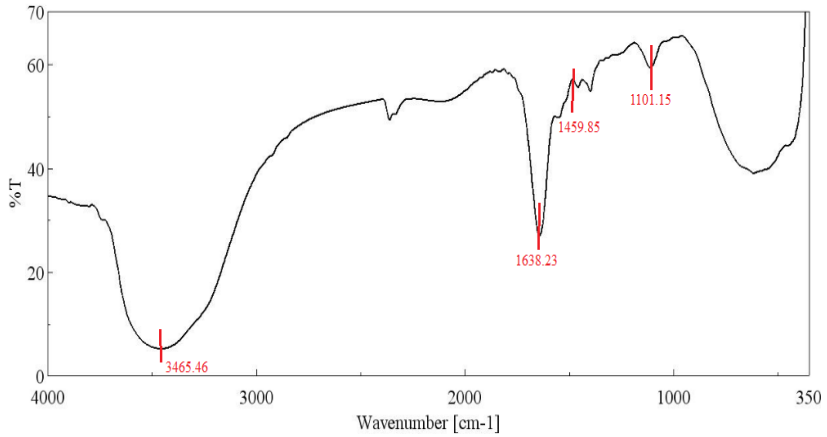
استخراج و خالص‌سازی فیکوسیانین از اسپیرولینا پلاتنسیس و آنالیز این رنگدانه توسط اسپکتروفتومتر UV-visible و FT-IR

در این مطالعه، فیکوسیانین با استفاده از روش سونیکاسیون و سانتریفوژ استخراج شد. در ابتدا، دیواره‌های سلولی اسپیرولینا، توسط موج‌های اولتراسونیک، تخریب و سپس، فیکوسیانین خام، ازطریق رسوب‌گذاری آمونیوم‌سولفات ۵۰ درصد اشباع و روش دیالیز در بافر سدیم‌فسفات، خالص‌سازی شد. خلوص و غلظت رنگدانه فیکوسیانین، ازطریق اندازه‌گیری جذب‌ها در طول موج‌های ۲۸۰، ۶۲۰ و ۶۵۲ نانومتر، برطبق رابطه‌های (۱)، (۲) و (۳) مشخص شدند. غلظت فیکوسیانین، ۰/۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد و مقادیر خلوص نیز، ۳ و ۱/۲۸ محاسبه شد. Muthulakshi *et al.* (2012)، غلظت فیکوسیانین و میزان خلوص آن را با روش استخراج آنزیمی به‌دست آوردند. براساس نتایج، غلظت فیکوسیانین، ۲/۳۹ و میزان خلوص، ۰/۷۳ و ۰/۹۹ گزارش شد.

در تحقیق حاضر، غلظت‌های مختلف فیکوسیانین (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تولید و جذب UV فیکوسیانین توسط اسپکتروفتومتر UV-visible در طول موج‌های ۲۸۰، ۶۲۰ و ۶۵۲ نانومتر مشخص شد. بیشترین جذب فیکوسیانین تخلیص‌شده، در طول موج ۶۲۰ نانومتر به‌دست آمد (شکل ۱). گروه‌های عملکردی فیکوسیانین نیز از طریق آنالیز اسپکترال IR، تشخیص داده شد (شکل ۲ و جدول۱).



شکل ۱. نمودار جذب فیکوسیانین استخراج‌شده از *اسپیرولینا پلاتنسیس*



شکل ۲. نمودار FT-IR فیکوسیانین استخراج‌شده از *اسپیرولینا پلاتنسیس*

جدول ۱. گروه‌های عملکردی فیکوسیانین استخراج‌شده از *اسپیرولینا پلاتنسیس*

عدد موج (cm^{-1})	گروه‌های عملکردی
۱۱۰۱/۱۵	کشش C-C در گروه‌های الکلی
۱۴۵۹/۸۵	C=C در گروه‌های آروماتیک
۱۶۳۸/۲۳	C=C در گروه‌های آلکنی
۳۴۶۵/۴۶	ارتعاش کشش N-H موجود در گروه‌های آمین، O-H در گروه‌های الکلی و N-H در گروه‌های آمیدی

بررسی فعالیت ضدقارچی فیکوسیانین

فعالیت ضدقارچی فیکوسیانین استخراج‌شده از اسپیرولینا پلاتنسیس در غلظت‌های مختلف مورد استفاده، روی قارچ *کاندیدا آلبیکنس*، ازطریق اندازه‌گیری هاله عدم رشد، مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین فعالیت مهارکنندگی فیکوسیانین در غلظت ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد (جدول ۲). میزان هاله عدم رشد برای نمونه شاهد، دیسک فلوکونازول، ۴۷ میلی‌متر به‌دست آمد.

