



## بررسی تاثیر شرایط نگهداری بر پایداری نانولیپوزوم‌های حاوی فیکوسیاینین پوشش داده شده با کیتوزان

عبدالخلیل آذری<sup>۱</sup>، سیدحسین حسینی قابوس<sup>۲\*</sup>، سیدمهدی جعفری<sup>۳</sup>، وحید عرفانی مقدم<sup>۴</sup>

۱-دانشجوی دکتری تخصصی رشته علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر، آزادشهر، ایران.

۲-استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر، آزادشهر، ایران.

۳-استاد، گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۴-استادیار گروه زیست فناوری پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

### چکیده

### اطلاعات مقاله

یکی از مهم‌ترین مسائل و چالش‌ها در زمینه استفاده از رنگ‌ها در مواد غذایی، بهبود و افزایش پایداری آن‌ها در مراحل فرآوری و همچنین کنترل آزاد شدن تا زمان مصرف می‌باشد. از این‌رو هدف از این پژوهش تولید نانولیپوزوم‌های حاوی فیکوسیاینین پوشش داده شده با کیتوزان با روش هیدراسیون لایه نازک- فراصوت به منظور افزایش پایداری فیکوسیاینین و بررسی ویژگی‌های فیزیکی و راندمان انکپسولاسیون آن در طی شرایط نگهداری بود. در این مطالعه فیکوسیاینین با غلظت‌های مختلف کیتوزان (۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) پوشش داده شد و در دو دما (۴ و ۲۵ درجه سلسیوس) برای ۲۸ روز نگهداری گردید و سپس برای تعیین بهترین غلظت کیتوزان برای پوشش نانولیپوزوم‌های تولیدی، آزمون‌های راندمان انکپسولاسیون، اندازه ذرات و پتانسیل زتا روی آن‌ها صورت پذیرفت. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت کیتوزان به بیش از ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تغییر معنی‌داری در راندمان انکپسولاسیون مشاهده نگردید ( $p > 0.05$ ) و نمونه‌ی فاقد کیتوزان کمترین اندازه ذرات را داشت که با نمونه‌های حاوی ۰/۲ و ۰/۴ کیتوزان اختلاف آماری معنی‌داری نداشت ( $p > 0.05$ ). با افزایش میزان کیتوزان در پوشش نانولیپوزوم‌ها، میزان پتانسیل زتا نمونه‌ها افزایش یافت. در نهایت نمونه‌ای که در پوشش نانولیپوزوم خود، حاوی ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کیتوزان بود به‌عنوان بهترین نمونه انتخاب گردید. یافته‌های حاصل از آزمون‌های انجام شده در طول نگهداری نانولیپوزوم‌ها مشخص نمود که نانولیپوزوم دارای فیکوسیاینین که فاقد هرگونه پوشش کیتوزان در روز تولید بود، بیشترین میزان راندمان انکپسولاسیون داشت و از طرفی مشخص گردید که با افزایش دمای نگهداری و زمان نگهداری میزان راندمان انکپسولاسیون کاهش ولی اندازه ذرات افزایش یافت. کمترین پتانسیل زتا نمونه‌ها مربوط به نمونه نانولیپوزوم فاقد فیکوسیاینین بود که تا روز ۲۱ ام نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس تغییر معنی‌داری نداشت. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نمونه‌ها نیز موید نتایج حاصل از اندازه‌گیری ذرات بود.

تاریخ‌های مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۸

کلمات کلیدی:

نانولیپوزوم،

فیکوسیاینین،

کیتوزان،

پوشش دادن،

روش هیدراسیون لایه نازک- فراصوت

DOI: 10.22034/FSCT.20.136.201

DOR: 20.1001.1.200088787.1402.20.136.16.4

\* مسئول مکاتبات:

hosseinighaboos@yahoo.com

## ۱- مقدمه

رنگ‌های غذایی نقش بسیار مهمی را در بهبود و هر چه بهتر شدن خصوصیات و ظاهر مواد غذایی ایفا می‌نمایند. تا قبل از پیدایش اولین رنگ مصنوعی در سال ۱۸۵۶ توسط ویلیام پرکینز، بشر تنها از رنگ‌های استخراج شده از گیاهان، حیوانات و مواد معدنی به‌عنوان رنگدانه‌های غذایی استفاده می‌کرد. بعد از آن با توجه به خواص برتر رنگ‌های مصنوعی به‌علت مقدار رنگ، ثبات مناسب و قیمت پایین تولید رنگ‌های مصنوعی نسبت به رنگ‌های طبیعی، استفاده از آن‌ها در محدوده وسیعی توسعه یافت. متأسفانه با توجه به بررسی‌های انجام شده و امکان وجود مواد سمی در برخی از رنگ‌های مصنوعی، استفاده از آن‌ها را، در مواد غذایی با محدودیت مواجهه نموده است. در مقابل افزایش تقاضا برای افزودنی‌های رنگی به‌همراه افزایش آگاهی برای حفظ سلامتی، تولیدکنندگان صنایع غذایی را به سمت استفاده از رنگ‌های طبیعی سوق داده است [۱]. یکی از مهم‌ترین مسائل و چالش‌ها در زمینه استفاده از رنگ‌ها در مواد غذایی، بهبود و افزایش پایداری آن‌ها در مراحل فرآوری و همچنین کنترل آزاد شدن تا زمان مصرف می‌باشد. بنابراین بهتر است قبل از استفاده در مواد غذایی و نوشیدنی‌ها، به‌منظور محدود کردن تجزیه یا افت آروما در طول فرآوری و نگهداری، این مواد ریزپوشانی شوند [۲]. فیکوسیانین به‌عنوان یکی از رنگدانه‌های اسپیرولینا، نقش مهمی در فرآیند فتوسنتز داشته و از رنگدانه‌های محلول در آب گروه فیکوبیلی پروتئین‌ها می‌باشد و به‌عنوان رنگدانه طبیعی در انواع مواد غذایی نظیر آدامس، ژله‌ها، نوشیدنی‌ها و نیز محصولات آرایشی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳]. فیکوسیانین‌ها پروتئین‌های محلول در آب موجود در سیانوباکتری‌ها هستند. سه نوع پیگمان فیکوسیانوبیلین<sup>۱</sup>، فیکوبیلین<sup>۲</sup> و فیکوئیرتروبیلین<sup>۳</sup> به فیکوسیانین‌ها متصل

