**مجله علوم و صنایع غذایی ایران**

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

# بررسی و مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی فیکوسیانین استخراج‌شده از میکروجلبک اسپیرولینا (*Spirulina Platensis*) در دو فرم خالص و نانو ریزپوشانی‌شده با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم

رضا صفری[1*]، زینب رفتنی امیری[2]، سهیل ریحانی پول[3]، رضا اسماعیل‌زاده کناری[2]

1- استادیار، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران.

2- استاد، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

3- دانش‌آموخته دکتری تخصصی، گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

**اطلاعات مقاله**

**تاریخ های مقاله :**

**تاریخ دریافت: 1400 /09/21**

**تاریخ پذیرش: 1400/11/06**

**کلمات کلیدی:**

اسپیرولینا،

فیکوسیانین،

نانو ریزپوشانی،

فعالیت آنتی‌اکسیدانی،

خاصیت ضد باکتریایی.

**چکیده**

**به دنبال نگرانی‌های ایجادشده در زمینه استفاده از نگهدارنده‌های سنتتیک در مواد غذایی مختلف، توجه به ترکیبات طبیعی با خاصیت نگهدارندگی ضروری به نظر می‌رسد. فیکوسیانینی که از میکروجلبک اسپیرولینا استخراج می‌شود، یکی از این ترکیبات است. هدف تحقیق حاضر، استخراج (به روش آنزیمی) و نانو ریزپوشانی این رنگدانه با پوشش ترکیبی مالتودکسترین- کازئینات سدیم و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی (علیه *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *یرسینیا روکری* و *استرپتوکوکوس اینیه‌ایی*) نانوکپسول‌ها در مقایسه با فیکوسیانین خالص بود. نتایج نشان داد با افزایش غلظت فیکوسیانین (در هر دو فرم خالص و نانو ریزپوشانی شده)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی تیمارها به صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد ($p<0/05$). مقایسه خواص تیمارها در روزهای صفر و 60 (نگهداری در دمای 18- درجه سانتی‌گراد) نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی فیکوسیانین خالص با گذشت زمان نگهداری به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد ($p<0/05$). اما تکنیک نانو ریزپوشانی از تغییر خواص مذکور جلوگیری و به حفظ آن‌ها کمک می‌کند. در بین باکتری‌های گرم‌مثبت، *لیستریا مونوسیتوژنز* نسبت به دو باکتری دیگر حساس‌تر بوده و تمامی غلظت‌های مورد استفاده دارای اثر مهارکننده بر این باکتری بودند. *استافیلوکوکوس اورئوس* به دو غلظت 2/5 و 5 و *استرپتوکوکوس اینیه‌ایی* به سه غلظت 2/5، 5 و 10 میکروگرم بر میلی‌لیتر مقاوم بودند. در بین دو باکتری گرم منفی، *یرسینیا روکری* از حساسیت بیشتری برخوردار بوده و غلظت‌های مورد استفاده، به استثنای غلظت‌های 2/5 و 5 میکروگرم بر میلی‌لیتر، دارای اثر مهارکننده بر هر دو باکتری بودند. مطابق نتایج روش رقیق‌سازی، برای باکتری‌های مورد مطالعه، دامنه MIC بین 50-500 و MBC بین 100-500 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. ضمن اینکه کمترین MIC برای *لیستریا مونوسیتوژنز* و بیشترین MBC برای *استرپتوکوکوس اینیه‌ایی* ثبت شد. از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که اولا فیکوسیانین خالص دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی است؛ دوما نانو ریزپوشانی این رنگدانه با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم موجب ارتقای این خواص و ثبات آن‌ها در طول دوره نگهداری می‌گردد.**

DOI: 10.22034/FSCT.19.127.345

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.127.13.6

* مسئول مکاتبات:

Safari1351@gmail.com



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-04 ]

[ DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.127.13.6 ]

[ DOI: 10.22034/FSCT.19.127.345 ]

## 1- مقدمه

فیکوسیانین یکی از رنگدانه‌های طبیعی است که از میکروجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* به روش‌های مختلف از جمله آنزیمی استخراج می‌شود. این رنگدانه از دو زیر واحد نسبتا مشابه $\alpha$ و $\beta$ تشکیل شده که زنجیره آلفا شامل یک فیکوسیانوبیلین متصل به سیستئین 89 و زنجیره بتا شامل دو فیکوسیانوبیلین متصل به سیستئین‌های 84 و 155 می‌باشند. این دو واحد، مونومرهای $\alpha\beta$، تری‌مرهای $\alpha_3\beta_3$ و هگزامرهای $\alpha_6\beta_6$ را تشکیل می‌دهند. فیکوسیانین به اشکال مختلف تری، هگزا و دکامر وجود داشته که بر اساس pH، قدرت یونی محیط، غلظت پروتئین و منشاء جلبک مورد نظر، متفاوت می‌باشند. علاوه بر این، شکل اولیه فیکوسیانین بر وزن مولکولی و شدت جذب نوری آن تاثیر دارد. محصول پودری، به رنگ آبی، غیر سمی، بدون بو و کمی شیرین است که وقتی در آب حل شود فلورسانس درخشان دارد. پایداری فیکوسیانین به منشاء، pH، دما، نور و برخی از مواد خارجی بستگی دارد. این رنگدانه در pHهای 4/5 تا 8 و دمای 45 درجه سانتی‌گراد پایدار اما مقاومت آن در برابر نور ضعیف است. اختلاف جزئی در ترکیب اسیدهای آمینه فیکوسیانین، بر پایداری و خواص ساختاری آن تاثیرگذار می‌باشد. فیکوسیانین به همراه سایر رنگدانه‌های گروه فیکوبیلی‌پروتئین‌ها دارای کاربرد گسترده در صنعت غذا، صنایع آرایشی- بهداشتی، زیست فناوری، تشخیص بیماری و درمان می‌باشند. فیکوسیانین اولین بار توسط یک شرکت ژاپنی تحت نام Blue Lina تجاری شده و در حال حاضر به عنوان رنگدانه طبیعی در کشورهای چین و ژاپن در محصولات غذایی نظیر آدامس، شکلات، فراورده‌های لبنی، ژله‌ها، بستنی، نوشیدنی‌ها و همچنین محصولات آرایشی نظیر کرم‌های ضد آفتاب و دور چشم مورد استفاده قرار می‌گیرد. قیمت هر میلی‌گرم فیکوسیانین در سال 2012، 2/5 دلار گزارش شده است [1].

استفاده از نگهدارنده‌های سنتتیک در فرمولاسیون مواد غذایی مختلف همواره نگرانی‌هایی را برای مصرف‌کنندگان و متولیان سلامت جمعیت به دنبال دارد. به همین دلیل باید از پتانسیل ترکیبات طبیعی با خواص نگهدارندگی بهره گرفت. از آنجا که خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی فیکوسیانین در تحقیقات مختلف اثبات شده است [2-4]، می‌توان از این منبع در فرمولاسیون مواد غذایی مختلف استفاده کرد.

در صنایع غذایی به منظور حفاظت از ساختار نگهدارنده‌ها در برابر عوامل محیطی (اکسیداسیون و کاهش خواص نگهدارندگی) از تکنیک ریزپوشانی استفاده می‌شود. کویروس ساسدا و همکاران (2014) در مطالعه خود به کاربرد پوشش‌های خوراکی جهت ریزپوشانی‌کردن ترکیبات آنتی‌اکسیدان، مواد ضد میکروبی، مواد طعم‌دهنده، پروبیوتیک‌ها و ترکیبات فعال اشاره کرده و یادآور شدند که این فرآیند باعث رهایش تدریجی مواد زیست‌فعال و متعاقب آن دوام و اثرات آن‌ها در درازمدت می‌شود. علاوه بر ویژگی‌های ذکر-شده، فرآیند ریزپوشانی موجب کنترل رطوبت، تبادلات گازی و واکنش‌های اکسیداسیون شده و خواص مکانیکی، حسی و کارکردی مواد ریزپوشانی‌شده را تغییر می‌دهد [5]. اوزکان و بیلک (2014) فرآیند ریزپوشانی را در رنگ‌های بیولوژیک خوراکی مورد بررسی قرار داده و اشاره کردند که پوشش‌هایی که برای ریزپوشانی‌کردن مورد استفاده قرار می‌گیرند بایستی دارای ویژگی‌هایی نظیر خاصیت تشکیل فیلم، خواص امولسیونی، قابلیت تجزیه‌پذیربودن، پایداری در مجرای گوارشی، ویسکوزیته مناسب، قیمت ارزان و هیدروسکوپی پائین باشند [6].

