



تولید نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین استخراج شده از میکروجلبک هماتوکوکوس
(*Haematococcus pluvialis*) با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم و ارزیابی خواص

فیزیکی، آنتی‌اکسیدانی و رنگی محصول

سکینه یگانه^{۱*}، سهیل ریحانی پول^۲

۱- استاد، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

۲- دانش آموخته دکتری تخصصی، گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست،

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۱۲

کلمات کلیدی:

هماتوکوکوس پلویالیس،

آستاگزانتین،

نانوکپسول‌های حامل،

مالتودکسترین، خواص فیزیکی،

فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

هدف تحقیق حاضر در مرحله اول، استخراج آستاگزانتین از میکروجلبک هماتوکوکوس (*Haematococcus pluvialis*) با استفاده از روش ترکیبی اسید-استون و ارزیابی بازده فرایند بود. سپس رنگدانه استخراج شده با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم نانو ریزپوشانی و خواص فیزیکی، آنتی‌اکسیدانی و رنگی نانوکپسول‌های حامل (و فرم خالص آستاگزانتین) طی دوره نگهداری (۳۰ در دمای یخچال) ارزیابی شدند. نتایج نشان داد با صابونی کردن و خالص سازی اولیه و ثانویه، بازده فرایند استخراج آستاگزانتین ارتقا و میزان رنگدانه طی مراحل مذکور، از ۸/۱۱ به ۲۱/۷۶ میلی گرم بر گرم افزایش یافته است. مطابق یافته‌ها، میانگین سائز و پتانسیل زتای نانوکپسول‌های تولید شده به ترتیب ۲۶۹/۱ نانومتر و ۴۶/۷۱+ میلی ولت بود؛ ضمن اینکه بازده فرایند نانو ریزپوشانی ۸۵/۱۹ درصد ثبت شد. پروفیل رهایش آستاگزانتین از نانوکپسول‌ها در محیط مشابه معده (SGF) و روده (SIF) نشان داد که رهایش رنگدانه در SGF از ۳/۲۱ تا ۱۴/۲۸ و در SIF از ۱۸/۴۹ تا ۴۱/۸۹ درصد متغیر است. بر اساس نتایج، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH رنگدانه خالص و نانوکپسول‌های حامل (در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و روزهای صفر، ۱۵ و ۳۰) به ترتیب از حدود ۲۱ تا ۵۷ و ۵۳ تا ۷۰ درصد متغیر بود. این میزان برای قدرت کاهندگی یون فریک به ترتیب از جذب ۰/۱۲ تا ۰/۵۴ و ۰/۵۵ تا ۰/۷۱ در طول موج ۷۰۰ نانومتر گزارش شد. در آزمون فعالیت کلاته‌کنندگی فلزات، دامنه تغییرات به ترتیب از ۲۳ تا ۵۲ و ۵۲ تا ۷۵ درصد ثبت گردید. با نانو ریزپوشانی رنگدانه و افزایش غلظت، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن به صورت معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$)؛ همچنین برخلاف فرم خالص آستاگزانتین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوکپسول‌های حامل در طول زمان نگهداری، ثابت ماند ($p > 0.05$). ارزیابی رنگ محصول نشان داد که شاخص روشنایی (L^*) در نانوکپسول‌های حامل به صورت معنی‌داری بیشتر از فرم خالص رنگدانه است ($p < 0.05$)؛ ضمن اینکه شاخص‌های رنگی نانوکپسول‌ها (بر خلاف آستاگزانتین خالص) با گذشت زمان، تغییر نکردند ($p > 0.05$). بنابر یافته‌ها، نانو ریزپوشانی آستاگزانتین با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم کارایی مطلوبی جهت بهبود و ثبات خواص آنتی‌اکسیدانی و رنگی آن دارد.

DOI: 10.22034/FSCT.19.131.303
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.24.5

* مسئول مکاتبات:

s.yeganeh@sanru.ac.ir

۱- مقدمه

افزایش نگرانی مصرف کنندگان به دلیل استفاده از نگهدارنده‌ها (آنتی اکسیدان‌ها) و رنگ‌دهنده‌های سنتتیک در فراورده‌های غذایی موجب شده تا متخصصین علوم و صنایع غذایی به دنبال تولید و کشف نگهدارنده‌ها و رنگ‌هایی با منشا طبیعی باشند. موجودات دریایی یکی از منابعی هستند که به دلیل دارا بودن رنگدانه‌های مختلف می‌توانند به عنوان راهکاری در این زمینه مطرح باشند. از جمله رنگدانه‌های مهمی که از آبزیان استخراج می‌شوند، می‌توان به آستاگزانتین و فیکوسیانیین اشاره کرد [۲۱]. آستاگزانتین در میکروارگانیسم‌های مختلف نظیر جلبک‌ها [۳]، مخمرها [۴] و باکتری‌ها [۵] وجود دارد. مطالعات زیادی در زمینه جداسازی آستاگزانتین از منابع طبیعی مانند میکروجلبک *هاتوکوکوس پلویالیس*^۱ [۶] و *کلرلا زوفینگینسیس*^۲، مخمر *زانتوفیلومایسی دندروروس*^۳ [۴]، *فافی رودوزیما*^۴ و باکتری *رودوباکتر اسفاویدز*^۵ [۵] انجام شده است. محتوی آستاگزانتین در ریزجلبک‌ها از ۱ تا ۵ درصد وزن خشک آن‌ها، متفاوت می‌باشد. فاکتورهای فیزیکی (pH و دما) و فاکتورهای مغذی (منابع کربن و نیتروژن) بر تولید آستاگزانتین توسط مخمر، باکتری و ریزجلبک‌ها موثر می‌باشند [۷]. آستاگزانتین یک ترکیب آلی است که در حلال‌هایی با قطبیت کم و انواع روغن‌ها حل می‌شود. به منظور استخراج آستاگزانتین از حلال‌های مختلف، اسیدها، روغن‌های خوراکی، روش مایکروویو و آنزیمی استفاده می‌گردد. در پژوهشی جهت استخراج این رنگدانه از استون ۴۰ درصد در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه استفاده شد که راندمان فرایند ۷۰ درصد گزارش گردید [۸]. در سایر تحقیقات نیز جهت استخراج آستاگزانتین از اسید کلریدریک [۹]، روغن‌های گیاهی نظیر روغن سویا، زیتون و روغن دانه انگور [۱۰] و اتانول [۱۱-۱۳] استفاده شده است. در تمامی روش‌های مذکور، رنگدانه با استفاده از حلال استخراج می‌شود. سپس حلال پراکنی از طریق روتاری انجام و مجدداً در حلال، حل و جذب نوری رنگدانه در طول موج ۴۸۰-۴۷۶ نانومتر قرائت می‌گردد [۱۴]. در تحقیقات مختلف، فعالیت آنتی اکسیدانی و رنگ‌دهندگی آستاگزانتین اثبات شده است [۱، ۱۵ و ۱۶].

