

Siyanobakterilerden Elde Edilen Fikosiyaninin Kullanım Alanları

*Aylin Akoğlu, M. Lütfü Çakmakçı

Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Dışkapı, 06110, Ankara
*E-mail: aylinsen61@yahoo.com

Abstract: Usage of phycocyanin obtained from cyanobacteria. Phycocyanin obtained from cyanobacteria is a natural blue pigment is odorless, non-toxic, water soluble and strong fluorescent. It is used as a colorant in food, pharmaceuticals and cosmetic industries. Apart from natural coloring, it used as fluorescent probe in microscopy, cytometry, immunology, tissue chemistry studies due to its fluorescent property. In addition there is also potential for use as nutraceuticals and pharmaceuticals owing to antioxidant and radical scavenging activities. In context, there has been increasing interest in production and potential uses of phycocyanin. This review provides information about structure, extraction, purification and areas of usage of phycocyanin.

Key Words: Cyanobacteria, Phycocyanin, Colouring, Fluorescent probe, Antioxidant

Özet: Siyanobakterilerden elde edilen fikosiyanin mavi renkli, kokusuz, toksik olmayan, suda çözünebilen, güçlü floresan özelliğe sahip doğal bir renk maddesidir. Gıda, ilaç ve kozmetik sanayilerinde renklendirici olarak kullanılmaktadır. Doğal renk maddesi özelliğinin dışında sahip olduğu floresan özellikten dolayı mikroskopi, sitometri, bağışıklık, doku kimyası çalışmalarında floresan prob olarak kullanılmakta ayrıca antioksidan ve radikal uzaklaştırıcı etkisinden dolayı nutrasötik ve farmasötik olarak kullanılma potansiyeli de bulunmaktadır. Bu bağlamda fikosiyanin üretimine ve kullanımına olan ilgi son zamanlarda giderek artmaktadır. Bu derleme siyanobakterilerden elde edilen fikosiyanin yapısı, ekstraksiyonu ve kullanım alanları hakkında bilgi vermektedir.

Anahtar Kelimeler: Siyanobakteriler, Fikosiyanin, Renklendirici, Floresan prob, Antioksidan

Siyanobakteriler ve Fikobiliproteinler

Siyanobakteriler, anaerobik metabolizmaya sahip, fototrof mikroorganizmalardır. Yaşayabilmeleri için su, CO₂, inorganik bileşikler ve ışığa ihtiyaç duyarlar. Enerji mekanizmalarının temelini fotosentez oluşturmaktadır ancak bazı türleri hiç fotosentez yapmaksızın kemoheterotrof olarak da karanlıkta uzun süre yaşayabilmektedir (Mur vd., 1999). Fotosentez sistemi fotosistem I ve fotosistem II olmak üzere iki fotoreaksiyon merkezinden oluşmakta ve bu sistemin tüm elemanları tilakoid membranda yer almaktadır. Tilakoid membranda iki grup anten pigmentleri vardır. Klorofil a ve karotenoidler birinci grubu oluştururken fikobilizomlar içinde yer alan fikobiliproteinler ikinci grupta yer almaktadır. Birinci grup anten pigmentleri absorbe edilen ışık enerjisini fotosistem I'e gönderirken, ikinci grup anten pigmentleri olan fikobiliproteinler de aynı şekilde absorbe ettikleri ışık enerjisini fotosistem II'ye transfer eder (Tunail, 2009). Fikobiliproteinler absorpsiyon özelliklerine göre; fikoeitrinler (C-PE, λmak. 540-570 nm), fikosiyaninler (C-PC, λmak. 615-640) ve allofikosiyaninler (C-APC λmak. 650-655) olmak üzere 3 ana sınıfa ayrılırlar (Bermejo vd., 2006). Fikobiliproteinlerin %75'ini fikosiyaninler, %12'sini allofikosiyaninler, %12'sini de fikoeitrinler ve pigmentsiz polipeptitler oluşturur (Tunail, 2009).