امروزه از پوشش‌های مختلفی جهت ریزپوشانی‌کردن مواد استفاده می‌شود که ممکن است ساختار پلی‌ساکاریدی، پروتئینی و یا لیپیدی داشته و از منابع گیاهی، دریایی، حیوانی و میکروبی تهیه گردند. در انتخاب دیواره بایستی به ویژگی‌های اولیه از جمله ترکیب و ساختار شیمیایی، وزن مولکولی و همچنین خواص ثانویه نظیر حلالیت، رفتار رئولوژیکی، توانایی تشکیل فیلم، کیفیت فیلم، فعالیت سطحی، دوام و تجزیه‌پذیری، نقطه ذوب و جوش توجه شود. در فرآیند ریزپوشانی انواع مختلف کربوهیدرات (نشاسته، کیتوزان، مالتودکسترین، شربت ذرت، دکسترین، ساکارز، دکسترین‌های حلقوی)، سلولز (کربوکسی‌متیل‌سلولز، متیل سلولز، اتیل سلولز، نیتروسلولز، استات سلولز و ...)، صمغ‌ها (صمغ عربی، آگار، آلژینات‌سدیم، کاراگینان و ...)، چربی‌ها (لیپوزوم، واکس، پارافین، بیزواکس، دی‌گلیسریدها، مونوگلیسریدها، روغن‌ها و ...)، پروتئین‌ها (گلوتن، کازئین، آب پنیر، ژلاتین، آلبومین، هموگلوبین، پپتیدها و ...) و پلیمرهایی با درجه غذایی (پلی‌پروپیلن، پلی‌وینیل استات و ...) غالباً به عنوان ماده‌ی دیواره یا حامل استفاده می‌شوند. پوشش‌ها ممکن است به



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-04 ]
[ DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.127.13.6 ]
[ DOI: 10.22034/FSCT.19.127.345 ]

صورت منفرد و یا ترکیبی مورد استفاده قرارگیرند [7 و 8].

مالتودکسترین از مشتقات نشاسته است و از منابع مختلف نشاسته‌ای مثل سیب‌زمینی، ذرت و گندم تهیه می‌گردد. این ماده به دلیل حلالیت بالا در آب و عدم داشتن بو و رنگ شاخص، از مهم‌ترین مواد پلی‌ساکاریدی جهت ریزپوشانی-کردن مواد مختلف از جمله عصاره‌های گیاهی و رنگدانه‌های شیمیایی و بیولوژیک می‌باشد. کازئینات سدیم برخلاف کازئین در آب محلول نیست و حلالیت آن با بالا رفتن دمای آب افزایش می‌یابد. این ماده دارای فعالیت سطحی و امولسیفایری مطلوبی می‌باشد و مواد پوشش‌داده‌شده توسط این ماده نسبت به پارامترهای محیطی از جمله بخار آب و اکسیژن نفوذپذیری کمی دارند [9 و 10].

در تحقیق حاضر، پس از استخراج فیکوسیانین از میکروجلبک اسپیرولینا (*Spirulina Platensis*) به روش آنزیمی (لیزوزیم)، این رنگدانه با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات‌سدیم نانو ریزپوشانی می‌شود. سپس فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی نانوکپسول‌های حامل فیکوسیانین و فرم خالص رنگدانه (علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی) در طول دوره نگهداری (دمای 18- درجه سانتی‌گراد به مدت 60 روز) مورد ارزیابی و مقایسه قرار می‌گیرند.

## 2-مواد و روش

### 2-1-کشت میکروجلبک اسپیرولینا

نمونه خالص جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* از آزمایشگاه جلبک‌شناسی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر تهیه گردید. جهت کشت اسپیرولینا از محیط کشت زاروک[1] اصلاح‌شده استفاده و پس از کشت در مقیاس‌های کوچک‌تر (100 و 500 میلی‌لیتر)، کشت نهایی در حجم‌های 5 و 50 لیتر انجام گردید. ترکیبات محیط کشت مذکور (pH=8/5) در جدول 1 ارائه شده است. پس از کشت جلبک و قراردادن در برابر نور فلورسنت با شدت نوری مناسب (3500 تا 8000 لوکس) و دوره زمانی 12 ساعت تاریکی و 12 ساعت روشنایی، نمونه‌ها در دمای 29 درجه سانتی‌گراد به مدت 16 روز قرار داده شدند. نمونه‌ها روزانه برای 3 بار تکان داده شده تا رشد جلبک به خوبی انجام گیرد. پس از مشاهده بلوم جلبکی، نسبت به جمع‌آوری توده سلولی اقدام شد. این فرآیند با استفاده از صافی‌های 100 و 20 میکرونی انجام گردید که به ترتیب برای جداسازی ذرات بزرگ‌تر و توده جلبک مورد استفاده قرار گرفتند. توده جمع‌آوری‌شده 3 بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد (جهت کاهش اثرات محیط کشت). برای خشک‌کردن جلبک، نمونه‌ها در دمای 45 درجه سانتی‌گراد آون (بهداد، ایران) برای مدت 48 ساعت قرار داده شدند [11-13].

**Table 1** Algae culture medium compounds

| Compounds | Amount (g) |
|---|---|
| $NaHCO_3$ | 8 |
| $K_2HPO_4$ | 0.5 |
| $NaNO_3$ | 2.5 |
| $K_2SO_4$ | 0.5 |
| NaCl | 2 |
| $MgSO_4$ | 0.2 |
| $FeSO_4$ | 0.05 |
| Urea | 0.2 |

### 2-2- استخراج فیکوسیانین به روش آنزیمی

در این روش، از آنزیم لیزوزیم جهت هضم و هیدرولیز آنزیمی جلبک استفاده شد و مقدار آن نیز 40 میلی‌گرم به ازای هر گرم وزن خشک جلبک بود. جهت آغاز هیدرولیز آنزیمی، از لیزوزیم به همراه EDTA و سدیم آزید به مقدار 100 میلی‌مولار (به عنوان عوامل ضد میکروبی) استفاده گردید. سپس نمونه‌ها به مدت 4 ساعت در حمام آب 44 درجه سانتی‌گراد شیک شدند (حمام آب شیکردار، اختریان، ایران). پس از انجام مراحل فوق، نمونه‌ها در دور 10000 دور در دقیقه به مدت 25 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ (Hettick، آلمان) شده و مایع رویی ( رنگ آبی تیره) برای اندازه‌گیری رنگدانه جمع‌آوری شد [11 و 12].

### 2-3-خالص‌سازی نسبی فیکوسیانین

برای خالص‌سازی نسبی فیکوسیانین از سولفات آمونیم با درجه اشباعیت 40 درصد استفاده شد. این ماده به آرامی به محلول حاوی فیکوسیانین اضافه و برای مدت یک ساعت هم زده شد. پس از قراردادن نمونه حاوی مخلوط فوق در مکان تاریک و دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت، فرآیند سانتریفوژ در دور 15000g به مدت 15 دقیقه انجام شد. مایع بی‌رنگ رویی حاصل از سانتریفوژ، دور ریخته شده و به رسوب آبی رنگ (خلوص $A_{620}/A_{280}$ 1/135 و غلظت

1. Zarrouk medium



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-04 ]
[ DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.127.13.6 ]
[ DOI: 10.22034/FSCT.19.127.345 ]

3/751 میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، مقداری محلول بافر فسفات (pH=7) اضافه و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید [14 و 15].

## 2-4- نانو ریزپوشانی‌کردن فیکوسیانین

به منظور نانو ریزپوشانی فیکوسیانین، از پوشش ترکیبی پلی‌ساکاریدی (مالتودکسترین DE=20) و پروتئینی (کازئینات سدیم) با نسبت 1:1 استفاده و نسبت پوشش‌ها به هسته نیز 4 به 1 در نظر گرفته شد. ابتدا سوسپانسیون همگنی از مالتودکسترین در آب مقطر (4 گرم در 50 میلی‌لیتر) تهیه شد و به لحاظ حلالیت این ماده در آب، از تیمار حرارتی استفاده نشد. جهت تهیه پوشش دوم، ابتدا سوسپانسیونی از کازئینات سدیم در آب مقطر تهیه (4 گرم در 50 میلی‌لیتر) و با قراردادن بر روی همزن مغناطیسی و دمای 45 درجه برای مدت 30 دقیقه، سوسپانسیون همگنی از آن تهیه گردید. محلول حاوی کازئینات (پس از کاهش دما به 25 درجه) به محلول دارای مالتودکسترین اضافه شد و 24 ساعت در دمای 4 درجه جهت افزایش جذب آب نگهداری گردید. در مرحله انتهایی، 2 گرم فیکوسیانین به محلول حاوی پوشش‌ها اضافه شده و پس از حل‌شدن آن، جهت تولید نانوکپسول، از دستگاه اولتراسوند (Hilscher, UP200، آلمان) با طول موج 40 کیلوهرتز به مدت 15 دقیقه و تعداد 6 سیکل (زمان هر سیکل 30 ثانیه و زمان استراحت 15 ثانیه بین سیکل‌ها، دمای 25 درجه سانتی‌گراد) استفاده شد. برای کاهش بیشتر اندازه ذرات و افزایش راندمان ذرات نانوکپسوله، از دستگاه هموژنایزر (اولتراتوراکس، IKa، ایتالیا) با دور 10000 دور در دقیقه برای مدت 15 دقیقه استفاده گردید. محلول حاصل از فرآیند، در دمای 18- درجه سانتی‌گراد منجمد و با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (Vaco 2 Zirbus، آلمان) در فشار 0/051 میلی‌بار و دمای 50- درجه سانتی‌گراد خشک گردید [9 و 10]. متوسط سایز نانو ذرات با استفاده از دستگاه پارتیکل سایز آنالایزر (Shimadzu، ژاپن) و بر اساس روش تفرق نور لیزر و بازده فرآیند نانو ریزپوشانی با استفاده از روش یان و همکاران (2014) تعیین گردید [9]. نتایج نشان داد میانگین سایز ذرات 397/1 نانومتر و بازده فرآیند 73/41 درصد است.