همچنین این رنگدانه خواص مختلف دیگری از جمله خاصیت ضد سرطانی [۱۷]، بهبود سلامت چشم [۱۸]، پیشگیری از بیماری قلبی-عروقی و التهابی [۱۹]، ضد دیابتی [۲۰] و ... دارد که استفاده از آن را در فراورده‌های غذایی مختلف توجیه می‌کند. در اتحادیه اروپا، آستاگزانتین به عنوان منبع غذایی جدید (EC No.258/97) و به عنوان مواد خام برای مکمل‌های غذایی مورد تایید قرار گرفته است [۲۱]. از سال ۱۹۹۷، کشورهای اروپایی از آستاگزانتین در ۵ گروه از غذاها و فراورده‌های غذایی (فراورده‌های لبنی، نوشیدنی‌ها، ژله‌ها، شیرینی‌جات و شکلات‌ها) استفاده می‌کردند. همچنین ژاپنی‌ها از روغن قرمز آستاگزانتین در ترشی سبزیجات، جلبک‌ها و میوه‌ها استفاده می‌کنند. در چین، میکروجلبک *هاتوکوکوس پلویالیس* (به دلیل دارا بودن آستاگزانتین) به عنوان منبع غذایی جدید توسط سازمان ملی غذا و دارو در سال ۲۰۱۰ مورد تایید قرار گرفت [۱۶]. با توجه به خواص ذکرشده برای آستاگزانتین، استفاده از روش‌هایی جهت افزایش پایداری و کارایی این رنگدانه به هنگام استفاده در فراورده‌های غذایی مختلف ضرورت می‌یابد. چرا که طی فرایند تولید و نگهداری مواد غذایی ممکن است تحت شرایطی از جمله استفاده از تیمارهای دمایی، آنزیمی، اسیدی، بازی و ...، ساختار و در نتیجه عملکرد آستاگزانتین تغییر کند. در صنایع غذایی در چنین مواردی از تکنیک نانو ریزپوشانی استفاده می‌شود [۲۲-۲۸]. طی این فرایند کپسولی اطراف رنگدانه را احاطه کرده و آن را در شرایط نامساعد از تغییرات احتمالی حفظ می‌کند. ضمن اینکه کپسول‌های تشکیل‌شده اطراف رنگدانه در این تکنیک، محتویات خود را با سرعت کنترل‌شده و شرایط ویژه رها می‌کنند. در فرایند نانو ریزپوشانی از ترکیبات مختلف کربوهیدراتی (مالتودکسترین، نشاسته، کیتوزان، دکسترین، ساکارز و ...)، سلولزی (کربوکسی‌متیل سلولز، متیل سلولز، اتیل-سلولز، نیتروسلولز و ...)، پروتئینی (کازئین، پروتئین آب پنیر، ژلاتین و ...)، لیپیدی (لیپوزوم، واکس، پارافین، بیزواکس، دی‌گلیسریدها، مونوگلیسریدها و ...) و ... جهت پوشش (دیواره) ترکیبات فعال (هسته) استفاده می‌شود. مالتودکسترین یکی از پوشش‌های کربوهیدراتی است که از مشتقات نشاسته می‌باشد و از منابع مختلف نشاسته‌ای مانند سیب زمینی، ذرت و گندم تهیه می‌گردد. این ماده بدلیل حلالیت بالا در آب و عدم داشتن بو و رنگ شاخص، از مهم‌ترین مواد پلی‌ساکاریدی

1. *Haematococcus pluvialis*2. *Chlorella zofingiensis*3. *Xanthophyllomyces dendrorhous*4. *Phaffia rhodozyma*5. *Rhodobacter sphaeroides*