می‌باشند [۴]. فیکوسیانوبیلین‌ها یک ترکیب تتراپیرولی زنجیر باز هستند که در فیکوسیانین‌های مادری حداکثر جذب را در ۶۲۵-۵۹۰ نانومتر انجام می‌دهند و یک رنگدانه آبی طبیعی برای استفاده در مواد غذایی است [۴ و ۵]. استفاده از فیکوسیانین در مواد غذایی به‌دلیل عدم ثبات آن در برابر شرایط محیطی از جمله pH و تیمارهای حرارتی، محدود شده است. جسرپرسن و همکاران (۲۰۰۵) اظهار کرده‌اند که فیکوسیانین نسبت به گرما و نور در محلول‌های آبی ناپایدار بوده و در دمای بالاتر از ۴۵ درجه سلسیوس به‌خاطر دناتوره شدن پروتئین رنگ آن تغییر می‌کند [۶]. رایج‌ترین روش رهایش کنترل شده در صنعت غذا، میکرو یا نانو انکپسولاسیون یا ریز پوشانی نام دارد که عبارت است از به دام افتادن یک جزء فعال (هسته) در ماده دیگر (دیواره یا پوسته) که منجر به تولید ذراتی با قطر چند میکرومتر تا چند نانومتر می‌گردد. ماده ریز پوشانی شده را فاز هسته، فعال یا درونی می‌نامند [۷ و ۸]. کیتوزان بر خلاف ترکیبات پلیمری مصنوعی با بافت موجود زنده سازگار بوده و قابل تجزیه در طبیعت و غیر سمی است. استفاده از کیتوزان به‌عنوان یک ماده نگهدارنده در سال‌های دهه ۸۰ تا اواسط دهه ۹۰ در کره و ژاپن مجاز و از سال ۱۹۸۳ توسط کمیته اتحادیه اروپا به‌عنوان افزودنی مواد غذایی اعلام شد [۹ و ۱۰]. نانو ذرات کیتوزان نسبت به پودر کیتوزان به‌دلیل پلی کاتیونی بودن و دارا بودن سطح ویژه و چگالی شار بیشتر علاوه بر دارا بودن طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی از جمله خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی و آنتی اکسیدانی، پتانسیل بالایی جهت درون پوشانی ترکیبات زیست فعال با ماهیت آب‌دوستی و آب‌گریزی داشته و به‌طور گسترده‌ای در مواد غذایی و دارویی کاربرد دارند [۱۱، ۱۲ و ۱۳]. یکی از انواع حامل‌های لیپیدی که برای ریزپوشانی مواد زیست فعال، غذا و دارو استفاده می‌شود، لیپوزوم‌ها می‌باشند. ریزپوشانی توسط

1. Phycocyanobilin  
2. phycobilin

3. Phycoerythrobilin

اسپیرولینا را با استفاده از کیتوزان به‌عنوان یک سیستم رهایش دارو و با هدف افزایش دسترسی زیستی فیکوسیانین و محافظت از این رنگدانه پروتئینی در برابر شرایط اسیدی معده نانوریزپوشانی نمودند که نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از کیتوزان منجر به بهبود پایداری فیزیکی این ترکیب گردید [۲۰]. با وجود این‌که رنگ‌های طبیعی به ویژه فیکوسیانین‌ها در تولید مواد غذایی فراسودمند و گسترش محصولات مفید جدید در صنایع غذایی اهمیت فراوانی دارند ولی این ترکیب در برابر شرایط محیطی ناپایدار می‌باشد، بنابراین هدف از این پژوهش، تولید نانولیپوزوم‌های پوشش داده شده با کیتوزان حاوی فیکوسیانین و بررسی ویژگی‌های فیزیکی آن در دو دمای ۴ (دمای یخچال) و ۲۵ درجه سلسیوس می‌باشد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد

فیکوسیانین مورد استفاده در این مطالعه از شرکت Roha هند، لسیتین (lipoid، آلمان)، کیتوزان (سیگما آلدریج، آمریکا)، اتانول ۹۶ درصد، پرسولفات پتاسیم، برمید پتاسیم و توپین ۸۰ (مرک، آلمان) تهیه شد.

### ۲-۲- تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی فیکوسیانین و پوشش داده شده با کیتوزان

در این پژوهش لیپوزوم با استفاده از روش هیدراسیون لایه نازک و بر اساس روش تشریح شده توسط اکبرگل و همکاران (۲۰۱۹) با اندکی تغییرات تولید گردید [۲۱]. فرآیند تولید لیپوزوم شامل انحلال به ترتیب، ۰/۰۹ و ۰/۰۱ گرم لسیتین سویا و کلسترول در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد بود. فرآیند تبخیر و تشکیل فیلم نازک در انتهای بالن ته‌گرد با استفاده از تبخیرکننده دوار<sup>۱</sup> با دور ۷۰ rpm در دمای ۶۰ درجه سلسیوس انجام گرفت. بالن مدور برای اطمینان از حذف کامل حلال، به مدت ۱۲ تا ۱۸ ساعت در

نانولیپوزوم‌ها که وزیکول‌های میکروسکوپی حاصل از تجمع خودبخودی مولکول‌های چربی و یا فسفولیپید در محیط آب هستند، می‌توانند با تشکیل ساختارهای کروی دولایه به‌عنوان حاملی برای حفاظت ترکیبات فعال یا حساس در نظر گرفته شوند [۱۴ و ۱۵]. تولید نانولیپوزوم از روش‌های جدیدی است که برای درون پوشانی مواد زیست فعال مانند ترکیبات فنولی استفاده می‌شود که تلخی این ترکیبات را پوشش می‌دهد و هر دو طیف ترکیبات آب‌دوست (در هسته داخلی) و آب‌گریز (در بین دو لایه لیپیدی) را حمل و به تدریج در مواد غذایی آزاد می‌سازد. از سوی دیگر کپسوله کردن ترکیبات زیست فعال در شکل لیپوزومی می‌تواند با افزایش جذب و ماندگاری آن‌ها در دستگاه گوارش به توسعه غذاهای فراسودمند کمک کند [۱۶]. هائو و همکاران (۲۰۱۷)، بیان داشتند که روش کپسوله کردن کورستین در داخل نانوکپسول‌های پلیمری کیتوزان/ لسیتین، با هدف محافظت از کورستین در برابر تخریب و افزایش سازگاری زیستی آن، یک روش موثر است [۱۷]. تاماکت و راویان (۲۰۱۵)، ویژگی‌های کاروتنوئید انکپسوله شده با نانو ذرات کیتوزان-تری پلی فسفات را بررسی کردند. نتایج این محققین نشان داد که ریزپوشانی ۳ درصد کاروتنوئیدها در ۱/۵ درصد کیتوزان (وزنی/حجمی) و ۲ درصد تری پلی فسفات (وزنی/حجمی) یک ترکیب مناسب می‌باشد که می‌تواند کاروتنوئیدها را تا ۸۹/۰۹ درصد در طی ۳۶ ساعت گرم‌خانه‌گذاری حفظ کند. نانوذرات حاصل دارای کارایی بالاتری در سیستم‌های آب و چربی بودند [۱۸]. نتایج مطالعات یان و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که استفاده از روش اکستروژن به‌عنوان یک روش ساده برای تهیه میکروکپسول‌های حاوی فیکوسیانین به کمک ترکیبات پوششی نظیر آلژینات سدیم و کیتوزان می‌تواند در حفظ و پایداری فیکوسیانین نقش موثری داشته باشد [۱۹]. مانکونی و همکاران (۲۰۱۰)، فیکوسیانین حاصل از ریزجلبک

1. Rotary evaporator

از شاخص‌های مطمئن برای پیش‌بینی پایداری پراکندگی کلونیدها در شرایط نگهداری می‌باشد. به‌منظور تعیین این کمیت از دستگاه زتا سایزر (Malvern، انگلستان) استفاده شد که بر مبنای میزان جابه‌جایی ذرات باردار در اثر میدان الکتریکی کار می‌کند. در انجام این آزمون ضریب شکست ۱/۳۳ و ثابت دی الکتریک ۷۸/۵ و دما ۲۵ درجه سلسیوس بود [۲۳].

