

آماده‌سازی نانولیپوزوم‌های حامل فیکوبیلی پروتئین مستخرج از جلبک قرمز با پوشش پلی‌مری کیتوزان: ارزیابی خصوصیات فیزیکوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی

امیر حق دوست^۱، لیلا گلستان^{۲*}، مریم حسنی^{۳*}، مصطفی شهیدی نوقابی^۴، سیداحمد شهیدی^۵

- ۱- دانشجوی دکتری، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران
- ۲- استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران
* نویسنده مسئول (l.golestan@iauamol.ac.ir)
- ۳- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران
* نویسنده مسئول (m.hasani@iau-shahrood.ac.ir)
- ۴- دانشیار، گروه شیمی مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
- ۵- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت‌الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۰۳

واژه‌های کلیدی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی
فعالیت ضد میکروبی
فیکوبیلی پروتئین
کیتوزان
نانولیپوزوم

درون‌پوشانی مواد در نانولیپوزوم‌ها می‌تواند به‌عنوان یک سیستم حامل محافظتی از ترکیبات زیست‌فعال طی فراوری و نگهداری در شرایط مختلف مورد استفاده قرار گیرد. فیکوبیلی پروتئین‌های مستخرج از جلبک‌ها با دارا بودن ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد سرطانی و ضد التهابی می‌توانند جهت تولید مواد اولیه غذاهای فراسودمند مورد استفاده قرار گیرد. لذا، در مطالعه حاضر رنگدانه فیکوبیلی پروتئین از جلبک گراسیلاریا استخراج و میزان رنگیزه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نانولیپوزوم‌های حاوی رنگدانه با پوشش کیتوزان (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد) تهیه شد و خصوصیات فیزیکوشیمیایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی آن ارزیابی گردید. میانگین قطر نانولیپوزوم‌ها و شاخص پراکندگی به ترتیب از محدوده ۳۳۶/۹ تا ۵۷۷/۷ نانومتر و ۰/۲۵ تا ۰/۲۸ در نانوحامل‌ها متغیر بود. بالاترین مقدار راندمان نانوپوشانی نانولیپوزوم فیکوبیلی پروتئین (۸۳/۹۸ درصد) تحت شرایط بهینه در نانولیپوزوم با پوشش ۱/۵ درصد کیتوزان به دست آمد. نتایج نشان داد فعالیت ضد میکروبی تیمارها به‌طور معنی‌داری پس از کپسوله‌کردن در نانولیپوزوم افزایش یافت. علاوه بر این فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیکوبیلی پروتئین‌ها پس از نانوپوشانی در لیپوزوم‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش داشت. به‌طوری‌که میزان EC₅₀ به پی‌پی‌ام ۸۱/۲۷±۱/۴۰ و ۱۰۷/۶۷±۶/۷۶ به ترتیب در تست‌های مهار رادیکال آزاد ۱و۱-دی‌فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل و ۲و۲-آزینوبیس (۳-اتیل بنزوتیازولین ۶-سلفونیک اسید) در نانولیپوزوم با پوشش ۱/۵ درصد کیتوزان کاهش یافت. براساس یافته‌های این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که درون‌پوشانی با پوشش کیتوزان به‌طور مؤثری پایداری، خواص ضد میکروبی و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی آن را افزایش داده است. لذا جهت افزایش پایداری ترکیبات طبیعی طی فرایندهای مختلف پیشنهاد می‌گردد.

مقدمه

تقاضا برای تولید و توسعه فرآورده‌های غذایی فراسودمند باعث توجه هرچه بیشتر به منابع طبیعی نوین گردیده است. جلبک‌ها به‌واسطه داشتن ترکیبات زیست‌فعال از جمله انواع پیگمان‌ها و کاروتنوئیدها مثل آستاگزانتین^۱، لوتئین^۲، کانتاگزانتین^۳ (فعالیت آنتی‌اکسیدانی، تقویت‌کننده سیستم ایمنی و اثرات مهارکننده بر سیستم سرطانی)، اسیدهای چرب نظیر اکوزاپنتانوئیک اسید (EPA^۴)، اولئیک، لینولنیک، پالمیتیک و دکوزاهگزانوئیک اسید (DHA^۵) (کاهش‌دهنده بیماری‌های قلبی-عروقی، آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی)، پروتئین‌ها مثل فیکوبیلی‌پروتئین‌ها^۶ (تحریک‌کننده سیستم ایمنی، فعالیت ضد سرطانی، اثرات محافظتی بر کبد، التهابی و خواص آنتی‌اکسیدانی)، پلی‌ساکاریدها نظیر پلی‌ساکاریدهای سولفات و فیبرهای غیرمحلول (خواص ضد ویروسی، ضد توموری، ضد انعقادی، کاهش‌دهنده کلسترول)، ویتامین‌ها و توکوفرول‌ها (خصوصیات آنتی‌اکسیدانی) و ترکیبات فنلی (خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی) حائز اهمیت بوده و در انواع محصولات غذایی و همچنین فرمولاسیون فرآورده‌های بیولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرند (Peng, Hong-Bo, Di, & Song, 2009). در سواحل جنوبی دریای خزر گونه *گراسیلاریا گراسیلیس*^۷ برای اولین بار توسط (باقری‌دینانی، دهپورجوبیاری، & اسلامی، ۱۳۹۳، مرداد) (۱۳۹۳) شناسایی شد که بیشتر متصل به سواحل سنگی و مخلوط با جلبک‌های *انترومورفا*^۸، *کلادوفورا*^۹ و *پلی‌سیفونیا*^{۱۰} یافت می‌شوند (Nabivailo, Skriptsova, & Titlyanov, 2005). رنگ جلبک قرمز به‌واسطه دارابودن رنگیزه‌های محلول در آب به نام فیکوبیلین همواره قرمز بوده اما بعضی اوقات به رنگ سبز تیره تا روشن یا حتی قهوه‌ای تیره یا سیاه ظاهر می‌شوند. رنگیزه غالب، آر-فیکواریترین^{۱۱}، موجب رنگ

قرمز می‌گردد. فیکوبیلی‌زوم‌ها^{۱۲} حاوی آلفوفیکوسیانیین^{۱۳} (APC) شناسایی شده در طول موج ۶۵۰ نانومتر، فیکوسیانیین^{۱۴} (PC) شناسایی شده در طول موج ۶۲۰ نانومتر و فیکواریترین^{۱۵} (PE) شناسایی شده در طول موج ۵۶۵ نانومتر می‌باشند و نقش مهمی را در فتوسنتزها بازی می‌کنند (Peng et al., 2009). فیکوبیلی‌پروتئین‌ها به‌طور عمده توسط سیانوباکترها و جلبک‌های قرمز تولید می‌شوند. بخش غیرپروتئینی فیکوبیلی‌پروتئین‌ها از بیلین ساخته شده است. بیلین نوعی زنجیرهٔ تتراپیرول^{۱۶} باز شده است که به‌صورت کووالان و با یک یا دو پیوند تیواستری^{۱۷} به اسیدآمینهٔ بخش پروتئینی خود متصل شده است (Assis, Machado, Motta, Costa, & Soares, 2014).

استفاده از فیکوبیلی‌پروتئین‌ها در کاهش ابتلا به بیماری کم‌خونی، التهاب، تقویت سیستم ایمنی، بیماری‌های کبد، عوامل ضد سرطان نقش مهمی را ایفا می‌کنند (Hosseini, Rezaei, Zandi, & Ghavi, 2013). این گونه ترکیبات همچنین به‌عنوان رنگ‌دهنده‌های طبیعی و امولسیفایر در محصولات غذایی نظیر انواع نوشیدنی‌های یخی و غیرالکلی، آدامس‌ها، آب‌نبات، قوام‌دهنده و ترکیبات ژل‌کننده و در صنایع بهداشتی و آرایشی نیز به‌عنوان جایگزین رنگ‌دهنده‌های مصنوعی به‌کار گرفته می‌شوند (Taylor, Weiss, Davidson, & Bruce, 2005).

از دیگر کاربردهای فیکوبیلی‌پروتئین‌ها می‌توان به تولید پروب‌های رنگی در تشخیص ایمنولوژیکی مواد براساس ویژگی‌های فلورسنت آنها اشاره نمود (Beheshtipour, Mortazavian, Mohammadi, Sohrabvandi, & Khosravi-Darani, 2013). از مهم‌ترین فاکتورهای اصلی جهت ارزیابی کیفیت مادهٔ غذایی می‌توان به رنگ، بو و طعم اشاره نمود که پارامتر رنگ مهم‌ترین عامل اصلی جهت پذیرش محصول توسط مشتری محسوب می‌گردد.