به رسوب اضافه شد و پس از ۱ ساعت هم‌زدن در دمای اتاق، با استفاده از امواج فراصوت، فرآیند سونیکاسیون به مدت ۱۰ دقیقه در فرکانس ۲۰ کیلو هرتز انجام گرفت. بعد از این مرحله، استون حاوی مایع رویی، با سانتریفوژ نمونه‌ها در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه جمع‌آوری شد. عمل استخراج مجدداً تکرار گردید. در انتهای آزمایش، حلال‌های استون حاصل از سانتریفوژ چند مرحله‌ای که حاوی رنگدانه آستاگزانتین بودند با هم ترکیب شدند و جهت قرائت غلظت آستاگزانتین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۸ نانومتر مورد استفاده قرار گرفتند [۱۵، ۳۱ و ۳۲]. جهت تعیین غلظت آستاگزانتین از فرمول $C = A/\alpha$ استفاده شد [۳۲]. در این رابطه C ، نشان‌دهنده غلظت آستاگزانتین، A ، طول موج مورد استفاده و α جذب قرائت‌شده است. در ادامه فرایند، به منظور هیدرولیز یا صابونی‌کردن آستاگزانتین ابتدا مخلوط حاوی سود ۰/۰۲ نرمال و عصاره حاوی رنگدانه به مدت ۳ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد در مکان تاریک قرار داده شدند. بعد از پایان فرآیند هیدرولیز، غلظت آستاگزانتین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و طول موج ۴۷۸ نانومتر قرائت گردید [۳۴]. به منظور خالص‌سازی آستاگزانتین استخراج‌شده، ابتدا عصاره هیدرولیز‌شده حاوی آستاگزانتین، آب مقطر و آن‌هگزان با نسبت ۱:۱:۱ مخلوط شدند و سپس با سانتریفوژ در دور ۴۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه، فرآیند جداسازی رنگدانه انجام گرفت. بعد از سانتریفوژ، فاز هگزان جمع‌آوری شد و فرآیند جداسازی، تا بی‌رنگ شدن کامل این فاز انجام گرفت. حلال آلی هگزان حاصل از سانتریفوژ با هم ترکیب و با استفاده از آب مقطر تا تنظیم pH در محدوده خنثی شستشو داده شد. در انتهای فرآیند، با استفاده از روتاری در دمای اتاق، حلال پراکنی انجام و سوسپانسیون حاوی رنگدانه، تغلیظ و به ۱۰ میلی‌لیتر کاهش داده شد و جهت تزریق به ستون کروماتوگرافی آماده گردید. جهت خالص‌سازی آستاگزانتین از روش کروماتوگرافی ستونی استفاده شد. به این منظور، ستون مورد استفاده با استفاده از سیلیکاژل پر و بعد از تنظیم پارامترهای مختلف شامل flow rate (۰/۶۵ میلی‌لیتر در دقیقه)، فرکانس (۴۷۶ نانومتر)، دمای ستون (۳۰ درجه سانتی‌گراد) و میزان تزریق (۲۰ میکرولیتر) و نوع ستون (PDA)، دستگاه جهت تزریق آماده گردید. ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه تغلیظ‌شده حاوی آستاگزانتین (حاوی یک

جهت نانو ریزپوشانی‌کردن مواد محسوب می‌شود [۲۹]. کازئینات سدیم جزء پوشش‌های پروتئنی و نمک سدیم کازئین است که شامل عناصر مهم، ضروری و مورد نیاز برای بدن است. این نمک به میزان مطلوبی دارای حلالیت می‌باشد و می‌تواند در یک مخلوط آبی پخش شود [۳۰].

هدف تحقیق حاضر در مرحله اول استخراج آستاگزانتین با استفاده از روش ترکیبی (پیش تیمار اولیه با اسیدکلریدریک و سپس استخراج با استون خالص) و بررسی بازده فرایند است. سپس رنگدانه استخراج‌شده با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم نانو ریزپوشانی و خواص فیزیکی، آنتی‌اکسیدانی و رنگی نانوکپسول‌های حامل در کنار فرم خالص آستاگزانتین ارزیابی می‌گردد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

پودر خالص میکروجلبک هماتوکوکوس پلوویالیس به صورت فریزدرای‌شده و با رنگ متمایل به قرمز از شرکت پرتو غذایی آریان سورنا مازندران تهیه شد. ترکیب شیمیایی این پودر در جدول ۱ ارائه شده است. مالتودکسترین، کازئینات سدیم، آنزیم پیپسین، آنزیم پانکراتین، رادیکال آزاد DPPH و تری‌کلرواستیک‌اسید از شرکت سیگما و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک خریداری شدند.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- استخراج، صابونی‌کردن و تخلیص رنگدانه

آستاگزانتین

روش مورد استفاده جهت استخراج، روش ترکیبی (پیش تیمار اولیه با اسیدکلریدریک و سپس استخراج با استون خالص) بود. در این روش، ابتدا نمونه‌ها تحت تأثیر پیش تیمار اولیه اسیدکلریدریک قرار گرفتند و ۱ میلی‌لیتر از اسید ۴ مولار به ۱۰ میلی‌گرم از پودر هماتوکوکوس اضافه و مخلوط به مدت ۱ ساعت در دمای ۷۰ درجه بن‌ماری قرار داده شد. پس از خنک‌شدن، سوسپانسیون حاصل به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. بعد از سانتریفوژ، نمونه‌ها دو مرتبه با آب مقطر شستشو و مجدداً سانتریفوژ شدند و در نهایت عمل استخراج بر روی رسوب بدست‌آمده با استفاده از استون انجام گرفت. بدین ترتیب که ابتدا ۴ میلی‌لیتر از استون

کاهش دما به ۲۵ درجه سانتی‌گراد) به محلول دارای مالتودکسترین اضافه و ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جهت افزایش جذب آب نگهداری گردید. در مرحله انتهایی، ۲ گرم آستاگزانتین به محلول حاوی پوشش‌ها اضافه و پس از حل شدن آن، جهت تولید نانوکپسول، از دستگاه اولتراسوند (Hilscher, UP200، آلمان) با طول موج ۴۰ کیلوهرتز به مدت ۱۵ دقیقه و تعداد ۶ سیکل (زمان هر سیکل ۳۰ ثانیه و زمان استراحت ۱۵ ثانیه بین سیکل‌ها، دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد) استفاده شد. برای کاهش بیشتر اندازه ذرات و افزایش راندمان ذرات نانوکپسوله، از دستگاه هموژنایزر با دور (اولتراتوراکس، JKa، ایتالیا) ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه استفاده گردید. محلول حاصل از فرآیند، در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد منجمد و با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (Vaco 2 Zirbus، آلمان) در فشار ۰/۰۵۱ میلی‌بار و دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد خشک گردید [۲، ۲۹ و ۳۷].

۲-۲-۳- ارزیابی خواص فیزیکی نانوکپسول‌ها

۲-۲-۳-۱- میانگین سایز ذرات و شاخص توزیع اندازه ذره‌ای (PDI)^۱

این دو شاخص پس از پس از رقیق کردن نمونه‌ها به میزان ۱۰ برابر با بافر فسفات نمکی^۲ به روش تفرق نور پویا^۳ با استفاده از دستگاه زتاسایزر (نانوسایزر، ۳۰۰۰، ساخت انگلستان، شرکت Malvern، زاویه ۹۰ درجه و سل مخصوص با عرض ۰/۰۱ متر) اندازه‌گیری شدند [۲۲].

