

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

امیر حق دوست<sup>۱</sup>، لیلا گلستان<sup>۱\*</sup>، مریم حسنی<sup>۲</sup>، مصطفی شهیدی نوقابی<sup>۳</sup>، سیداحمد شهیدی<sup>۴</sup>

۱- گروه بهداشت مواد غذایی، واحد آیت‌الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران  
\* نویسنده مسئول (l.golestan@iauamol.ac.ir و golestan57@yahoo.com)

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران  
\* نویسنده مسئول (m.hasani@iau-shahrood.ac.ir)

۳- گروه شیمی مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

۴- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت‌الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

### چکیده

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۲۲  
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۶/۲۲  
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۰۳  
تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۰/۰۸/۱۷

### 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 فرآوری 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 مقادیر 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. به طوری که میزان  $EC_{50}$  به پی‌پی‌ام  $81/27 \pm 1/40$  و  $107/67 \pm 6/76$  به ترتیب در تست‌های مهار رادیکال آزاد ۱-دی‌فنیل-۱-پیکریل-هیدرازیل و ۲-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

از جمله انواع پیگمان‌ها و کاروتنوئیدها مثل آستاگزانتین<sup>۱</sup>، لوتئین<sup>۲</sup>، کانتاگزانتین<sup>۳</sup> (فعالیت آنتی‌اکسیدانی،

تقاضا برای تولید و توسعه فرآورده‌های غذایی فراسودمند باعث توجه هرچه بیشتر به منابع طبیعی نوین گردیده است. جلبک‌ها به‌واسطه داشتن ترکیبات زیست‌فعال

<sup>1</sup> Astaxanthin

<sup>2</sup> Lutein

<sup>3</sup> Canthaxanthin

می‌شوند. بخش غیرپروتئینی فیکوبیلی پروتئین‌ها از بیلین ساخته شده است. بیلین نوعی زنجیرهٔ تتراپیرول<sup>۱۳</sup> باز شده است که به صورت کووالان و با یک یا دو پیوند تیواستری<sup>۱۴</sup> به اسیدآمینۀ بخش پروتئینی خود متصل شده است (Assis *et al.*, 2014).

استفاده از فیکوبیلی پروتئین‌ها در کاهش ابتلا به بیماری کم‌خونی، التهاب، تقویت سیستم ایمنی، بیماری‌های کبد و عوامل ضدسرطان نقش مهمی را ایفا می‌کنند (Hosseini *et al.*, 2013). این‌گونه 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 به‌کارگرفته می‌شوند (Taylor *et al.*, 2005).

از دیگر کاربردهای فیکوبیلی پروتئین‌ها می‌توان به تولید پروب‌های رنگی در تشخیص ایمنولوژیکی مواد براساس ویژگی‌های فلورسنت آنها اشاره نمود (Beheshtipour *et al.*, 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 ازجمله 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، آلودگی‌های زیست‌محیطی، پایداری پایین، حساسیت در برابر فاکتورهای محیطی و همچنین استفاده از مواد نه‌چندان مفید در فرمولاسیون آنها، روزه‌روز درحال‌کاهش بوده و تولیدکنندگان مواد غذایی به استفاده از رنگ‌های طبیعی تمایل بیشتری نشان می‌دهند (Rocha *et al.*, 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

تقویت‌کنندهٔ سیستم ایمنی و اثرات مهارکننده بر سیستم سرطانی)، اسیدهای چرب نظیر اکوزاپنتانوئیک اسید (EPA<sup>۱</sup>)، اولئیک، لینولنیک، پالمیتیک و دکوزاهگزانوئیک اسید (DHA<sup>۲</sup>) (کاهش‌دهندهٔ بیماری‌های قلبی-عروقی، آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی)، پروتئین‌ها مثل فیکوبیلی پروتئین‌ها<sup>۳</sup> (تحریک‌کنندهٔ سیستم ایمنی، فعالیت ضدسرطانی، اثرات محافظتی بر کبد، التهابی و خواص آنتی‌اکسیدانی)، پلی‌ساکاریدها نظیر پلی‌ساکاریدهای سولفات و فیبرهای غیرمحلول (خواص ضدویروسی، ضدتوموری، ضدانعقادی و کاهش‌دهندهٔ کلسترول)، ویتامین‌ها و توکوفرول‌ها (خصوصیات آنتی‌اکسیدانی) و ترکیبات فنولی (خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی) حائز اهمیت بوده و در انواع محصولات غذایی و همچنین فرمولاسیون فراورده‌های بیولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرند (Peng *et al.*, 2009). در سواحل جنوبی دریای خزر گونهٔ *گراسیلاریا گراسیلیس*<sup>۴</sup> برای اولین بار توسط Bagheri Dinani و همکاران (۲۰۱۴) شناسایی شد که بیشتر متصل به سواحل سنگی و مخلوط با جلبک‌های *انترومورفا*<sup>۵</sup>، *کلادوفورا*<sup>۶</sup> و *پلی‌سیفونیا*<sup>۷</sup> یافت می‌شوند (Nabivailo *et al.*, 2005).