در برخی از مواد غذایی از جمله نوشیدنی‌ها، انواع بستنی‌ها، ژله‌ها، شکلات‌ها و محصولات لبنی، فاکتور رنگ از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. مصرف رنگ‌های مصنوعی به لحاظ وجود باقی‌ماندهٔ آنها در غذا،

¹ Astaxanthin

² Lutein

³ Canthaxanthin

⁴ Eicosapentaenoic Acid

⁵ Docosahexaenoic Acid

⁶ Phycobiliprotein

⁷ *Gracilaria gracilis*

⁸ *Enteromorpha* sp.

⁹ *Cladophora* sp.

¹⁰ *Polysiphonia* sp.

¹¹ R- phycoerythrin

¹² Phycobilisome

¹³ Allophycocyanin

¹⁴ Phycocyanin

¹⁵ Phycoerythrin

¹⁶ Tetrapyrrole

¹⁷ Thioester

وزیکول‌های کلئیدی متشکل از لیپیدهای قطبی به‌ویژه فسفولیپیدها بوده که در حضور مولکول‌های آب، ساختارهای کروی دولایه‌ای را ایجاد می‌کنند (Ghorbanzade, Jafari, Akhavan, & Hadavi, 2017). این ترکیبات به دلیل خاصیت دوگانه‌دوستی^۱، توانایی کپسوله کردن طیف وسیعی از ترکیبات آب‌دوست، چربی‌دوست و دوگانه‌دوست را دارند. لیپوزوم‌ها و نانولیپوزوم‌ها اگرچه خصوصیات ساختاری، شیمیایی و ترمودینامیک یکسان دارند، اما نانولیپوزوم‌ها در مقایسه با لیپوزوم‌ها، به علت اندازه ذرات کوچک‌تر، ناحیه سطحی بیشتری را فراهم کرده و باعث افزایش حلالیت، بهبود قابلیت دسترسی زیستی، رهایش کنترل شده و تحویل دقیق‌تر مواد انکپسوله‌شده به نواحی هدف می‌شوند. همچنین دارای پایداری کلئیدی بالاتر بوده و کدورت کمتری ایجاد می‌کنند (Rasti, Jinap, Mozafari, & Yazid, 2012). باین وجود، سیستم‌های تحویل مبتنی بر لیپید، به دلیل کم ثباتی، در محیط اسیدی نمک‌های صفاوی و لیپاز معده مناسب نمی‌باشند (Page & Cudmore, 2001). استفاده از سیستم‌های پلی‌مری چسبنده مخاطی مانند کیتوزان، مهم‌ترین گام در جهت افزایش تحویل لیپوزومی ترکیبات پروتئینی زیست‌فعال به شکل خوراکی می‌باشد. به طوری که ثبات حامل لیپوزومی و راندمان جذب در دستگاه گوارش می‌تواند تا حدود زیادی توسط یک لایه پوشش کیتوزانی افزایش یابد که می‌توان به اتصال کیتوزان و لیپوزوم از طریق واکنش‌های الکترواستاتیک بین گروه‌های کاتیونی کیتوزان و گروه‌های فسفولیپید آنیونی نسبت داد. در مورد پایداری شیمیایی نانولیپوزوم‌ها، پایداری ترکیبات فسفولیپیدی به کاررفته در ساختمان نانولیپوزوم نقش مهمی ایفا می‌کند (Souza et al., 2014). پرکاربردترین فسفولیپید در ساختار لیپوزوم‌ها و نانولیپوزوم‌ها، فسفاتیدیل کولین^۲ است که دارای یک سر قطبی آب‌دوست به نام فسفوکولین، یک پل گلیسرولی و یک زنجیره آسیل هیدروکربنی آب‌گریز است. در صورت قرارگرفتن این فسفولیپیدها در غشای لیپوزوم به تنهایی، غشا حالت سفت و محکم به خود می‌گیرد. به همین دلیل از جزء دیگری به نام کلسترول به منظور افزایش انعطاف غشا

آلودگی‌های زیست‌محیطی، پایداری پایین، حساسیت در برابر فاکتورهای محیطی و همچنین استفاده از مواد نه‌چندان مفید در فرمولاسیون آنها، روزبه‌روز در حال کاهش بوده و تولیدکنندگان مواد غذایی به استفاده از رنگ‌های طبیعی تمایل بیشتری نشان می‌دهند (Rocha, Fávoro-Trindade, & Grosso, 2012).

رنگ‌های طبیعی به لحاظ اثرات مثبت بر سلامت و بهداشت مردم، اثرات تغذیه‌ای و دارویی، عدم مشکلات محیطی و بازار مناسب، پتانسیل جایگزینی با رنگ‌های مصنوعی را دارا می‌باشند. از مهم‌ترین دلایل استفاده از رنگ‌ها در مواد غذایی می‌توان به افزایش رنگ محصول بخصوص در نوشیدنی‌ها، استاندارد نمودن رنگ و ظاهر محصول مانند مارگارین‌ها، شیرینی‌ها و دسرها، حفظ رنگ اولیه از دست‌رفته به هنگام عمل‌آوری مثل آرد، دسرها و سس‌های استریل‌شده، حفظ بو و همچنین ویتامین‌های حساس به نور، افزایش پذیرش ماده غذایی به عنوان محرک اشتها آور و همچنین استفاده از رنگ به عنوان ترکیب افزودنی مغذی با خصوصیات منحصربه‌فرد آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی اشاره نمود (Chen, Wu, Yang, & Wang, 2017). رشد سالانه رنگ‌های طبیعی مواد غذایی در بازار صنعت بین ۱۰-۱۵ درصد بوده که این امر به واسطه آگاهی مردم از عوارض و خطرهای رنگ‌های مصنوعی می‌باشد. باین حال مطالعه‌های محدودی روی فیکوبیلی پروتئین‌های غذایی (با خلوص بیشتر از ۷۰ درصد) گزارش شده است (Chen et al., 2017). این ترکیبات پتانسیل بالایی در به‌کارگیری به عنوان افزودنی و ترکیبات فراسودمند به علت طبیعی بودن، رنگ منحصربه‌فرد و همچنین دارا بودن صفات بیولوژیکی دارد. استفاده از رنگدانه‌های طبیعی در غذا با محدودیت‌هایی از قبیل حساسیت بالای این ترکیبات به حرارت، نور، واکنش‌های شیمیایی و اکسیداسیون، تخریب آنها در طول فراوری و نگهداری، توزیع ناهمگن مواجه شده و همچنین عطروطعم آنها ممکن است سبب تغییراتی در خواص حسی محصول غذایی گردد (El Asbahani et al., 2015). بنابراین در این راستا استفاده از تکنیک درون‌پوشانی، روشی عملی برای محافظت از ترکیبات زیست‌فعال در برابر هضم با استفاده از پوشش و تشکیل کپسول است. یکی از انواع حامل‌های لیپیدی که برای درون‌پوشانی مواد زیست‌فعال و غذا-دارو استفاده می‌شود، لیپوزوم‌ها می‌باشند. لیپوزوم‌ها

¹ Amphiphilic

² Phosphatidylcholine

موجود در مسیر استفاده از این ترکیبات ارزشمند در صنایع غذایی و دارویی، مورد توجه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جلبک قرمز گونه *گراسیلاریا گراسیلیس* از بانک ملی جلبک ایران خریداری گردید. کیتوزان با وزن مولکولی پایین (۵۰-۱۹۰ کیلودالتون) و (درجه داستیلاسیون ۷۵-۸۵ درصد) از شرکت سیگما آلد ریچ (آمریکا) سایر مواد شیمیایی مورد نیاز با درجه خلوص بالا از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*^۲ (PTCC1917) و *اشریشیا کلی*^۳ (PTCC1769) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران (تهران) تهیه شد. برای تهیه و آماده‌سازی تمام محلول‌ها از آب دیونیزه استفاده شد.