۲-۲-۳-۲- سنجش پتانسیل زتای سطح نانوکپسول‌ها

به منظور اندازه‌گیری پتانسیل زتای سطح نانوکپسول‌ها، از دستگاه زتاسایزر استفاده گردید. در این روش نانوکپسول‌ها با استفاده از ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات (pH=۷/۴) به میزان ۱۰ برابر رقیق شدند. ارزیابی پتانسیل زتا در زاویه ۱۷۳ درجه سانتی‌گراد و طول موج ۶۳۳ نانومتر هلیوم-تنگستن (در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) انجام گردید [۲۲].

۲-۲-۳-۲- تعیین راندمان ریزپوشانی (EE^۴)

بازده فرآیند نانو ریزپوشانی با استفاده از روش یان و همکاران (۲۰۱۴) و از طریق رابطه زیر تعیین گردید. در این رابطه، FA، مقدار آستاگزانتین فاقد پوشش و A، مقدار آستاگزانتین

گرم رنگدانه) جهت تزریق آماده شد. عمل خالص‌سازی در ابتدا با هگزان/استون (نسبت ۷ به ۳ حجمی/حجمی) به مدت ۴۰ دقیقه، سپس با هگزان/دی‌کلرومتان/استون (به نسبت ۵ به ۲/۵ حجمی-حجمی) انجام گرفت. مدت زمان انجام عمل خالص‌سازی ۹۰ دقیقه بود. به منظور محاسبه آستاگزانتین قابل استخراج از رابطه زیر استفاده شد. در این رابطه، توده آستاگزانتین، مقدار آستاگزانتین استخراج‌شده در حلال آلی، m، میزان جلبک مورد استفاده و عدد ۳ میزان تقریبی آستاگزانتین در هماتوکوکوس است.

= آستاگزانتین قابل استخراج (%)

$$100 \times [3] / (100m \text{ توده آستاگزانتین})$$

حلال‌های جمع‌آوری در مرحله قبل، با استفاده از دستگاه روتاری خارج شدند و رنگدانه باقیمانده مجدداً در ۱۰۰ میلی-لیتر استون ترکیب شد. بعد از این مرحله، چند قطره آب مقطر به حلال اضافه گردید و ترکیب بدست‌آمده به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴ درجه قرار داده شد تا عمل کریستالیزه‌شدن انجام گیرد. رنگ کریستال‌های تشکیل‌شده به رنگ قرمز قهوه‌ای بود. فرآیند فوق مجدداً تکرار و در نهایت نمونه جمع‌آوری‌شده فریز درایر گردید [۱، ۱۰، ۳۵ و ۳۶].

Table 1 Qualitative analysis of Hematococcus microalgae used in this study

Cell composition	Amount (%)
Protein	23
Carbohydrate	37.5
Total fat	35.5
Astaxanthin	3
Beta-carotene	0.037
Lutein	0.018
Canthaxanthin	0.18

۲-۲-۲- نانو ریزپوشانی کردن آستاگزانتین

به منظور نانو ریزپوشانی آستاگزانتین، از پوشش ترکیبی مالتودکسترین و کازئینات سدیم با نسبت برابر استفاده و نسبت پوشش‌ها به هسته نیز ۴ به ۱ در نظر گرفته شد. ابتدا سوسپانسیون همگنی از مالتودکسترین در آب مقطر (۴ گرم در ۵۰ میلی‌لیتر) تهیه شد. سپس جهت تهیه پوشش دوم، سوسپانسیونی از کازئینات سدیم در آب مقطر (۴ گرم در ۵۰ میلی‌لیتر) ایجاد و با قراردادن بر روی همزن مغناطیسی و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، سوسپانسیون همگنی از آن حاصل شد. محلول حاوی کازئینات سدیم (پس از

1. Particle Dispersity Index
2. Phosphate-Buffered Saline or PBS
3. Dynamic Light Scattering
4. Encapsulation Efficiency

اضافه شده در ابتدای آزمایش است [۳۷].

$$EE (\%) = (FA - A) / A$$

۲-۲-۴- رهائش آستاگزانتین از نانوکپسول‌ها در محیط‌های شبیه‌سازی شده معده (SGF^1) و روده (SIF^2)

به منظور طراحی محیطی مشابه معده، ۱۰۰ میلی گرم آنزیم پپسین در ۵ میلی لیتر آب مقطر حاوی ۰/۳۵ میلی لیتر هیدروکلریک اسید غلیظ حل شد. در ادامه، ۱۰۰ میلی گرم کلرید سدیم به محلول اضافه گردید. حجم نهایی این محلول با استفاده از آب مقطر به ۵۰ میلی لیتر و pH آن به ۱/۲ تنظیم شد. سپس ۵۰۰ میلی گرم از نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین به محیط SGF اضافه گردید. با توجه به اینکه زمان تخلیه معده برای یک وعده غذایی استاندارد ۱۱۲ دقیقه است [۳۸]، مخلوط حاصل به مدت ۱۲۰ دقیقه در سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد شیک شد. به منظور آماده سازی محیطی مشابه روده، در ابتدا ۳۴۰ میلی گرم پتاسیم فسفات مونوبازیک در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. در مرحله بعد، ۴ میلی لیتر سدیم هیدروکسید ۰/۲ مولار و ۵۰۰ میلی گرم پانکراتین به محلول تهیه شده اضافه گردید. در نهایت حجم و pH نهایی محلول به ترتیب به ۵۰ میلی لیتر و ۶/۸ تنظیم شد. به این محلول هم ۵۰۰ میلی گرم از نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین اضافه اما با توجه به اینکه زمان عبور غذا از روده کوچک ۲ تا ۴ ساعت است [۳۹]، زمان انکوباسیون (شیک کردن با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) نانوکپسول‌ها در محیط SIF، ۴ ساعت در نظر گرفته شد. تغییرات غلظت آستاگزانتین رهائشده، در هر ۳۰ دقیقه، با استفاده از روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری گردید [۲، ۲۲ و ۳۷].