رنگ جلبک قرمز به‌واسطهٔ 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. رنگیزهٔ غالب، آر-فیکواریترین<sup>۸</sup>، موجب رنگ قرمز می‌گردد. فیکوبیلی‌زوم‌ها<sup>۹</sup> حاوی آلفوکیکوسیانین (APC<sup>۱۰</sup>) شناسایی شده در طول موج ۶۵۰ نانومتر، فیکوسیانین (PC<sup>۱۱</sup>) شناسایی شده در طول موج ۶۲۰ نانومتر و فیکواریترین (PE<sup>۱۲</sup>) شناسایی شده در طول موج ۵۶۵ نانومتر می‌باشند و نقش مهمی را در فتوسیستم‌ها بازی می‌کنند (Peng *et al.*, 2009). فیکوبیلی پروتئین‌ها به‌طور عمده توسط سیانوباکترها و جلبک‌های قرمز تولید

<sup>1</sup> Eicosapentaenoic acid

<sup>2</sup> Docosahexaenoic acid

<sup>3</sup> Phycobiliprotein

<sup>4</sup> *Gracilaria gracilis*

<sup>5</sup> *Enteromorpha* sp.

<sup>6</sup> *Cladophora* sp.

<sup>7</sup> *Polysiphonia* sp.

<sup>8</sup> R-phycoerythrin

<sup>9</sup> Phycobilisome

<sup>10</sup> Allophycocyanin

<sup>11</sup> Phycocyanin

<sup>12</sup> Phycoerythrin

<sup>13</sup> Tetrapyrrole

<sup>14</sup> Thioester

همچنین دارای پایداری کلئیدی بالاتر بوده و کدورت کمتری ایجاد می کنند (Rasti *et al.*, 2012). با این وجود، سیستم های تحویل مبتنی بر لیپید، به دلیل کم ثباتی، در محیط اسیدی نمک های صفراوی و لیپاز معده مناسب نمی باشند (Page & Cudmore, 2001). استفاده از سیستم های پلی مری چسبنده مخاطی مانند کیتوزان، مهم ترین گام در جهت افزایش تحویل لیپوزومی ترکیبات پروتئینی زیست فعال به شکل خوراکی می باشد. به طوری که ثبات حامل لیپوزومی و راندمان جذب در دستگاه گوارش می تواند تا حدود زیادی توسط یک لایه پوشش کیتوزانی افزایش یابد که می توان به اتصال کیتوزان و لیپوزوم از طریق واکنش های الکترواستاتیک بین گروه های کاتیونی کیتوزان و گروه های فسفولیپید آنیونی نسبت داد. در مورد پایداری شیمیایی نانولیپوزوم ها، پایداری ترکیبات فسفولیپیدی به کاررفته در ساختمان نانولیپوزوم نقش مهمی ایفا می کند (Souza *et al.*, 2014). پرکاربردترین فسفولیپید در ساختار لیپوزوم ها و نانولیپوزوم ها، فسفاتیدیل کولین<sup>۲</sup> است که دارای یک سر قطبی آب دوست به نام فسفوکولین، یک پل گلیسرولی و یک زنجیره آسیل هیدروکربنی آب گریز است. در صورت قرار گرفتن این فسفولیپیدها در غشای لیپوزوم به تنهایی، غشا حالت سفت و محکم به خود می گیرد. به همین دلیل از جزء دیگری به نام کلسترول به منظور افزایش انعطاف غشا بهره می گیرند. نانولیپوزوم های پوشش داده شده با پلی مرهای فعال، موجب خواص مناسبی از جمله مخاط چسبی بهتر و نفوذپذیری بهتر از دیواره دستگاه گوارش می شود (Moghimpour *et al.*, 2012). در سامانه های نوین داروسازی، لیپوزوم ها و نانولیپوزوم ها توانسته اند بخش وسیعی از تحقیق ها را به خود اختصاص دهند. به کارگرفتن چنین ساختارهایی باتوجه به شباهت فراوانی که با غشاهای زیستی دارند و همچنین هدف گذاری آنها توانسته در کنار بهبود اثربخشی دارو کاهش قابل توجهی در زمینه عوارض دارویی نیز داشته باشد. از سوی دیگر با رهایش کنترل شده دارو در بافت های هدف، میزان داروی بیشتری به سلول های هدف رسیده و روند درمانی با سرعت بیشتری صورت خواهد پذیرفت (Takeuchi & Sugihara, 2010).