#### ۲-۴- راندمان انکپسولاسیون

برای محاسبه راندمان انکپسولاسیون لازم است ابتدا منحنی کالیبراسیون در غلظت‌های مختلف از فیکوسیاینین حل شده در اتانول به‌دست آید. برای این منظور غلظت‌های ۰/۱ تا ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فیکوسیاینین در اتانول تهیه گردید سپس جذب این نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Scintec، انگلستان) در طول موج ۶۲۰ نانومتر محاسبه شد. برای تعیین راندمان انکپسولاسیون، مقدار ۲ میلی‌لیتر از نمونه‌های تهیه شده در یک فیلتر آمیکون ۱۰۰ کیلودالتونی ریخته شد و با سانتیفریژ (Heidolph، آلمان)، ۳۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریژ گردید [۲۱] و میزان فیکوسیاینین فاز عبور کرده، مطابق روش فتحی و همکاران (۲۰۱۳) محاسبه شد [۲۴]. در نهایت از رابطه زیر میزان راندمان انکپسولاسیون فیکوسیاینین مشخص شد.

$$\text{رابطه ۱) } (E-D/E) \times 100 = \text{راندمان انکپسولاسیون}$$

که در رابطه ۱) E، غلظت فیکوسیاینین کل به‌کار رفته در فرمولاسیون نانولیپوزوم‌ها و D غلظت فیکوسیاینین آزاد یا ریزپوشانی نشده می‌باشد.

#### ۲-۵- بررسی ریخت‌شناسی نمونه‌ها با دستگاه

##### الکترونی روبشی (SEM<sup>۲</sup>)

برای مشاهده ریزساختار، از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (هیتاچی، ژاپن) استفاده شد. مقداری از

دسیکاتور و در دمای محیط نگهداری شد. سپس فیلم لیپیدی خشک شده با استفاده از بافر فسفات نمکی (PBS; pH ۷/۴) و فیکوسیاینین با غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌مدت یک دقیقه با استفاده از همزن مجدداً هیدراته گردید. محلول حاصل با استفاده از تبخیرکننده دوار در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به‌مدت دو دقیقه در دمای محیط هم‌زده و خنک شد. این فرآیند هم‌زدن در ۳ مرتبه تکرار گردید. نهایتاً محلول حاصل برای ۱۰ مرحله (در هر مرحله به‌مدت یک دقیقه روشن و یک دقیقه خاموش به‌صورت متناوب) تحت پروب فراصوت (vibracell Sonics & Materials، انگلستان) (توان ۷۰ درصد و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز) قرار گرفت. برای جلوگیری از افزایش دما، فرآیند فراصوت در شرایط نگهداری نانولیپوزوم در آب سرد انجام گرفت. برای پوشش‌دهی نانولیپوزوم‌ها، در آزمون و خطاهای اولیه غلظت‌های مختلفی از کیتوزان (۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد وزنی-حجمی) بررسی گردید. برای این آزمون، کیتوزان در محلول یک درصد اسیداستیک گلاسیال به‌مدت ۲۴ ساعت حل و هم‌زده شد. سپس حجم یکسانی از محلول کیتوزان به آرامی و به‌صورت قطره قطره به محلول نانولیپوزوم در حین هم‌زدن افزوده و توسط خشک‌کن انجمادی (SciQuip، آلمان)، برای ۴۸ ساعت خشک گردید. نمونه‌ها پس از پوشش‌دهی به یخچال منتقل شد [۲۲].

#### ۲-۳- تعیین اندازه ذرات و پتانسیل زتا

اندازه‌گیری اندازه ذرات ریزپوشانی شده ۳۰ دقیقه پس از تولید با استفاده از روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS<sup>۱</sup>)، اندازه و پراکنش اندازه ذرات در تیمارهای مختلف انجام و مقایسه شد. مبنای اندازه‌گیری دستگاه بر اساس روش پراکندگی دینامیکی نور یا تفرق نور لیزر پویا می‌باشد. بار الکتریکی سطحی ذرات که به پتانسیل زتا موسوم است یکی

2. Scanning electron microscope

1. Dynamic light scattering

نانولیپوزوم‌های خشک شده توسط چسب مخصوص روی پین‌های آلومینیومی چسبانده شدند. موادی که جز دسته فلزات نیستند باید به وسیله یک لایه نازک رسانا (طلا و پالادیوم) پوشانده شوند. این کار به کمک ابزاری به نام پوشش دهنده و با استفاده از میدان الکتریکی و گاز آرگون انجام گردید. سپس از سطح خارجی نمونه‌های آماده سازی شده در ولتاژ ۱۵ کیلو ولت و بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر، تصویر برداری شد [۲۲ و ۲۵].

#### ۶-۲- بررسی تاثیر شرایط نگهداری بر برخی از

##### خواص فیزیکی نانولیپوزوم‌های تهیه شده

برای بررسی تاثیر شرایط نگهداری بر نمونه‌ها، ۲ میلی‌لیتر از هریک از نمونه‌ها (نمونه لیپوزوم فاقد فیکوسیاینین، نانولیپوزوم حاوی ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فیکوسیاینین و نانولیپوزوم حاوی فیکوسیاینین پوشش داده شده با بهترین غلظت از کیتوزان) در لوله‌هایی ریخته شد و در دو دمای ۴ (دمای یخچال) و ۲۵ درجه سلسیوس برای مدت ۲۸ روز نگهداری گردید و راندمان انکپسولاسیون، اندازه ذرات و پتانسیل زتا آنها اندازه گیری شد [۲۲].

#### ۷-۲- تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با حداقل سه تکرار انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش آزمون دانکن در سطح ۵ درصد و از نرم افزار آماری SAS انجام گرفت.

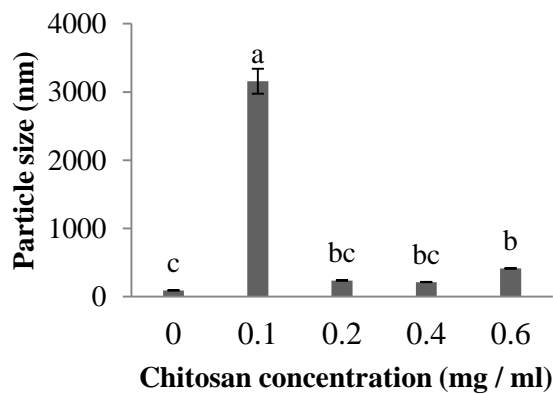
### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- تاثیر غلظت کیتوزان بر راندمان انکپسولاسیون

آنالیز داده‌های به دست آمده نشان داد که غلظت کیتوزان بر راندمان انکپسولاسیون نانولیپوزوم‌های حاوی فیکوسیاینین تاثیر معنی‌دار داشت ( $p < 0.05$ ). مقایسه میانگین داده‌ها به روش آزمون دانکن (شکل ۱) نیز مشخص نمود که بیشینه