جدول ۲. بررسی منطقه مهار رشد *کاندیدا آلبیکنس* روی دیسک

غلظت فیکوسیانین (mg/ml)	قطر هاله عدم رشد (mm)
۵	۰/۰۰
۱۰	۵±۰/۰۲۵
۱۵	۱۲/۵±۰/۰۰۱
۲۰	۳۰±۰/۰۳۹
۲۵	۳۱±۰/۰۳۹

نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌است (n=۵، P<۰/۰۵).

نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضدقارچی غلظت‌های مختلف فیکوسیانین (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵

میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در مقابل قارچ *کاندیدا آلیکنس* در هر چاهک نیز نشان داد غلظت ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از فیکوسیانین، تأثیر بیشتری بر مهار قارچ *کاندیدا آلبیکنس* داشته است که تأیید کننده نتایج به‌دست آمده در روش قبل می‌باشد (جدول ۳).

جدول ۳. بررسی منطقه مهار شد *کاندیدا آلبیکنس* در چاهک

غلظت فیکوسیانین (mg/ml)	قطر هاله عدم رشد (mm)
۵	۲/۵±۰/۰۳۳
۱۰	۷/۵±۰/۰۳۳
۱۵	۱۸±۰/۰۰۰
۲۰	۳۵±۰/۰۵۰
۲۵	۳۶±۰/۰۵۰

نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است (n=۵، P<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

جلبک‌ها، به‌عنوان یکی از بهترین ارگانیسم‌ها در تولید ترکیبات ضروری بشر به‌شمار می‌روند (Mishra *et al.*, 2014) و قابلیت تولید مواد فعال بیوشیمیایی متعددی در آن‌ها گزارش شده است (Mayer & Hamann, 2004)، علاوه بر این بسیاری از مواد فعال زیستی با فعالیت‌های ضدباکتریایی، ضدویروسی، قارچ کشی، مهارکنندگی آنزیم و سیتوتوکسیسیتی، از بیومس جلبک‌هایی مانند *اسپیرولینا پلاتنسیس*، استخراج شده‌اند (Harrigan *et al.*, 1999; Mayer & Hamann, 2004). این سیانوباکتری، به‌دلیل داشتن رنگدانه‌هایی مانند فیکوسیانین که ویژگی‌های دارویی زیادی دارد، از اهمیت بالایی برخوردار است (Ozdemir *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2009) و در مقایسه با سایر ریزجلبک‌ها (Li *et al.*, 2007) و همچنین گیاهان (Zhou *et al.*, 2004; da Silva *et al.*, 2013)، منبعی غنی از فیکوسیانین محسوب می‌شود. فیکوسیانین با وزن مولکولی کم، در مقایسه با دیگر رنگدانه‌ها، بسیار کوچک است و قدرت ضدقارچی بیشتری دارد (Colla *et al.*, 2007). با توجه به کاربردهای زیاد فیکوسیانین، استخراج مؤثر این رنگدانه از *اسپیرولینا پلاتنسیس* بسیار مفید به نظر می‌رسد.

