

Spirulina'dan (*Spirulina platensis*) Klorofil-a ve Fikosiyanin Pigment Ekstraksiyonuna Ultrasonikasyon Süresinin Etkisi

Salih Aksay , Rıdvan Arslan 

Mersin Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 33343, Mersin

Geliş Tarihi (Received): 17.09.2018, Kabul Tarihi (Accepted): 10.10.2018

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): saksay@mersin.edu.tr (S. Aksay)

☎ 0 324 361 00 01 📠 0 324 361 00 32

ÖZ

Mikroalgelere olan ilgi protein, elzem yağ asitleri, vitaminler ve pigmentler gibi besinsel bileşenler yönünden oldukça zengin olmaları nedeniyle giderek artmaktadır. *Spirulina platensis*'in rengi mavi fikosiyanin ve yeşil klorofil pigmentlerinden ileri gelmekte olup bu pigmentler süt ürünleri, jöle ve sakız gibi gıda ürünleri ile eczacılıkta renklendirici olarak kullanılabilir. Spirulinadan pigment ekstraksiyonunda çözümlerle ekstraksiyon, süperkritik akışkan, dondurma/çözdürme, sonikasyon ve enzimasyon gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu çalışmada farklı sürelerde ultrasonikasyon uygulamasının (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 45 ve 60 dakika) metanol ve sulu sodyum nitrat çözeltisiyle (%1.5 NaNO₃) klorofil-a ve fikosiyanin ekstraksiyonuna ve elde edilen pigmentlerin antioksidan aktivitesine (FRAP: Ferric İndirgeme Antioksidan Potansiyel) etkisi incelenmiştir. Ultrasonikasyon sonrası metanol ve sodyum nitratla çözümlerle ekstraksiyonu 120 dakika boyunca manyetik karıştırıcıyla ortam sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Klorofil-a derişimi kontrol örneğinde 6.75 mg/g kuru spirulina olarak bulunurken; sonikasyon uygulama süresiyle artarak 30. dakikada 7.70 mg/g kuru spirulina derişime ulaşmış ve sonrasında sabit kalmıştır. Kontrol örneğinin fikosiyanin derişimi 34.52 mg/g spirulina bulunurken, sonikasyon uygulama süresiyle artarak 45. dakikada 51.83 mg/g kuru spirulina derişime ulaşmış ve sonrasında sabit kalmıştır. En yüksek antioksidan aktivite 60 dakika sonikasyon ardından çözümlerle ekstraksiyonda elde edilmiş ve klorofil-a ile fikosiyanin için sırasıyla 15.74 mg/g ve 11.98 mg/g olarak bulunmuştur. Sonuç olarak klorofil-a metanol ekstraksiyonu öncesi 30 dakika ultrasonikasyon, fikosiyanin sodyum nitrat ekstraksiyonu öncesi 45 dakika ultrasonikasyon işlem süreleri önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: *Spirulina platensis*, Ultrasonikasyon, Klorofil-a, Fikosiyanin, Antioksidan aktivite

Effects of Ultrasonication Time on Chlorophyll-a and Phycocyanin Pigment Extraction from *Spirulina platensis*

ABSTRACT

Interest on microalgae has increased in food, pharmacy and cosmetic industries because of their high nutrient contents such as proteins, essential oils, vitamins and pigments. Phycocyanin and chlorophyll, which are responsible for blue and green pigments in *Spirulina*, are used as colorants in foods such as dairy products, chewing gums and jellies, and pharmacy. For pigment extraction from *Spirulina*, various methods are used such as solvent extraction, supercritical solvent, freezing/thawing, sonication and enzymation. In this study, the effect of ultrasonication process time on the extraction of phycocyanin and chlorophyll-a prior to the application of solvent extraction with methanol and aqueous sodium nitrate solution (1.5% NaNO₃), and the antioxidant activity (FRAP, Ferric Reducing Ability of Plasma) of extracts were determined. Ultrasonication for 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 45, and 60 minutes were applied prior to methanol and NaNO₃ solvent extraction for 120 minutes at room temperature. Chlorophyll-a concentration with 6.75 mg/g dry spirulina for control sample increased to 7.70 mg/g dry spirulina by 30 minute sonication process, and it remained constant at further sonication times. Moreover, phycocyanin concentration with 34.52 mg/g dry spirulina for