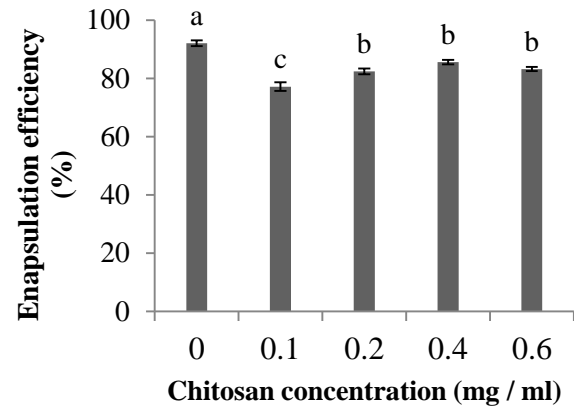
راندمان انکپسولاسیون مربوط به نمونه‌ی فاقد کیتوزان بود و کمینه راندمان انکپسولاسیون نیز متعلق به نمونه‌ای بود که در آن از ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کیتوزان به‌عنوان پوشش استفاده شده بود و با افزایش غلظت کیتوزان از ۰/۱ به ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر میزان راندمان انکپسولاسیون از ۷۷/۲ به ۸۲/۴۵ درصد افزایش یافت و سپس با افزایش بیشتر فیکوسیاینین تغییر معنی‌داری در سطح ۵ درصد در راندمان انکپسولاسیون به‌وجود نیامد. پوشش‌دهی نانوذرات با کیتوزان با ممانعت از خروج ترکیبات از غشای لیپوزومی در مراحل اولیه نگهداری منجر به افزایش این مقدار می‌شود. لیو و همکاران (۲۰۱۵)، سیستم‌های رسانش خوراکی بر پایه لیپوزوم پوشش‌دهی شده با کیتوزان (در غلظت‌های صفر تا ۰/۶ درصد وزنی/حجمی) با استفاده از فسفولیپیدهای غشای گلبول چربی شیر (در غلظت‌های ۳، ۵ و ۱۰ درصد وزنی/حجمی) برای ریزپوشانی پپتیدهایی با خاصیت ضد دیابت حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین ماهی سالمون (در غلظت ثابت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) طراحی کردند. حداکثر بازده ریزپوشانی (۷۱/۳ درصد) و بالاترین پایداری فیزیکی در نمونه‌های حاصل از ۱۰ درصد فسفولیپید غشای گلبول چربی شیر و ۰/۴ درصد کیتوزان حاصل شد [۲۶]. داروزا زوارز و همکاران (۲۰۱۴) ریزپوشانی پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی حاصل از هیدرولیز عضله و محصولات جانبی ماهی کروکر سفید را انجام دادند و بیان داشتند که بازده ریزپوشانی این ترکیبات با لیپوزوم پوشش داده شده با کیتوزان بیش از ۸۰ درصد می‌باشد، هم‌راستا بود [۲۷]. نتایج این بخش با نتایج سرابندی و جعفری (۲۰۲۰)، که تاثیر پوشش کیتوزان بر پایداری نانولیپوزوم حاوی پپتیدهای بذر کتان را در طول خشک کردن افشانه‌ای بررسی کرده بودند و بیان داشته بودند که با افزایش غلظت کیتوزان از صفر تا ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر میزان راندمان ریزپوشانی کاهش و سپس افزایش می‌یابد، مطابقت داشت [۲۵].

بر میلی لیتر اندازه ذرات افزایش و سپس کاهش یافت [۲۲] و [۲۵].



**Figure 2- Effect of chitosan concentration on particle size of nanoliposomes containing phycocyanin**

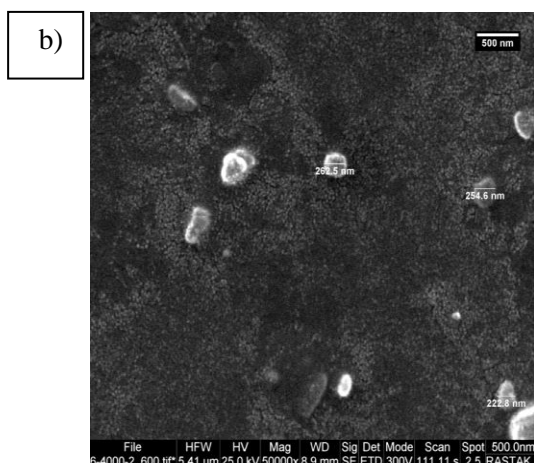
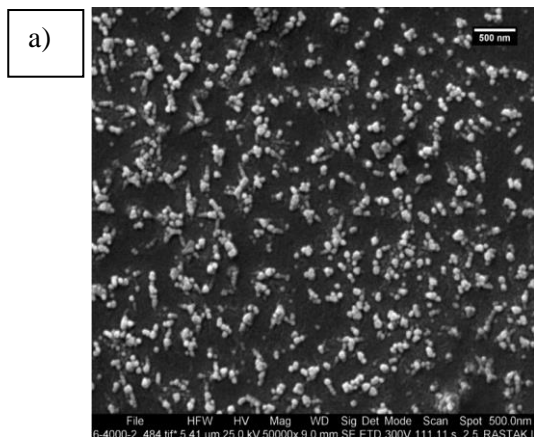
۳-۳- تاثیر غلظت کیتوزان بر پتانسیل زتا  
مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون دانکن (شکل ۳) نشان داد که کمترین میزان پتانسیل زتا نمونه‌ها متعلق به نمونه فاقد کیتوزان بود. از طرفی مشخص شد که با افزایش میزان کیتوزان در پوشش نانولیپوزوم‌ها، میزان پتانسیل زتا نمونه‌ها افزایش یافت. پتانسیل زتا تعیین کننده خصوصیات الکترواستاتیک نانولیپوزوم‌ها است که نمایانگر بار کلی ذره در یک محیط مایع و شاخص مفیدی از بار سطحی ذرات و نیروهای دافعه کلئیدی میان آن‌ها و پایداری فیزیکی سیستم‌های نانوحامل است [۲۷]. کیتوزان به عنوان یک پلی ساکارید کاتیونی می‌تواند پتانسیل زتا را در جهت مثبت تغییر دهد. افزایش مقدار پتانسیل زتا ذرات پس از پوشش-دهی از طریق افزایش دافعه بین ذرات، منجر به کاهش ناپایداری فیزیکی و نیز از طریق ایجاد یک لایه و پوشش در اطراف ذرات، منجر به کاهش نرخ رهایش و از دست رفتن ترکیبات بارگیری می‌شود [۲۷ و ۲۹]. در تحقیقات دیگری، مقدار پتانسیل زتا نانولیپوزوم حاوی پپتیدهای حاصل از کلاژن ماهی ( $-40/8$  mV) و پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی پوست ماهی قزل آلائی رنگین کمان از



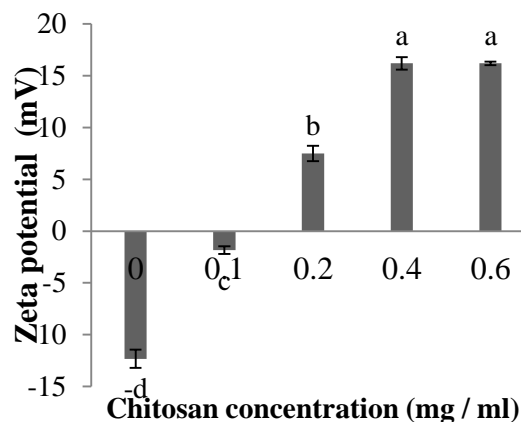
**Figure 1- Effect of chitosan concentration on encapsulation efficiency of nanoliposomes containing phycocyanin**