Fikosiyanin

Fikosiyanin, suda çözülebilen, yüksek antioksidan ve güçlü floresan özelliği sahip, toksik olmayan, mavi renkli, fotosentetik bir pigment maddesidir. Siyanobakterilerde yüksek miktarda bulunan ve ekonomik anlamda en önemli

fikobiliprotein çeşididir. Fikosiyaninin protoplazma içinde hücre kuru ağırlığının yaklaşık %20'sine varabilen oranlarda bulunabildiği bildirilmiştir (Santiago-Santos vd., 2004, Eriksen 2006). Fikosiyanin yapısı ise bağlı bulunduğu mikroorganizma çeşidine ve ortam koşullarına göre farklılık göstermektedir. Fikosiyaninin prostetik grubu olarak kabul edilen ve proteinin karakteristik mavi renginden sorumlu olan fikosiyanobilin kromoforu farklı bölgelerden sistein aminoasitine bağlanarak fikosiyanin yapısının oluşumunu sağlamaktadır (Stec vd., 1999; Santiago-Santos vd., 2004; Contreras-Martel vd., 2007). Yapılan çalışmalar fikosiyaninin molekül ağırlığının 44–260 kDa aralığında olduğunu ve mevcut yapıların monomer, kendi içinde agregatlar yaparak trimer, hatta disk şeklini alan hegzamer yapısına da dönüşebildiğini göstermiştir (Boussiba ve Richmond, 1979; Hilditch, 1991; MacColl, 1998; Stec vd., 1999). Proteinin agregasyon seviyesi ortamın pH'sına, iyonik gücüne ve protein konsantrasyonuna karşı çok duyarlıdır. Nötral pH'da, optimum iyonik güçte ve protein konsantrasyonunda en çok karşılaşılan agregasyon formu ise trimer yapısıdır (Bermejo vd., 2006). Siyanobakteriler arasında en önemli fikosiyanin üreticisi fototrofik bir siyanobakteri türü olan *Spirulina platensis*'tir ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar fikosiyanin üretimi açısından birçok siyanobakteri türünün (*Spirulina maxima*, *Spirulina fusiformis*, *Anabaena* sp., *Synechococcus* sp., *Aphanothece halophytica*, *Nostoc* sp., *Oscillatoria quadripunctulata*, *Phormidium ceylanicum*) *S. platensis*'e alternatif olabileceğini göstermiştir (Eriksen, 2008).

Fikosiyanin ekstraksiyonu

Ticari açıdan son derece önemli olduğu bilinen fikosiyaninden faydalanabilmek için bu maddeyi fikobilizomlardan uygun şekilde ekstrakte etmek ve saflaştırmak gerekmektedir (Sekar ve Chandramohan, 2008). Siyanobakterilerden fikobiliproteinlerin ekstraksiyonu hücre duvarının aşırı dayanıklı olması nedeniyle oldukça zordur (Stewart ve Farmer, 1984). Fikobiliproteinlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması için çok çeşitli teknikler denenmiş olsa da henüz standart bir teknik belirlenmemiştir. Bir organizma grubu için iyi sonuç veren bir yöntem başka bir organizma için uygun olmayabilmektedir (Ranjitha ve Kaushik, 2005). Kapsamlı bir ekstraksiyon için, hızlı ve etkili bir ayırım sağlanmalı ve açığa çıkan pigmentler ortamdan kolayca ayrılabilmelidir (Stewart ve Farmer, 1984). Fikobiliproteinlerin, ekstraksiyon ve saflaştırmadaki zorlukları nedeniyle pigmentler oldukça pahalıdır ve bu pigmentleri saf olarak elde etmek ilgi çeken bir çalışma alanıdır (Reis vd., 1998).