control sample increased to 51.83 mg/g dry spirulina up to 45 minute sonication process and remained constant at further sonication. Antioxidant activity of chlorophyll-a and phycocyanin were 15.74 mg/g and 11.98 mg/g, respectively for 60 minutes sonic application followed by solvent extraction. In conclusion, prior to solvent extraction, 30 minute sonication process is recommended for chlorophyll-a while 45 minute process for phycocyanin.

Keywords: *Spirulina platensis*, Ultrasonication, Chlorophyll-a, Phycocyanin, Antioxidant activity

GİRİŞ

Mikroalgler zengin besin içeriği ve sağlık üzerindeki etkileri nedeniyle farklı alanlarda kullanılmakta olup, insanlar tarafından yüzyıllardır gıda ve gıda katkıları olarak tüketilmektedir. Mikroalglerin besin kompozisyonu, karbonhidratlar, proteinler, vitaminler, lipidler, antioksidanlar ve diğer iz elementler gibi farklı kimyasal ve biyolojik bileşiklerden oluşmaktadır. Mikroalglerin içerdikleri bileşiklerin biyoaktif özellikleri sayesinde, sağlık üzerindeki yararları etkileri; antiviral, antikanser, antidiyabetik, antibiyotik, antioksidan, prebiyotik, probiyotik, bağışıklık sistemi güçlendiricisi, kardivasküler sistem koruyucusu, hipokolesterolemik ve antiaterojenik şeklinde sıralanabilir. Bunların yanında, antibiyotik ve antibakteriyel olarak kullanılan farklı ürünler de alglerden elde edilebilmektedir [1]. Endüstriyel açıdan değerli olan birçok bileşiğin özellikle pigmentlerin elde edilmesinde, gıda endüstrisinde sağlık amaçlı, proteince zengin ve fonksiyonel besleyici özelliğe sahip, düşük kalorili gıda üretiminde de mikroalglerin kullanımı bulunmaktadır [2-4]. Ayrıca mikroalglerin toprak zenginleştirme, hayvan yemi, atık su arıtım, biyodizel üretimi, hidrojen üretimi, losyon, cilt kremi, pigment üretimi gibi kullanımları da bulunmaktadır [5-8].

Mikroalgler (*Chlorella*, *Dunaliella* ve *Spirulina* gibi) sadece gıda üretimi için değil, aynı zamanda pigment gibi ticari önemi olan kimyasalların elde edilmesi açısından da önemli canlılardır. Üretilen pigment türüne göre değişkenlik gösterirken, genel olarak mikroalg hücre kuru ağırlığının %0.5-1.5'i kadar klorofil, %0.1-0.2'si kadar karotenoid ve %14-20'si kadar fikobiliprotein gibi pigmentleri üretebilmektedirler. Yalnız *Dunaliella* türü kuru ağırlığının yaklaşık %14'üne kadar β -karoten üretebilmektedir. Ticari olarak üretimi yapılan mikroalgler *Dunaliella salina* ve *Scenedesmus acutus*'tan β -karoten, *Spirulina sp.*'den fikosiyenin, *Haematococcus pluvialis*'ten astaksantin, *Nannochloropsis oculata*'dan ksantofil, *Muriellopsis sp.*'den Lutein ve *Porphyridium cruentum*'dan Fikoeritrin üretilmektedir. *Spirulina platensis*'ten elde edilen mavi renkli fikosiyenin pigmenti, bir antioksidan olarak bağışıklık sistemini güçlendirici ve anti-inflamatuar etkiye sahiptir. Fikosiyenin, stabilitesi nedeniyle kozmetik formülasyonlarda ve gıda renklendiricisi olarak da kullanılabilir [2, 9-11].