یکی از مهم‌ترین فرآیندها در حصول فیکوسیانین از *اسپیرولینا*، بهینه‌سازی مراحل استخراج و خالص‌سازی است، تاکنون روش‌های مختلفی برای استخراج و خالص‌سازی فیکوسیانین، استفاده شده است. به‌عنوان نمونه، فیکوسیانین با استفاده از روش‌های مکانیکی مانند فشار بالا و یا استفاده از امواج فراصوت و روش‌های آنزیمی مثل لیزوزیم قابل استخراج است (Abalde *et al.*, 1998; Patil *et al.*, 2008). با این‌حال روشی که برای خالص‌سازی فیکوسیانین از یک ارگانیسم مناسب است، ممکن است برای خالص‌سازی این رنگدانه از ارگانیسم دیگر مناسب نباشد. با توجه به اینکه استخراج فیکوسیانین، رابطه مستقیم با تخریب سلولی دارد و از طرف دیگر اسپیرولینا، دیواره‌های سلولی چند لایه‌ای محکمی دارد که باعث می‌شود فرآیند استخراج را دشوار نماید، روش سونیکاسیون برای استخراج فیکوسیانین از اسپیرولینا، روش مناسبی است (Stewart & Farmer, 1984; Qureshi *et al.*, 1996). در سال‌های اخیر، در تحقیقات متعددی، روش‌های استخراج فیکوسیانین از بیومس اسپیرولینا بررسی شده است. در همه این تحقیقات، سیکل انجماد و ذوب، بهترین روش گزارش شده و نسبت به سایر روش‌ها، فیکوسیانین بیشتری تولید می‌شود. همچنین، این روش دارای مزیت‌های دیگری از جمله سهولت، سرعت بیشتر (۱۰ تا ۱۲ ساعت) و تجدیدپذیری می‌باشد. براساس گزارش McGann & Acker (2003)، وقتی سلول یخ می‌زند، دیواره سلولی آن تخریب شده و منجر به استخراج بهتر مواد داخل سلولی می‌شود (Bermejo *et al.*, 2006; Sarada *et al.*, 1999; Soni *et al.*, 2008). در این تحقیق، علاوه بر روش سیکل انجماد و ذوب، از روش ساده و کارامد سونیکاسیون و دیالیز نیز استفاده شد که نسبت به روش سیکل انجماد و ذوب به‌تنهایی، نتیجه بهتری داشت.

فیکوسیانین استحصال شده توسط اسپکتروفتومتری UV-Vis و FT-IR، در طول موج‌های ۲۸۰، ۶۲۰ و ۶۵۲ نانومتر، آنالیز شد. نتایج نشان داد فیکوسیانین خالص، در طول موج ۶۲۰ نانومتر، بیشترین میزان جذب را دارد. میزان خلوص فیکوسیانین در انتهای فرآیند، ۳ و ۱/۲۸ به‌دست آمد و غلظت فیکوسیانین نیز ۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

فعالیت ضد قارچی عصاره‌های مختلف و رنگدانه‌های مختلف *اسپیرولینا پلاتنسیس* در مطالعات متعددی بررسی شده است. به‌عنوان نمونه، تأثیر عصاره‌های مختلف *اسپیرولینا پلاتنسیس* مانند عصاره اتری، کلروفرم، استون و عصاره متانولی، در مقابل سه گونه قارچی *آسپرژیلوس فومیگاتس*، *آسپرژیلوس نیجر* و *کاندیدا آلبیکنس* ارزیابی و فعالیت ضدقارچی عصاره متانولی *اسپیرولینا پلاتنسیس* در مقابل قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتس* گزارش شده است (vinay *et al*., 2009). این محققین، از روش‌های مختلفی از جمله روش انتشار دیسک (Okigbo *et al*., 2005)، روش انتشار در چاهک (Shanmuga *et al*., 2002)، MIC(غلظت مهاری حداقل) و کاهش در وزن قارچی (Kunert, 1972)، برای تشخیص فعالیت ضدقارچی عصاره متانولی *اسپیرولینا پلاتنسیس* در مقابل قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتس* استفاده کردند و به این نتیجه رسیدند که عصاره متانولی *اسپیرولینا پلاتنسیس* به‌عنوان یک منبع مهم ضدقارچی در مقابل بیماری‌های قارچی عمل می‌کند.