تهیه و خالص‌سازی فیکوبیلی پروتئین‌ها

فیکوبیلی پروتئین‌ها طبق روش (Morales, Sala, 2011) (Cerveira, & Kalil, 2011) با اندکی تغییرات استخراج گردید. جلبک خشک و آسیاب شده در بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار (pH= ۶/۸) تحت هم‌زدن مداوم تا به دست آمدن محلول سلول‌های جلبک خیسانده شدند. سلول‌های جلبک با استفاده از امواج اولتراسونیک حمام یخ شکسته شده و به مدت ۸ ساعت در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) تحت هم‌زدن قرار گرفت. بقایای سلولی توسط عمل سانتریفیوژ (مدل Hermle Z323K، ساخت آلمان) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جدا گردید. فیکوبیلی پروتئین‌ها طی دو مرحله توسط سولفات آمونیوم از سوپرناتانت جداسازی شدند. جداسازی طی سه مرحله سانتریفیوژ انجام شده و محلول به دست آمده در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH= ۶/۸) حل شد. نمونه برای انجام آزمایش‌های بعدی لیوفیلیزه (مدل FDB-5503، ساخت شرکت Operon، کره) گردید.

سنجش رنگیزه‌های فیکوبیلی پروتئین‌ها

سنجش رنگیزه‌های فیکوبیلی پروتئین‌ها روی پودر خشک جلبک قرمز *گراسیلاریا* مطابق روش (Wyman & Fay, 2010)

بهره می‌گیرند. نانولیپوزوم‌های پوشش داده شده با پلی‌مرهای فعال، موجب خواص مناسبی از جمله مخاط چسبی بهتر و نفوذپذیری بهتر از دیواره دستگاه گوارش می‌شود (Moghimipour, Aghel, Mahmoudabadi, Ramezani, & Handali, 2012). در سامانه‌های نوین داروسازی، لیپوزوم‌ها و نانولیپوزوم‌ها توانسته‌اند بخش وسیعی از تحقیق‌ها را به خود اختصاص دهند. به کارگرفتن چنین ساختارهایی با توجه به شباهت فراوانی که با غشاهای زیستی دارند و همچنین هدف‌گذاری آنها توانسته در کنار بهبود اثربخشی دارو کاهش قابل توجهی درزمینه عوارض دارویی نیز داشته باشد. از سوی دیگر با رهایش کنترل شده دارو در بافت‌های هدف، میزان داروی بیشتری به سلول‌های هدف رسیده و روند درمانی با سرعت بیشتری صورت خواهد پذیرفت (Takeuchi & Sugihara, 2010).

در تحقیق (Seyed Yagoubi, Shahidi, Mohebbi, Varidi, & Golmohammadzadeh, 2018) (۲۰۱۸) رنگدانه فیکوسیانیین جلبک *اسپیروولینا* در نانوذرات لیپیدی جامد و حامل‌های لیپیدی نانو ساختار درون پوشانی گردید. نتایج آنها نشان داد نوع و میزان چربی و سورفاکتانت تأثیر معنی‌داری بر میزان اندازه ذرات، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا داشت. (صفری، رفتنی‌امیری، & اسماعیل‌زاده کناری، ۱۳۹۶) (۱۳۹۶) به بهینه‌سازی استخراج رنگدانه فیکوسیانیین از جلبک *اسپیروولینا* پلاتنسیس^۱ و بررسی خواص کیفی رنگدانه ریزپوشانی شده با پوشش مالتودکسترین و کازئینات سدیم پرداختند. آنها دریافتند، فیکوسیانیین و بخصوص فرم ریزپوشانی شده به لحاظ پایداری در شرایط مختلف، می‌تواند به عنوان ماده آنتی‌اکسیدان و یا رنگ‌دهنده بیولوژیک در صنایع غذایی مورد استفاده قرار گیرد (صفری et al., 1396).

بنابراین با توجه به گستردگی و پراکنش بالای جلبک‌های دریایی در آب‌های جنوب و شمال کشور و همچنین وجود پتانسیل بالقوه تولید فراورده‌هایی با ارزش افزوده از این مواد، تحقیق حاضر با هدف امکان تولید و ارزیابی نانولیپوزوم‌های حامل رنگدانه فیکوبیلی پروتئین با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی برای غلبه بر چالش‌های

¹ *Staphylococcus aureus*

² *E. coli*

¹ *Spirulina platensis*

Accepted Article

برای تهیه نانولیپوزوم، ترکیبات فرمولاسیون لیپوزومی شامل لسیتین و روغن آفتابگردان به منظور اطمینان کامل از حل شدن لسیتین و روغن در حمام آبی در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. فیکوبیلی پروتئین لیوفیلیزه به مخلوط روغن آفتابگردان و لسیتین اضافه شده و با ۱۰۰۰ دور در دقیقه مخلوط گردید. محلول با افزودن آب دیونیزه و گلیسرول (غلظت نهایی ۲ درصد حجمی/حجمی) در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد هیدراته شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه هموزن شد. لیپوزوم های خام تحت فشار بالا هموزن شده و با نسبت های متفاوتی (غلظت ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد وزنی/حجمی) از محلول کیتوزان (محلول کیتوزان با حل شدن کیتوزان در اسید استیک ۱ درصد حجمی/حجمی تهیه گردید) در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت با دور ۲۰۰ دور در دقیقه مخلوط گردید. محلول لیپوزومی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با سونیکاتور (مدل Vibracl، 750 VCX، Sonics، ساخت آمریکا) با پروب ۲۰۰ یوپی اس تحت سونیکاسیون قرار گرفت. نانولیپوزوم ها در دمای محیط تحت گاز نیتروژن قرار گرفته و برای مراحل بعدی آزمایش نگهداری شدند (Rasti et al., 2012; حسنی، شهیدی نوقایی، & اجاق، ۱۳۹۸).

تعیین خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و ساختاری نانولیپوزوم ها

اندازه نانوذرات، توزیع اندازه ذره ای (PDI²) و پتانسیل زتا

اندازه ذره ای، توزیع اندازه ذره ای و پتانسیل زتای لیپوزوم ها پس از رقیق کردن نمونه به میزان ۱۰ برابر با بافر به روش تفرق نور پویا³ توسط دستگاه زتاسایزر (شرکت Malvern، انگلستان) (Nano ZS) انجام شد (Machado, Pinheiro, Vicente, Souza-Soares, & Cerqueira, 2019).

تعیین کارایی درون پوشانی

به منظور تعیین کارایی درون پوشانی (EE⁴) نانولیپوزوم های حاوی فیکوبیلی پروتئین از روش غیرمستقیم (روش

1986) (۱۹۸۶) انجام شد. بدین منظور ۰/۱ گرم از نمونه خشک شده به مدت ۲ ساعت در یخچال (۴ درجه سانتیگراد)، به کمک گلیسرول تحت فشار اسمزی شدید قرار گرفت. سپس، سلول ها توسط استات سدیم ۰/۳ نرمال و آب مقطر شکسته شده به نحوی که غلظت نهایی استات سدیم در محلول ۲۰۰ میلی مولار گردد. در نهایت جذب نمونه ها در مقابل بلانک تهیه شده از مواد مورد استفاده در استخراج فیکوبیلی پروتئین در طول موج های ۵۶۲، ۶۱۵، ۵۲۶ و ۷۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل 6800 UV/VIS، شرکت Jenway، ساخت آلمان) خوانده شد. برای محاسبه فیکوبیلی پروتئین ها بر حسب میلی گرم در گرم از رابطه های (۱)، (۲) و (۳) استفاده گردید.

رابطه (۱)

$$(AP) = [1000 (A_{615} - A_{750}) - 208(A_{615} - A_{750})] / 5109$$

رابطه (۲)

$$(PC) = [1000 (A_{615} - A_{750}) - 474(A_{615} - A_{750})] / 5134$$

رابطه (۳)

$$(PE) = [1000 (A_{615} - A_{750}) - 2/41(PC) - 0/948(AP)] / 962$$

در این روابط A مقدار جذب در طول موج ارائه شده (نانومتر) می باشد.

آنالیز ترکیب آمینواسیدی

پودر لیوفیلیزه فیکوبیلی پروتئین ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد به وسیله اسید هیدروکلریک ۶ مولار هضم شده و سپس توسط آب مقطر رقیق گردید. ۰/۵ میلی لیتر از محلول برداشته شده و با ۰/۵ میلی لیتر بافر مخلوط شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه نهایی به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا¹ (مدل Kenauer، ساخت آلمان) (به کمک دتکتور UV-Vis با دو طول موج ۴۴۰ و ۵۷۰ نانومتر و ستون تبادل کاتیونی با ابعاد ۴/۶×۲۰۰) تزریق گردید (Volkman, Imianovsky, Oliveira, & Sant'Anna, 2008).