## 2-5- ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین

جهت بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین خالص و نانو ریزپوشانی‌شده، از سه شاخص قدرت مهار رادیکال آزاد ۲،۲ دی فنیل- 1- پیکریل هیدرازیل (DPPH)، کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی و فعالیت کلاته‌کردن فلزات استفاده شد. دو غلظت 200 و 500 میکروگرم بر میلی‌لیتر از فیکوسیانین، بعد از آماده‌سازی مواد و معرف‌ها در هر روش، جهت بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی در زمان‌های صفر و 60 روز (نگهداری در دمای 18- درجه سانتی‌گراد) مورد استفاده قرار گرفت تا تاثیر زمان بر قدرت آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین خالص و نانو ریزپوشانی‌شده مشخص گردد. نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین با آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول (BHA) و بوتیل‌هیدروکسی‌تولوئن (BHT) در غلظت 200PPM مقایسه گردید [16].

### 2-5-1- قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH

برای اندازه‌گیری این شاخص، ابتدا استوک اولیه‌ایی از معرف DPPH تهیه شد. بدین ترتیب که 23/5 میلی‌گرم از معرف به 100 میلی‌لیتر از اتانول 99 درصد اضافه و در دمای 4 درجه قرار داده شد. در مرحله بعد، 100 میکرولیتر از فیکوسیانین خالص به 3/9 میلی‌لیتر و 500 میکرولیتر از محلول فیکوسیانین نانو ریزپوشانی‌شده به 3/5 میلی‌لیتر از معرف رقیق‌شده DPPH (1 به 10) اضافه (به طور جداگانه) و محلول حاصل در دور بالا، هموژن و به مدت 30 دقیقه در مکان تاریک قرار داده شد. در مرحله نهایی آزمایش، به منظور تعیین توانایی فیکوسیانین جهت مهار رادیکال DPPH، طول موج محلول تهیه‌شده در 517 نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت و درصد مهار DPPH از طریق رابطه زیر محاسبه گردید [16].

قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH =

100 x [جذب شاهد/(جذب نمونه-جذب شاهد)]

### 2-5-2- قدرت کاهندگی آهن سه ظرفیتی

قدرت کاهندگی آهن طبق روش زو و همکاران (2002) با اندکی تغییر انجام گرفت [17]. برای انجام این آزمایش، ابتدا 0/5 میلی‌لیتر از محلول فیکوسیانین با 2/5 میلی‌لیتر از بافر فسفات 0/2 مولار (pH=6/6) و 2/5 میلی‌لیتر فری‌سیانید پتاسیم



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-04 ]
[ DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.127.13.6 ]
[ DOI: 10.22034/FSCT.19.127.345 ]

یک درصد مخلوط و در دمای 50 درجه سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه و پس از آن در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. بعد از این مرحله، 2/5 میلی‌لیتر از تری‌کلرو استیک‌اسید 10 درصد و به دنبال آن 2/5 میلی‌لیتر کلرید آهن 0/1 درصد به مخلوط اضافه شده و به مدت 5 دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. در مرحله نهایی آزمایش، 2/5 میلی‌لیتر از ماحصل محلول‌های تهیه-شده، با 2/5 میلی از آب مقطر مخلوط و جذب در طول 700 نانومتر قرائت شد. قدرت کاهندگی یون فریک بر اساس ΔOD (تغییرات جذب نوری) بر میلی‌گرم وزن خشک بوده و واحد آن نیز میلی‌گرم TAE[1] بر گرم وزن خشک می‌باشد. برای ارزیابی قدرت کاهندگی آهن توسط فیکوسیانین نانو ریزپوشانی‌شده، روند آزمایش مشابه فیکوسیانین خالص بوده با این تفاوت که نسبت مواد مورد استفاده، 5 برابر بوده تا از این طریق نسبت پوشش‌های مورد نظر و هسته رعایت گردد.

### 2-5-3- فعالیت کلاته‌کردن فلزات

ارزیابی فعالیت کلاته‌کنندگی فیکوسیانین طبق روش اسماعیل و همکاران (2016) انجام گرفت [18]. 150 میکرولیتر از سولفات آهن 500 میکرومولار به مخلوط واکنش شامل 168 میکرولیتر تریس اسید کلریدریک 0/1 مولار (pH=7/4) و 218 میکرولیتر فیکوسیانین اضافه شد. مخلوط تهیه‌شده به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و بعد از یک ساعت، 10 فنانترولین 0/25 درصد به مقدار 13 میکرولیتر به آن اضافه گردید. فعالیت کلاته‌کنندگی فیکوسیانین از طریق جذب نوری نمونه شاهد یا بلانک (محلول حاوی یون فریک) و نمونه اصلی (مخلوط یون فریک و فیکوسیانین) طبق فرمول ذیل محاسبه شد. به منظور بررسی فعالیت کلاته‌کنندگی فیکوسیانین نانو ریزپوشانی‌شده، نسبت مواد مورد استفاده، 5 برابر در نظر-گرفته شد.

**فعالیت کلاته‌کنندگی فلزات (%) =**

100 × [جذب شاهد/(جذب نمونه-جذب شاهد)]

## 2-6-ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی فیکوسیانین

### 2-6-1- باکتری‌های مورد استفاده و شرایط کشت آن‌ها

ویال‌های فریزدرایرشده سه باکتری *اشریشیاکلی*[2] PTCC 1330، *استافیلوکوکوس اورئوس*[3] PTCC 1113، *لیستریا مونوسیتوژنز*[4] PTCC 1165 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و دو باکتری *یرسینیا روکری*[5] و *استرپتوکوکوس اینیهایی*[6] از پژوهشکده اکولوژی دریای خزر تهیه شد. باکتری‌های گروه اول جزء باکتری‌های بیماری‌زا و بیماری‌زای فرصت‌طلب بوده که در اثر آلودگی ثانویه به ماده غذایی منتقل و باعث بروز بیماری‌های مختلف نظیر مسمومیت غذایی می‌شوند. باکتری‌های گروه دوم جزء باکتری‌های بیماری‌زا در آبزیان هستند و از ماهی قزل آلای بیمار جدا شدند. جهت آماده‌سازی باکتری‌ها از محیط کشت آبگوشت اینفیوژن مغز و قلب گاو[7] استفاده گردید و پس از کشت اولیه باکتری‌های مورد نظر، نمونه‌ها در دمای 35 و 30 درجه سانتی‌گراد به ترتیب برای باکتری‌های گروه اول و دوم به مدت 18 ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. به منظور دستیابی به رسوب باکتریایی، محیط‌های کشت حاوی سوسپانسیون باکتری در دور 5000 دور در دقیقه برای مدت 15 دقیقه سانتریفوژ شدند و پس از خارج‌کردن مایع رویی و افزودن بافر فسفات به رسوب باقیمانده، فرآیند سانتریفوژ برای دو مرتبه دیگر تکرار گردید؛ در هر مرحله نیز از بافر فسفات جهت خارج‌کردن اثرات محیط آبگوشت اولیه استفاده شد. به رسوب باقیمانده مقداری بافر فسفات اضافه و با لوله استاندارد 0/5 مک‌فارلند (معادل $1/5 \times 10^8$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر) مقایسه شد و در نهایت با رقیق‌سازی نمونه‌ها، رقت $1 \times 10^6$ جهت آزمایشات بعدی مورد استفاده قرارگرفت [19].

### 2-6-2- ارزیابی اثرات ضد باکتریایی با استفاده از روش انتشار در محیط آگار

برای انجام این روش، ابتدا سوسپانسیون تهیه‌شده از باکتری‌ها به صورت سطحی بر روی محیط کشت مولر هینتون[8] آگار کشت داده شد. سپس چاهک‌هایی به قطر 6 میلی‌متر در سطح محیط

1 .Tannic Acid Equivalent

2 . *Escherichia coli*
3 . *Staphylococcus aureus*
4 . *Listeria monocytogenes*
5. *Yersinia ruckeri*
6. *Streptococcus iniae*
7. Brain Heart Infusion broth
8. Muller Hinton



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-04 ]
[ DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.127.13.6 ]
[ DOI: 10.22034/FSCT.19.127.345 ]

تعبیه و مقدار 50 میکرولیتر از غلظت‌های 2/5، 5، 10، 20 و 25 میکروگرم بر میلی‌لیتر فیکوسیانین به چاهک‌ها انتقال داده شد. نمونه‌ها در دمای 35 و 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و بعد از آن، قطر هاله عدم رشد اطراف چاهک با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر گزارش شد. از آب مقطر به عنوان نمونه کنترل منفی و آنتی-بیوتیک‌های تتراسیکلین[9] (30 میلی‌گرمی) و آمیکاسین[1] (30 میلی‌گرمی) به عنوان کنترل مثبت به ترتیب برای باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت و همچنین آنتی‌بیوتیک داکسی‌سیلین[2] (30 میلی‌گرمی) برای هر دو گروه باکتریایی استفاده گردید [20 و 21].