در تحقیق Seyed Yagoubi و همکاران (۲۰۱۸) رنگدانه فیکوسیانیین جلبک اسپروولینا در نانوذرات لیپیدی

محصول مانند مارگارین ها، شیرینی ها و دسر ها، حفظ رنگ اولیه از دست رفته به هنگام عمل آوری مثل آرد، دسر ها و سس های استریل شده، حفظ بو و همچنین ویتامین های حساس به نور، افزایش پذیرش ماده غذایی به عنوان محرک اشتها آور و همچنین استفاده از رنگ به عنوان ترکیب افزودنی مغذی با خصوصیات منحصربه فرد آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی اشاره نمود (Chen *et al.*, 2017). رشد سالانه رنگ های طبیعی مواد غذایی در بازار صنعت بین ۱۰-۱۵ درصد بوده که این امر به واسطه آگاهی مردم از عوارض و خطرهای رنگ های مصنوعی می باشد. با این حال مطالعه های محدودی روی فیکوبیلی پروتئین های غذایی (با خلوص بیشتر از ۷۰ درصد) گزارش شده است (Chen *et al.*, 2017). این ترکیبات پتانسیل بالایی در به کارگیری به عنوان افزودنی و ترکیبات فراسودمند به علت طبیعی بودن، رنگ منحصربه فرد و همچنین دارابودن صفات بیولوژیکی دارد. استفاده از رنگدانه های طبیعی در غذا با محدودیت هایی از قبیل حساسیت بالای این ترکیبات به حرارت، نور، واکنش های شیمیایی و اکسیداسیون، تخریب آنها در طول فراوری و نگهداری، توزیع ناهمگن مواجه شده و همچنین عطر و طعم آنها ممکن است سبب تغییراتی در خواص حسی محصول غذایی گردد (El Asbahani *et al.*, 2015).

بنابراین در این راستا استفاده از تکنیک درون پوشانی، روشی عملی برای محافظت از ترکیبات زیست فعال در برابر هضم با استفاده از پوشش و تشکیل کپسول است. یکی از انواع حامل های لیپیدی که برای درون پوشانی مواد زیست فعال و غذا-دارو استفاده می شود، لیپوزوم ها می باشند. لیپوزوم ها وزیکول های کلئیدی متشکل از لیپیدهای قطبی به ویژه فسفولیپیدها بوده که در حضور مولکول های آب، ساختارهای کروی دولایه ای را ایجاد می کنند (Ghorbanzade *et al.*, 2017). این ترکیبات به دلیل خاصیت دوگانه دوستی<sup>۱</sup>، توانایی کپسوله کردن طیف وسیعی از ترکیبات آب دوست، چربی دوست و دوگانه دوست را دارند. لیپوزوم ها و نانولیپوزوم ها اگرچه خصوصیات ساختاری، شیمیایی و ترمودینامیک یکسان دارند، اما نانولیپوزوم ها در مقایسه با لیپوزوم ها، به علت اندازه ذرات کوچک تر، ناحیه سطحی بیشتری را فراهم کرده و باعث افزایش حلالیت، بهبود قابلیت دسترسی زیستی، رهایش کنترل شده و تحویل دقیق تر مواد انکپسوله شده به نواحی هدف می شوند.

<sup>2</sup> Phosphatidylcholine

<sup>1</sup> Amphiphilic

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، ساخت کره جنوبی) گردید.

#### سنجش رنگی‌های فیکوبیلی پروتئین‌ها

سنجش رنگی‌های فیکوبیلی پروتئین‌ها روی پودر خشک جلبک قرمز *گراسیلاریا* مطابق روش Wyman و Fay (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، سلول‌ها توسط استات سدیم ۰/۳ نرمال و آب مقطر شکسته شده به نحوی که غلظت نهایی استات سدیم در محلول ۲۰۰ میلی‌مولار گردد. در نهایت جذب نمونه‌ها در مقابل بلانک تهیه شده از مواد مورد استفاده در استخراج فیکوبیلی پروتئین در طول موج‌های ۵۶۲، ۶۱۵، ۵۲۶ و ۷۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل 6800 UV/VIS، شرکت Jenway، ساخت آلمان) خوانده شد. برای محاسبه فیکوبیلی پروتئین‌ها برحسب میلی‌گرم در گرم از رابطه‌های (۱)، (۲) و (۳) استفاده گردید.