تهیه نانولیپوزوم

² Particle dispersity index

³ Dynamic light scattering

⁴ Encapsulation efficiency

¹ High Performance Liquid Chromatography

فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد با استفاده از رابطه (۵) محاسبه شد:

رابطه (۵)

$$100 \times \frac{\text{جذب شاهد} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب شاهد}} = \text{فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد}$$

(درصد)

قدرت مهارکنندگی رادیکال (ABTS)

قدرت مهارکنندگی رادیکال ۲و۲-آزینوبیس (۳-اتیل بنزوتیازولین ۶-سلفونیک اسید) (ABTS^۳) براساس روش بنزوتیازولین ۶-سلفونیک اسید (Wang, Li, Chi, Zhang, & Luo, 2012) (۲۰۱۲) با اندکی اصلاح اندازه‌گیری گردید. در ابتدا نانولیپوزوم‌ها به مدت ۵ دقیقه به منظور رهایش در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در آن قرار گرفت. سپس محلول ABTS (۷ میلی‌مولار) با پتاسیم پرسولفات (۲/۴۵ میلی‌مولار) مخلوط شده و در تاریکی به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. محلول رادیکال ABTS در بافر فسفات پتاسیم نمکی (۷/۴ pH) تا رسیدن به جذب ۰/۷±۰/۰۲ در ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. سپس ۹۸۰ میلی‌لیتر از محلول ABTS با ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف نمونه مخلوط و میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۳۴ نانومتر قرائت گردید. محلول ABTS همراه با آب مقطر به‌عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته و توانایی مهارکنندگی رادیکال ABTS نیز با استفاده از رابطه (۵) محاسبه گردید.

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی فیکوبیلی پروتئین و نانولیپوزوم‌های حامل

جهت ارزیابی خصوصیات ضد میکروبی فیکوبیلی پروتئین و نانولیپوزوم‌های حامل با فرمولاسیون‌های مختلف در مقابل باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی با تعیین حداقل میزان ممانعت‌کننده (MIC^۴) و حداقل میزان کشندگی (MBC^۵) از روش تهیه رقت^۶ استفاده شد (Hashemi et al., 2017).

تجزیه و تحلیل آماری

تحقیق حاضر در قالب طرح آماری بلوک‌های کاملاً تصادفی به اجرا درآمد. آنالیز نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام گرفت و نتایج به صورت

فیلتراسیون توسط فالدکون‌های فیلتردار ۵۰ میلی‌لیتر آمیکون با وزن مولکولی برابر ۱۰۰ کیلودالتون) استفاده شد. به این منظور مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر از نانولیپوزوم حامل به فالدکون اضافه شده، سپس درب فالدکون کاملاً بسته شده و درون روتور دستگاه قرار داده شد. سپس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ مقدار مایع عبور داده شده از فیلتر جدا شده و مقدار جذب توسط دستگاه طیف‌سنج نوری (مدل 6800 UV/VIS، ساخت شرکت Jenway، آلمان) قرائت گردید (Fathi, Mozafari, & Mohebbi, 2012). درصد کارایی درون‌پوشانی مطابق رابطه (۴) محاسبه شد:

رابطه (۴)

$$WT - WF / WT = \text{درصد کارایی درون‌پوشانی}$$

در رابطه (۴)، W_T معادل وزن کل فیکوبیلی پروتئین به کاررفته در فرمولاسیون نانولیپوزوم و W_F معادل مقدار فیکوبیلی پروتئین آزاد در فاز فیلترشده است.

ظرفیت مهارکنندگی رادیکال آزاد (DPPH)

ظرفیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ۱و۱-دی‌فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH^۱) در نمونه‌ها طبق روش (Taheri, Sabeena Farvin, Jacobsen, & Baron, 2014) (۲۰۱۴) با اندکی تغییرات اندازه‌گیری شد. قبل از انجام آزمایش نانولیپوزوم‌ها به مدت ۵ دقیقه به منظور رهایش در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس ۲ میلی‌لیتر از نمونه با ۲ میلی‌لیتر از DPPH ۰/۱۶ میلی‌مولار (محلول در اتانول ۹۵ درصد) مخلوط شد. نمونه‌ها در تاریکی و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرارداده شده و در انتها میزان جذب محلول حاصل در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری گردید. نمونه شاهد نیز به روش مشابه تهیه و اتانول ۹۵ درصد جایگزین نمونه قرار گرفت. منحنی استاندارد با استفاده از بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT^۲) در محدوده صفر تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آماده شد. در آزمون حاضر اسید آسکوربیک به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده و^۲

¹ 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl

² Butylated hydroxytoluene

³ 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

⁴ Minimum Inhibitory Concentration

⁵ Minimum Bacteriocidal Concentration

⁶ Broth dilution

به دست آمد. با توجه به مطالعه‌های پیشین مقادیر رنگی‌های فیکوبیلینی ۱۰ گونه از جلبک‌های قرمز در رنگی‌های فیکواریترین در محدوده ۰/۱۸ تا ۱/۲۳ میلی‌گرم بر گرم، فیکوسیانیین در محدوده ۰/۱۶ تا ۰/۳۶ میلی‌گرم بر گرم و برای آلفوفیکوسیانیین ۰/۴۳ تا ۰/۱۲ گزارش گردید. نتایج مطالعه‌های حاضر با یافته‌های پیشین همخوانی داشت. نتایج نشان داد محیط رشد و فصل‌های مختلف سال تأثیرات چشمگیری بر غلظت رنگی‌های موجود در جلبک دارد (Pandey, Pandey, & Sharma, 2013). طبق گزارش آنها بیشترین غلظت رنگی‌های فیکوبیلینی در فصل زمستان هنگامی که پرتو نور و غلظت عناصر غذایی در منطقه برای بیوسنتز این متابولیت‌ها مناسب است، یافت شد.

میانگین \pm انحراف معیار توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) بیان شد. مقایسه میانگین بین داده‌های مختلف و تفاوت معنی‌داری آن‌ها با آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) انجام شد.

نتایج و بحث

شناسایی رنگی‌های فیکوبیلی پروتئین‌ها

سنجش رنگی‌های جلبک قرمز *گراسیلاریا* انجام گردید و میزان رنگی‌های فیکوبیلینی بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک جلبک به دست آمد (جدول ۱). با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، از میان پیگمانت‌های فیکوبیلینی بیشترین مقدار مربوط به فیکواریترین با 1.03 ± 0.27 و کمترین مقدار مربوط به آلفوفیکوسیانیین با 0.23 ± 0.01 و سپس در فیکوسیانیین (0.7 ± 0.0)

جدول ۱- میزان رنگی‌های فیکوبیلی پروتئین (میلی‌گرم بر گرم وزن مرطوب) در جلبک *گراسیلاریا گراسیلیس*

نوع رنگی‌ه	آلفوفیکوسیانیین (APC)	فیکوسیانیین (PC)	فیکواریترین (PE)	فیکوبیلی پروتئین کل
میزان رنگی‌ه	0.23 ± 0.01	0.7 ± 0.0	1.03 ± 0.27	1.96 ± 0.18

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار است.

(2017) (۲۰۱۷) در بررسی پروفایل اسیدهای آمینه در جلبک پورفیرا^۹ گزارش گردید که حاکی از وجود ۵۰/۴۷ درصد از اسیدهای آمینه آب‌گریز در فیکوبیلی پروتئین‌های مستخرج از جلبک بود.