### 2-6-3- بررسی اثرات ضد باکتریایی با استفاده از روش رقیق‌سازی در لوله[3]

در این روش، کمترین غلظت مهارکننده باکتری[4] و کمترین غلظت کشنده باکتری[5] فیکوسیانین با استفاده از رقیق‌سازی در لوله‌های آزمایش مورد ارزیابی قرار گرفتند. رقت‌های مورد استفاده فیکوسیانین مشابه روش قبلی، 50، 100، 200، 400 و 500 میکروگرم بر میلی‌گرم بوده که به همراه یک میلی‌لیتر از محیط آبگوشت اینفیوژن قلب و مغز گاو به لوله آزمایش اضافه شد. در مرحله بعد، 100 میکرولیتر از کشت 24 ساعته باکتری-های شاخص به لوله‌ها اضافه و در دماهای 30 و 37 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. جهت بررسی تغییرات حاصله، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج 600 نانومتر قرائت شد. آب مقطر و داکسی‌سیلین نیز به عنوان کنترل منفی و مثبت در نظر گرفته شدند. غلظتی از سوسپانسیون میکروبی که کمترین جذب نوری را نشان داد به عنوان MIC و غلظتی از سوسپانسیون که بعد کشت 24 ساعته، فاقد رشد کلنی در محیط کشت بود نیز به عنوان MBC گزارش شد [20 و 21].

9. Tetracycline
1. Amikacin
2. Doxycycline
3. Microdilution test
4. Minimal Inhibitory Concentration or MIC
5. Minimal Bactericidal Concentration or MBC

### 2-7- تجزیه و تحلیل آماری

پژوهش حاضر در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا و به منظور آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS استفاده گردید. داده‌ها از طریق آزمون آنالیز واریانس یکطرفه[6] آنالیز و معنی‌داری تفاوت بین میانگین‌ها بوسیله آزمون دانکن[7] در سطح اطمینان 95 درصد ارزیابی شد.

## 3- نتایج

### 3-1- فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین نانو ریزپوشانی‌شده در مقایسه با فیکوسیانین خالص

نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین خالص و نانو ریزپوشانی‌شده، با سه روش قدرت مهار رادیکال DPPH، قدرت کاهندگی آهن سه‌ظرفیتی و فعالیت کلاته‌کردن فلزات که در زمان های صفر و 60 روز انجام گرفته در جدول 2 ارائه شده است. مطابق این جدول، قدرت آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین در غلظت 500 میکروگرم بر میلی‌لیتر (در هر سه روش) بیشتر از غلظت 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود ($p<0/05$). هر دو فرم فیکوسیانین (در دو غلظت) نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های تجاری از نظر فعالیت در سطح پائین‌تری قرار داشتند. با نانوریزپوشانی فیکوسیانین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن به صورت معنی‌داری افزایش یافت ($p<0/05$). قدرت آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین خالص و نانو ریزپوشانی‌شده در زمان صفر تقریبا مشابه بوده ولی زمان نگهداری، بر کارآیی آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین خالص تاثیر کاهنده داشته است. کاهش نسبی قدرت آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین خالص پس از 60 روز نگهداری، در اکثر موارد معنی‌دار بوده است ($p<0/05$). اما تکنیک نانوریزپوشانی از کاهش معنی‌دار فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین در غالب موارد جلوگیری کرده است.

6. One-Way ANOVA
7. Duncan



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-04 ]
[ DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.127.13.6 ]
[ DOI: 10.22034/FSCT.19.127.345 ]

**Table 2** Antioxidant activity of phycocyanin and its carrier nanocapsules on days 0 and 60 of storage at -18°C

| Time (day) | Phycocyanin forms | Concentration (µg/ml) | DPPH radical scavenging activity (%) | Ferric reducing antioxidant power (mg TAE/g) | $Fe^{2+}$ Chelating activity (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 | Pure | 200 | 45.75±2.16$^{f}$ | 0.051±0.01$^{f}$ | 40.23±1.45$^{f}$ |
| | | 500 | 57.22±1.45$^{c}$ | 0.061±0.005$^{d}$ | 51.45±1.11$^{d}$ |
| | Nanoencapsulated | 200 | 46.21±1.09$^{f}$ | 0.05±0.02$^{f}$ | 41.17±1.12$^{f}$ |
| | | 500 | 58.56±1.17$^{c}$ | 0.063±0.009$^{c}$ | 54.48±1.22$^{b}$ |
| 60 | Pure | 200 | 41.56±1.83$^{g}$ | 0.046±0.01$^{h}$ | 36.56±2.37$^{g}$ |
| | | 500 | 50.32±1.32$^{e}$ | 0.053±0.006$^{e}$ | 45.32±1.15$^{e}$ |
| | Nanoencapsulated | 200 | 45.55±1.17$^{f}$ | 0.049±0.01$^{g}$ | 40.25±0.5$^{f}$ |
| | | 500 | 56.14±2.02$^{cd}$ | 0.060±0.003$^{d}$ | 53.25±1.30$^{c}$ |
| BHA | | 200 | 92.39±1.42$^{a}$ | 0.093±0.02$^{a}$ | 96.02±3.11$^{a}$ |
| BHT | | 200 | 87.38±0.96$^{b}$ | 0.089±0.03$^{b}$ | 94.54±1.31$^{a}$ |

*Different letters in each column indicate a significant difference between the data ($p<0.05$).

## 3-2- فعالیت ضد باکتریایی فیکوسیانین نانو ریزپوشانی‌شده در مقایسه با فیکوسیانین خالص

خواص ضد میکروبی فیکوسیانین خالص و نانو ریزپوشانی‌شده با دو روش انتشار در آگار با اندازه‌گیری هاله عدم رشد و روش رقیق‌سازی در لوله انجام گرفت. برای انجام آزمایش، غلظت‌های مختلف فیکوسیانین (2/5، 5، 10، 20 و 25 میکروگرم بر میلی‌لیتر) در دو زمان صفر و 60 روز (نگهداری در دمای 18- درجه سانتی‌گراد) مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج بدست‌آمده در جداول 3 و 4 ارائه شده است.

### 3-2-1- روش انتشار در آگار

نتایج هاله عدم رشد باکتری‌ها در محیط آگاردار موید آن است که با نانو ریزپوشانی‌کردن فیکوسیانین، اثر ضد باکتریایی آن در گذر زمان حفظ شده و تفاوت معنی‌داری بین روز صفر و 60 روز ثبت نشد ($p>0/05$). اما در فیکوسیانین خالص، اثر ضد باکتریایی با نگهداری فیکوسیانین کاهش نسبی داشته و در برخی از موارد، اختلاف موجود معنی‌دار بوده است ($p<0/05$). در تمامی موارد، با افزایش غلظت فیکوسیانین، اثر ضد باکتریایی آن افزایش یافته و تغییرات ثبت شده نیز معنی‌دار بوده است ($p<0/05$).

**Table 3** The halo diameter of non-growth of gram-positive bacteria against pure phycocyanin and its carrier nanocapsules on days 0 and 60 of storage at -18°C (mm)

| Strain | Time (day) | T | Concentrations (µg/ml) | | | | | Positive control | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 2.5 | 5 | 10 | 20 | 25 | Tet | Doxy |
| *L. monocytogenes* | 0 | C | 10.11±0.11$^{gA}$ | 13±0.41$^{fA}$ | 17.20±1.14$^{eB}$ | 19.5±1.41$^{dA}$ | 22.11±1.25$^{cAB}$ | 33 ±1.56$^{bA}$ | 41 ±1.14$^{aA}$ |
| | | N | 10.51±0.17$^{fA}$ | 14.5±1.21$^{eA}$ | 19.3±1.25$^{dA}$ | 20.82±0.65$^{dA}$ | 24.2±1.31$^{cA}$ | | |
| | 60 | C | 8.22±0.31$^{eB}$ | 9±0.55$^{eB}$ | 13.41±1.2$^{dC}$ | 14.3±1.32$^{dBC}$ | 17.61±1.45$^{cC}$ | 33 ±1.56$^{bA}$ | 41 ±1.14$^{aA}$ |
| | | N | 10.35±0.1$^{fA}$ | 13.8±0.61$^{eA}$ | 19.21±1.17$^{dA}$ | 20.25±1.21$^{dA}$ | 23.35±0.86$^{cA}$ | | |
| *Staph. aureus* | 0 | C | R | R | 11.45±1.11$^{dC}$ | 15.44±1.3$^{cB}$ | 16.5±1.27$^{cC}$ | 24 ±0.32$^{bB}$ | 35.45 ±1.21$^{aB}$ |
| | | N | R | R | 11.65±1.08$^{dC}$ | 16.25±1.17$^{cB}$ | 17.1±1.15$^{cC}$ | | |
| | 60 | C | R | R | 8.5±0.26$^{dD}$ | 12.5±0.7$^{cD}$ | 13.68±1.11$^{cD}$ | 24 ±0.32$^{bB}$ | 35.45 ±1.21$^{aB}$ |
| | | N | R | R | 11.5±1.15$^{bC}$ | 16.12±0.85$^{aB}$ | 16.8±1.12$^{aC}$ | | |
| *Strep. Iniaei* | 0 | C | R | R | R | 10.55±0.47$^{cDE}$ | 10.76±0.41$^{cE}$ | 19.04 ±0.44$^{bC}$ | 27.23 ±1.56$^{aC}$ |
| | | N | R | R | R | 11.21±1.21$^{cD}$ | 11.57±0.88$^{cE}$ | | |
| | 60 | C | R | R | R | 8.5±0.33$^{cF}$ | 9.5±0.32$^{cF}$ | 19.04 ±0.44$^{bC}$ | 27.23 ±1.56$^{aC}$ |
| | | N | R | R | R | 11.1±1.15$^{cD}$ | 11.5±1.13$^{cE}$ | | |

*T: Treatments, C: Control (pure phycocyanin), N: Nanoencapsulated phycocyanin, R, Resistant, Tet: Tetracycline, Doxy: Doxycilin

**The uppercase and lowercase letters in each column and row indicate a significant difference between the data, respectively ($p<0.05$).