۲-۲-۵- ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین و نانوکپسول‌های حامل آن

به منظور ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین خالص و نانو ریزپوشانی شده (نانوکپسول‌های حامل)، از سه شاخص قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH، کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی و فعالیت کلاته کردن فلزات استفاده شد. دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از آستاگزانتین و نانوکپسول‌های

حامل به منظور ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی در زمان‌های صفر، ۱۵ و ۳۰ روز (نگهداری در دمای یخچال؛ $\pm 1^\circ C$ درجه سانتی-گراد) مورد استفاده قرار گرفتند. هدف از انتخاب سه زمان، سنجش اثر زمان نگهداری بر تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین خالص و نانو ریزپوشانی شده بود. نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه با دو آنتی‌اکسیدان بوتیل‌هیدروکسی-آنیزول^۳ و بوتیل‌هیدروکسی‌تولون^۴ در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر مقایسه گردید [۴۰].

۲-۲-۵-۱- قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH

برای اندازه‌گیری شاخص قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH، ابتدا ۵۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۱۶ میلی مولار DPPH در اتانول ۹۶ درصد با حجم برابری از نمونه مخلوط و ترکیب حاصل کاملاً و رتکس شد. سپس این محلول در دمای اتاق و محیط تاریکی (کابینت) به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. نهایتاً جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت و قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه‌ها بر اساس رابطه زیر محاسبه و به صورت درصد گزارش شد [۴۱].

= قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH

$$100 \times [\text{جذب شاهد} / (\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد})]$$

۲-۲-۵-۲- قدرت کاهندگی آهن سه ظرفیتی

به منظور ارزیابی قدرت کاهندگی نمونه‌ها، ابتدا یک میلی لیتر نمونه با ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH=۶/۶ و ۲/۵ میلی لیتر محلول ۱٪ وزنی- حجمی پتاسیم فریسیانید مخلوط شد. این محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و بعد از این مدت با اضافه کردن ۲/۵ میلی لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد، واکنش خاتمه یافت. در نهایت ۲/۵ میلی لیتر از این مخلوط با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر فریک کلرید ۰/۱ درصد ترکیب و ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه و سپس جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. جذب بالاتر نشان‌دهنده قدرت کاهندگی بالاتر نمونه است [۴۲].

۲-۲-۵-۳- فعالیت کلاته کردن فلزات

جهت ارزیابی فعالیت کلاته‌کنندگی، ابتدا محلولی از نمونه (با غلظت مشخص) تهیه و یک میلی لیتر از آن به ۳/۷ میلی لیتر آب مقطر اضافه گردید. سپس به محلول حاضر ۰/۱ میلی لیتر

3. BHA
4. BHT

1. Simulated Gastric Fluid
2. Simulated Intestinal Fluid

(۷۲/۵۳ درصد) میلی گرم بر گرم ارتقا یافته است.

Table 2 Amounts of astaxanthin in different stages of extraction, saponification and purification from *Haematococcus pluvialis* (mg/g)

Extraction steps	Level
Initial extraction	Amount 8.11±0.09 ^D
	Percentage 29.42
Saponify	Amount 11.34±0.1 ^C
	Percentage 42.85
Initial purify	Amount 16.94±0.18 ^B
	Percentage 60.12
Final purify	Amount 21.76±0.15 ^A
	Percentage 72.53

*Different letters indicate significant difference between the data (p<0.05).

*n=5, Initial amount of astaxanthin = 3% of dry weight of algae

۲-۳- خواص فیزیکی نانوکپسول های حامل

آستاگزانتین

خواص فیزیکی نانوکپسول های حامل آستاگزانتین با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم در جدول ۳ ارائه شده است. مطابق این جدول، میانگین سایز نانوکپسول ها، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتای آن ها به ترتیب حدود ۲۶۹/۱ نانومتر، ۰/۴۲۳ و ۴۶/۷۱+ است. همچنین بازده فرایند نانو ریزپوشانی نیز ۸۵/۱۹±۴/۰۹ درصد ثبت شد.

Table 3- Physical properties of nanocapsules carrying astaxanthin coated by maltodextrin and sodium caseinate

Physical properties	Level
Average particle size (nm)	269.1±3.95
Particle distribution index	0.423±1.28
Zeta potential (mv)	+46.71±2.88
Encapsulation efficiency (%)	85.19±4.09

۳-۳- پروفیل رهائش آستاگزانتین از

نانوکپسول های حامل در محیط SGF و SIF

اشکال ۱ و ۲، پروفیل رهائش آستاگزانتین از نانوکپسول ها را در شرایط و محیط های مشابه دستگاه گوارش انسان نشان می دهند. مطابق این اشکال، میزان رهائش آستاگزانتین از نانوکپسول های

محلول ۲ میلی مولار کلرید آهن و ۰/۲ میلی لیتر محلول ۵ میلی مولار فروزین اضافه و ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از این مدت، جذب محلول در طول موج ۵۶۲ نانومتر قرائت و فعالیت کلاته کردن از طریق رابطه زیر محاسبه و به صورت درصد گزارش گردید [۴۳].

= فعالیت کلاته کنندگی فلزات (%)

۱۰۰ × [جذب شاهد / (جذب نمونه در طول موج ۵۶۲ نانومتر - ۱)]

۲-۲-۶- رنگ سنجی محصول و تغییرات شاخص های

رنگی

آنالیز رنگ برای آستاگزانتین خالص و نانوکپسول های حامل (فرم نانو ریزپوشانی شده آستاگزانتین) در روزهای صفر و ۳۰، با استفاده از دستگاه رنگ سنج (IMG- pardazesh cam- system XI) در سیستم CIE انجام گرفت. شاخص های مورد استفاد a^* ، b^* و L^* (به ترتیب شاخص روشنی، قرمزی و زردی) بودند. تغییرات رنگ نمونه ها بین روزهای صفر و ۳۰ نیز با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد [۴۴].

$$\Delta E = [(L_{30}-L_0)^2 + (a_{30}-a_0)^2 + (b_{30}-b_0)^2]^{0.5}$$

۲-۲-۷- تجزیه و تحلیل آماری

پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا و به منظور تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار آماری SPSS استفاده شد. داده ها از طریق آنالیز واریانس یک طرفه^۱ آنالیز شدند و ارزیابی معنی داری تفاوت بین میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن و t-test (در سطح اطمینان ۹۵ درصد) انجام گرفت. به منظور رسم جداول و اشکال نیز از نرم افزار EXCEL استفاده گردید.