Fikosiyanin hem kuru hem de ıslak biyokütleden ekstrakte edilebilmektedir. Kuru biyokütleden ekstraksiyon yönteminde hücre kültürü farklı sıcaklıklarda ve farklı kurutma yöntemleri ile kurutulmakta ve çeşitli tamponlarla çözündürülerek C-PC açığa çıkartılmaktadır (Doke, 2005; Oliveira vd., 2008). Kuru biyokütleden fikosiyanin ekstraksiyonunda yüksek sıcaklık uygulaması fikosiyanin kaybına neden olmakta bu nedenle kurutma işlemi düşük sıcaklıklarda yapılmaktadır (Eriksen, 2008). Ancak genel anlamda kuru biyokütleden yapılan ekstraksiyon verim ve saflığının düşük olması nedeniyle tercih edilmemektedir. Sarada vd., (1999) yapmış oldukları fikosiyanin ekstraksiyon çalışmalarında, kurutulmuş *Spirulina* sp.'nin yaklaşık %50 oranında fikosiyanin kaybına uğradığını, bu yüzden fikosiyanin ekstraksiyonunda ıslak biyokütle kullanımının daha uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Islak biyokütleden C-PC ekstraksiyonu için fiziksel ve kimyasal birçok yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemlerden bazıları; -25°C, -18°C veya sıvı azotta dondurma, 4°C veya 30°C'de çözme (Abalde vd., 1998; Zhang ve Chen, 1999; Minkova vd., 2003; Doke, 2005; Soni vd., 2006), homojenizasyon (Boussiba ve Richmond, 1979; Abalde vd., 1998; Doke, 2005; Schmidt vd., 2005), yüksek basınç uygulaması (Patil vd., 2006; Patil ve Raghavarao, 2007), sonikasyon (Abalde vd., 1998), asit uygulaması (Sarada vd., 1999), lizozim uygulaması (Boussiba ve Richmond, 1979) ve *Klebsiella pneumonia* ile ekstraksiyon (Zhu vd., 2007) yöntemleridir. Tüm bu yöntemlerin dışında süper kritik karbondioksit tekniği üzerinde yapılan çalışmalarla siyanobakterilerden renk maddelerinin ekstraksiyonunda gelişmeler sağlanmıştır (Valderrama vd., 2003; Herrero vd., 2006; Macías-Sánchez vd., 2007).

Genel olarak her yöntemin kendine göre avantaj ve dezavantajları vardır ve bu nedenle ekstraksiyon sırasında harcanan süre, maliyet, elde edilen verim ve saflık gibi faktörler de dikkate alınarak çalışılan suşa ait en uygun ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi gerekmektedir. Endüstriyel açıdan düşünüldüğünde seçilen ekstraksiyon

yönteminin ölçek büyütme için uygun ve ekonomik olması gerekmektedir. Ancak fikosiyanin ile ilgili yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu fikosiyaninin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerine yoğunlaşmaktadır. Moraes vd. (2010), faktöriyel dizayn yöntemi ile matematiksel olarak ölçek büyütme için uygun olacak ekstraksiyon yöntemi çalışması yapmışlardır. Bunun dışında literatürde ölçek büyütme ve ekonomik kullanım ile ilgili çalışmaya rastlanmamaktadır.

Fikosiyaninin saflaştırılması

Siyanobakterilerden C-PC saflaştırılması için amonyum sülfatla çöktürme/diyaliz, ultrafiltrasyon, iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi, hidroksiapatit kromatografisi, genişletilmiş yataklı adsorbsiyon kromatografisi (EBAC) gibi birçok kromatografik teknik ve bu tekniklerin birbiri ile kombinasyonları denenmiştir (Reis vd., 1998; Bermejo vd., 2003; Minkova vd., 2003; Santiago-Santos vd., 2004; Soni vd., 2006; Chen vd., 2006). Bu yöntemlerin temel sınırlayıcı unsurları; saflaştırma işleminin uzun vakit alması, pahalı olması, yüksek hacimlerde çalışılmaması ve saflık oranının düşük olmasıdır (Niu vd., 2007). İşte tüm bu nedenlerden dolayı araştırmacılar fikosiyanin eldesi ve saflaştırılması için yeni ve ucuz yöntemler üzerinde yoğunlaşmışlardır (Patel vd., 2005; Singh vd., 2009). Saflaştırma işlemi sırasında fikosiyanin saflığı 620 nm'deki absorpsiyon değerinin 280 nm'deki absorpsiyon değerine oranı (A620/A280) ile tespit edilmektedir. Elde edilen bu saflık oranına göre fikosiyaninin kullanım alanı belirlenmektedir. Buna göre, fikosiyaninin saflık oranı 0.7 ve üstünde ise gıdaya uygun, 3.9 ise reaktif, 4 ve üzerinde ise analitik saflıkta olduğu kabul edilmektedir (Rito-Palomares vd., 2001).