۳-۲- تاثیر غلظت کیتوزان بر اندازه ذرات  
شکل ۲، نشان داد که اندازه تمامی ذرات مورد مطالعه در این بخش در محدوده  $92/3 - 3156/7$  نانومتر قرار داشتند از طرفی مشخص گردید که در بین نمونه‌ها، نمونه‌ی فاقد کیتوزان کمترین اندازه ذرات را داشت که با نمونه‌های حاوی  $0/2$  و  $0/4$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کیتوزان اختلاف آماری معنی‌داری نداشت ( $p < 0/05$ ). افزایش اندازه ذرات و تشکیل توده‌های بزرگ در نانولیپوزوم‌ها را می‌توان به خنثی شدن بار سطحی، توده‌ای شدن و تشکیل پل بین ذرات مجاور نسبت داد. فرآیند چسبیدن ذرات به یکدیگر در نتیجه واکنش جاذب بین ذراتی با سطوح با بار نسبتاً منفی و مثبت رخ می‌دهد [۲۸]. همان‌طور که مشخص است نمونه حاوی  $0/1$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کیتوزان به‌علت ناپایداری زیاد و تجمع ذرات دارای بیشترین اندازه ذرات بود. سرابندی و جعفری (۲۰۲۰) نیز بیان داشتند که با ذرات دارای  $0/1$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کیتوزان دارای بیشترین اندازه ذرات بودند و با افزایش غلظت کیتوزان (تا  $0/4$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اندازه ذرات کاهش و سپس افزایش یافت و همچنین یافته‌های لی و همکاران (۲۰۱۵) نیز مشخص نمود که با افزایش غلظت کیتوزان تا  $0/1$  میلی‌گرم

چسبیده با سطوح صاف بودند. ذرات کروی به علت تماس سطحی کمتر با محیط، توانایی بیشتری در کنترل رهایش ترکیبات دارند و همچنین این ذرات پایدارتر نیز می‌باشند [۳۲].



در ۳/۹ mV در لیپوزوم‌های پوشش‌دهی نشده به ۴۵/۵ mV در نمونه‌های پوشش‌دهی شده، گزارش شده است [۲۹ و ۳۰].



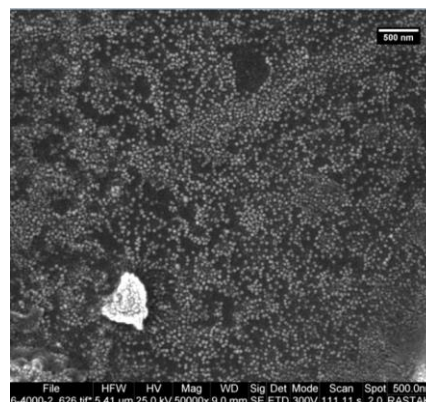
**Figure 3- Effect of chitosan concentration on zeta potential of nanoliposomes containing phycocyanin**

۳-۴- بهینه‌یابی غلظت کیتوزان در ساختار نانولیپوزوم‌های تولیدی با توجه به نتایج به دست آمده از راندمان انکپسولاسیون، اندازه ذرات و پتانسیل زتا می‌توان بیان داشت، نمونه‌ای که در پوشش نانولیپوزوم خود، حاوی ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کیتوزان بود به‌عنوان بهترین نمونه انتخاب گردید.

۳-۵- ریخت‌شناسی ذرات نمونه بهینه نانولیپوزوم حاوی فیکوسیاینین و کیتوزان

بررسی ویژگی مورفولوژی نانوذرات توسط روش‌های میکروسکوپی با بزرگنمایی بالا صورت می‌گیرد که نشان دهنده تاثیر فرآیند تولید، نوع و ترکیبات فرمولاسیون این مواد می‌باشد [۳۱]. ویژگی ساختاری نانولیپوزوم فاقد فیکوسیاینین (شکل 4a)، نانولیپوزوم حاوی فیکوسیاینین (شکل 4b) و نانولیپوزوم حاوی فیکوسیاینین پوشش داده شده با ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کیتوزان (شکل 4c) مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید که نانولیپوزوم حاوی فیکوسیاینین پوشش داده شده با کیتوزان ذرات نسبتاً کروی و

سیلیسیوس، مقدار از دست رفته هیدرولیز شده پس از ۴ هفته نگهداری به حدود ۸۷ درصد رسید. پوشش‌دهی لیپوزوم با کیتوزان منجر به کاهش و از دست رفتن ماده فعال به حدود ۱۱ درصد در طول نگهداری شد [۳۴]. اجاق و همکاران (۲۰۲۲)، تأثیر فرآیندهای انجماد - انجمادزدایی و خشک کردن انجمادی- هیدراسیون بر پایداری فیزیکی نانولیپوزوم‌های حامل پپتیدهای زیست فعال را مورد مطالعه قرار دادند و نگهداری به مدت ۴ هفته در دمای ۴ درجه سیلیسیوس نسبت به دمای ۲۵ درجه سیلیسیوس شرایط نگهداری مناسب‌تری برای تمامی فرمولاسیون‌ها می‌باشد و لیپوزوم‌های دارای پوشش توانایی بیشتری در حفظ مواد کپسوله شده داشتند [۳۵].



c)

**Figure 4 - Morphological characteristics of a) empty nanoliposomes, b) nanoliposomes containing phycocyanin and c) nanoliposomes containing phycocyanin coated with chitosan**

### ۳-۶- بررسی شرایط نگهداری بر راندمان انکپسولاسیون

نتایج اثر متقابل پارامترهای مورد مطالعه بر راندمان انکپسولاسیون در جدول ۱، آورده شده است. همان طور که مشخص است، بیشترین میزان راندمان انکپسولاسیون متعلق بود به نانولیپوزوم دارای فیکوسیانین که فاقد هرگونه پوشش کیتوزان در روز تولید بود از طرفی مشخص گردید که با افزایش دمای نگهداری و زمان نگهداری میزان راندمان انکپسولاسیون کاهش یافت و نمونه‌های دارای پوشش کیتوزان در روزهای انتهایی نگهداری دارای راندمان بالاتری نسبت به نمونه‌های فاقد پوشش بودند. حفظ بازده ریزپوشانی، پایداری بیشتر و رهايش کمتر نانولیپوزوم‌ها در دمای پایین را می‌توان به نفوذپذیری کم‌تر غشا در دمای پایین، کاهش توده‌ای شدن در نتیجه تحرک مولکولی کمتر و تأخیر در فرآیند اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع در فسفولیپیدها نسبت داد [۳۳]. در تحقیق دیگری، اثر نگهداری طولانی مدت بر رهايش و بازده ریزپوشانی پروتئین‌های زیست فعال هیدرولیز شده سالمون در لیپوزوم‌های پوشش‌دهی شده با کیتوزان بررسی شد. در طول نگهداری لیپوزوم‌ها به مدت ۴ هفته در دمای ۴ درجه



**Table 1- Effect of storage conditions on encapsulation efficiency (%)**

Liposome type	Storage temperature (° C)	Time Storage (days)					
		0	1	7	14	21	28
NLP	4	92.13±1.02 <sup>a</sup>	86.17±0.64 <sup>b</sup>	80.37±0.33 <sup>d</sup>	75.33±0.15 <sup>efg</sup>	73.53±0.13 <sup>ghi</sup>	72.00±0.21 <sup>i</sup>
	25	92.13±1.02 <sup>a</sup>	86.63±0.74 <sup>b</sup>	77.03±0.29 <sup>e</sup>	68.67±0.10 <sup>j</sup>	63.30±0.20 <sup>k</sup>	56.80±0.09 <sup>l</sup>
NLPC	4	85.70±0.77 <sup>b</sup>	83.16±0.43 <sup>c</sup>	76.76±0.31 <sup>e</sup>	74.67±0.17 <sup>efgh</sup>	72.87±0.19 <sup>ghi</sup>	72.60±0.12 <sup>hi</sup>
	25	85.70±0.77 <sup>b</sup>	81.677±0.65 <sup>cd</sup>	75.93±0.20 <sup>ef</sup>	72.30±0.19 <sup>hi</sup>	70.93±0.17 <sup>ij</sup>	65.13±0.40 <sup>k</sup>