۳- نتایج

۳-۱- میزان آستاگزانتین استخراج شده

جدول ۲، میزان آستاگزانتین را در مراحل مختلف استخراج، صابونی کردن، خالص سازی اولیه و ثانویه نشان می دهد. همانطور که در جدول زیر مشاهده می شود، به هنگام صابونی کردن و خالص سازی اولیه و ثانویه، روند استخراج و خالص سازی آستاگزانتین به طور معنی داری افزایش یافت ($p < 0.05$)؛ به گونه ای که میزان رنگدانه طی مراحل مختلف استخراج و تخلیص، از ۸/۱۱ (۲۹/۴۲ درصد) به ۲۱/۷۶

1. One way Anova

محدوده $18/49 \pm 0/95$ تا $41/89 \pm 0/11$ درصد قرار داشت. بیشترین نرخ رهایش در این محیط مربوط به ۳۰ دقیقه اول بود که طی این مدت میزان رهایش حدود $18/5$ درصد اندازه‌گیری شد. همچنین نرخ رهایش رنگدانه از نانوکپسول‌های حامل در SIF تا ۲ ساعت اول افزایشی و سپس تا رسیدن به زمان ۴ ساعت، ثابت بود.

۳-۴- ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

آستاگزانتین و نانوکپسول‌های حامل

۳-۴-۱- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

در جدول ۴، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH آستاگزانتین خالص و نانو ریزپوشانی‌شده در دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و سه زمان صفر، ۱۵ و ۳۰ روز ارائه شده است. همانطور که در این جدول مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت از ۱۰۰ به ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه‌ها به صورت معنی‌داری افزایش یافته است ($p < 0/05$). همچنین با نانو ریزپوشانی آستاگزانتین، میزان شاخص مذکور در رنگدانه به شکل معنی‌داری (نسبت به فرم خالص) بیشتر شد ($p < 0/05$). به این صورت که در هر دو غلظت و سه زمان، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH نانوکپسول‌های حامل به صورت قابل ملاحظه‌ای بیشتر از فرم خالص رنگدانه است ($p < 0/05$). دامنه تغییرات این فعالیت در فرم خالص آستاگزانتین در دو غلظت و سه زمان از حدود ۲۱ تا ۵۷ درصد می‌باشد. این دامنه برای نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین از حدود ۵۳ تا ۷۰ درصد ثبت شد. مطابق یافته‌ها، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین در طول زمان، ثابت و بدون تغییر معنی‌داری حفظ شد ($p > 0/05$). در مقابل، این فعالیت در فرم خالص رنگدانه طی دوره نگهداری به صورت معنی‌داری کاهش یافته است ($p < 0/05$).

حامل در محیط مشابه معده (SGF, pH=1.2)، به صورت قابل ملاحظه‌ای کمتر از میزان رهایش این رنگدانه در محیط مشابه روده (SIF, pH=6.8) است. در SGF، میزان رهایش آستاگزانتین از $3/21 \pm 0/56$ تا $14/28 \pm 0/15$ درصد متغیر بود.

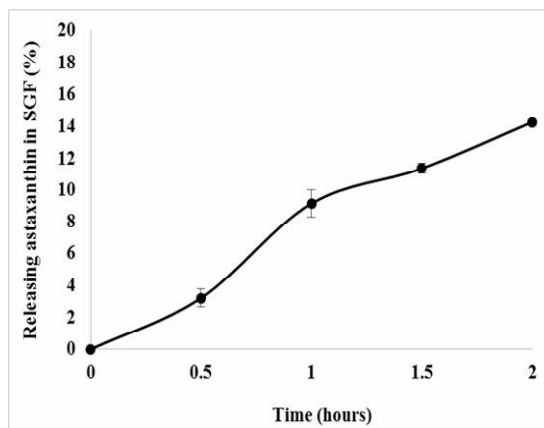


Fig 1 Amounts of astaxanthin released from the nanocapsules at different times in SGF (astaxanthin release profile)

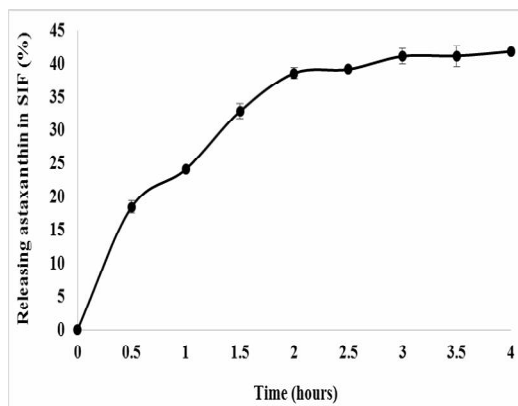


Fig 2 The amounts of astaxanthin released from the nanocapsules at different times in SIF (astaxanthin release profile)

همچنین رهایش آستاگزانتین در SGF در طول ۲ ساعت روند افزایشی داشت؛ گرچه نرخ رهایش بین بازه‌های اندازه‌گیری (هر ۳۰ دقیقه) یکسان نبود. در SIF، میزان رهایش آستاگزانتین در

Table 4 DPPH free radical scavenging activity of astaxanthin and its carrier nanocapsules (%)

Time (day)	Concentration (µg/ml)	Form of astaxanthin		Positive control	
		Pure	Nanocapsule	BHA	BHT
0	100	39.47±0.67 ^{Cb}	54.27±0.08 ^{Ba}	89.22±1.34 ^a	81.37±0.91 ^b
	200	56.33±1.05 ^{Ad}	70.09±0.12 ^{Ac}		
15	100	27.65±1.02 ^{Db}	54.14±1.48 ^{Ba}		
	200	45.91±0.18 ^{Bb}	69.87±1.92 ^{Aa}		
30	100	21.06±0.01 ^{Eb}	53.95±0.03 ^{Ba}		
	200	39.11±0.14 ^{Cb}	69.97±1.06 ^{Aa}		

*Different uppercase and lowercase letters in the column and row indicate significant differences between the data, respectively ($p < 0.05$).