Fikosiyaninin kullanım alanları

Renklendirici olarak kullanımı

Gıda boyaları, ürünlerin renk kalitesini artırmak amacıyla kullanılan en önemli gıda katkı maddeleri arasında yer almaktadır. Gıdalarda çeşitli işlemler ve depolama sırasında kaybolan doğal rengi vermek, zayıf olan doğal rengi kuvvetlendirmek, gerçekte renksiz olan gıdalara renk vermek ve böylece cazip ve kabul edilebilir ürünler elde etmek amacıyla kullanılmaktadır. Yapay renk maddelerinin keşfedilmesi ve üretimine başlanmasıyla beraber doğal renk maddelerinin yerini almıştır. Yapay renk maddeleri daha stabil olmaları, kuvvetli renk vermeleri gibi birçok avantaja sahip olmalarına karşın toksik ve alerjik etkilerinin olması ve kullanımında yasal sınırlamalar getirilmesi tüketicilerin sentetik renklendiricilerin güvenliği ile ilgili endişeler duymasına ve yapay renk maddelerine olan ilginin giderek azalmasına yol açmıştır. Tüm bu nedenler, üreticileri tekrar doğal renk maddelerini kullanmaya yöneltmiştir. (Karaali ve Özçelik, 1993; Yentür vd., 1998).

Günümüzde gıda sanayisinde özellikle içecek ve şekerleme sanayisinde yapay mavi renkli boyaların kullanımı kısıtlanmakta ve doğal mavi renkli boyaların kullanımına olan ilgi giderek artmaktadır (Jespersen vd., 2005). Fikosiyaninin,

gıda, ilaç ve kozmetik sanayilerinde, doğal bir pigment olarak, kanserojen olduğundan şüphe edilen sentetik pigmentlerin yerini alabileceği bildirilmiştir (Sarada vd., 1999). Bu bağlamda siyanobakteriden elde edilen, doğal ve mavi renkli bir pigment olan fikosiyanın üretimi dikkat çekmektedir.

Fikosiyanın dünyada çeşitli firmalar tarafından ticari olarak üretilmektedir. Japonya'da "Dainippon Ink. & Chemicals Inc." şirketi "Lina mavisı" adıyla ticari olarak fikosiyanın üretimi yapmakta ve kg fiyatını 130 dolardan satmaktadır (Herrera vd., 1989; Henrikson, 2011). S. platensis'den elde edilen C-PC, Japonya'da gıda ve kozmetik alanında renklendirici olarak kullanılmasına rağmen Avrupa yasal kısıtlamalar nedeni ile bu tip kullanımı henüz onaylanmamıştır. C-PC, fermente süt ürünleri, dondurma, alkolsüz içkiler, tatlılar, sakızlar, buzlu şekerler, dekorasyon ürünleri gibi birçok gıda ürünüde renklendirici olarak kullanılmaktadır. Ancak mavi renkli gıdaların sınırlı tüketimi bu maddenin gıdalarda renklendirici olarak kullanımına olan ilgiyi azaltmaktadır. Fikosiyanın, sıcaklığa ve ışığa karşı stabilitesi zayıf olmasına rağmen indigo ve gardenya mavisinden çok daha elverişli olduğu kabul edilmiştir. Kırmızı mikroalg türü olan Phorphyridium aerugineum'dan elde edilen fikosiyanın renginin ışığa ve pH değişimlerine karşı stabil kaldığı ancak sıcaklığa karşı duyarlı olduğu bildirilmiştir. Fikosiyanın farklı koşullardaki stabilitesinin belirlenmesi gıda proseslerindeki kullanım olanaklarının tespiti açısından oldukça önemlidir. Üretimleri sırasında ısıtma işlemi görmeyen içeceklerle (Pepsi® ve Bacardi Brezzer®) ilave edilmesi halinde oda sıcaklığında 1 ay boyunca renk kaybı olmadığı tespit edilmiştir. Kuru gıdalarda kullanılması durumunda renk stabilitesi çok yüksek olduğu, kek dekorasyonunda kullanılan şekerli çiçeklerin renklerinin bir yıl boyunca stabil kaldığı belirlenmiştir (Eriksen, 2008; Sekar ve Chandramohan, 2008).