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-04 ]
[ DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.127.13.6 ]
[ DOI: 10.22034/FSCT.19.127.345 ]

**Table 4** The halo diameter of non-growth of gram-negative bacteria against pure phycocyanin and its carrier nanocapsules on days 0 and 60 of storage at -18°C (mm)

| Strain | Time (day) | T | Concentrations (µg/ml) | | | | | Positive control | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 2.5 | 5 | 10 | 20 | 25 | Amikacin | Doxycycline |
| *Y. ruckeri* | 0 | C | R | R | $10.43\pm0.51^{eA}$ | $12.34\pm0.24^{dA}$ | $14.5\pm0.35^{cA}$ | $16\pm0.35^{bA}$ | $32.11\pm1.28^{aB}$ |
| | | N | R | R | $11.22\pm0.42^{cA}$ | $12.65\pm0.14^{cA}$ | $15.11\pm0.86^{bA}$ | | |
| | 60 | C | R | R | $8.11\pm0.15^{cdBC}$ | $9.66\pm0.21^{cCD}$ | $10.21\pm0.17^{cC}$ | $16\pm0.35^{bA}$ | $32.11\pm1.28^{aB}$ |
| | | N | R | R | $10.92\pm0.35^{dA}$ | $12.25\pm0.21^{cA}$ | $15.04\pm0.44^{bA}$ | | |
| *E.coli* | 0 | C | R | R | $9.26\pm0.3^{dAB}$ | $10.44\pm0.5^{dBC}$ | $12.22\pm0.2^{cB}$ | $17.5\pm0.6^{bA}$ | $36.55\pm2.17^{aA}$ |
| | | N | R | R | $9.85\pm0.12^{dAB}$ | $11.17\pm0.34^{cB}$ | $12.86\pm0.14^{cB}$ | | |
| | 60 | C | R | R | $7.5\pm0.22^{dCD}$ | $9.11\pm0.25^{cDE}$ | $9.7\pm0.43^{cCD}$ | $17.5\pm0.6^{bA}$ | $36.55\pm2.17^{aA}$ |
| | | N | R | R | $9.62\pm0.15^{dAB}$ | $11.1\pm0.25^{cB}$ | $12.55\pm0.31^{cB}$ | | |

*T: Treatments, C: Control (pure phycocyanin), N: Nanoencapsulated phycocyanin, R, Resistant
*The uppercase and lowercase letters in each column and row indicate a significant difference between the data, respectively ($p<0.05$).

در بین باکتری‌های گرم‌مثبت، *لیستریا مونوسیتوژنز* نسبت به دو باکتری دیگر حساس‌تر بوده و تمامی غلظت‌های مورد استفاده دارای اثر مهارکننده بر این باکتری بودند. اما با این وجود، قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های پائین‌تر، کم‌تر ثبت شد. *استافیلوکوکوس اورئوس* به دو غلظت 2/5 و 5 و *استرپتوکوکوس اینیه‌ایی* به سه غلظت 2/5، 5 و 10 میکروگرم بر میلی‌لیتر مقاوم بودند. در تمامی آزمایشات، قطر هاله عدم رشد در آنتی‌بیوتیک‌های تتراسیکلین و داکسی‌سیلین بزرگ‌تر از غلظت‌های فیکوسیانین بوده و اختلاف مورد نظر نیز معنی‌دار ثبت گردید ($p<0/05$). در بین دو باکتری گرم‌منفی، *یرسینیا روکری* از حساسیت بیشتری برخوردار بوده و غلظت‌های مورد استفاده، به استثنای غلظت‌های 2/5 و 5 ، دارای اثر مهارکننده بر هر دو باکتری بودند. به طور کلی حساسیت باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی بیشتر بود اما با این وجود *استرپتوکوکوس اینیه‌ایی* از این قاعده مستثنی می‌باشد و نسبت به سه غلظت اولیه فیکوسیانین مقاوم بوده و غلظت‌های بالاتر نیز تاثیر چندانی بر این باکتری نشان ندادند.

### 3-2-2- روش رقیق‌سازی در لوله

نتایج تاثیر فیکوسیانین خالص و نانو ریزپوشانی‌شده بر برخی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی در روش رقیق‌سازی در لوله (Microdilution) در جدول 5 ارائه شده است. مطابق این جدول، دامنه MIC بین 500-50 و MBC بین 500-100 میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. ضمن اینکه کمترین میزان MIC برای *لیستریا مونوسیتوژنز* و بیشترین مقدار MBC برای *استرپتوکوکوس اینیه‌ایی* ثبت شده است.

**Table 5** MIC and MBC values of pure phycocyanin and its carrier nanocapsules for gram-positive and gram-negative bacteria on days 0 and 60 of storage at -18°C

| Strain | Phycocyanin forms | Time (day) | MIC (µg/ml) | MBC (µg/ml) |
|---|---|---|---|---|
| *L. monocytogenes* | Pure | 0 | 50 | 100 |
| | | 60 | 100 | 200 |
| | Nanoencapsulated | 0 | 50 | 100 |
| | | 60 | 50 | 100 |
| *Staph. aureus* | Pure | 0 | 100 | 200 |
| | | 60 | 200 | 400 |
| | Nanoencapsulated | 0 | 100 | 200 |
| | | 60 | 100 | 200 |
| *Strep. iniae* | Pure | 0 | 400 | 500 |
| | | 60 | 500 | - |
| | Nanoencapsulated | 0 | 400 | 500 |
| | | 60 | 400 | 500 |
| *Y. ruckeri* | Pure | 0 | 200 | 400 |
| | | 60 | 200 | 500 |
| | Nanoencapsulated | 0 | 200 | 400 |
| | | 60 | 200 | 400 |
| *E.coli* | Pure | 0 | 200 | 400 |
| | | 60 | 200 | 500 |
| | Nanoencapsulated | 0 | 200 | 400 |
| | | 60 | 200 | 400 |



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-04 ]
[ DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.127.13.6 ]
[ DOI: 10.22034/FSCT.19.127.345 ]

همانطور که در جدول 5 مشاهده می‌شود، فیکوسیانین خالص در روز 60 قادر به حذف *استرپتوکوکوس اینیه‌ایی* نیست اما فرم نانو ریزپوشانی‌شده آن در غلظت 500 میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر به حذف این باکتری بوده است.

مقادیر MIC در باکتری‌های گرم منفی در دو فرم خالص و نانو ریزپوشانی‌شده مشابه هم و معادل 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود؛ ضمن اینکه غلظت‌های 400 و 500 میکروگرم بر میلی‌لیتر برای این باکتری‌ها به عنوان MBC ثبت شدند. نتایج آزمایشات انجام‌گرفته در روش رقیق‌سازی در لوله موید آن است که مقاومت باکتری‌های گرم منفی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت است؛ بجز *استرپتوکوکوس اینیه‌ایی* که از مقاومت خاصی برخوردار بوده است (مشابه روش انتشار در محیط آگاردار).