Numbers with the same letters have no significance at the 5% level and NLP: nanoliposomes containing phycocyanin and NLPC: nanoliposomes containing phycocyanin coated with chitosan

فیزیکی نانولیپوزوم‌های حاوی پپتیدهای زیست فعال، نشان دادند که اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها در دمای ۲۰ درجه بزرگ‌تر از اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های نگهداری شده در دمای ۴ درجه سلیسیوس بود که همراستا با نتایج این بخش بود [۳۵]. عموماً لیپوزوم‌ها در معرض تجمع و تشکیل وزیکول‌های بزرگتر در طول زمان می‌باشند. دیسپرسیون‌های لیپوزومی تمایل به حرکت به سمت حداقل انرژی و رسیدن به پایداری ترمودینامیکی بیشتر دارد. افزایش پایداری مشاهده در پایداری لیپوزوم‌های پوشش‌دهی شده با کیتوزان می‌تواند با دافعه استریک و الکترواستاتیک توضیح داده شود. نتایج این مطالعه بیانگر این مطلب بود که غشای ضخیم‌تر لیپوزوم منجر به انتشار کندتر فیکوسیانین از طریق لایه‌های پوشش شده گردید که در نتیجه آن اندازه ذرات در طول نگهداری نسبت به نمونه‌هایی که در آنها از پوشش کیتوزان استفاده نشده بود، کاهش یافت [۳۳].

### ۷-۳- بررسی شرایط نگهداری بر اندازه ذرات

نتایج اثر متقابل تمامی پارامترهای عملیاتی بر اندازه ذرات لیپوزوم‌های تولیدی در جدول ۲، آورده شده است. همان طور که مشخص است، بیشترین میزان اندازه ذرات متعلق بود به لیپوزوم دارای فیکوسیانین که فاقد هرگونه پوشش کیتوزان بعد از ۲۸ روز نگهداری و زمان نگهداری سلیسیوس بود و با افزایش دمای نگهداری و زمان نگهداری میزان اندازه ذرات افزایش یافت. نگهداری نانولیپوزوم‌های تولیدی نشان داد که افزایش اندازه ذرات می‌تواند ناشی از بارهای منفی موجود در ترکیبات فیکوسیانین باشد که موجب دفع ذرات نانولیپوزومی و در نتیجه باز شدن لایه‌ها و افزایش اندازه نانولیپوزوم‌ها می‌شود [۲۷]. در دمای محیط لیپوزوم‌ها به دلیل سیالیت بالای غشا، آگلومریزه می‌شوند و لخته تشکیل می‌دهند که افزایش اندازه ذرات و توزیع ناهمگون ذرات را در پی خواهد داشت. اجاق و همکاران (۲۰۲۲) با بررسی تاثیر فرایندهای مختلف بر پایداری

**Table 2- Effect of storage conditions on particle size (nm)**

Liposome type	Storage temperature (° C)	Time Storage (days)					
		0	1	7	14	21	28
NL	4	84.67±1.40 <sup>s</sup>	93.63±1.40 <sup>s</sup>	139.00±2.10 <sup>pq</sup>	164.70±3.00 <sup>nop</sup>	176.30±1.90 <sup>mno</sup>	183.30±0.60 <sup>lmn</sup>

	25	84.67±1.40 <sup>s</sup>	93.33±1.40 <sup>s</sup>	151.00±2.10 <sup>op</sup>	180.30±4.40 <sup>lmn</sup>	201.00±1.70 <sup>kim</sup>	205.00±3.80 <sup>kl</sup>
NLP	4	92.33±1.5 <sup>s</sup>	105.67±4.30 <sup>ns</sup>	262.00±3.00 <sup>i</sup>	336.00±7.10 <sup>h</sup>	473.60±7.00 <sup>d</sup>	553.00±9.70 <sup>c</sup>
	25	92.33±1.70 <sup>s</sup>	121.33±2.20 <sup>br</sup>	376.30±5.20 <sup>fg</sup>	545.00±2.60 <sup>c</sup>	709.70±2.90 <sup>b</sup>	835.30±1.40 <sup>a</sup>
NLPC	4	212.70±2.70 <sup>jk</sup>	229.40±2.00 <sup>j</sup>	261.00±2.00 <sup>i</sup>	344.00±0.80 <sup>h</sup>	350.00±3.90 <sup>gh</sup>	357.30±0.50 <sup>gh</sup>
	25	212.70±2.70 <sup>jk</sup>	262.30±5.00 <sup>i</sup>	393.30±3.40 <sup>f</sup>	440.30±1.20 <sup>e</sup>	445.30±5.70 <sup>d</sup>	549.00±2.60 <sup>c</sup>

Numbers with the same letters have no significance at the 5% level and NL: Empty nanoliposomes, NLP: nanoliposomes containing phycocyanin and NLPC: nanoliposomes containing phycocyanin coated with chitosan.

نگهداری نداشت [۳۷]. در در یک سیستم کلونیدی اختلاف پتانسیل بین لایه یونی غیرمتحرک (لایه استرن) و لایه متحرک (لایه انتشار)، در اتمسفر یونی اطراف ذرات باردار، پتانسیل زتا نامیده می‌شود. پتانسیل زتا بهترین شاخص برای تعیین وضعیت الکتریکی سطح ذرات است زیرا نشان دهنده میزان تجمع بار در لایه غیر متحرک و شدت جذب یون‌های مخالف بر روی سطح ذره است و بنابراین بار ذرات اغلب بر حسب پتانسیل زتا گزارش می‌شود. بالا بودن پتانسیل زتای ذرات کلونیدی موجب بالا رفتن نیروی دافعه الکترواستاتیک و در نتیجه افزایش پایداری فیزیکی سیستم می‌شود [۳۸] که با توجه به نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نانولیپوزوم‌های حاوی فیکوسیانین پوشش‌داده شده با ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کیتوزان دارای بالاترین پتانسیل زتا و در نتیجه افزایش پایداری سیستم هستند.

### ۳-۸- بررسی شرایط نگهداری بر پتانسیل زتا

جدول ۳، نشان داد که کمترین پتانسیل زتا نمونه‌ها مربوط به نمونه لیپوزوم فاقد فیکوسیانین بود که تا روز ۲۱ ام نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس تغییر معنی‌داری نداشت ولی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس از روز ۱۴ ام نگهداری به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت، در اکثر نمونه‌ها نیز درجه حرارت و زمان نگهداری تاثیر معنی‌داری بر پتانسیل زتا نمونه‌ها نداشت. لوجان و همکاران (۲۰۱۹) با بررسی که روی سنتتیک تشکیل نانولیپوزوم‌های حاوی اسید ریبونوکلیتیک انجام دادند، بیان داشتند که درجه حرارت و زمان نگهداری تاثیر معنی‌داری بر میزان پتانسیل زتا نمونه‌های تولیدی نداشت که با نتایج این بخش مطابقت داشت [۳۶]. محمدی و همکاران (۲۰۱۴) نیز نشان دادند که زمان نگهداری تغییر معنی‌داری در پتانسیل زتا نمونه‌های نانولیپوزوم حاوی ویتامین D<sub>3</sub> در طول مدت زمان ۳۰ روز

Table 3- Effect of storage conditions on zeta potential (mV)