Spirulina platensis, genellikle birkaç milimetre uzunluğunda ve çapı 3-12 μ m silindirik hücrelerden oluşan, spiral şekilli bir prokaryotik organizma olup, yüksek sıcaklıklarda (35-38°C) ve yüksek alkali ortamda üreyebilmektedir. Özellikle Asya, Güney Amerika ve Afrika kıtalarında beslenme amacıyla ve besin destek maddesi olarak kullanılan *Spirulina*, modern

biyoteknolojik yöntemler kullanılarak dünyada ticari anlamda en fazla üretimi yapılan bir siyanobakteridir. *Spirulina platensis* %55-70 protein oranında içeren, esansiyel aminoasit ve yağ asitleri, Fe ve Ca minerallerince ve vitamince zengin, biyoaktif özellikteki klorofil, karoten ve mavi renkli fikosiyenin pigmentlerini yüksek miktarlarda yapılarında bulundurmaktadır. Spirulinadan pigment ekstraksiyonunda çözümlerle ekstraksiyon, süperkritik akışkan, dondurma/çözündürme, sonikasyon ve enzimasyon gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır [4, 5, 12, 13].

Bu çalışmada farklı sürelerde ultrasonikasyon uygulamasının (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 45 ve 60 dakika) metanol ve sulu sodyum nitrat çözeltisiyle (%1.5 NaNO₃) klorofil ve fikosiyenin ekstraksiyonuna ve elde edilen pigmentlerin antioksidan aktivitesine (FRAP: Ferric Reducing Ability of Plasma) etkisi incelenmiştir.

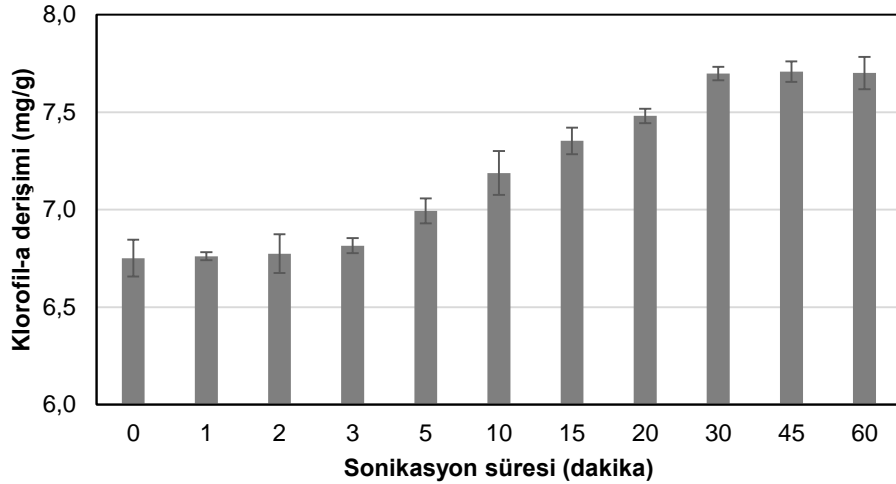
MATERYAL ve METOT

Materyal

Çalışma materyali olarak, CN Lab Nutrition Asian Group (Shaanxi, Çin) işletmesinden temin edilen %100 *Spirulina platensis* tozu kullanılmıştır. Toz spirulina materyali kullanım süresince -20°C derin dondurucuda saklanmıştır.