## 4- بحث و نتیجه‌گیری

جهت بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین خالص و نانو ریزپوشانی‌شده از سه روش مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت کاهندگی یون فریک و کلاته‌کردن فلزات استفاده شد. نتایج نشان داد که تیمارها (فیکوسیانین خالص و نانوریزپوشانی‌شده) در غلظت 500 میکروگرم بر میلی‌لیتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به غلظت 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر دارند. همچنین تکنیک نانو ریزپوشانی موجب شده، زمان نگهداری تاثیر چندانی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوکپسول‌های حامل فیکوسیانین نداشته باشد. دوی و همکاران (2016) گزارش کردند که میکروکپسوله‌کردن فیکوسیانین با مالتودکسترین و کارآگینان باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محافظت آن در برابر فرآیند اکسیداسیون می‌گردد. نتایج مطالعه مذکور با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد [2]. علت اصلی ارتقاء فعالیت آنتی‌اکسیدانی در فرم‌های نانو ریزپوشانی‌شده، بدلیل افزایش نسبی فیکوسیانین در شرایط مذکور بوده است (افزایش load). مطالعه سوزری و همکاران (2016) حاکی از افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین نانو ریزپوشانی‌شده با کیتوزان 3 درصد بود [3]. در مطالعه حاضر نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی فرم نانو ریزپوشانی‌شده فیکوسیانین در زمان‌های مختلف بیشتر از فرم خالص می‌باشد. با انجام فرآیند نانو ریزپوشانی، میزان لودینگ فیکوسیانین افزایش یافته و به لحاظ رهایش تدریجی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن نیز تداوم می‌یابد. کویروس ساسدا و همکاران (2014) در مطالعه خود به کارایی پوشش‌های پلی‌ساکاریدی، پروتئینی و چربی اشاره کرده و یادآور شدند که پوشش‌های مذکور باعث تغییرات فیزیکی، مکانیکی و عملکردی از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی انواع رنگدانه‌ها و مواد زیست‌فعال می‌شوند [5]. مطالعه مارتینز و پالما (2015) در خصوص پروتئین‌های هیدرولیزشده و پلی‌فنل‌های اسپیرولینا نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز بیشتر از پلی‌فنل‌ها بوده و باعث کلاته‌کردن آهن و مس دو ظرفیتی می‌شوند [22]. فیکوسیانین رنگدانه پروتئینی از خانواده فیکوبیلی‌پروتئین و دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. هیدرولیز انجام‌شده در مطالعه مذکور، جزء پروتئینی فیکوبیلی‌پروتئین که شامل سه پروتئین فیکوسیانین، فیکواریترین و آلوفیکوسیانین که 60 درصد از کل پروتئین را شامل می‌شوند را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در استخراج آنزیمی انجام‌گرفته در تحقیق حاضر، آنزیم لیزوزیم با شکستن دیواره اسپیرولینا و هیدرولیز آن، اجزاء مختلف فیکوبیلی‌پروتئین را جدا کرده و مشابه مکانسیم انجام گرفته در مطالعه فوق عمل می‌کند. در مطالعه جرلی و پرابا (2015) از روش مهار رادیکال آزاد DPPH جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین استفاده شد و نتایج نشان داد که توانایی فیکوسیانین در غیرفعال‌کردن رادیکال مذکور 25/21 درصد می‌باشد که در مقایسه با مطالعه حاضر کمتر است [16]. استرادا و همکاران (2001) گزارش کردند که با افزایش خلوص فیکوسیانین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن نیز افزایش یافته و فیکوسیانین به عنوان جزء اصلی گروه فیکوبیلی‌پروتئین، مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسپیرولینا می‌باشد. در تحقیق مذکور، درصد مهار DPPH توسط این رنگدانه، 46/40 درصد ثبت شد که در مقایسه با مطالعه حاضر در بیشتر موارد کم‌تر می‌باشد [23].

فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین خالص در تحقیق حاضر پس از 60 روز نگهداری در دمای 18- درجه سانتی‌گراد کاهش یافته است که این امر ناشی از ماهیت پروتئینی فیکوسیانین می‌باشد که تحت تاثیر انجماد، برخی از خواص عملکردی آن از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد. اما در فرم نانو ریزپوشانی‌شده، تغییرات مذکور معنی‌دار نیست که این موضوع نشان‌دهنده عملکرد مناسب پوشش‌های مورد استفاده در پایداری اکسایشی فیکوسیانین می‌باشد. در تحقیق اسماعیل و همکاران (2016) مشخص گردید که فعالیت آنتی‌اکسیدانی



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-04 ]
[ DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.127.13.6 ]
[ DOI: 10.22034/FSCT.19.127.345 ]

اسپیرولینا بیشتر از آنتی‌اکسیدان مصنوعی بوتیل‌هیدروکسی تولوئن است [18]. در تحقیق حاضر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین کمتر از BHT و BHA بود. در مطالعه اسماعیل و همکاران (2016) علاوه بر فیکوسیانین، سایر مواد با ماهیت آنتی‌اکسیدانی نظیر پلی‌فنل‌ها و کاروتنوئیدها نیز در عصاره خام وجود داشته که باعث افزایش مضاعف فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌گردند [18]. در تحقیق پالیوال و همکاران (2015) عصاره-های آبی و متانولی سه جلبک اسپیرولینا، لینگبیا[1]و سودوآنابنا[2] مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص گردید که عصاره آبی و متانولی لینگبیا دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به دو جلبک دیگر بوده است [24].

قدرت غیرفعال‌کنندگی فلزات در فیکوسیانین خالص، در روز 60 ، کاهش داشته و در مقایسه با روز صفر معنی‌دار است اما این روند در فیکوسیانین نانو ریزپوشانی‌شده معنی‌دار نبوده است. برمجو و همکاران (2008) گزارش کردند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین ناشی از غیرفعال‌کردن رادیکال‌های آزاد و کلاته‌کردن فلزات می‌باشد [25]. اسماعیل و همکاران (2014) نشان دادند که *اسپیرولینا پلاتنسیس* دارای فعالیت غیرفعال‌کنندگی رادیکال‌های آزاد و قدرت احیاءکنندگی فلزات است [26].

جهت ارزیابی فعالیت ضد میکروبی فیکوسیانین خالص و نانو ریزپوشانی‌شده در این پژوهش از دو روش انتشار در آگار با اندازه‌گیری هاله عدم رشد و روش رقیق‌سازی در لوله استفاده گردید. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت فیکوسیانین، اثرات ضد باکتریایی آن نیز افزایش می‌یابد اما این رنگدانه در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های تجاری ضعیف‌تر عمل می‌کند. از طرف دیگر، فعالیت ضد میکروبی فیکوسیانین در فرم نانو ریزپوشانی‌شده بیشتر از فرم خالص حفظ شده و نگهداری در دمای 18- درجه سانتی‌گراد به مدت 60 روز، تغییرات معنی‌داری بر اثرات ضد میکروبی فیکوسیانین نداشته است. اندازه هاله عدم رشد در بین باکتری‌های گرم مثبت مورد مطالعه، بین 8/5 تا 24/20 میلی‌متر متغیر بود. لیستریا نسبت به سایر باکتری‌های گرم مثبت حساس‌تر بوده و بعد از آن نیز *استافیلوکوکوس اورئوس* قرار داشت. دامنه هاله عدم رشد در باکتری‌های گرم منفی بین 7/5 تا 15/11 میلی‌متر و یرسینیا حساس‌تر از *اشریشیاکلی* بوده است. به طور کلی حساسیت باکتری‌های گرم مثبت مورد مطالعه بیشتر از باکترهای گرم منفی بوده و استثناء در این مورد *استرپتوکوکوس اینیه‌ایی* است که هر چند یک باکتری‌گرم مثبت می‌باشد ولی مقاومت آن بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود. نتایج مقادیر کم‌ترین غلظت مهارکننده (MIC) و کم‌ترین غلظت کشنده (MBC) در این تحقیق بسته به غلظت‌های مورد استفاده فیکوسیانین، فرم‌های خالص و نانو ریزپوشانی‌شده، نوع باکتری و زمان نگهداری متفاوت بود. بدین ترتیب که دامنه MIC بین 500-50 و MBC بین 500-100 میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده و کمترین MIC برای *لیستریا مونوسیتوژنز* و بیشترین MBC برای *استرپتوکوکوس اینیه‌ایی* ثبت شده است. حساسیت و یا مقاومت یک باکتری به یک ماده ضد میکروبی به عوامل مختلف از جمله نوع باکتری، ترکیب دیواره سلولی، ویرولانس، قدرت تولید آنزیم‌ها و متابولیت‌های مختلف و ... بستگی دارد. مطالعات نشان داد که در مقایسه این رنگدانه با سایر ترکیبات فنلی با ماهیت ضد میکروبی، اثرات ضد میکروبی فیکوسیانین ضعیف‌تر می‌باشد.