Liposome type	Storage temperature (°C)	Time Storage (days)					
		0	1	7	14	21	28
NL	4	-18.33±0.3 <sup>h</sup>	-17.67±0.1 <sup>gh</sup>	-17.67±0.1 <sup>gh</sup>	-17.00±0.7 <sup>gh</sup>	-16.33±0.3 <sup>fg</sup>	-16.00±0.3 <sup>fg</sup>
	25	-18.33±0.3 <sup>h</sup>	-17.67±0.1 <sup>gh</sup>	-17.00±0.7 <sup>gh</sup>	-16.00±0.3 <sup>fg</sup>	-15.67±0.2 <sup>f</sup>	-15.33±0.3 <sup>f</sup>
NLP	4	-12.33±0.5 <sup>e</sup>	-12.67±0.3 <sup>e</sup>	-12.00±0.5 <sup>de</sup>	-12.00±0.5 <sup>de</sup>	-11.67±0.4 <sup>de</sup>	-12.00±0.5 <sup>de</sup>
	25	-12.33±0.5 <sup>e</sup>	-11.67±0.4 <sup>de</sup>	-11.33±0.7 <sup>de</sup>	-10.33±0.5 <sup>cd</sup>	-10.33±0.5 <sup>cd</sup>	-9.33±0.4 <sup>c</sup>
NLPC	4	16.20±0.20 <sup>ab</sup>	16.00±0.2 <sup>ab</sup>	15.33±0.6 <sup>ab</sup>	16.67±0.1 <sup>a</sup>	16.33±0.1 <sup>ab</sup>	15.83±0.2 <sup>ab</sup>

25      16.20±0.20<sup>ab</sup>      16.67±0.1<sup>a</sup>      15.67±0.4<sup>ab</sup>      14.64±0.3<sup>b</sup>      15.67±0.2<sup>ab</sup>      16.67±0.1<sup>a</sup>

Numbers with the same letters have no significance at the 5% level and NL: Empty nanoliposomes, NLP: nanoliposomes containing phycocyanin and NLPC: nanoliposomes containing phycocyanin coated with chitosan.

دما و زمان نگهداری راندمان انکپسولاسیون کاهش ولی اندازه ذرات افزایش یافت ولی با پوشش دهی نانولیپوزومها توسط کیتوزان کاهش راندمان کسپولاسیون در روزهای انتهایی نگهداری کمتر بود. در پایان می توان گفت که غشای دولایه مورد استفاده در این تحقیق و همچنین نگهداری نانولیپوزومهای تولیدی در دمای ۴ درجه سانتی گراد تا حدود زیادی منجر به افزایش پایداری فیکوسیانین می گردد.

#### ۴- نتیجه گیری کلی

در این مطالعه انکپسولاسیون فیکوسیانین در نانولیپوزومهای پوشش داده شده با کیتوزان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که غلظت کیتوزان در راندمان انکپسولاسیون، پتانسیل زتا و اندازه ذرات نمونهها تاثیر گذار بود که با افزایش غلظت کیتوزان پتانسیل زتا نمونهها افزایش یافت. از طرفی نتایج مشخص نمود که شرایط نگهداری نیز در پایداری نمونههای تولیدی موثر بود به گونه ای که با افزایش

#### ۵- منابع

[1] Baygan, A., Jafari Jade, A., Mehravar, N. and Habibzadeh, M. 2016. Natural pigments and its application in food industry. The First International Congress and the 24th National Congress of Food Science and Technology of Iran. Iranian Food Science and Technology Association, Tarbiat Modares University, Tehran. (In Persian).

[2] McClements, D. J. 2005. Food emulsions. principles, practices and techniques. CRC Press, Boca Raton.

[3] Saranraj, P. and Sivasakthi, S. 2014. Spirulina platensis -Food for future. Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology. 4: 26-33.

[4] Bermejo, R. 2014. Phycocyanins. In N. Sharma, A. Rai, & L. Stal (Eds.), Cyanobacteria: An Economic Perspective. John Wiley & Sons Ltd.

[5] Newsome, A., Culver, C. and Breemen, R. 2014. Nature's palette: the search for natural blue colorants. Journal of

Agricultural and Food Chemistry. 6498-6511.

[6] Jesperse, L., Strømdahl, L. D., Olsen, K. and Skibsted, L.H. 2005. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionary and beverages. European Food Research and Technology. 220: 261-266.

[7] Calvo, P., Hernandez, T., Lozano, M. and Gomez, D.G. 2010. Microencapsulation of extra-virgin olive oil by spray-drying: Influence of wall material and olive quality. European Journal of Lipid Science and Technology. 112: 852-858.

[8] Horváth, H., Kovács, A.W., Riddick, C. and Présing, M. 2013. Extraction methods for phycocyanin determination in freshwater filamentous cyanobacteria and their application in a shallow lake. European Journal of Phycology. 48: 278-286.

[9] Hu, B., Pan, C., Sun, Y., Hou, Z., Ye, H., Hu, B. and Zeng, X. 2008. Optimization of fabrication parameters to produce chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for delivery

of tea catechins. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 56: 7451-7458.

[10] Luo, Y., Zhang, B., Whent, M., Yu, L.L., Wang, Q. 2011. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol, and its in vitro controlled release study. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 85: 145-152.

[11] Woranuch, S. and Yoksan, R. 2013. Eugenol-loaded Chitosan Nanoparticles. I. Thermal Stability Improvement of Eugenol through Encapsulation. *Journal of Carbohydrate Polymer*. 96: 578-585.

[12] Ghaderi-Ghahfarokhi, M., Barzegar, M., Sahari, M. A., Ahmadi Gavlighi, H. and Gardini, F. 2017. Chitosan-cinnamon essential oil nano-formulation: Application as a novel additive for controlled release and shelf life extension of beef patties. *International Journal of Biological Macromolecules*. 16 (10): 1-17.

[13] Lange, A., Neves, P., Cardoso, C., Leidiani, M., Humberto, M., Riella, G., Cabral, N., Hellen, K., and Stulzer, K. 2013. Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 10 (6): 1-16.

[14] Keller, B.C. 2001. Liposomes in nutrition. *Trends in Food Science and Technology*. 12: 25-31.

[15] Ghorbanzade, T., Jafari, S.M., Akhavan, S. and Hadavi, R. 2017. Nano-encapsulation of fish oil in nanoliposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chemistry*. 216: 146-152.

[16] Emami, S., Azadmard-Damirchi, S., Peighambardoust, S.H., Valizadeh, H. and Hesari, J. 2016. Liposomes as carrier vehicles for functional compounds in food sector. *Journal of Experimental Nanoscienc*. 11: 1-23.

[17] Hao, J., Guo, B., Yu, Sh., Zhang, W., Zhang, D., Wang, J. and Wang, Y. 2017. Encapsulation of the flavonoid quercetin with chitosan-coated nano-liposomes. *Food Science and Technology*. 85: 37-44.

[18] Thamaket, P. and Raviyan, P. 2015. Preparation and physical properties of carotenoids encapsulated in chitosan cross-linked tripolyphosphatene nanoparticles. *Food and Applied Bioscience Journal*, 3 (1): 69-84.

[19] Yan, M., Liu, B., Jiao, X., and Qin, S. 2013. Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties. *Food and Bioproducts Processing*. 92(1): 89-97.

[20] Manconi, M., Mura, S., Manca, M.L., Fadda, A.M., Dolz, M., Hernandez, M.J., Casanovas, A. and Diez-Sales, O. 2010. Chitosomes as drug delivery systems for c-phycocyanin: preparation and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*. 392: 92-100.