جدول ۲- ترکیبات اسید آمینه فیکوبیلی پروتئین‌ها (PBPs)

اسید آمینه	مقادیر (درصد)
اسید گلوتامیک	۴/۱۲
پرولین	۲/۸۷
تریپتوفان	۱/۴۳
سیستئین	۰/۱۳
ایزولوسین	۶/۱۴
ترئونین	۶/۳۲
تیروزین	۰/۳۸
اسید آسپارتیک	۵/۲۴
سرین	۶/۷۶
گلیسین	۵/۴۵
والین	۹/۹
آلانین	۱۶/۲۳
متیونین	۰/۶۳
لیزین	۴/۴۵

آنالیز ترکیبات اسید آمینه فیکوبیلی پروتئین‌ها

ترکیب اسید آمینه نقش مهمی در خصوصیات و عملکردهای پروتئین دارد، ترکیب اسید آمینه فیکوبیلی پروتئین‌ها (PBPs) در جدول (۲) ارائه شده است. PBPs غنی از آلانین^۱ (۱۶/۲۳ درصد)، والین^۲ (۹/۹ درصد)، و لوسین^۳ (۹/۱۲ درصد) بود. اسیدهای آمینه اسیدی (اسید گلوتامیک^۴ و اسید آسپارتیک^۵) و اسیدهای آمینه قلیایی (آرژنین^۶، هیستیدین^۷ و لیزین^۸) به ترتیب ۹/۳۶ و ۷/۳۳ درصد را تشکیل می‌دهند. اسیدهای آمینه آب‌گریز ۵۶/۱۱ درصد را به خود اختصاص داد، که به فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی PBPs اختصاص داده می‌شود. علاوه بر این، فیکوبیلی پروتئین‌ها با محتوای بالای اسیدهای آمینه ضروری دارای ارزش تغذیه‌ای بالایی می‌باشند. نتایج مشابهی توسط (Chen et al.,

¹ Alanine

² Valine

³ Leucine

⁴ Glutamic acid

⁵ Aspartic acid

⁶ Arginine

⁷ Histidine

⁸ Lysine

⁹ Porphyrin

همچنین صحت تشکیل آن توسط انواع روش‌های میکروسکوپی مورد تأیید قرار گرفته است (Hasani, Katouzian & Taheri, Ojagh, & Ghorbani, 2018). میانگین اندازه ذرات با افزودن پوشش کیتوزان کاهش یافته و سپس با افزایش غلظت کیتوزان افزایش یافت. نتایج حاضر نشان داد استفاده از کیتوزان تا غلظت ۰/۵ درصد کیتوزان طی پوشش‌دهی به سمت تشکیل لیپوزوم‌های با قطر کوچک‌تر توسط نیروی انقباضی ایجاد شده توسط کشش‌های یونی رفته و با افزایش مقادیر کیتوزان یک لایه ضخیم‌تر ساخته شده که منجر به تولید لیپوزوم بزرگ‌تر شده است. همچنین، پایداری ذرات در برابر چسبندگی و ممانعت از تشکیل رسوب به دلیل وجود دافعه الکترواستاتیکی بین ذرات می‌باشد (Salminen, Gömmel, Leuenberger, & Weiss, 2016).

مطالعه دیگری افزایش اندک اندازه لیپوزوم‌های حامل ویتامین E را پس از فرایند پوشش‌دهی گزارش نمودند که با مطالعه حاضر مطابقت داشت (Liu & Park, 2009). (Bang et al., 2011) (۲۰۱۱) در بررسی افزودن کیتوزان به عنوان پوشش با درجه‌های مختلف استیل‌زدایی (۸۰، ۸۸ و ۹۵ درصد) و وزن مولکولی (۳۰۰۰، ۳۰۰۰۰ و ۱۵۰۰۰۰ دالتون)، دریافتند که با افزایش درجه داستیلاسیون تا غلظت ۰/۲ و ۰/۳ درصد، اندازه نانولیپوزوم‌های پوشش‌دار شده افزایش و سپس کاهش می‌یابد.

لوسین	۹/۱۲
فنیل‌آلانین	۴/۹۷
هیستیدین	۰/۶۸
آرژنین	۲/۲۰

ارزیابی فیزیکوشیمیایی نانولیپوزوم‌های حامل PBPs بررسی اندازه ذرات و شاخص پراکندگی (PDI)

میانگین اندازه ذرات، شاخص پراکندگی ذرات و راندمان نانوپوشانی در PBPs نانوکپسوله شده در لیپوزوم با فرمولاسیون‌های مختلف، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مربوط به اندازه ذرات و شاخص پراکندگی در جدول (۳) آورده شده است. نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش کیتوزان با میانگین $557/7 \pm 25/9$ نانومتر و نانولیپوزوم‌های تهیه شده با پوشش کیتوزان (۰/۵ درصد) با میانگین $336/9 \pm 21/30$ نانومتر به ترتیب بیشترین و کمترین مقادیر اندازه ذرات را دارا بودند. همان‌طور که در منحنی توزیع اندازه ذرات مشاهده می‌شود نتایج نشان‌دهنده یکنواخت بودن توزیع اندازه ذرات و در نتیجه موفقیت فرایند تولید نانولیپوزوم با درصدهای مختلف پوشش کیتوزان می‌باشد. همچنین شاخص پراکندگی در نانولیپوزوم‌ها از ۰/۲۵ تا ۰/۲۸ متغیر بود که نشان‌دهنده پراکندگی کمتر و همگن بودن اندازه ذرات می‌باشد. لیپوزوم‌های پوشش‌دهی شده با کیتوزان که به نام کیتوزوم نیز نامیده می‌شود، توسط پژوهشگران پیشین گزارش شده و

جدول ۳- تأثیر سطوح مختلف کیتوزان (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد) بر خصوصیات فیزیکی نانولیپوزوم‌های حامل فیکوبیلی پروتئین

تیمارها	راندمان درون پوشانی (درصد)	میانگین اندازه ذرات (نانومتر)	شاخص پراکندگی	پتانسیل زتا (میلی‌ولت)
نانولیپوزوم فاقد پوشش کیتوزان	$70/14 \pm 1/24^d$	$557/7 \pm 25/9^a$	$0/25 \pm 0/0^a$	$-10/8 \pm 1/85^c$
نانولیپوزوم با پوشش (۰/۵ درصد کیتوزان)	$75/1 \pm 68/2^c$	$336/9 \pm 21/3^c$	$0/26 \pm 0/03^a$	$22/6 \pm 2/7^b$
نانولیپوزوم با پوشش (۱ درصد کیتوزان)	$80/1 \pm 98/12^b$	$406/8 \pm 12/7^b$	$0/28 \pm 0/0^a$	$30/33 \pm 1/45^a$
نانولیپوزوم با پوشش (۱/۵ درصد کیتوزان)	$83/0 \pm 98/73^a$	$515/5 \pm 41/2^a$	$0/26 \pm 0/03^a$	$21/31 \pm 5/21^b$

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار است.

حروف کوچک در هر ستون نشان دهنده معنی‌داری بین تیمارهای مختلف می‌باشد.

مخزنی برای ترکیبات زیست‌فعال همانند رنگدانه‌ها عمل می‌کنند. نانولیپوزوم‌های تهیه شده با ۱/۵ درصد کیتوزان دارای بالاترین راندمان نانوپوشانی ($83/98 \pm 0/73$ درصد) و نانولیپوزوم‌های با پوشش ۱ درصد ($80/98 \pm 1/12$ درصد) و ۰/۵ درصد ($75/68 \pm 1/20$ درصد) و فاقد پوشش

ارزیابی راندمان نانوپوشانی نانولیپوزوم‌های حامل PBPs در ساختار لیپوزوم دو بخش آبدوست و آب‌گریز وجود دارد، به طوری که ترکیبات آبدوست در محیط آبی درون لیپوزوم و ترکیبات آب‌گریز توسط دو لایه فسفولیپیدی احاطه می‌شوند. بنابراین دو لایه فسفولیپیدی به عنوان