رابطه (۱)

$$(AP) = [1000 (A_{652} - A_{750}) - 208(A_{615} - A_{750})] / 5.09$$

رابطه (۲)

$$(PC) = [1000 (A_{615} - A_{750}) - 474 (A_{625} - A_{750})] / 5.34$$

رابطه (۳)

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. Safari و همکاران (۲۰۱۸) به بهینه‌سازی استخراج رنگدانه فیکوسیانیین از جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس*<sup>۱</sup> و بررسی خواص کیفی رنگدانه ریزپوشانی شده با پوشش مالتودکسترین و کاربونات سدیم پرداختند. آنها دریافتند، فیکوسیانیین و بخصوص فرم ریزپوشانی شده به لحاظ پایداری در شرایط مختلف، می‌تواند به‌عنوان ماده آنتی‌اکسیدان و یا رنگ‌دهنده بیولوژیک در صنایع غذایی مورد استفاده قرار گیرد (Safari et al., 2018).

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 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 آلدریج (آمریکا) و سایر مواد شیمیایی مورد نیاز با درجه خلوص بالا از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*<sup>۲</sup> (PTCC1917) و *اشریشیا کلی*<sup>۳</sup> (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 Moraes و همکاران (۲۰۱۱) با اندکی تغییرات استخراج گردید. جلبک خشک و

<sup>۱</sup> *Spirulina platensis*

<sup>۲</sup> *Staphylococcus aureus*

<sup>۳</sup> *E. coli*

## تعیین خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و ساختاری نانولیپوزوم‌ها

اندازه نانوذرات، توزیع اندازه ذره‌ای ( $PDI^2$ ) و پتانسیل زتا اندازه ذره‌ای، توزیع اندازه ذره‌ای و پتانسیل زتای لیپوزوم‌ها پس از رقیق کردن نمونه به میزان ۱۰ برابر با بافر به روش تفرق نور پویا<sup>۳</sup> توسط دستگاه زتاسایزر (Nano ZS، شرکت Malvern، انگلستان) انجام شد (Machado et al., 2019).

### تعیین کارایی درون پوشانی

به منظور تعیین کارایی درون پوشانی ( $EE^4$ ) نانولیپوزوم‌های حاوی فیکوبیلی پروتئین از روش غیرمستقیم (روش فیلتراسیون توسط فالتون‌های فیلتردار ۵۰ میلی‌لیتر آمیکون با وزن مولکولی برابر ۱۰۰ کیلودالتون) استفاده شد. به این منظور مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر از نانولیپوزوم حامل به فالتون اضافه شده، سپس درب فالتون 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، ساخت آلمان) قرائت گردید (Fathi et al., 2012). درصد کارایی درون پوشانی مطابق رابطه (۴) محاسبه شد:

$$\text{رابطه (۴)}$$

$$W_T - W_F / W_T = \text{درصد کارایی درون پوشانی}$$

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 فیلتر شده است.

### ظرفیت مهارکنندگی رادیکال آزاد (DPPH)

ظرفیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ۱-دی‌فنیل-۲-پیکریل-هیدرازیل ( $DPPH^5$ ) در نمونه‌ها طبق روش Taheri و همکاران (۲۰۱۴) با اندکی تغییرات اندازه‌گیری شد. قبل از انجام آزمایش نانولیپوزوم‌ها به مدت ۵ دقیقه به منظور رهایی در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس ۲ میلی‌لیتر از نمونه با ۲ میلی‌لیتر از DPPH ۰/۱۶

$$PE = [1000 (A_{652} - A_{750}) - 2.41(PC) - 0.948 (AP)] / 9.62$$

در رابطه‌های (۱)، (۲) و (۳)، A مقدار جذب در طول موج (نانومتر) می‌باشد.

### آنالیز ترکیب آمینواسیدی

پودر لیوفیلیزه فیکوبیلی پروتئین‌ها 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 میلی‌لیتر از محلول برداشته شده و با ۰/۵ میلی‌لیتر بافر مخلوط شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه نهایی به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا<sup>۱</sup> (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 et al., 2008).

### تهیه نانولیپوزوم

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 دور ۱۰۰۰ در دقیقه به مدت ۲ درصد حجمی/حجمی (دیونیزه و گلیسرول (غلظت نهایی ۲ درصد حجمی/حجمی)) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد هیدراته شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه هموژن شد. لیپوزوم‌های خام تحت فشار بالا هموژن شده و با نسبت‌های 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 یوپی‌سی تحت سونیکاسیون قرار گرفت. نانولیپوزوم‌ها در دمای محیط تحت گاز نیتروژن قرار گرفته و برای مراحل بعدی آزمایش نگهداری شدند (Rasti et al., 2012).