Floresan prob olarak kullanımı

Fikobilizomlar sulu çözeltiden ekstrakte edildiklerinde fikobiliproteinler uyarılma enerjilerinin doğal alıcılarını kaybederler ve böylece yüksek floresan özelliğe sahip olurlar. Diğer floresan maddelerle karşılaştırıldıklarında fikobiliproteinler yüksek molar ekstinksiyon (sönüm) katsayısına, yüksek oligomer stabilitesine ve yüksek floresan kuantum verimine sahiptir ve bu özellikleri onların güçlü ve yüksek duyarlılıkta floresan etken olarak kullanımlarını sağlamaktadır (Glazer, 1994; Spolaore vd., 2006). Fikobiliproteinlerin hegzamer yapısı trimer ve monomerlerine ayrıştığı zaman uyarım (eksitasyon) katsayısı ve floresan kuantum verimi azalmakta, denatürasyonu sonucunda ise floresan özelliği tamamen kaybolmaktadır (Fukui vd., 2004; Kupka ve Scheer, 2008).

Floresan özelliği etkileyen en önemli değişkenlerden biri kuantum verimidir. Kuantum verimi, lüminesans yapan moleküllerin sayısının toplam uyarılmış molekül sayısına oranı olarak ifade edilir ve floresan özellik arttıkça bu oran bire yaklaşıp. Floresan prob olarak en yaygın kullanılan fikobiliprotein, %82-98 floresan kuantum verimi ile fikoeitridir (Oi vd., 1982; Glazer, 1994). Fikosiyanın ve allofikosiyanın

kuantum verimlerinin düşük olduğu (sırasıyla %68 ve %50) belirlenmiştir (Oi vd., 1982). Stabilize edici bazı etkenlerin polipeptit zincirine bağlanması sonucu kimyasal stabilizasyon sağlanmış ve bu sayede fikosiyanın histokimya, floresan mikroskopi, akış sitometrisi, bağışıklık testleri gibi birçok alanda floresan prob olarak kullanımı olanaklı hale getirilmiştir (Oi vd., 1982; Glazer, 1994; Spolaore vd., 2006). Bunun yanı sıra, fikosiyanın floresan özelliğinden faydalanarak, siyanobakterilerin gelişimi eş zamanlı olarak takip edilebilmekte, içme sularındaki toksik siyanobakteriler tespit edilebilmekte ve doğal su kaynaklarında siyanobakteri varlığı uzaktan belirlenebilmektedir (Eriksen, 2008).

Gıda katkısı ve fonksiyonel gıda olarak kullanımı

Siyanobakterilerin fonksiyonel gıda olarak tüketimi fikosiyanın kullanım alanlarından bir diğerini oluşturmaktadır. Kurutulmuş S. platensis'in fonksiyonel gıda olarak tüketiminde fikosiyanın fonksiyonunu gösteren bir dizi çalışma bulunmaktadır. Son zamanlarda ilgi fikosiyanın fonksiyonel bileşenler içeren kurutulmuş S. platensis ile alınmasına doğru kaymaktadır. Besinsel değerlerinin ötesinde tüm siyanobakterilerin fikosiyanın içerikleri nedeniyle, bağışıklık sistemini uyardığı, antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, antikanser ve kolesterol düşürücü etkiler gösterdiği öne sürülmüştür. Siyanobakteriler biyolojik olarak birçok aktif bileşik içerdiğinden, siyanobakterinin tüketilmesi ile oluşan bu sağlık etkilerinin yalnızca fikosiyanın içeriği ile ilişkilendirilmesi tam olarak mümkün değildir (Eriksen, 2008).