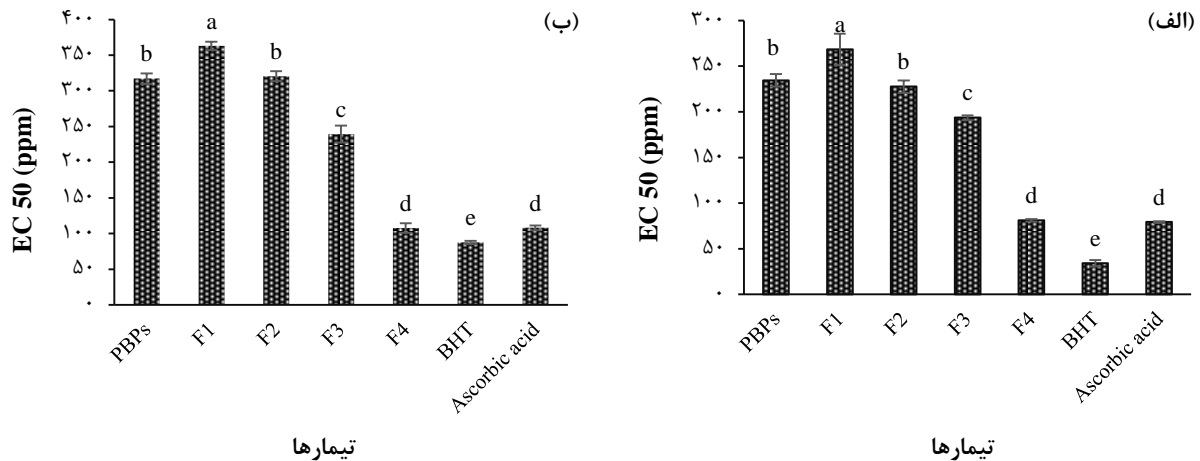
اندازه گیری میزان مهار رادیکال های آزاد DPPH و ABTS از روش های معتبر، دقیق، آسان و مقرون به صرفه با قابلیت تکرارپذیری بالا است که در بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فعال زیستی در شرایط آزمایشگاهی به کار می رود. نتایج به وضوح نشان داد رنگدانه فیکوبیلی پروتئین به صورت آزاد و کپسوله در لیپوزوم فعالیت مهارکنندگی مناسبی در برابر رادیکال آزاد DPPH داشت و مهار رادیکال آزاد در نانولیپوزوم های حاوی رنگدانه بالاتر از رنگدانه آزاد بود. نتایج نشان داد تیمارهای کپسوله شده با پوشش کیتوزان (۱/۵ درصد) بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را نسبت به دیگر تیمارها داشتند ($P \leq 0.05$). نتایج به دست آمده می تواند مربوط به حضور کیتوزان در ترکیب دیواره فسفولیپیدی لیپوزوم باشد. از آنجایی که این ترکیبات دارای گروه های هیدروکسیل در ساختار شیمیایی خود هستند که با اهدای الکترون آزاد به افزایش شدت فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس کمک می کنند. مهارکننده های رادیکال آزاد می توانند با رادیکال های پراکسید واکنش داده، واکنش های زنجیره ای اکسیداسیون را محدود کرده و مانع از فعالیت آنها گردند. محققان دریافتند کیتوزان به عنوان یک ترکیب با خاصیت آنتی اکسیدانی به وسیله مهار رادیکال های اکسیژن مانند هیدروکسیل، سوپر اکسید، الکیل و همچنین رادیکال های پایدار DPPH و ABTS عمل می کند (Younes & Rinaudo, 2015). به علاوه گزارش گردیده است که ویژگی مهار رادیکال آزاد در کیتوزان متأثر از وزن مولکولی آن می باشد. به طوری که کیتوزان های با وزن مولکولی پایین تر فعال تر از کیتوزان با وزن های مولکولی بالا می باشند. با توجه به شکل (۱) می توان بیان کرد نه تنها نانوپوشانی رنگدانه تأثیر منفی بر بروز خصوصیات آنتی اکسیدانی PBPs محصور شده نداشت، بلکه سبب تولید رنگدانه کپسوله با پایداری بیشتر با فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتر گردید. (Ha et al., 2015) (۲۰۱۵) مشاهده کردند اثر آنتی اکسیدانی نانوکپسول حاوی لیکوپن بیشتر از ماده فعال خالص بود و این تأثیر را ناشی از پراکندگی بسیار بالای لیکوپن در نانوکپسول و واکنش سریع با رادیکال های آزاد مرتبط دانستند.

(جدول ۳). نتایج راندمان نانوپوشانی گزارش شده در پژوهش حاضر مشابه نتایج در پژوهش های قبلی (Katouzian & Taheri, 2021; حسنی 1398 et al.) در مورد نانولیپوزوم ها می باشد. به طور کلی ثابت گردید که راندمان درون پوشانی مواد در ساختار لیپوزوم می تواند تحت تأثیر اندازه و سطح مخصوص قرار گیرد. با این وجود مطالعه حاضر رابطه مستقیم اندازه ذرات و راندمان نانوپوشانی را برای لیپوزوم های حاوی رنگدانه نشان داد. با توجه به نتایج می توان دریافت مولکول های کیتوزان به سطح لیپوزوم متصل شده و تشکیل پوسته سختی را می دهند و تحرک غشای لیپیدی را محدود می نماید، در نتیجه غشا سخت تر و مقاوم تر می شود (Seyedabadi, Rostami, Jafari, & Fathi, 2021).

ارزیابی پتانسیل زتا نانولیپوزوم های حامل PBPs

پتانسیل زتا یکی از فاکتورهای مهم در پایداری نانوذرات است. پتانسیل زتا نانولیپوزوم ها در جدول (۳) نشان داده شده است. هرچه اندازه پتانسیل زتا بالاتر باشد، بار سطحی نانوذرات بیشتر و در نتیجه دافعه الکترواستاتیک نیز افزایش می یابد. مقادیر پایین پتانسیل زتا سبب کاهش پایداری و به هم چسبیدگی نانوذرات می گردد. پتانسیل زتا در نمونه ها از -10.8 ± 1.85 تا 30.33 ± 1.45 میلی ولت متغیر بود. دلیل منفی بودن بار سطحی نانولیپوزوم فاقد پوشش، وجود لیسیتین به عنوان یک امولسیفایر یونی می باشد. با افزودن کیتوزان، با توجه به نیروهای الکترواستاتیکی منفی و مثبت بین فسفولیپیدهای لیپوزوم و کیتوزان پوشش دهی صورت می گیرد. کیتوزان در شرایط اسیدی به خاطر وجود گروه های آمین آزاد، دارای بار مثبت می باشد. بعد از فرایند پوشش دهی، پیوندهای یونی بین گروه ها و سطح لیپوزوم های با بار منفی، سبب تغییر پتانسیل زتا از بار منفی به مثبت می شود. به طور کلی با افزایش غلظت کیتوزان، بار سطحی ذاتی افزایش و واکنش یونی بین لیپوزوم و کیتوزان افزایش می یابد.

فعالیت آنتی اکسیدانی و نانولیپوزوم های حامل PBPs



شکل ۱- مقایسه قدرت آنتی‌اکسیدانی فیکوبیلی پروتئین آزاد (PBPs)، نانوکپسوله با فرمولاسیون‌های مختلف در مقابل BHT و اسید آسکوربیک به روش الف) DPPH و ب) ABTS

F1: نانولیپوزوم حاوی PBPs فاقد پوشش کیتوزان، F2: نانولیپوزوم حاوی PBPs با پوشش ۵/۰ درصد کیتوزان، F3: نانولیپوزوم حاوی PBPs با پوشش ۱ درصد کیتوزان، F4: نانولیپوزوم حاوی PBPs با پوشش ۱/۵ درصد کیتوزان

باشد که ممکن است در باکتری‌های گرم منفی از ورود ترکیبات فعال به غشای سیتوپلاسمی جلوگیری به عمل آورد. در مطالعه (Cui, Zhou, & Lin, 2016) (۲۰۱۶) مشاهده شد انکپسوله نمودن اسانس گیاه مریم‌گلی در نانولیپوزوم سبب ثبات بیشتر اسانس و افزایش اثرات ضد میکروبی آن در مقایسه با اسانس آزاد گردید. این عمل مبتنی بر افزایش فعالیت ضد میکروبی سیستم‌های حامل در مقیاس نانو در مقایسه با شکل آزاد می‌باشد. نتایج بررسی MIC و MBC در تیمارهای مختلف نشان داد که با افزایش غلظت کیتوزان فعالیت ضد باکتریایی نانولیپوزوم‌ها در برابر هر دو باکتری مورد آزمایش بهبود می‌یابد. مطالعه‌های بسیاری تأیید نمودند که کیتوزان می‌تواند به عنوان ترکیبی زیست‌تخریب‌پذیر با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی بالا به عنوان پوشش و فیلم خوراکی عمل کند (Hosseini et al., 2013). به علاوه بیان گردید که در خصوص باکتری‌های گرم منفی /شریشیالکی، توانایی ضد باکتری کیتوزان با کاهش وزن مولکولی افزایش می‌یابد. این محققان دو مکانیسم را برای فعالیت ضد میکروبی پیشنهاد کردند: در مورد باکتری /استافیلوکوکوس اورئوس، کیتوزان روی سطح سلول یک غشای پلی‌مری تشکیل داده که از ورود مواد مغذی به داخل سلول جلوگیری می‌کند و موجب مرگ سلول باکتری می‌گردد. در خصوص باکتری /شریشیالکی نیز