به‌منظور افزایش زمان ماندگاری محصولات غذایی و کاهش بار آلودگی و همچنین تاخیر در فرآیند فساد شیمیایی از نگهدارنده‌های شیمیایی استفاده می‌شود. این مواد به لحاظ عوارض جانبی (جهش‌زایی، سرطان‌زا بودن و ...) کمتر مورد توجه قرار گرفته و امروزه از نگهدارنده‌های طبیعی (به تنهایی و یا در ترکیب با نگهدارنده‌های شیمیایی با غلظت کمتر) استفاده می‌گردد. این مواد علاوه بر ایمن‌بودن، باعث ایجاد طعم و بوی مطبوع و رنگ مناسب در مواد غذایی می‌شوند [27]. بنابراین استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی با ماهیت ضد میکروبی بیشتر مورد نظر محققین می‌باشد [27-29]. از مهم‌ترین نگهدارنده‌های طبیعی می‌توان به متابولیت‌های میکروبی (نایسین، اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، لاکتوپراکسیدازها و پروتامین‌ها) و جلبکی (ترکیبات فنلی و رنگدانه‌ها) اشاره نمود. مطالعات کمی در خصوص اثرات ضد باکتریایی فیکوسیانین اسپیرولینا انجام گرفته اما با این وجود، اثرات ضد میکروبی فیکوسیانین از سایر سیانوفیت ها بیشتر مورد ارزیابی قرار گرفته است. در مطالعه سیتوهی و همکاران (2015) اثرات ضد باکتریایی فیکوسیانین آنابنا بر *کلبسیلا پنومونیه*[3]، *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس*[4] مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که

1 Lyngbya
2 Pseudoanabaena

3 *Klebsiella pneumoniae*
4 *Bacillus cereus*



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-04 ]
[ DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.127.13.6 ]
[ DOI: 10.22034/FSCT.19.127.345 ]

استافیلوکوکوس حساس‌تر از سایر باکتری‌ها بوده و با افزایش غلظت فیکوسیانین از 5 به 30 میکروگرم، اثرات ضد باکتریایی آن نیز افزایش می‌یابد که این نتیجه مشابه تحقیق حاضر است [21]. محیط و همکاران (2015) گزارش کردند که درصد کاهش باکتری‌ها تحت تاثیر فیکوسیانین، 66/34، 60، 58/5، 85 و 20 درصد به ترتیب برای باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتی‌لیس*[1]، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی*[2] بوده است. در تحقیق مذکور، با افزایش غلظت فیکوسیانین از 0/34 به 1/74 میکروگرم، اثرات ضد باکتریایی به طور معنی‌داری افزایش یافت [30] که این نتیجه مشابه پژوهش حاضر است. نتایج مطالعات سارادا و همکاران (2011) در خصوص اثرات ضد باکتریایی فیکوسیانین (100 میکروگرم) با دو روش انتشار در آگار و روش رقیق‌سازی متفاوت از نتایج تحقیق حاضر بود. در تحقیق مذکور دامنه MIC فیکوسیانین بین 50-5 میکروگرم بر میلی-لیتر ثبت شد [31]. در حالی که در پژوهش حاضر این میزان بین 500-50 میکروگرم بر میلی لیتر متغیر بوده است. در تحقیق سارادا و همکاران (2011)، باکتری‌های اسینتوباکتر[3] و انتروکوکوس[4] به تمام غلظت‌های مورد استفاده مقاوم بودند [31]. در صورتی که در تحقیق حاضر *استرپتوکوکوس اینیه‌ایی* به غلظت‌های پائین مقاوم بوده و غلظت‌های بالاتر (500-400 میکروگرم بر میلی‌لیتر) دارای اثرات مهارکننده بر این باکتری بودند. موتالاک‌شمی و همکاران (2012) اثرات ضد میکروبی فیکوسیانین را بر *اشریشیاکلی*، استرپتوکوکوس[5]، سودوموناس[6]، باسیلوس[7]، *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه قرار داده و نتایج نشان داد که با افزایش غلظت فیکوسیانین، اثرات ضد باکتریایی آن نیز افزایش می‌یابد (400 میکرولیتر/دیسک آنتی بیوگرام) که این یافته مشابه تحقیق حاضر می‌باشد [4]. در تحقیق مذکور، در بین باکتری‌های مورد بررسی استرپتوکوکوس و استافیلوکوکوس به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری بوده که این نتیجه با پژوهش حاضر مغایرت دارد [4]. انتخاب سویه و همچنین گونه‌های مورد بررسی در نتیجه آزمایشات ضد میکروبی تاثیرگذار است و در نتیجه مقاومت و حساسیت آن‌ها به انواع مواد ضد میکروبی از جمله فیکوسیانین متفاوت خواهد بود.

تاثیر ضد میکروبی میکروجلبک اسپیرولینا، علاوه بر فیکوسیانین، به متابولیت‌های دیگر مثل ترکیبات فنلی و پلی‌ساکاریدی نیز مربوط می‌باشد. الباز و همکاران (2013) گزارش کردند که عصاره اتانولی اسپیرولینا دارای اثرات ضد ویروسی علیه ویروس‌هایی نظیر آدنوویروس[8] تیپ 7، کوکساکی ویروس[9] $B_4$، آستروویروس[10] نوع 1، روتاویروس[11] و آدنوویروس[12] تیپ 4 بوده و به ترتیب قادر به کاهش 53/3، 66، 76/7، 56/7 و 50 درصد از جمعیت آن‌ها می‌باشد. همچنین در تحقیق مذکور، از گروه باکتری‌ها نیز *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی*، *انتروکوکوس فکالیس*[13] و مخمر *کاندیدا آلبیکنس*[14] تحت تاثیر عصاره الکلی اسپیرولینا قرار گرفته و رشدشان مهار گردید [32]. در مطالعه کومار و همکاران (2011) از عصاره متانولی و استونی اسپیرولینا در جهت ارزیابی رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی* استفاده شده و نتایج نشان داد که دامنه 700-250 میلی‌گرم بر لیتر باعث مهار رشد آن‌ها می‌شود اما با این وجود مقاومت سالمونلا بیشتر از استافیلوکوکوس بوده است. همچنین نتایج GC-MS نشان داد که ترکیب اصلی عامل ضد میکروبی جلبک، اسید چرب می‌باشد [33]. مالا و همکاران (2009) گزارش کردند که عصاره آبی *اسپیرولینا پلاتنسیس* نسبت به عصاره آلی دارای اثرات ضد میکروبی بیشتری بوده که این نتایج مغایر با اکثر مطالعات عصاره‌گیری از جلبک‌ها و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی آن‌ها می‌باشد [34]. در پژوهش مذکور مشخص شد باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت، از مقاومت بیشتری برخوردار هستند که این یافته مشابه تحقیق نتیجه حاضر است. به طور کلی باکتری‌های گرم منفی به لحاظ وجود سه لایه چربی و همچنین لیپوپلی‌ساکارید در دیواره سلولی خود کم‌تر تحت تاثیر مواد ضد میکروبی قرار می‌گیرند.

## 5- نتیجه‌گیری کلی

فیکوسیانین خالص دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی (علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی) است که این خواص با افزایش غلظت رنگدانه، بهبود می‌یابند. تکنیک نانو

1 *Bacillus subtilis*
2 *Salmonella Typhi*
3 Acinetobacter
4 Enterococcus
5 Streptococcus sp
6 Pseudomonas sp.
7 Bacillus sp.

8 Adenoviruses
9 Coxsackievirus
10 Astrovirus
11 Rotavirus
12 Adenoviruses
13 *Enterococcus faecalis*
14 *Candida albicans*



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-04 ]
[ DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.127.13.6 ]
[ DOI: 10.22034/FSCT.19.127.345 ]

ریزپوشانی فیکوسیانین با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم نه تنها به ارتقا خواص مذکور در رنگدانه کمک می‌کند، بلکه موجب ثبات این خواص در طول دوره نگهداری (در اینجا دمای 18- درجه سانتی‌گراد به مدت 60 روز) می‌شود. بنابراین استفاده از فیکوسیانین بخصوص به صورت نانو ریزپوشانی‌شده در فرمولاسیون مواد غذایی (به شرط عدم ایجاد تغییرات منفی در خواص حسی) می‌تواند با جلوگیری از فساد اکسیداتیو و باکتریایی، موجب افزایش زمان ماندگاری فراورده شود. از آنجا که میزان مقاومت گونه‌های باکتریایی در برابر غلظت‌های مختلف فیکوسیانین، متفاوت است، به هنگام استفاده از این رنگدانه در مواد غذایی به عنوان نگهدارنده، باید به این فاکتور (غلظت) توجه ویژه گردد. چرا که مطابق یافته‌های تحقیق حاضر، برخی از گونه‌های مورد مطالعه نسبت به غلظت‌های پائین رنگدانه و نانوکپسول‌های حامل آن مقاوم بودند.

## 6- تشکر و قدردانی

محققین تحقیق حاضر بر خود لازم می‌دانند از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و همچنین پژوهشکده اکولوژی دریای خزر جهت حمایت مالی و در اختیارنهادن تجهیزات تخصصی تقدیر و تشکر به عمل آورند.

## 7- منابع

[1] Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G., and Al-Hazimi, A. 2013. Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycocyanin. BioMed Research International, 1-9

[2] Dewi, E. N., Purnamayati, L., and Kurniasih, R. A. 2016. Antioxidant activities of phycocyanin microcapsules using maltodextrin and carrageenan as coating materials. Jurnal Teknologi, 78(4): 45–50.

[3] Suzery, M., Majid, D., Setyawan, D., and Sutanto, H. 2017. Improvement of stability and antioxidant activities by using phycocyanin-chitosan encapsulation technique. In *IOP* Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 55, No. 1, p. 012052), IOP Publishing.

[4] Muthulakshmi, M., Saranya, A., Sudha, M., and Selvakumar, G. 2012. Extraction, partial purification, and antibacterial activity of phycocyanin from Spirulina isolated from fresh water body against various human pathogens. Journal of Algal Biomass Utilization, 3(3): 7-11.

[5] Quirós-Sauceda, A. E., Ayala-Zavala, J. F., Olivas, G. I., and González-Aguilar, G. A. 2014. Edible coatings as encapsulating matrices for bioactive compounds: a review. Journal of Food Science and Technology, 51(9): 1674-1685.