Nutrasötik ve farmasötik olarak kullanımı

Farklı siyanobakterilerden elde edilen saf fikosiyanın antioksidan ve radikal uzaklaştırıcı aktivitesi olduğu ve bu bağlamda saflaştırılmış C-PC'nin nutrasötik ve farmasötik olarak kullanıma potansiyeline sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Benedetti vd., 2006; Bermejo vd., 2008; Soni vd., 2008). Hidroksil radikallerinin yok olmasında fikosiyanın büyük bir kısmını oluşturan fikosiyanobilinlerin sorumlu olduğu belirlenmiştir (Zhou vd., 2005). Fikosiyanobilinlerin kimyasal yapısı güçlü bir antioksidan olduğu bilinen bilirubin kimyasal yapısı ile benzerlik göstermektedir (Romay vd., 2003). Bilirubin, plazmada biliverdin redüktaz enzimi tarafından biliverdinden sentezlenen ve lipitleri oksidasyondan koruyan bir maddedir. Diğer yandan antioksidan aktivitenin asıl sorumlusunun fikosiyanobilinin indirgenmiş formu olan fikosiyanorubin olabileceği de ifade edilmiştir. C-PC'nin denatürasyonu veya tripsin ile parçalanması sonucunda antioksidan aktivitesi artmakta ve peroksit radikallerinin parçalanması sırasında rengini kaybetmektedir (Zhou vd., 2005).

Bir dizi bozulmuş fizyolojik durumun C-PC uygulaması ile düzeltilebildiği ve birçok vakadaki sağlık üzerine olan bu olumlu etkinin, C-PC'nin antioksidan ve radikal parçalayıcı etkisi aracılığıyla oluştuğu ifade edilmiştir. C-PC'nin NADH oksidaz gibi diğer bazı enzimleri de inhibe ederek, memeli hücrelerinde ve deney farelerinde gen düzenlenmesini etkilediği, hücre çoğalmasını önlediği ve kanserojenik

hücrelerde apoptozisi (programlı hücre ölümü) uyardığı gözlenmiştir. Bu gözlemler nutrasötik veya farmasötik olarak C-PC kullanımına olan ilginin giderek artmasına neden olmaktadır (Eriksen, 2008).

Sonuç olarak; tüm bu üstün özelliklerinden dolayı fikosiyanın geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Özellikle son 10-15 yıldır fikosiyanın kullanımına ve üretimine olan ilgi giderek artmaktadır. Daha yüksek saflıkta ve verimde fikosiyanın elde edilebilir ve dolayısıyla birçok alanda daha rahat kullanım potansiyeli yaratılmak için; fikosiyanın üreticisi yeni suşların belirlenmesi, yeni ve etkili saflaştırma tekniklerinin geliştirilmesi, genetik ve protein mühendisliği çalışmaları ile üretim potansiyelinin ve fikosiyanın stabilitesinin artırılması gerektiği düşünülmektedir.