در برخی از مطالعات نیز فعالیت ضدمیکروبی موجود در سیانوباکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. به‌عنوان نمونه بررسی‌های انجام‌شده نشان داده است که سیانوباکتری‌ها، ازطریق ایجاد سم فعال، یک مکانیسم دفاعی در مقابل میکروارگانیسم‌های دیگر مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و ریزجلبک‌های یوکاریوتیک دارند (Mundt *et al*., 2001; Fazilati *et al*., 2016). همچنین گزارش شده است که گونه‌های دیگری از سیانوباکتری‌های متعلق به خانواده نوستاسه[1]، میکروکائتاسه[2] و سیتونماتاسه[3]، در مقابل *کاندیدا آلبیکنس* و *استافیلوکوکوس آرئوس*، فعالیت ضدمیکروبی دارند (Ramamurthy *et al*., 2012). در ایران، از بین ۱۵۰ شاخه سیانوباکتری، ۲۱ نوع اثرات ضد باکتریایی مهمی دارند و برای ۱۳ نمونه، فعالیت ضدقارچی گزاش شده است (Ghasemi *et al*., 2003). هرچند فعالیت ضدقارچی *اسپیرولینا* طی تحقیقات متعددی بررسی شده است به‌عنوان نمونه Mishra *et al*. (2015)، تأثیر گونه‌های مختلف *اسپیرولینا* (*اسپیرولینا پلاتنسیس* و *اسپیرولینا ماکسینا*) و عصاره آن‌ها را در مقابل قارچ *کاندیدا آلبیکنس*، بررسی و فعالیت ضدقارچی آن را گزارش نمودند (Mishra & Prasad, 2015). Sheekh *et al*. (2010) نیز تأثیر کاروتنوئیدهای موجود در *اسپیرولینا* را بر سیستم ایمنی موش‌های عفونی‌شده با *کاندیدا آلبیکنس* و *سودوموناس آئوروژنس*، بررسی و گزارش کردند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که اضافه‌کردن کاروتنوئید، فیکوسیانین و پلی‌ساکاریدها به غذا به‌عنوان ماده افزودنی، باعث افزایش پاسخ سیستم ایمنی درمقابل عفونت میکروبی می‌گردد (El-Sheekh *et al*., 2010). همچنین، اثرات ضدقارچی فیکوسیانین موجود در *اسپیرولینا* در گونه‌های قارچی (*آسپرژیلوس نیجر*، *آسپرژیلوس فلاووس*، *پنی‌سیلیوم و گونه‌های ریزوپوس*) به‌روش سیتوتوکسیسیتی، ارزیابی شد. نتایج نشان دادند فیکوسیانین تخلیص‌شده در مقایسه با فیکوسیانین خام، تأثیر بیشتری روی مهار قارچ‌ها داشته است (Murugan, 2011).

در تحقیق حاضر، فعالیت ضدفارچی فیکوسیانین تخلیص‌شده به روش انتشار دیسک و انتشار روی چاهک، درمقایسه با فلوکونازول، مورد تأیید قرار

1. Nostaceae
2. Microchaetaceae
3. Scytonematacaea

گرفت و بیشترین اثر مهارکنندگی آن در غلظت ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از فیکوسیانین گزارش شد. در نهایت با توجه به افزایش مقاومت به ترکیبات شیمیایی ضدقارچی، به‌کارگیری ترکیبات جدیدی با منشأ طبیعی از جمله فیکوسیانین در تحقیق حاضر، می‌تواند به‌عنوان جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی در درمان عفونتهای کاندیدایی مورد نظر قرار گیرد.

REFERENCES

Abalde, J.; Betancourt, L.; Torres, E.; Cid, A.; Barwell, C. (1998). Purification and characterization of phycocyanin from marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. Plant Science; 136(1): 109-120.

Bermejo, R.; Felipe, M.A.; Talavera, E.M.; Alvarez-Pez, J.M. (2006). Expanded bed adsorption chromatography for recovery of phycocyanins from the microalgae *Spirulina platensis*. Chromatographia; 63(1-2): 59-66.

Bhat, V.B.; Madyastha, K. (2001). Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from Spirulina platensis: protection against oxidative damage to DNA. Biochemical and Biophysical Research; 285(2):262-266.

Colla, L.M.; Costa, J.A.V.; Furlong, E.B. (2007). Antioxidant properties of *Spirulina* (*Arthospira*) *platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. Brazilian Archives of Biology and Technology; 50(1): 161-167.