بررسی خصوصیات ضد میکروبی و نانولیپوزوم‌های حامل PBPs

جهت تعیین حداقل میزان ممانعت‌کننده (MIC) و حداقل میزان کشنده (MBC) در نمونه‌ها از روش تهیه رقت استفاده شد. مقادیر MIC و MBC رنگدانه خام و نانولیپوزوم (با درصدهای مختلف کیتوزان) در مقایسه با آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین در جدول (۴) آورده شده است. که نشان‌دهنده سنجش فعالیت عوامل ضد میکروبی است. نتایج بیانگر آن بود که هر دو رنگدانه خام و کپسوله فعالیت ضد میکروبی بالایی را نشان دادند. بر اساس یافته‌های حاصل از هر دو سویه باکتری مورد آزمایش، فعالیت ضد میکروبی رنگدانه در فرم نانولیپوزوم بیشتر از رنگدانه خالص بود. مقادیر MIC و MBC در مقابل باکتری /شریشیالکی در مقایسه با باکتری /استافیلوکوکوس اورئوس بالاتر بود که نشان‌دهنده مقاومت بیشتر باکتری /شریشیالکی در برابر غلظت‌های مختلف نانولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات زیست‌فعال ضد میکروبی می‌باشد. به علاوه، نتایج تحقیق حاضر حاکی از آن بود که مقادیر MIC و MBC هر دو سویه مورد آزمایش در حضور مقادیر بالاتر کیتوزان کاهش می‌یابند.

به‌طور کلی تأثیر ترکیبات زیست‌فعال گیاهی با ویژگی‌های ضد میکروبی روی باکتری‌های گرم مثبت، بیشتر از باکتری‌های گرم منفی می‌باشد. دلیل حساسیت بالاتر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی می‌تواند به علت عدم وجود دیواره سلولی لیپوپلی ساکاریدی

Accepted Article

کیتوزان با وزن مولکولی پایین به راحتی می تواند وارد سلول باکتری شود (Younes & Rinaudo, 2015).

جدول ۴- حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی میکروارگانیزم ها برحسب میکروگرم بر میلی لیتر در PBPs آزاد و کپسوله شده در نانولیپوزوم

آمی سیلین		PBPs										میکروارگانیزم ها
		نانولیپوزوم (وزنی/حجمی)										
۱/۵ درصد کیتوزان		۱ درصد کیتوزان		۰/۵ درصد کیتوزان		فاقد کیتوزان		آزاد				
MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	
۲۰	۴۰	۲۰	۸۰	۸۰	۳۲۰	۳۲۰	۶۴۰	۶۴۰	۱۲۸۰	۳۲۰	۱۲۸۰	استافیلوکوکوس اورئوس
۴۰	۸۰	۸۰	۳۲۰	۱۶۰	۶۴۰	۶۴۰	۱۲۸۰	۱۲۸۰	۲۵۶۰	۱۲۸۰	۲۵۶۰	اشریشیاکلی

نتیجه گیری

رنگدانه در لیپوزوم با پوشش کیتوزان به طور مؤثری تأثیرهای مفید رنگدانه آزاد از جمله خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی آن را بهبود بخشید. لذا، می توان دریافت به کارگیری فناوری تهیه نانولیپوزوم با پوشش پلی مری مانند کیتوزان به دلیل عدم استفاده از هرگونه حلال و مواد سمی و شرایط مناسب تولید به عنوان یکی از سیستم های نوین در پایدارسازی و بهبود خصوصیات عملکردی رنگدانه های پروتئینی مطرح گردد.

یافته های تحقیق حاضر نشان داد جلبک قرمز *Gracilaria gracilis* گراسیلیس منبع خوبی به لحاظ دارابودن رنگیزه های فیکوبیلی پروتئینی و آنتی اکسیدان های غیرآزیمی و آزیمی محسوب می شود. مطابق با نتایج به دست آمده، می توان گفت نانوحامل های لیپوزومی به عنوان یکی از سامانه های مؤثر در نانوپوشانی ترکیبات زیست فعال مانند فیکوبیلی پروتئین محسوب می شود. نانوکپسولاسیون

منابع

- باقری دینانی، ش.، دهپور جویباری، ع.، & اسلامی، ب. (۱۳۹۳، مرداد). بررسی اجزای متشکله روغن های اسانسی و اثرات ضد میکروبی عصاره های مختلف جلبک *Gracilaria gracilis* ارائه شده در دومین همایش ملی گیاهان دارویی و کشاورزی پایدار، همدان. <https://civilica.com/doc/306228>
- حسینی، ش.، شهیدی نوقابی، م.، & اجاق، س. (۱۳۹۸). تولید و ارزیابی نانولیپوزوم های حامل پپتیدهای زیست فعال به دست آمده از ضایعات ماهی با استفاده از آنزیم آلکالاز. پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، ۸(۱)، ۳۱-۴۴. doi:<https://dx.doi.org/10.22101/jrifst.2019.04.30.813>
- صفری، ر.، رفتنی امیری، ز.، & اسماعیل زاده کناری، ر. (۱۳۹۶). ارزیابی تاثیر دما، زمان و pH بر پایداری رنگدانه فیکوسیانین استخراج شده از جلبک اسپیرولینا (*Spirulina platensis*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۶(۵)، ۸۵-۹۳. doi:<https://doi.org/10.22092/isfj.2017.115342>
- Assis, L. M. d., Machado, A. R., Motta, A. d. S. d., Costa, J. A. V., & Soares, L. A. d. S. (2014). Development and characterization of nanovesicles containing phenolic compounds of microalgae *Spirulina* strain LEB-18 and *Chlorella pyrenoidosa*. *Advances in Materials Physics and Chemistry*, 4, 6-12. doi:<http://dx.doi.org/10.4236/ampc.2014.41002>
- Bagheri Dinani, S., Dehpour, A., & Eslami, B. (2014, Agust). *Investigation of essential oil components and antimicrobial effects of various extracts of Gracilaria gracilis*. Paper presented at the Second National Conference on Medicinal Plants and Sustainable Agriculture, Hamedan. <https://civilica.com/doc/306228/> (in Persian)
- Bang, S., Hwang, I., Yu, Y., Kwon, H., Kim, D., & Park, H. J. (2011). Influence of chitosan coating on the liposomal surface on physicochemical properties and the release profile of nanocarrier systems. *Journal of microencapsulation*, 28(7), 595-604. doi:<https://doi.org/10.3109/02652048.2011.557748>