Pigment Ekstraksiyonu

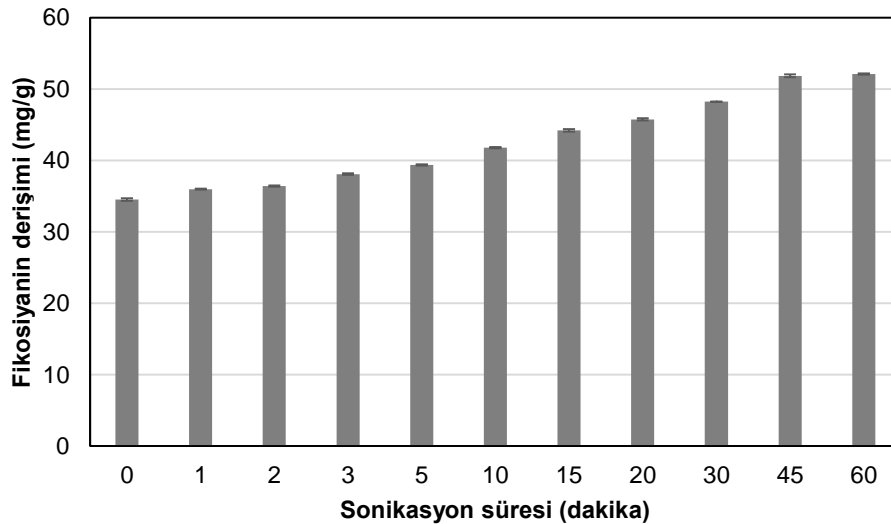
S. platensis'den klorofil-a ekstraksiyonu Macías-Sánchez ve ark. [14] önerdiği saf metanol, fikosiyenin ekstraksiyonu Boussiba ve Richmond [15] önerdiği %1.5'lik sodyum nitrat sulu çözeltisi kullanılarak yapılmıştır. Kontrol olarak kullanılan çözen ekstraksiyonu uygulamasında 0.5 g toz *Spirulina* tartılarak 50 mL çözen içerisinde (katı/sıvı oranı 1/100 olarak kullanılmıştır) süspansiyon hazırlanmıştır. Süspansiyon ortam sıcaklığında 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırma işleminden sonra 20°C sıcaklıkta 5000 rpm'de santrifüj (J.P. Selecta Medifriger BL-S, İspanya) edilmiştir. Klorofil-a derişimi berrak metanol pigment çözeltisi filtre edildikten sonra spektrofotometrede (Agilent Cary 60 UV-Vis, Malezya) 666 nm dalga boyundaki absorbans değeri ölçülerek hesaplanmıştır (Klorofil-a (mg/g) = 13.9 x A₆₆₆). Fikosiyenin derişimi ise santrifüj sonrası berrak sodyum nitrat çözeltisinin spektrofotometrede 620 nm dalga boyundaki absorbans değeri ölçülerek hesaplanmıştır (Fikosiyenin (mg/g) = 137 x A₆₂₀). Ultrasonikasyon sürelerinin pigment ekstraksiyonunun etkisini incelemek için hazırlanan *Spirulina* süspansiyonu 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 45 ve 60 dakika süreyle 53 kHz ultrasonik banyoda (Kudos, Ultrasonic Cleaner, SK1200H, 53 kHz, 50W) tutulmuştur. Ultrasonikasyon sonrasında çözenle



Şekil 2. Ultrasonikasyon süresinin ekstrakte edilen klorofil-a derişimine etkisi

Sodyum nitrat çözeltisiyle 2 saatlik kontrol ekstraksiyonunda fikosiyenin derişimi 34.52 ± 0.169 mg/g spirulina olarak bulunmuştur. Fikosiyenin derişimi ultrasonikasyon uygulama sürene paralel olarak artış göstermiş ve 10 dakika sonikasyon ve ardından çözgen ekstrasyonu uygulamasında 41.783 ± 0.068 mg/g spirulina değerinin ulaşmıştır. Otuz dakikalık ultrasonikasyon sonrasında 48.221 ± 0.023 mg/g spirulina derişimine ulaşırken ekstraksiyondaki artış yavaşlamış, 45. dakikada 51.831 ± 0.207 mg/g spirulina derişime, 60 dakika sonikasyonda çok fazla artış olmamış ve 52.096 ± 0.096 mg/g spirulina derişimde yataya gelmiştir. Şekil 3'de görüldüğü gibi 45 dakika ultrasonikasyon sonrasında sodyum nitrat çözeltisiyle yapılan ekstraksiyon sonrasında derişimde önemli bir

artış olmadığı ancak kontrol ekstraksiyonuna göre sonik uygulamada fikosiyenin derişiminin yaklaşık %50 daha yüksek olduğu söylenebilir. Sonikasyon uygulaması sonrasında spirulineden klorofil-a ekstraksiyonu yaklaşık %0.77 civarında literatürdeki ortalama %1 değerinden daha az bulunurken fikosiyenin miktarı literatürde verilen %4.26'dan daha yüksek yaklaşık %5.2 civarında bulunmuştur. Moraes ve ark. [18] dondurma çözündürme, sonikasyon, enzimasyon ve asit uygulamalarının fikosiyenin ekstraksiyonuna etkisini inceledikleri çalışmada benzer olarak en yüksek verimi sonik uygulamada dondurma çözündürme uygulamasına göre yaklaşık %57 verim artışı olduğunu rapor etmişlerdir.