<sup>2</sup> Particle dispersity index

<sup>3</sup> Dynamic light scattering

<sup>4</sup> Encapsulation efficiency

<sup>5</sup> 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

<sup>1</sup> High performance liquid chromatography

تعیین حداقل میزان ممانعت‌کننده ( $MIC^3$ ) و حداقل میزان کشندگی ( $MBC^4$ ) از روش تهیه رقت<sup>۵</sup> 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 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 رنگیزه‌های فیکوبیلی پروتئین‌ها

سنجش رنگیزه‌های جلبک قرمز *گر/سیلاریا* انجام گردید و میزان رنگیزه‌های فیکوبیلینی برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک جلبک به دست‌آمد (جدول ۱). باتوجه به نتایج به دست‌آمده در این مطالعه، از میان پیگمانت‌های فیکوبیلینی بیشترین مقدار مربوط به فیکواریترین با  $1.03 \pm 0.27$  و کمترین مقدار مربوط به آلفوکیکوسیانین با  $0.23 \pm 0.01$  و سپس در فیکوسیانین ( $0.7 \pm 0.0$ ) به دست‌آمد. باتوجه به مطالعه‌های پیشین مقادیر رنگیزه‌های فیکوبیلینی ۱۰ گونه از جلبک‌های قرمز در رنگیزه فیکواریترین در محدوده ۰/۱۸ تا ۱/۲۳ میلی‌گرم بر گرم، فیکوسیانین در محدوده ۰/۱۶ تا ۰/۳۶ میلی‌گرم بر گرم و برای آلفوکیکوسیانین ۰/۰۴۳ تا ۰/۱۲ گزارش گردید.

میلی‌مولار (محلول در اتانول ۹۵ درصد) مخلوط شد. نمونه‌ها در تاریکی و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده 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 ( $BHT^1$ ) در محدوده صفر تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آماده شد. در آزمون حاضر اسید آسکوربیک به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده و 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 ۲ و ۲-آزینوبیس (۳-اتیل بنزوتیازولین ۶-سلفونیک اسید) ( $ABTS^2$ ) براساس روش Wang و همکاران (۲۰۱۲) با اندکی اصلاح اندازه‌گیری گردید. در ابتدا نانولیپوزوم‌ها به مدت ۵ دقیقه به منظور رهایش در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در آون 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 ( $pH=7.4$ ) تا رسیدن به جذب  $0.7 \pm 0.2$  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 به عنوان 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

<sup>3</sup> Minimum inhibitory concentration

<sup>4</sup> Minimum bactericidal concentration

<sup>5</sup> Broth dilution

<sup>1</sup> Butylated hydroxytoluene

<sup>2</sup> 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

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

نوع رنگی‌ه	آلفیکوسیانیین (APC)	فیکوسیانیین (PC)	فیکواریترین (PE)	فیکوبیلی پروتئین کل
میزان رنگی‌ه	۰/۲۳±۰/۰۱	۰/۷±۰/۰	۱/۰۳±۰/۲۷	۱/۹۶±۰/۱۸

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار است.

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
لایزین	۴/۴۵
لوسین	۹/۱۲
فنیل آلانین	۴/۹۷
هیستیدین	۰/۶۸
آرژنین	۲/۲۰
لوتئین	۱۱/۱۱

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 et al., 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.

#### 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<sup>۱</sup> (۱۶/۲۳ درصد)، والین<sup>۲</sup> (۹/۹ درصد) و لوسین<sup>۳</sup> (۹/۱۲ درصد) بود. اسیدهای آمینه اسیدی (اسید گلوتامیک<sup>۴</sup> و اسید آسپارتیک<sup>۵</sup>) و اسیدهای آمینه قلیایی (آرژنین<sup>۶</sup>، هیستیدین<sup>۷</sup> و لیزین<sup>۸</sup>) 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 و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی پروفایل اسیدهای آمینه در جلبک پورفیرا<sup>۹</sup> گزارش گردید که حاکی از وجود ۵۰/۴۷ درصد از اسیدهای آمینه آب‌گریز در فیکوبیلی پروتئین‌های مستخرج از جلبک بود.

#### ارزیابی فیزیکیوشیمیایی نانولیپوزوم‌های حامل PBPs

##### بررسی اندازه ذرات و شاخص پراکندگی (PDI)

میانگین اندازه ذرات، شاخص پراکندگی ذرات و راندمان نانوپوشانی در PBPs نانوکپسوله‌شده 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 تهیه‌شده 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.