Constanta, T.; Ansaf, M.E. (2016). Heat related disseminated candidiasis. Ecotoxicologie, Zootehnie și Tehnologii de Industrie Alimentară; 15(B).

da Silva Frozza, C.O.; Garsia, C.S.C.; Gambato, G.; de Souza, M.D.O.; Salvador, M.; Moura, S.; *et al*. (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. Food and Chemical Toxicology; 52: 137-142.

El-Sheekh, M.; Mahmoud, Y.G.; Abo-Shady, A.; Hamza, W. (2010). Efficacy of Rhodotorula glutinis and Spirulina platensis carotenoids in immunopotentiation of mice infected with Candida albicans SC5314 and Pseudomonas aeruginosa 35. Folia Microbiologica; 55(1): 61-67.

Eriksen, N.T. (2008). Production of phycocyanin-a pigment with applications in biology, biotechnology , foods and medicine. Microbiology and Biotechnology; 80(1):1-14.

Estrada, J.P.; Bescós, P.B.; Del Fresno, A.V. (2001). Antioxidant activity of different fractions of Spirulina platensis protean extract. Il farmaco; 56(5-7): 497-500.

Fazilati, M.; Latifi, A.M.; Salavati, H.; Choopani, A. (2016). Antioxidant Properties of Spirulina. Journal of Applied Biotechnology Reports; 3(1): 345-351.

Gavanji, S.; Larki, B. (2017). Comparative effect of propolis of honey bee and some herbal extracts on Candida albicans. Journal of Integrative Medicine; 23(3): 201-207.

Ghasemi, Y.; Yazdi, M.T.; Shokravi, S.; Soltani, N.; Zarrini, G. (2003). Antifungal and antibacterial activity of paddy-fields cyanobacteria from the north of Iran. Journal of Sciences Islamic Republic of Iran; 14(3): 203-210.

Harrigan, G.G.; Luesch, H.; Yoshida, W.Y.; Moore, R.E.; Nagle, D.G.; Paul, VJ. (1999). Symplostatin 2:a dolastatin 13 analogue from the marine cyanobacterium Symploca hydnoides. Journal of Natural Products; 62(4): 655-658.

Izadi, M.; Fazilati, M. (2018). Extraction and purification of phycocyanin from *spirulina platensis* and evaluating its antioxidant and anti-inflammatory

activity. Asian Journal of Green Chemistry; 2: 364-379.

Khan, Z.; Bhadouria, P.; Bisen, P. (2005). Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina*. Pharmaceutical Biotechnology; 6(5): 373-379.

Kumar, A.; Saini, P.; Shrivastava, J.N. (2009). Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. Indian Journal of Experimental Biology; 47: 57-62.

Kunert, J. (1972). Keratin decomposition by dermatophytes: evidence of the sulphitolysis of the protein. Experintia; 28(9): 1025-1026.

Li, H.B.; Cheng, K.W.; Wong, C.C.; Fan, K.W.; Chen, F.; Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. Food Chemistry; 102(3): 771-776.

Manolakaki, D.; Velmahos, G.; Kourkoumpetis, T.; Chang, Y.; Alam, H.B.; De Moya, M.M.; *et al*. (2010). Candida infection and colonization among trauma patients. Virulence; 1(5): 367-375.

Mayer, A.M.; Hamann, M.T. (2004). Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. Marine Biotechnology; 6(1): 37-52.

Mishra, P.; Mishra, R.R.; Tiwari, M.; Shukla, P.; Singh, A.; Shukla, H.S. (2014). Implication of endophytic metabolite and their derivatives in cancer chemotherapy: a prospective study. Advances in Endophytic Research, Springer; 373-388.

Mishra, P.; Prasad, S.M. (2015). Evaluation of Anticandidal Activities of Spirulina Metabolite against Candida Albicance. International Journal of Pharmacology Science Research; 6(3):1000-1007.

Mundt, S.; Kreitlow, S.; Nowotny, A.; Effmert, U. (2001). Biochemical and pharmacological investigations of selected cyanobacteria. International Journal of Hygiene and Environmental Health; 203(4): 327-334.