۳-۴-۲- قدرت کاهندگی یون فریک

در جدول ۵، قدرت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی (فریک) آستاگزانتین و نانوکپسول های حامل آن ارائه شده است. مطابق این جدول، قدرت کاهندگی نانوکپسول های حامل آستاگزانتین نسبت به فرم خالص رنگدانه (در هر دو غلظت و سه زمان) به صورت معنی داری بیشتر است ($p < 0.05$). میزان قدرت کاهندگی آستاگزانتین در دو غلظت و سه زمان از جذب ۰/۱۲ تا ۰/۵۴ در طول موج ۷۰۰ نانومتر متغیر بود. این مقادیر برای

نانوکپسول های حامل در محدوده جذب ۰/۵۵ تا ۰/۷۱ در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرار داشتند. مطابق نتایج، با افزایش غلظت، قدرت کاهندگی آستاگزانتین و نانوکپسول های حامل آن به صورت قابل ملاحظه ای افزایش یافته است ($p < 0.05$). در ادامه مشخص شد روند تغییرات قدرت کاهندگی نانوکپسول های حامل رنگدانه در طول زمان نگهداری، ثابت و فاقد اختلاف معنی دار است ($p > 0.05$). اما این تغییرات برای فرم خالص رنگدانه، دارای روند کاهشی و معنی دار می باشد ($p < 0.05$).

Table 5 Reducting power of astaxanthin and its carrier nanocapsules (Ab at 700nm)

Time (day)	Concentration (µg/ml)	Form of astaxanthin		Positive control	
		Pure	Nanocapsule	BHA	BHT
0	100	0.32±0.01 ^{Bb}	0.56±0.05 ^{Ba}	0.92±0.02 ^a	0.79±0.04 ^b
	200	0.54±0.05 ^{Ad}	0.71±0.06 ^{Ac}		
15	100	0.21±0.01 ^{Cb}	0.55±0.04 ^{Ba}		
	200	0.33±0.01 ^{Bb}	0.7±0.08 ^{Aa}		
30	100	0.12±0.02 ^{Db}	0.56±0.01 ^{Ba}		
	200	0.2±0.04 ^{Cb}	0.71±0.03 ^{Aa}		

*Different uppercase and lowercase letters in the column and row indicate significant differences between the data, respectively ($p < 0.05$).

اما در نانوکپسول های حامل از حدود ۵۲ تا ۷۵ درصد متغیر بود. همچنین با افزایش غلظت، فعالیت کلاته کنندگی آستاگزانتین و نانوکپسول های حامل آن به صورت معنی داری افزایش یافت ($p < 0.05$). در ادامه مشخص شد فعالیت کلاته کنندگی نانوکپسول های حامل در طول زمان، ثابت و بدون تغییر معنی دار است ($p > 0.05$). اما در فرم خالص آستاگزانتین، این فعالیت در طول دوره نگهداری به صورت معنی داری دارای روند کاهشی می باشد ($p < 0.05$).

۳-۴-۳- فعالیت کلاته کنندگی فلزات

فعالیت کلاته کنندگی نانوکپسول های حامل آستاگزانتین و فرم خالص رنگدانه در جدول ۶ ارائه شده است. همانطور که در این جدول مشاهده می شود، با نانو ریزپوشانی آستاگزانتین، فعالیت کلاته کنندگی آن به صورت معنی داری بیشتر شد ($p < 0.05$) و در هر دو غلظت و سه زمان، این فعالیت در نانوکپسول های حامل به صورت معنی داری بیشتر از آستاگزانتین خالص است ($p < 0.05$). به این صورت که فعالیت کلاته کنندگی آستاگزانتین در طول زمان و غلظت های مختلف از حدود ۲۳ تا ۵۲ درصد،

Table 6 Chelating activity of astaxanthin and its carrier nanocapsules (%)

Time (day)	Concentration (µg/ml)	Form of astaxanthin		Positive control	
		Pure	Nanocapsule	BHA	BHT
0	100	40.06±1.12 ^{Cb}	52.82±0.98 ^{Ba}	94.18±1.15 ^a	85.66±1.49 ^b
	200	51.23±1.37 ^{Ad}	74.18±1.18 ^{Ac}		
15	100	31.29±0.82 ^{Eb}	52.99±1.68 ^{Ba}		
	200	44.11±0.19 ^{Bb}	73.84±1.29 ^{Aa}		
30	100	23.67±0.15 ^{Fb}	53.06±0.54 ^{Ba}		
	200	36.86±0.08 ^{Db}	74.11±1.62 ^{Aa}		

*Different uppercase and lowercase letters in the column and row indicate significant differences between the data, respectively ($p < 0.05$).

ریزپوشانی شده در دو زمان صفر و ۳۰ روز (نگهداری در دمای یخچال) در جدول ۷ ارائه شده است. همانطور که در این جدول مشاهده می شود، در فرم خالص آستاگزانتین، شاخص روشنایی (L^*) با گذر زمان (۳۰ روز) به صورت معنی داری

۳-۵- شاخص های رنگی آستاگزانتین و

نانوکپسول های حامل آن

شاخص های رنگی آستاگزانتین در دو فرم خالص و نانو

صفر و ۳۰) برای نانوکپسول‌های حامل بسیار ناچیز، اما این میزان برای فرم خالص آستاگزانتین، قابل ملاحظه است. از مقایسه رنگ آستاگزانتین خالص و نانوکپسول‌های حامل آن مشخص شد که با نانو ریزپوشانی رنگدانه، شاخص روشنایی افزایش اما نسبت شاخص قرمزی به زردی کاهش یافته است.