Kaynakça

- Abalde, J., Betancourt, L., Torres, E., Cid, A., Barwell, C. 1998. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. *Plant Science*, 136:109-120.
- Benedetti, S., Rinalducci, S., Benvenuti, F., Francogli, S., Pagliarini, S., Giorgi M, Micheloni, L., D'Amici, G.M., Zolla, L., Canestrari, F. 2006. Purification and characterization of phycocyanin from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Journal of Chromatography B*, 833:12-18.
- Bermejo, R., Acién, F.G., Ibáñez, M.J., Fernández, J.M., Molina, E., Alvarez-Pez, J.M. 2003. Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B*, 790:317-325.
- Bermejo, R., Felipe, M.A., Talavera, E.M., Alvarez-Pez, J.M. 2006. Expanded bed adsorption chromatography for recovery of phycocyanins from the microalga *Spirulina platensis*. *Chromatographia*, 63:59-66.
- Bermejo, P., Piñero, E., Villar, A.M. 2008. Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*, 110:436-445.
- Boussiba, S., Richmand, A.E. 1979. Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*, 120:155-159.
- Chen, T., Wong, Y., Zheng, W. 2006. Purification and characterization of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis*. *Phytochemistry*, 67:2424-2430.
- Contreras-Martel, C., Matamala, A., Bruna, C., Poo-Caamaño, G., D., Almonacid, 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*, 125:388-396.
- Doke, J.H., 2005. An improved and efficient method for the extraction of phycocyanin from *Spirulina* sp. *International Journal of Food Engineering*, 1:2.
- Eriksen, N.T., 2008. Production of phycocyanin – a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80:1-14.
- Fukui, K., Saito, T., Noguchi, Y., Kodera, Y., Matsushima, A., Nishimura, H., Inada, Y. 2004. Relationship between color development and protein conformation in the phycocyanin molecule. *Dyes and Pigments*, 63:89-94.
- Glazer, A.N., 1994. Phycobiliproteins-a family of valuable, widely used fluorophores. *Journal of Applied Phycology*, 6:105-112.
- Henrikson, R. 2011. Development of a *Spirulina* Industry-Marketing. <http://www.algaeindustrymagazine.com/special-report-spirulina-part-6/>, Erişim tarihi: 28.01.2012.
- Herrera, A., Boussiba, S., Napoleone, V., Hohlberg, A. 1989. Recovery of C-phycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. *Journal of Applied Phycology*, 1:325-331.
- Herrero, M., Cifuentes, C., Ibanez, E. 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. *Food Chemistry*, 98:136-148.
- Hilditch, M.C. 1991. C-phycocyanin from the cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Phytochemistry*, 11:3515-3517.
- Jespersen, L., Strømdahl, L.D., Olsen, K., Skibsted, L.H. 2005. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. *European Food Research and Technology*, 220:261-266.
- Karaali, A., Özçelik, B., 1993. Natural and Synthetic Colours as Food Additives (in Turkish with English abstract). *Gıda*, 18(6):389-396.
- Kupka, M., Scheer, H. 2008. Unfolding of C-phycocyanin followed by loss of non covalent chromophore-protein interactions. 1. Equilibrium experiments. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1777:94-103.
- Macias-Sánchez, M.D., Mantell, C., Rodríguez, M., Ossa, E.M., Lubián, L.M., Montero, O. 2007. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Synechococcus*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 39(3):323-329.
- Minkova, K.M., Tchernov, A.A., Tchordadjieva, M.I., Fournadjieva, S.T., Antova, R.E., Busheva, M. 2003. Purification of C-phycocyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. *Journal of Biotechnology*, 102:55-59.
- Moraes, C.C., Burkert, J.F.M., Kalil, S.J. 2010. C-Phycocyanin extraction process for large-scale use. *Journal of Food Biochemistry*, 34:133-148.
- Mur, L.C., Skulberg, O.M., Utiklen, H. 1999. Toxic cyanobacteria in water. 15-34 pp., In: Cyanobacteria in the environment. Chorus I, Bartram J. (eds), Spon Press, 417 p., New York.
- Niu, J.F., Wang, G.C., Lin, X.Z., Zhou, B.C. 2007. Large-scale recovery of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B*, 850:267-276.
- Oi, V.T., Glazer, A.N., Stryer, L. 1982. Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. *The Journal of Cell Biology*, 93:981-986.
- Oliveira, E.G., Rosa, G.S., Moraes, M.A., Pinto, L.A.A. 2008. Phycocyanin content of *Spirulina platensis* dried in spouted bed and thin layer. *Journal of Food Process Engineering*, 31:34-50.
- Patel, A., Mishra, S., Pawar, R., Ghosh, P.K. 2005. Purification and characterization of C-phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expression and Purification*, 40:248-255.
- Patil, G., Chethana, S., Sridevi, A.S., Raghavarao, K.S.M.S. 2006. Method to obtain C-phycocyanin of high purity. *Journal of Chromatography A*, 1127:76-81.
- Patil, G., Raghavarao, K.S.M.S. 2007. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycocyanin. *Biochemical Engineering Journal*, 34:156-164.
- Ranjitha, K., Kaushik, B.D. 2005. Purification of phycobiliproteins from *Nostoc muscorum*. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 64:372-375.
- Reis, A., Mendes, A., Lobo-Fernande, H., Empis, J.A., Novias, J.M., 1998. Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp.. *Bioresource Technology*, 66:181-187.
- Rito-Palomares, M., Nuñez, L., Amador, D. 2001. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for C-phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 76:1273-1280.
- Romay, C., Armesto, J., Ramirez, D., González, R., Ledon, N., Garcia, I. 1998. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. *Journal of Inflammation Research*, 47:36-41.
- Santiago-Santos MaC, Ponce-Noyola, T., Olvera-Ramírez, R., Ortega-López, J., Cañizares-Villanueva, R.O. 2004. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp.. *Process Biochemistry*, 39:2047-2052.
- Sarada, R., Pillai, M.G., Ravishankar, 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*, 24:795-801.
- Schmidt, R.A., Wiebe, M.G., Eriksen, N.T. 2005. Heterotrophic high cell density fed-batch cultures of the phycocyanin producing red alga *Galdieria sulphuraria*. *Biotechnology and Bioengineering*, 90:77-84.
- Sekar, S., M. Chandramohan. 2008. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology*, 20:113-136.
- Singh, N.K., Parmar, A., Madamwar, D. 2009. Optimization of medium components for increased production of C-phycocyanin from