Murugan, T. (2011). Screening for Antifungal and Antiviral activity of C-phycocyanin from Spirulina Platensis.

Muthulakshmi, M.; Saranya, A.; Sudha, M.; Selvakumar, G. (2012). Extraction, partial purification, and antibacterial activity of phycocyanin from Spirulina isolated from fresh water body against various human pathogens. Journal of Algal Biomass Utilization; 3(3): 7-11.

Okigbo, R.N.; Mbajiuka, C.S.; Njoku, C.O. (2005). Antimicrobial potentials of (UDA) Myopias aesthetical and Acetum gratissimum L. on some pathogens of man. Int J Mole Medi Adv Sci; 1: 392-397.

Ozdemir, G.; Ulku Karabay, N.; Dalay, M.C.; Pazarbasi, B. (2004). Antibacterial activity of volatile component and various extracts of Spirulina platensis. Journal of Natural Product Derivatives; 18(9): 754-577.

Patil, G.; Chethana, S.; Madhusudhan, M.C.; Raghavarao, K. (2008). Fractionation and purification of the phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. Bioress Technol; 99: 7393-7396.

Patil, G.; Chethana, S.; Sridevi, A.; Raghavarao, K. (2006). Method to obtain C-phycocyanin of high purity. Journal of Chromatography A; 1127 (1-2): 76-81.

Qureshi, M.; Garlich, J.; Kidd, M. (1996). Dietary Spirulina platensis enhances humoral and cell-mediated immune functions in chickens. Immunopharmacology and Immunotoxicology; 18(3): 465-476.

Ramamurthy, V.; Raveendran, S.; Thirumeni, S.; Krishnaveni, S. (2012). Antimicrobial activity of heterocytic

cyanobacteria. International Journal of Advanced Life Sciences; 1: 32-39.

Reddy, M.C.; Subhashini, J.; Mahipal, S.; Bhat, V.B.; Reddy, P.S.; Kiranmai, G.; *et al*. (2003). C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. Biochemical and Biophysical research; 304(2):385-392.

Reis, A.; Mendes, A.; Lobo-Fernandes, H.; Empis, J.; Novais, J.M. (1998). Production, extraction and purification of phycobiliproteins from Nostoc sp. Bioresource Technology; 66(3):181-187.

Romay, C.; Gonzalez, R.; Ledon, N.; Remirez, D.; Rimbau, V. (2003). C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. Current Protein and Peptide Science; 4(3): 207-216.

Sarada, R.; Pillai, M.G.; Ravishankar, G.A. (1999). Phycocyanin from Spirulina sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. Process Biochemistry; 34(8): 795-801.

Shanmuga, P.K.; Gnanamani, A.; Radhakrishnan.; N.B.M. (2002). Antimicrobial activity of Daturaalba. Indian Drugs; 39: 113-116.

Soltani, M.; Khosravi, A.R.; Sarfallah, A. (2015). The effects of Spirulina on nitric oxide production in peritoneal macrophages of Balb/C mice with systemic candidiasis. Journal of Advanced Research; 3.

Soni, B.; Trivedi, U.; Madamwar, D. (2008). A novel method of single step hydrophobic interaction chromatography for the purification of phycocyanin from Phormidium fragile and its characterization for antioxidant property. Bioresource Technology; 99(1): 188-194.

Stewart, D.E.; Farmer, F.H. (1984). Extraction, identification, and quantitation of phycobiliprotein pigments from phototrophic plankton. Limnology and Oceanography; 29(2): 392-397.

Sudhir, P.R.; Pogoryelov, D.; Kovacs, L.; Garab, G.; Murthy, S.D. (2005). The effects of salt stress on photosynthetic electron transport and thylakoid membrane proteins in the cyanobacterium Spirulina platensis. BMB Reports; 38(4): 481-485.

Vinay, K.; Usmani, S.K.; Shrivastava, J.N. (2009). Antifungal activity of Spirulina platensis (Geitler) against some human pathogenic fungi. Vegetos; 22(2): 83-89.

Zhou, Z.; Robards, K.; Helliwell, S.; Blanchard, C. (2004). The distribution of phenolic acids in rice. Food Chemistry; 87(3): 401-406.