[21] Akbarbaglu, Z., Jafari, S.M., Sarabandi, K., Mohammadi, M., Heshmati, M. K. and Pezeshki, A. 2019. Influence of spray drying encapsulation on the retention of antioxidant properties and microstructure of flaxseed protein hydrolysates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 178: 421-429.

[22] Li, Z., Paulson, A.T. and Gill, T.A. 2015. Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes. *Journal of Functional Foods*. 19: 733-743.

[23] Joye, I.J., Davidov-Pardo, G. and McClements, D.J. 2015. Encapsulation of resveratrol in biopolymer particles produced using liquid antisolvent precipitation. Part 2: Stability and functionality. *Food Hydrocolloids*. 49: 127-134.

[24] Fathi, M., Varshosaz, J., Mohebbi, M. and Shahidi, F. 2013. hesperetin-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructure lipid carries for food fortification: preparation, characterization, and modeling. *Food bioprocess technology*. 6: 1464-1475.

[25] Sarabandi, K. and Jafari, S.M. 2020. Effect of chitosan coating on the properties

of nanoliposomes loaded with flaxseed-peptide fractions: Stability during spray-drying. *Food Chemistry*. 310: 1-10.

[26] Liu, W. L., Ye, A., Liu, C., Han, J. and Singh, H. 2015. Behavior of liposomes loaded with bovine serum albumin during in vitro digestion. *Food Chemistry*. 175: 16-24.

[27] da Rosa Zavareze, E., Telles, A. C., El Halal, S. L. M., da Rocha, M., Colussi, R., de Assis L. M., Suita de Castro, L. A., Guerra Dias, A. R. and Prentice-Hernández, C. 2014. Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. *Food Science and Technology*. 59: 841-848.

[28] Mun, S., Decker, E.A. and McClements, D.J. 2005. Influence of droplet characteristics on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant-chitosan layers. *Langmuir*. 21: 6228-6234.

[29] Ramezanzade, L., Hosseini, S.F. and Nikkhab, M. 2017. Biopolymercoated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skinderived antioxidant peptides. *Food Chemistry*. 234: 220- 229.

[30] Mosquera, M., Giménez, B., da Silva, I. M., Boelter, J. F., Montero, P., Gómez-Guillén, M. C. and Brandelli, A. 2014. Nanoencapsulation of an active peptidic fraction from sea bream scales collagen. *Food Chemistry*. 156: 144-150.

[31] Sarabandi, K., Peighambaroust, S.H., Mahoonak, A.S. and Samaei, S.P. 2017. Effect of carrier types and compositions on the production yield, microstructure and physical characteristics of spray dried sour cherry juice concentrate. *Journal of Food Measurement and Characterization*. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9540-3>.

1773-1780.

[32] Rabelo, R.S., Oliveira, I.F., da Silva, V.M., Prata, A. S. and Hubinger, M.D. 2018. Chitosan coated nanostructured lipid carriers (NLCs) for loading Vitamin D: A physical stability study. *International Journal of Biological Macromolecules*. 119: 902-912.

[33] Gibis, M., Zeeb, B. and Weiss, J. 2014. Formation, characterization, and stability of encapsulated hibiscus extract in multilayered liposomes. *Food Hydrocolloid*. 38: 28-39.

[34] Liu, W.L., Ye, A., Liu, C.M., Liu, W. and Singh, H. 2012. Structure and integrity of liposomes prepared from milk or soybeanderived phospholipids during in vitro digestion. *Food Research International*. 48 (2): 499-506.

[35] Ojagh, S.M., Hasani, S. and Hasani, M. 2022. The Effect of Freezing/thawing and Freeze-drying / Rehydration Processes on the Physical Stability of Nano-Liposomes Containing the Bioactive Peptides. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*. 13(4): 65-81. (In Persian).

[36] Lujan, H., Griffin, W.C., Taube, J.H. and Sayes, C.M. 2019. Synthesis and characterization of nanometer-sized liposomes for encapsulation and micro RNA transfer to breast cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*. 14: 5159-5173.

[37] Mohammadi, M., Ghanbarzadeh, B. and Hamishehkar, H. 2014. Formulation of Nanoliposomal Vitamin D3 for Potential Application in Beverage Fortification. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 4 (2): 569-575.

[38] Borges, O., Silva, M., de Sousa, A., Borchard, G., unginger, H.E. and Cordeiro-da-Silva, A., 2008. Alginate coated chitosan nanoparticles are an effective subcutaneous adjuvant for hepatitis B surface antigen. *Int. Immunopharmacol.* 8:



## Scientific Research

### The effect of storage conditions on the stability of chitosan-coated nanoliposomes containing phycocyanin

Abdul Khalil Azari<sup>1</sup>, Seyed Hossein Hosseini Qaboos<sup>\*2</sup>, Seyed Mehdi Jafari<sup>3</sup>, Vahid Erfani Moghadam<sup>4</sup>

1- Ph.D. student in Food Science and Industry, Islamic Azad University, Azadshahr Branch, Azadshahr, Iran.

2-Assistant Professor, Department of Food Science and Industry, Islamic Azad University, Azadshahr Branch, Azadshahr, Iran.

3- Professor, Department of Material Engineering and Food Industry Design, Faculty of Food Industry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

4-Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

#### ABSTRACT

Increasing and improving the stability of colors in food during processing and also controlling the release until consumption is one of the most important issues and challenges in the use of natural colors in food. Hence, the objective of this study was to produce phycocyanin-containing nanoliposomes coated with chitosan by thin-layer ultrasonic hydration method to increase the stability of phycocyanin and to investigate its physical properties and encapsulation efficiency during storage. In this study, phycocyanin was coated with different concentrations of chitosan (0, 0.1, 0.2, 0.4, and 0.6 mg/mL) and stored at two temperatures (4 and 25° C) for 28 days. Then, to determine the best concentration of chitosan for coating the nanoliposomes, encapsulation efficiency, particle size, and zeta potential tests were performed. The results revealed that by increasing the concentration of chitosan to more than 0.2 mg/mL, no significant change in encapsulation efficiency was observed ( $p > 0.05$ ). The sample without chitosan had the lowest particle size which was not a significant difference from samples containing 0.2 and 0.4 ( $p > 0.05$ ). Increasing chitosan in the coating of nanoliposomes has led to increased zeta potential. Finally, a sample containing 0.2 mg/mL chitosan was selected as the best sample. Findings from analyses performed during the storage of nanoliposomes showed that nanoliposomes containing phycocyanin, which did not have any chitosan coating, had the highest encapsulation efficiency. On the other hand, it was found that with increasing storage temperature and storage time, the encapsulation efficiency decreased but the particle size increased. The lowest zeta potential of the samples was related to the phycocyanin-free nanoliposome sample which did not change significantly until the 21st day of storage at 4 °C. Scanning electron microscopy (SEM) images of the samples also confirmed the results of particle measurements.

#### ARTICLE INFO

##### Article History:

Received : 2021/12/2  
Accepted 2022/5/29

##### Keywords:

Nanoliposomes,  
Phycocyanin,  
Chitosan,  
Coating,  
Thin-layer hydration – ultrasound method

DOI: 10.22034/FSCT.20.137.1

DOI: 20.1001.1.200088787.1402.20.136.16.4

\*Corresponding Author E-Mail:  
hosseinighaboos@yahoo.com