<sup>1</sup> Alanine

<sup>2</sup> Valine

<sup>3</sup> Leucine

<sup>4</sup> Glutamic acid

<sup>5</sup> Aspartic acid

<sup>6</sup> Arginine

<sup>7</sup> Histidine

<sup>8</sup> Lysine

<sup>9</sup> Porphyra

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

تیمارها	راندمان درون‌پوشانی (درصد)	میانگین اندازه ذرات (نانومتر)	شاخص پراکندگی	پتانسیل زتا (میلی‌ولت)
نانولیپوزوم فاقد پوشش کیتوزان	۷۰/۱۴±۱/۲۴ <sup>d</sup>	۵۵۷/۷±۲۵/۹۰ <sup>a</sup>	۰/۲۵±۰/۰۰ <sup>a</sup>	-۱۰/۸±۱/۸۵ <sup>c</sup>
نانولیپوزوم با پوشش ۰/۵ درصد کیتوزان	۷۵/۶۸±۱/۲۰ <sup>c</sup>	۳۳۶/۹±۲۱/۳۰ <sup>c</sup>	۰/۲۶±۰/۰۲ <sup>a</sup>	۲۲/۶±۲/۷۰ <sup>b</sup>
نانولیپوزوم با پوشش ۱ درصد کیتوزان	۸۰/۹۸±۱/۱۲ <sup>b</sup>	۴۰۶/۸±۱۲/۷۰ <sup>b</sup>	۰/۲۸±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۳۰/۳۳±۱/۴۵ <sup>a</sup>
نانولیپوزوم با پوشش ۱/۵ درصد کیتوزان	۸۳/۹۸±۰/۷۳ <sup>a</sup>	۵۱۵/۵±۴۱/۲۰ <sup>a</sup>	۰/۲۶±۰/۰۲ <sup>a</sup>	۲۱/۳۱±۵/۲۱ <sup>b</sup>

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار است.

حروف کوچک در هر ستون نشان‌دهنده معنی‌داری بین تیمارهای مختلف می‌باشد.

۰/۲ و ۰/۳ درصد، اندازه نانولیپوزوم‌های پوشش‌دار شده افزایش و سپس کاهش می‌یابد.

#### 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 در بین دو لایه فسفولیپیدی احاطه می‌شوند. بنابراین دو لایه فسفولیپیدی به عنوان مخزنی برای ترکیبات زیست‌فعال همانند رنگدانه‌ها عمل می‌کنند. نانولیپوزوم‌های تهیه‌شده با ۱/۵ درصد کیتوزان دارای بالاترین راندمان نانوپوشانی (۸۳/۹۸±۰/۷۳ درصد) و نانولیپوزوم‌های با پوشش ۱ درصد (۸۰/۹۸±۱/۱۲ درصد)، ۰/۵ درصد (۷۵/۶۸±۱/۲۰ درصد) و فاقد پوشش (۷۰/۱۴±۱/۲۴ درصد) مقادیر کمتری را نشان دادند (جدول ۳). نتایج راندمان نانوپوشانی گزارش‌شده در پژوهش حاضر مشابه نتایج در پژوهش‌های قبلی (Hasani et al., 2021; Katouzian & Taheri, 2019) در مورد نانولیپوزوم‌ها می‌باشد. به‌طور کلی ثابت گردید که راندمان درون‌پوشانی مواد در ساختار لیپوزوم می‌تواند تحت تأثیر اندازه و سطح مخصوص قرار گیرد. باین وجود مطالعه حاضر رابطه مستقیم اندازه ذرات و راندمان نانوپوشانی را برای لیپوزوم‌های حاوی رنگدانه نشان داد. باتوجه به نتایج می‌توان دریافت مولکول‌های کیتوزان به سطح لیپوزوم متصل شده و تشکیل پوسته سختی را می‌دهند و تحرک غشای لیپیدی را محدود می‌نماید، در نتیجه غشا سخت‌تر و مقاوم‌تر می‌شود (Seyedabadi et al., 2021).

#### ارزیابی پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌های حامل PBPs

پتانسیل زتا یکی از فاکتورهای مهم در پایداری نانوذرات است. پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌ها در جدول (۳) نشان داده

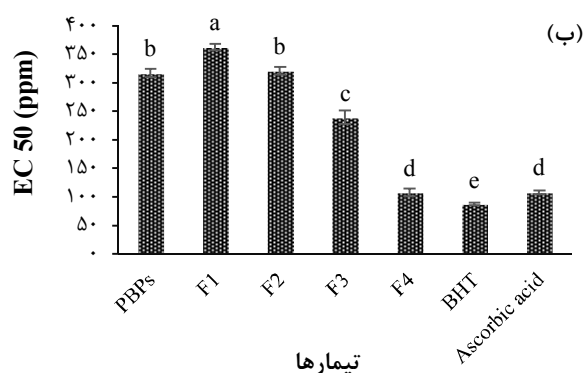
همان‌طور که در منحنی توزیع اندازه ذرات مشاهده می‌شود نتایج نشان‌دهنده یکنواخت بودن توزیع اندازه ذرات و در نتیجه موفقیت فرایند تولید نانولیپوزوم با درصدهای مختلف پوشش کیتوزان می‌باشد. همچنین شاخص پراکندگی در نانولیپوزوم‌ها از ۰/۲۵ تا ۰/۲۸ متغیر بود که نشان‌دهنده پراکندگی کمتر و همگن بودن اندازه ذرات می‌باشد. لیپوزوم‌های پوشش‌دهی‌شده با کیتوزان که به نام کیتوزوم نیز نامیده می‌شود، توسط پژوهشگران پیشین گزارش شده و همچنین صحت تشکیل آن توسط انواع روش‌های میکروسکوپی مورد تأیید قرار گرفته است (Hasani et al., 2018; Katouzian & Taheri, 2021). 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 et al., 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 و همکاران (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 استیل‌زدایی تا غلظت