- Beheshtipour, H., Mortazavian, A. M., Mohammadi, R., Sohrabvandi, S., & Khosravi-Darani, K. (2013). Supplementation of *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* algae into probiotic fermented milks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(2), 144-154. doi:https://doi.org/10.1111/1541-4337.12004
- Chen, X., Wu, M., Yang, Q., & Wang, S. (2017). Preparation, characterization of food grade phycobiliproteins from *Porphyra haitanensis* and the application in liposome-meat system. *Lwt*, 77, 468-474. doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.005
- Cui, H., Zhou, H., & Lin, L. (2016). The specific antibacterial effect of the *Salvia* oil nanoliposomes against *Staphylococcus aureus* biofilms on milk container. *Food Control*, 61, 92-98. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.034
- El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. A., Casabianca, H., . . . Renaud, F. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, 483(1-2), 220-243. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069
- Fathi, M., Mozafari, M. R., & Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 23(1), 13-27. doi:https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.003
- Ghorbanzade, T., Jafari, S. M., Akhavan, S., & Hadavi, R. (2017). Nano-encapsulation of fish oil in nanoliposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chemistry*, 216, 146-152. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.022
- Ha, T. V. A., Kim, S., Choi, Y., Kwak, H.-S., Lee, S. J., Wen, J., . . . Ko, S. (2015). Antioxidant activity and bioaccessibility of size-different nanoemulsions for lycopene-enriched tomato extract. *Food Chemistry*, 178, 115-121. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.048
- Hasani, S., Ojagh, S. M., & Ghorbani, M. (2018). Nanoencapsulation of lemon essential oil in Chitosan-Hicap system. Part 1: Study on its physical and structural characteristics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 143-151. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.038
- Hasani, S., Shahidi Noghabi, M., & Ojagh, S. M. (2019). The Production and Evaluation of Nanoliposomes Containing Bioactive Peptides Derived from Fish Wastes Using the Alkalase Enzyme. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 8(1), 31-44. doi:https://dx.doi.org/10.22101/jrifst.2019.04.30.813 (in Persian)
- Hashemi, M., Ehsani, A., Hassani, A., Afshari, A., Aminzare, M., Sahranavard, T., & Azimzadeh, Z. (2017). Phytochemical, Antibacterial, Antifungal and Antioxidant Properties of *Agastache foeniculum* Essential Oil. *Journal of Chemical Health Risks*, 7(2), -. doi:https://dx.doi.org/10.22034/jchr.2017.544170
- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., & Ghavi, F. F. (2013). Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. *Food Chemistry*, 136(3), 1490-1495. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.081
- Katouzian, I., & Taheri, R. A. (2021). Preparation, characterization and release behavior of chitosan-coated nanoliposomes (chitosomes) containing olive leaf extract optimized by response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 58(9), 3430-3443. doi:https://doi.org/10.1007/s13197-021-04972-2
- Liu, N., & Park, H.-J. (2009). Chitosan-coated nanoliposome as vitamin E carrier. *Journal of microencapsulation*, 26(3), 235-242. doi:https://doi.org/10.1080/02652040802273469
- Machado, A. R., Pinheiro, A. C., Vicente, A. A., Souza-Soares, L. A., & Cerqueira, M. A. (2019). Liposomes loaded with phenolic extracts of *Spirulina* LEB-18: Physicochemical characterization and behavior under simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 120, 656-667. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.023
- Moghimpour, E., Aghel, N., Mahmoudabadi, A. Z., Ramezani, Z., & Handali, S. (2012). Preparation and characterization of liposomes containing essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* leaf. *Jundishapur journal of natural pharmaceutical products*, 7(3), 117.
- Moraes, C. C., Sala, L., Cerveira, G. P., & Kalil, S. J. (2011). C-phycoyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(1), 45-49. doi:https://doi.org/10.1590/S0104-66322011000100006

- Nabivailo, Y. V., Skriptsova, A. V., & Titlyanov, E. A. (2005). Interactions of Algae within the Community of *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Russian Journal of Marine Biology*, 31(5), 288-293. doi:https://doi.org/10.1007/s11179-005-0090-x
- Page, D. T., & Cudmore, S. (2001). Innovations in oral gene delivery: challenges and potentials. *Drug Discovery Today*, 6(2), 92-101. doi:https://doi.org/10.1016/S1359-6446(00)01600-7
- Pandey, V., Pandey, A., & Sharma, V. (2013). Biotechnological applications of cyanobacterial phycobiliproteins. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(9), 89-97.
- Peng, C., Hong-Bo, S., Di, X., & Song, Q. (2009). Progress in *Gracilaria* Biology and Developmental Utilization: Main Issues and Prospective. *Reviews in Fisheries Science*, 17(4), 494-504. doi:https://doi.org/10.1080/10641260903144586
- Rasti, B., Jinap, S., Mozafari, M. R., & Yazid, A. M. (2012). Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods. *Food Chemistry*, 135(4), 2761-2770. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.016
- Rocha, G. A., Fávaro-Trindade, C. S., & Grosso, C. R. F. (2012). Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bioprocess Technology*, 90(1), 37-42. doi:https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.01.001
- Safari, R., Raftani Amiri, Z., & Esmaeilzadeh Kenari, R. (2018). Evaluation of the effect of temperature, time and pH on stability of phycocyanin extracted from *Spirulina platensis*. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 26(5), 85-93. doi:https://doi.org/10.22092/isfj.2017.115342 (in Persian)
- Salminen, H., Gömmel, C., Leuenerberger, B. H., & Weiss, J. (2016). Influence of encapsulated functional lipids on crystal structure and chemical stability in solid lipid nanoparticles: Towards bioactive-based design of delivery systems. *Food Chemistry*, 190, 928-937. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.054
- Seyed Yagoubi, A., Shahidi, F., Mohebbi, M., Varidi, M., & Golmohammadzadeh, S. (2018). Preparation, characterization and evaluation of physicochemical properties of phycocyanin-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(1), 378-385. doi:https://doi.org/10.1007/s11694-017-9650-y
- Seyedabadi, M. M., Rostami, H., Jafari, S. M., & Fathi, M. (2021). Development and characterization of chitosan-coated nanoliposomes for encapsulation of caffeine. *Food Bioscience*, 40, 100857. doi:https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100857
- Souza, J. M., Caldas, A. L., Tohidi, S. D., Molina, J., Souto, A. P., Fanguero, R., & Zille, A. (2014). Properties and controlled release of chitosan microencapsulated limonene oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24, 691-698. doi:https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.11.007
- Taheri, A., Sabeena Farvin, K. H., Jacobsen, C., & Baron, C. P. (2014). Antioxidant activities and functional properties of protein and peptide fractions isolated from salted herring brine. *Food Chemistry*, 142, 318-326. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.113
- Takeuchi, H., & Sugihara, H. (2010). Absorption of calcitonin in oral and pulmonary administration with polymer-coated liposomes. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 130(9), 1135-1142. doi:https://doi.org/10.1248/yakushi.130.1135
- Taylor, T. M., Weiss, J., Davidson, P. M., & Bruce, B. D. (2005). Liposomal Nanocapsules in Food Science and Agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(7-8), 587-605. doi:https://doi.org/10.1080/10408390591001135
- Volkman, H., Imianovsky, U., Oliveira, J. L., & Sant'Anna, E. S. (2008). Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino-acid profile. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 98-101. doi:https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000100022
- Wang, B., Li, Z.-R., Chi, C.-F., Zhang, Q.-H., & Luo, H.-Y. (2012). Preparation and evaluation of antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of *Sphyrna lewini* muscle. *Peptides*, 36(2), 240-250. doi:https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.05.013

Wyman, M., & Fay, P. (1986). Interaction between light quality and nitrogen availability in the differentiation of akinetes in the planktonic cyanobacterium *Gloeotrichia echinulata*. *British Phycological Journal*, 21(2), 147-153. doi:<https://doi.org/10.1080/00071618600650171>

Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs*, 13(3), 1133-1174. doi:<https://doi.org/10.3390/md13031133>

Preparation of nano-liposomes carrying phycobiliprotein extracted from red algae with chitosan polymer coating: evaluation of physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties

Amir Haghdoust¹, Leila Golestan^{2*}, Maryam Hasani^{3*}, Mostafa Shahidi Noghabi⁴,
Seyed Ahmad Shahidi⁵

- 1- PhD. Student, Department of Food Hygiene, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
- 2- Assistant Professor, Department of Food Hygiene, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
- * Corresponding author (l.golestan@iauamol.ac.ir)
- 3- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran
- * Corresponding author (m.hasani@iau-shahrood.ac.ir)
- 4- Associate Professor, Department of Food Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
- 5- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

Abstract

Encapsulation in liposome structure can be used as a protective carrier system for bioactive compounds during processing and storage under different conditions. Phycobiliproteins (PBPs) extracted from algae with antioxidant, antimicrobial, anti-cancer and anti-inflammatory properties can be applied to produce raw materials for functional foods. Therefore, in the present study, phycobiliprotein pigment was extracted from *Gracilaria* algae and the amounts of pigment was investigated. Also, nanoliposomes containing PBPs coated by chitosan (0, 0.5, 1 and 1.5%) were prepared and their physicochemical properties, antioxidant and antimicrobial activity were evaluated. The mean diameter of nanoliposomes and Polydispersity index (PDI) ranged from 336.9 to 577.7 nm and 0.25 to 0.28 in nanocarriers, respectively. The highest values of nanoliposome encapsulation efficiency of PBPs (83.98%) were obtained under optimal conditions in nanoliposomes with 1.5% chitosan coating. The results showed that the antimicrobial activity of the treatments increased significantly after encapsulation in the nanoliposome. In addition, the antioxidant activity of PBPs increased significantly after nanoencapsulation in liposomes. So that the EC50 level decreased to 81.27 and 107.67 ppm in DPPH and ABTS tests in nanoliposomes with 1.5% chitosan coating, respectively. Based on the findings of this study, it can be realized that nanocoating with chitosan effectively increases its stability, antimicrobial and antioxidant properties. Therefore, in order to increase the stability of natural compounds during different processes, it is recommended.

Keywords: Antimicrobial activity, Antioxidant activity, Chitosan, Nanoliposome, Phycobiliprotein