[6] Özkan, G., and Bilek, S. E. 2014. Microencapsulation of natural food colourants. International Journal of Nutrition and Food Sciences, 3(3), 145-156.

[7] Gibbs B. F. 1999. Encapsulation in the food industry: A review. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 50: 213-224.

[8] Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., and Bugarski, B. 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. Procedia Food Science, 1: 1806-1815.

[9] Yan, M., Liu, B., Jiao, X., and Qin, S. 2014. Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties. Food and Bioproducts Processing, 92(1): 89-97.

[10] Machado, A. R., Assis, L. M., Costa, J. A. V., Badiale-Furlong, E., Motta, A. S., Micheletto, Y. M. S., and Souza-Soares, L. A. 2014. Application of sonication and mixing for nanoencapsulation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in liposomes. International Food Research Journal, 21(6): 2201.

[11] Kamble, S. P., Gaikar, R. B., Padalia, R. B., and Shinde, K. D. 2013. Extraction and purification of C-phycocyanin from dry Spirulina powder and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 3(8): 149-153

[12] Prabakaran, P., and Ravindran, A. D. 2013. Efficacy of different extraction methods of phycocyanin from *Spirulina platensis*. International Journal of Research in Pharmacy and Life Sciences, 1(1): 15-20.

[13] Murugan, T., and Rajesh, R. 2014. Cultivation of two species of Spirulina (*Spirulina platensis* and *Spirulina platensis* var lonar) on sea water medium and extraction of C-phycocyanin. European Journal of Experimental Biology, 4(2): 93-97.

[14] Leema, J. M., Kirubagaran, R., Vinithkumar, N. V., Dheenan, P. S., and Karthikayulu, S. 2010. High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. Bioresource Technology, 101(23): 9221-9227.



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-04 ]

[ DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.127.13.6 ]
[ DOI: 10.22034/FSCT.19.127.345 ]

2008. Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulin aplatensis*. Food Chemistry, 110(2): 436-445.
[26] Ismaiel, M. M., El-Ayouty, Y. M., and Piercey-Normore, M. D. 2014. Antioxidants characterization in selected cyanobacteria. Annals of Microbiology, 64(3): 1223-1230.
[27] Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., and Coton, E. 2017. Antifungal microbial agents for food biopreservation—a review. Microorganisms, 5(37): 1-35.
[28] Song, S. K., Beck, B. R., Kim, D., Park, J., Kim, J., Kim, H. D., and Ringø, E. 2014. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. Fish and Shellfish Immunology, 40(1): 40-48.
[29] Cerezuela, R., Meseguer, J., and Esteban, M. A. 2011. Current knowledge in synbiotic use for fish aquaculture: a review. Journal of Aquaculture Research and Development S, 1, 1-7.
[30] Mohite, Y. S., Shrivastava, N. D., and Sahu, D. G. 2015. Antimicrobial activity of C-phycocyanin from *Arthrospira platensis* isolated from extreme haloalkaline environment of Lonar Lake. Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology, 1(4): 40-45.
[31] Sarada, D. V., Kumar, C. S., and Rengasamy, R. 2011. Purified C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (Nordstedt) Geitler: a novel and potent agent against drug resistant bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(4): 779-783.
[32] El-Baz, F. K., El-Senousy, W. M., El-Sayed, A. B., and Kamel, M. M. 2013. In vitro antiviral and antimicrobial activities of *Spirulina platensis* extract. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 3(12): 52-56.
[33] Kumar, V., Bhatnagar, A. K., and Srivastava, J. N. 2011. Antibacterial activity of crude extracts of *Spirulina platensis* and its structural elucidation of bioactive compound. Journal of Medicinal Plants Research, 5(32): 7043-7048.
[34] Mala, R., Sarojini, M., Saravanababu, S., and Umadevi, G. 2009. Screening for antimicrobial activity of crude extracts of *Spirulina platensis*. Journal of Cell and Tissue Research, 9(3): 1951.
[15] Patil, G., Chethana, S., Sridevi, A. S., and Raghavarao, K. S. M. S. 2006. Method to obtain C-phycocyanin of high purity. Journal of Chromatography A, 1127(1-2): 76-81.
[16] Jerley, A., and Prabu, D. 2015. Purification, characterization and antioxidant properties of C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. Scrutiny International Research Journal of Agriculture, Plant Biotechnology and Bio Products, 2(1): 7-15.
[17] Zhu, Q. Y., Hackman, R. M., Ensunsa, J. L., Holt, R. R., and Keen, C. L. 2002. Antioxidative activities of oolong tea. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(23): 6929-6934.
[18] Ismaiel, M. M. S., El-Ayouty, Y. M., and Piercey-Normore, M. 2016. Role of pH on antioxidants production by *Spirulina (Arthrospira) platensis*. Brazilian Journal of Microbiology, 47: 298-304.
[19] Sarada, R. M. G. P., Pillai, M. G., and Ravishankar, G. A. 1999. Phycocyanin from Spirulina sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. Process Biochemistry, 34(8): 795-801.
[20] Zgoda, J. R., and Porter, J. R. 2001. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. Pharmaceutical Biology, 39(3): 221-225.
[21] Sitohy, M., Osman, A., Ali Abdel G., and Salama A. 2015. Antibacterial phycocyanin from *Anabaena oryzae* SOS13. International Journal of Applied Research in Natural Products, 8(4): 27-36.
[22] Martínez-Palma, N., Martínez-Ayala, A., and Dávila-Ortiz, G. 2015. Determination of antioxidant and chelating activity of protein hydrolysates from spirulina (*Arthrospira maxima*) obtained by simulated gastrointestinal digestion. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 14(1): 25-34.
[23] Estrada, J. P., Bescós, P. B., and Del Fresno, A. V. 2001. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. II farmaco, 56(5-7): 497-500.
[24] Paliwal, C., Ghosh, T., Bhayani, K., Maurya, R., and Mishra, S. 2015. Antioxidant, anti-nephrolithe activities and in vitro digestibility studies of three different cyanobacterial pigment extracts. Marine Drugs, 13(8): 5384-5401.
[25] Bermejo, P., Piñero, E., and Villar, Á. M.

[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-04 ]
[ DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.127.13.6 ]
[ DOI: 10.22034/FSCT.19.127.345 ]

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

# Evaluation and comparison of antioxidant and antibacterial activity of phycocyanin extracted from spirulina microalgae (*Spirulina Platensis*) in both pure and nanoencasulated forms with maltodextrin-sodium caseinate combination coating

**Safari, R. [1*], Raftani Amiri, Z. [2], Reyhani Poul, S. [3], Esmaeilzadeh Kenari, R. [2]**

1. Assistant professor, Caspian Sea Ecology Research Institute, Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Sari, Iran.
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
3. PhD Graduate, Department of Processing of Fishery Products, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

**ARTICLE INFO**

**Article History:**

Received 2021/ 12/ 12
Accepted 2022/ 01/ 26

**Keywords:**

Spirulina,
Phycocyanin,
Nanoencapsulation,
Antioxidant activity,
Antibacterial property.

**DOI: 10.22034/FSCT.19.127.345**
**DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.127.13.6**

*Corresponding Author E-Mail:
Safari1351@gmail.com

**ABSTRACT**

Following the concerns created in the field of using synthetic preservatives in various foods, it seems necessary to pay attention to natural compounds with preservative properties. Phycocyanin extracted from spirulina microalgae is one of these compounds. The aim of the present study was to extract (using enzymatic method) and nanoencapsulation of this pigment with maltodextrin-sodium caseinate combination coating and evaluate the antioxidant and antibacterial activity (against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia ruckeri* and *Streptococcus iniae*) of nanocapsules in comparison with pure phycocyanin. The results showed that with increasing the concentration of phycocyanin (in both pure and nanoencapsulated forms), the antioxidant and antibacterial activity of the treatments increased significantly ($p<0.05$). Comparison of the properties of the treatments on days 0 and 60 (stored at -18°C) showed that the antioxidant and antibacterial activity of pure phycocyanin was significantly reduced over time ($p<0.05$). But the nanoencapsulation technique prevents the mentioned properties from changing and helps to preserve them. Among gram-positive bacteria, *Listeria monocytogenes* was more sensitive than the other two bacteria and all concentrations used had an inhibitory effect on this bacteri. *Staphylococcus aureus* was resistant to two concentrations of 2.5 and 5 µg/ml and *Streptococcus iniae* to three concentrations of 2.5, 5 and 10 µg/ml. Among the two gram-negative bacteria, *Yersinia ruckeri* was more sensitive and the concentrations used, with the exception of concentrations of 2.5 and 5 µg/ml, had an inhibitory effect on both bacteria. According to the results of the dilution method, for the studied bacteria, the MIC range was between 50-500 and the MBC between 100-500 µg/ml. Also, the lowest MIC was recorded for *Listeria monocytogenes* and the highest MBC was recorded for *Streptococcus iniae*. It can be concluded from this research that first, pure phycocyanin has antioxidant and antibacterial activity; second, nanoencapsulation of this pigment with combined coating of maltodextrin-sodium caseinate improves these properties and their stability during the storage period.

[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-04 ]
[ DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.127.13.6 ]
[ DOI: 10.22034/FSCT.19.127.345 ]