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.

باتوجه 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 و همکاران (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.

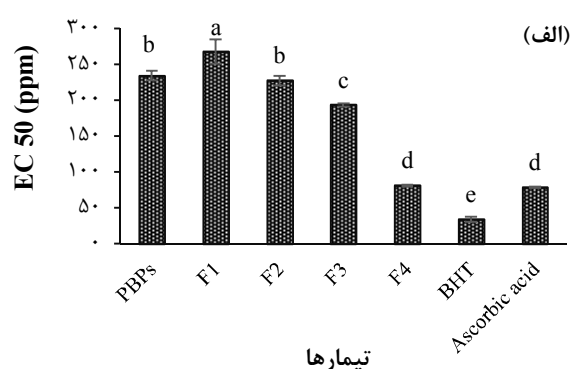


شده است. هرچه اندازه پتانسیل زتا بالاتر باشد، بار سطحی نانوذرات بیشتر و در نتیجه دافعه الکترواستاتیک نیز افزایش می یابد.

مقادیر پایین پتانسیل زتا سبب کاهش پایداری و به هم چسبیدگی نانوذرات می گردد. پتانسیل زتا در نمونه ها از  $-10.8 \pm 1.85$  تا  $30.33 \pm 1.45$  میلی ولت متغیر بود. دلیل منفی بودن بار سطحی نانولیپوزوم فاقد پوشش، وجود لسیترین به عنوان یک امولسیفایر یونی می باشد. با افزودن کیتوزان، باتوجه 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

اندازه گیری میزان مهار رادیکال های آزاد DPPH و ABTS از روش های معتبر، دقیق، آسان و مقرون به صرفه با قابلیت تکرارپذیری بالاست 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



شکل ۱- مقایسه قدرت آنتی اکسیدانی فیکوبیلی پروتئین آزاد (PBPs)، نانوکپسوله با فرمولاسیون های 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 درصد کیتوزان، F3: نانولیپوزوم حاوی PBPs با پوشش ۱ درصد کیتوزان، F4: نانولیپوزوم حاوی PBPs با پوشش ۱/۵ درصد کیتوزان

جدول ۴- حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی میکروارگانیزمها برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر در BBPs آزاد و کپسوله‌شده در نانولیپوزوم

		BBPs										میکروارگانیزمها
		نانولیپوزوم (وزنی/حجمی)										
آمی‌سیلین		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

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 ضدباکتریایی نانولیپوزومها در برابر هر دو باکتری موردآزمایش بهبود می‌یابد. مطالعه‌های بسیاری تأیید نمودند که کیتوزان می‌تواند به‌عنوان ترکیبی زیست‌تخریب‌پذیر با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی بالا به‌عنوان پوشش و فیلم خوراکی عمل کند (Hosseini et al., 2013). به‌علاوه بیان گردید که درخصوص باکتری‌های گرم منفی اشریشیاکلی، توانایی ضدباکتری کیتوزان با کاهش وزن مولکولی افزایش می‌یابد. این محققان دو مکانیسم را برای فعالیت ضد میکروبی پیشنهاد کردند: درمورد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، کیتوزان روی سطح سلول یک غشای پلیمری تشکیل‌داده که از ورود مواد مغذی به داخل سلول جلوگیری می‌کند و موجب مرگ سلول باکتری می‌گردد. درخصوص باکتری اشریشیاکلی نیز کیتوزان با وزن مولکولی پایین به‌راحتی می‌تواند وارد سلول باکتری شود (Younes & Rinaudo, 2015).