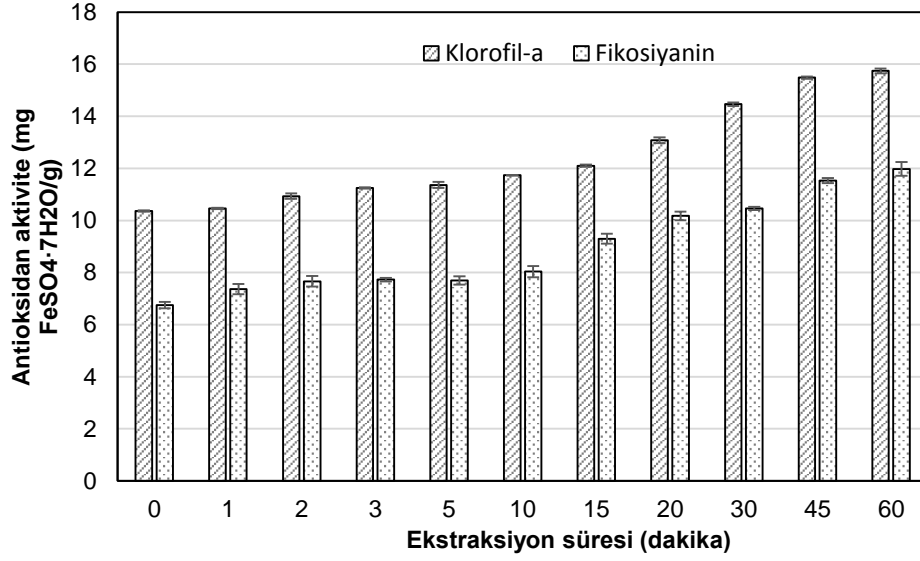
Şekil 3. Ultrasonikasyon süresinin ekstrakte edilen fikosiyenin derişimine etkisi

Ultrasonikasyon süresinin ekstrakte edilen klorofil-a ve fikosiyenin pigmentlerinin antioksidan aktivitelerine etkisi Şekil 4'de gösterilmiştir. Kontrol olarak kullanılan çözgen ekstraksiyonlarında klorofil-a ve fikosiyenin pigmentlerinin antioksidan aktiviteleri sırasıyla 10.365 ± 0.025 mg/g ve 6.749 ± 0.121 mg/g olarak bulunmuştur. Sonikasyon süresiyle doğru orantılı olarak antioksidan aktivite artış

göstermiş ve 60 dakika sonikasyon sonunda klorofil-a 15.745 ± 0.094 mg/g, fikosiyenin pigment ekstraksiyonunda 11.977 ± 0.267 mg/g değerine çıkmıştır. Heriki kontrol ve sonik uygulamasında da klorofil-a pigmentinin fikosiyenine göre antioksidan aktivite değerinin daha yüksek olduğu söylenebilir. Kuatrakul ve ark. [19] taze *Spirulina* örneğini kullanarak

sıcak hava ve mikroalga vakumlu kurutma sonrasında antioksidan aktiviteleri 5.17-9.65 mg FeSO₄·7H₂O/g kuru ağırlık olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda

sonikasyon etkisiyle doku parçalanmasına bağlı olarak daha fazla pigment ekstraksiyonunun antioksidan aktiviteyi de arttırdığı söylenebilir.