- Phormidium ceylanicum and its purification by single step process. *Bioresource Technology*, 100:1663-1669.
- Soni, B., Kalavadia, B., Trivedi, U., Madamwar, D. 2006. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* – Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. *Process Biochemistry*, 41:2017-2023.
- 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*, 99:188-194.
- Spolaore, P., Cassan, C.J., Duran, E., Isanbert, A. 2006. Commercial application of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2):87-96.
- Stec, B., Troxler, R.F., Teeter, M.M. 1999. Crystal structure of C-phycocyanin from *Cyanidium caldarium* provides a new perspective in phycobilisome assembly. *Biophysical Journal*, 76:2912-2921.
- Steward, D.E., Farmer, F.H. 1984. Extraction, identification and quantitation of phycobiliprotein pigments from phototrophic plankton. *Limnology and Oceanography*, 29(2):392-397.
- Sun, L., Wang, S., Qiao, Z. 2006. Chemical stabilization of the phycocyanin from cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Journal of Biotechnology*, 121:563-569.
- Tunail, N. 2009. Mikrobiyoloji. Pelin ofset, 448 s., Ankara.
- Valderrama, J.O., Perru, M., Majewski, W. 2003. Extraction of astaxanthine and phycocyanine from microalgae with supercritical carbon dioxide. *J Chemical Engineering Journal*, 48:827-830.
- Viskari, P.J.V., Colyer, C.L. 2003. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. *Analytical Biochemistry*, 319(2):263-271.
- Yentür, G., Yaman, M., Bayhan, A. 1998. Studies conducted for the quantity determination of synthetic dyes added into some foodstuffs (in Turkish with English abstract). *Gıda*, 23(3):195-199.
- Zhang, Y., Chen, F. 1999. A simple method for efficient separation and purification of C-phycocyanin and allophycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biotechnology Technology journal*, 13:601-603.
- Zhou, Z.P., Liu, L.N., Chen, X.L., Wang, J.X., Chen, M., Zhang, Y.Z., Zhou, B.C. 2005. Factors that effect antioxidant activity of C-phycocyanins from *Spirulina platensis*. *Journal of Food Biochemistry*, 29:313-322.
- Zhu, Y., Chen, X.B., Wang, K.B., Li, Y.X., Bai, K.Z., Kuang, T.Y., Ji, H.B. 2007. A simple method for extracting C-phycocyanin from *Spirulina platensis* using *Klebsiella pneumonia*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74:244-248.