#### نتیجه‌گیری

یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد جلبک قرمز گراسیلاریا گراسیلیس منبع خوبی به لحاظ دارابودن رنگیزه‌های فیکوبیلی‌پروتئینی و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآزیمی و آنزیمی محسوب می‌شود. مطابق با نتایج به‌دست‌آمده، می‌توان گفت نانوحامل‌های لیپوزومی به‌عنوان یکی از سامانه‌های مؤثر در نانوپوشانی ترکیبات زیست‌فعال مانند فیکوبیلی‌پروتئین محسوب می‌شود. نانوکپسولاسیون رنگدانه در لیپوزوم با پوشش کیتوزان به‌طور مؤثری تأثیرهای مفید رنگدانه آزاد از جمله خواص ضد میکروبی و

#### بررسی خصوصیات ضد میکروبی و نانولیپوزوم‌های حامل BBPs

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 نانولیپوزومه (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. براساس یافته‌های حاصل از هر دو سویه باکتری موردآزمایش، فعالیت ضد میکروبی رنگدانه در فرم نانولیپوزومه بیشتر از رنگدانه خالص بود. مقادیر MIC و MBC در مقابل باکتری اشریشیاکلی در مقایسه با باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بالاتر بود که نشان‌دهنده مقاومت بیشتر باکتری اشریشیاکلی در برابر غلظت‌های مختلف نانولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات زیست‌فعال ضد میکروبی می‌باشد. به‌علاوه، نتایج تحقیق حاضر حاکی از آن بود که مقادیر MIC و MBC هر دو سویه موردآزمایش 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 به‌علت عدم وجود دیواره سلولی لیپوپلی‌ساکاریدی باشد که ممکن است در باکتری‌های گرم منفی از ورود ترکیبات فعال به غشای سیتوپلاسمی جلوگیری به‌عمل آورد. در مطالعه Cui و همکاران (۲۰۱۶) مشاهده شد انکپسوله‌نمودن اسانس گیاه مریم‌گلی در نانولیپوزوم سبب ثبات بیشتر اسانس و افزایش اثرات ضد میکروبی آن در مقایسه با اسانس آزاد گردید. این عمل

پژوهشی و طراحی مقاله، بازبینی و اصلاح مقاله، نظارت بر مطالعه و تأیید نسخه نهایی؛ مریم حسنی: ارائه ایده پژوهشی و طراحی مقاله، نوشتن پیش نویس مقاله، تجزیه و تحلیل و تفسیر داده ها، بازبینی و اصلاح مقاله، تأیید نسخه نهایی؛ مصطفی شهیدی نوقابی و سیداحمد شهیدی: آنالیز داده ها و نظارت بر مطالعه.

آنتی اکسیدانی آن را بهبود بخشید. لذا، می توان دریافت به کارگیری فناوری تهیه نانولیپوزوم با پوشش پلیمری 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.

#### مشارکت نویسندگان

امیر حق دوست: جمع آوری داده، نوشتن پیش نویس مقاله، تجزیه و تحلیل و تفسیر داده ها؛ لیلا گلستان: ارائه ایده

#### تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

#### منابع

- 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. <https://doi.org/10.4236/ampc.2014.41002>
- Bagheri Dinani, S., Dehpour, A., & Eslami, B. (2014, August). *Investigation of essential oil components and antimicrobial effects of various extracts of Gracilaria gracilis* 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. <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. <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. <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. <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. <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. <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 nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chemistry*, 216, 146-152. <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. <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. <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. <https://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), -. <https://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. <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. <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. <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. <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-phycoerythrin extraction from Spirulina platensis wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(1), 45-49. <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. <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. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(00\)01600-7](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. <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. <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 Bioproducts Processing*, 90(1), 37-42. <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. <https://doi.org/10.22092/isfj.2017.115342> (in Persian)

- Salminen, H., Gömmel, C., Leuenberger, 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. <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. <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. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100857>
- Souza, J. M., Caldas, A. L., Tohidi, S. D., Molina, J., Souto, A. P., Figueiro, R., & Zille, A. (2014). Properties and controlled release of chitosan microencapsulated limonene oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *24*, 691-698. <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. <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. <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. <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. <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. <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. <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. <https://doi.org/10.3390/md13031133>

## Preparation of Nano-liposomes Carrying Phycobiliprotein Extracted from Red Algae (*Gracilaria gracilis*) with Chitosan Polymer Coating: Evaluation of Physicochemical, Antioxidant and Antimicrobial Properties

Amir Haghdoost<sup>1</sup>, Leila Golestan<sup>1\*</sup>, Maryam Hasani<sup>2\*</sup>, Mostafa Shahidi Noghabi<sup>3</sup>,  
Seyed Ahmad Shahidi<sup>4</sup>

1- Department of Food Hygiene, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

\* Corresponding author (l.golestan@iauamol.ac.ir & golestan57@yahoo.com)

2- Department of Food Science and Technology, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran

\* Corresponding author (m.hasani@iau-shahrood.ac.ir)

3- Department of Food Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

4- 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 EC<sub>50</sub> 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

© 2022, Research Institute of Food Science and Technology. All rights reserved.

This is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0). To view a copy of this license, visit (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