Şekil 4. Ultrasonikasyon süresinin ekstrakte edilen klorofil-a ve fikosiyanin pigmentlerinin antioksidan aktivitelerine etkisi

SONUÇ

Sadece çözgen ekstraksiyonuna göre ultrasonikasyon uygulaması ve ardından çözgen ekstraksiyonuyla daha yüksek pigment ekstraksiyonun elde edilebildiği gözlenmiştir. Sonikasyon uygulama süresi ile pigment ekstraksiyon verimi ve elde edilen pigmentlerin antioksidan aktiviteleri orantılı olarak artış göstermiştir. En yüksek antioksidan aktivite 60 dakikalık sonikasyon uygulamasında elde edilmiş olsa da çözgen ekstraksiyonu öncesi klorofil-a için 30 dakika, fikosiyanin ekstraksiyonunda 45 dakika sonikasyonun yeterli olabileceği söylenebilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nce 2017-1-TP2-2246 Proje Numarası ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Demiriz, T. (2008) Bazı Alglerin Antibakteriyel Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 2008.
- [2] Kavas, G., Kavas, N. (2009) Fonksiyonel gıdalarda mikroalglerin nutrasötik olarak kullanılması. *Dünya Gıda Dergisi*, 7, 96-98.
- [3] Venugopal, V. (2009). Marine Products for Healthcare: Functional and Bioactive Nutraceutical Compounds from the Ocean, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 528s.
- [4] Yılmaz, H.K., Duru, M.D. (2011). Syanobakteri *Spirulina platensis*'in besin kimyası ve mikrobiyolojisi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 4(1), 31-43.

- [5] Richmond, A. (2004). Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Science Ltd., New Jersey, USA, 588s.
- [6] Gouveia, L. (2008). Microalgae in Novel Food Products. In Food Chemistry Research Developments, Edited by K.N. Papadopoulos, Nova Science Publishers Inc. New York, USA, 75-111s.
- [7] Eliçin, K., Koç, C., Gezici, M., Gürhan, R. (2013). Biyoyakıt amaçlı mikroalg üretimi için bazı yetiştirme parametrelerinin belirlenmesi. *Tarım Makinaları Bilimi Dergisi*, 9(2), 99-107.
- [8] Gökpınar, Ş., Işık, O., Göksan, T., Durmaz, Y., Uslu, L., Ak, B., Önalın, S.K., Akdoğan, P. (2013). Algal biyoteknoloji çalışmaları. *Yunus Araştırma Bülteni*, 13(4), 21-26.
- [9] Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87-96.
- [10] Duru, M.D., Yılmaz, H.K. (2013). Mikroalglerin pigment kaynağı olarak balık yemlerinde kullanımı. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6(2), 112-118.
- [11] Raposo, M.F.J., Morais, R.M.S.C., Morais, A.M.M.B. (2013). Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences*, 93, 479-486.
- [12] Habib, M.A.B., Parvin, M., Huntington, T.C., Hasan, M.R. (2008). A review of culture, production and use of Spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1034 Rome.
- [13] Soundarapandian, P., Vasanthi, B. (2008). Effects of chemical parameters on *Spirulina platensis* biomass production: Optimized method for phycocyanin extraction. *International Journal of Zoological Research*, 4(1), 1-11.

- [14] Macías-Sánchez, M.D., Mantell, C., Rodríguez, M., Ossa, E.M., Lubián, L.M., Montero, O. (2005). Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*. *Journal of Food Engineering*, 66(2), 245–251.
- [15] Boussiba, S., Richmond, A. (1979). Isolation and characterization of phycocyanin from the blue-green algae *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*, 120(2), 155-159.
- [16] Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70- 76.
- [17] Koru, E. (2012). Earth Food Spirulina (Arthrospira): Production and Quality Standarts. In Food Additive. Edited by El-Samragy, In Tech. Croatia, 256s.
- [18] Moraes, C.C., Sala, L., Cerveira, G.P., Kalil, S.J. (2011). C-Phycocyanin extraction from *Spirulina platensis*. *Wet Biomass*, 28(1), 45–49.
- [19] Kuatrakul, I., Kuarthongsri, P., Yabuuchi, C., Somsai, K., Utama-ang, N. (2017). Sensory descriptive analysis and physicochemical properties of *Spirulina platensis* from different drying processes: Hot air drying and microwave vacuum drying. *Current Applied Science and Technology Journal*, 17(2), 191–199.
-