کاهش و نسبت شاخص قرمزی به زردی (a^*/b^*) به صورت قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است ($p < 0.05$). اما چنین تغییری در فرم نانو ریزپوشانی شده آستاگزانتین (نانوکپسول-های حامل) ثبت نشد و شاخص‌های رنگی نانوکپسول‌ها در طول دوره نگهداری بدون تغییر معنی‌دار و ثابت باقی ماندند ($p > 0.05$). مطابق جدول ۷، شاخص تغییرات رنگ (بین روز

Table 7 Color indices of astaxanthin and its carrier nanocapsules during storage time

Treatments/Index	L*	a*/b*	ΔE_{0-30}
Pure astaxanthin in 0 day	40.68±0.15 ^b	2.64±0.08 ^b	8.21±0.19 ^a
Pure astaxanthin in 30 day	32.57±0.21 ^c	3.15±0.39 ^a	
Carrier nanocapsules in 0 day	46.05±0.34 ^a	2.01±0.01 ^c	0.07±0.03 ^b
Carrier nanocapsules in 30 day	45.95±0.26 ^a	2.01±0.02 ^c	

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

آمورف سلولز را صابونی می‌کند و با تخریب دیواره سلولی جلبک و واکنش بین نواحی هیدروفوب آستاگزانتین و استون، رنگدانه آزاد می‌گردد [۱]. در تحقیق سان و همکاران (۲۰۱۵) از روش مایکروویو به همراه حلال‌های مختلف جهت استخراج آستاگزانتین استفاده شد. نتایج نشان داد که در بین حلال‌های دی‌کلرومتان، کلروفرم، متانول و استون، مطلوب‌ترین حلال، استون است [۳۶]. به منظور افزایش غلظت آستاگزانتین آزاد، استرهای آن بایستی تحت تاثیر صابونی کردن قرار گرفته تا به آستاگزانتین آزاد تبدیل گردند. در پژوهش حاضر از سدیم هیدروکسید در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد جهت صابونی کردن استفاده شد. مطالعه سان و همکاران (۲۰۱۵) موی آن است که دمای بالای صابونی کردن در مقایسه با دمای پایین (مثلاً ۴ درجه سانتی‌گراد) بازدهی بیشتری دارد [۳۶]. در بخش صابونی کردن، فاکتور بسیار مهم، زمان است؛ به گونه‌ای که اگر زمان فرایند مذکور بیش از حد زیاد گردد، از کیفیت و غلظت رنگدانه استخراج شده کاسته خواهد شد؛ به همین جهت در تحقیق حاضر از زمان ۳ ساعت استفاده شد [۱]. در تحقیق دواتی و همکاران (۲۰۲۰) از سود الکلی و شیک کردن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت جهت طی فرایند صابونی کردن استفاده شد. نتایج تحقیق مذکور نشان داد که طی فرایند صابونی کردن، میزان استحصال آستاگزانتین در مقایسه با نمونه صابونی نشده بیشتر می‌باشد که این یافته با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد [۳۴].

ترکیبات فعالی مانند آستاگزانتین با همه خواص نگهدارندگی در مواد غذایی و همچنین خواص دارویی و درمانی ذکر شده در بخش مقدمه، باید ساختارشان با استفاده از روش‌هایی حفظ

۴- بحث

مطابق نتایج مشخص شد که استفاده از HCl به عنوان پیش تیمار اولیه و سپس استفاده از استون (روش ترکیبی)، روش مطلوبی جهت استخراج آستاگزانتین می‌باشد (راندمان فرایند ایده‌آل است). این روش (ترکیبی) در سایر تحقیقات نیز مورد تأیید بوده است. در پژوهشی که توسط سرادا و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد، از حلال‌های مختلف جهت استخراج آستاگزانتین استفاده گردید. نتایج تحقیق مذکور نشان داد که استفاده از اسیدکلریدریک به عنوان حلال معدنی و سپس استون به عنوان حلال آلی، درصد استخراج (بازده فرایند) آستاگزانتین را به صورت معنی‌داری افزایش می‌دهد [۳۱]. در تحقیق دیگری که از چهار روش متانول به همراه استون، ترکیب هگزان/ایزوپروپانول، اسیدکلریدریک به همراه استون و استخراج با روغن سویا جهت تخلیص آستاگزانتین استفاده گردید، مشخص شد ترکیب HCl و استون بالاترین راندمان را در استخراج آستاگزانتین (۱۹/۸ میلی‌گرم بر گرم) و روغن از جلبک (۳۳/۳ درصد) داشته است [۱۵]. چنین نتیجه‌ای در پژوهش لیو و همکاران (۲۰۱۸) نیز ثبت شد [۳۲]. در تحقیق دانگ و همکاران (۲۰۱۴)، مورفولوژی جلبک هماتوکوکوس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره قبل و بعد از تاثیر حلال مورد ارزیابی قرار گرفت. مطابق نتایج، قبل از تاثیر حلال، شکل جلبک به صورت تیره و فاقد هرگونه صدمه سطحی بود اما بعد از تاثیر HCl و استون، رنگ جلبک، سفید، دیواره سلولی آن آسیب دیده و سطح سلول چین خورده مشاهده شد [۱۵]. رنگ سفید نشان‌دهنده خروج رنگدانه از سول جلبکی می‌باشد. در واقع HCl به صورت غیرانتخابی نواحی

گردد [۲]. چرا که ایفای نقش این ترکیبات به حفظ ماندن و ثبات ساختارشان بستگی دارد. تیمارهای اسیدی، بازی، آنزیمی و ... اعمال شده طی تولید و نگهداری مواد غذایی مختلف و داروها (مکمل های غذایی حاوی آستاگزانتین) و همچنین شرایط اسیدی و آنزیمی دستگاه گوارش، می توانند از طریق تجزیه و تخریب ساختار آستاگزانتین، عملکرد آن را به شکل منفی تحت تاثیر قرار دهند. واکنش آستاگزانتین با یکسری از ترکیبات هم ممکن است اثر مشابهی بر نقش این رنگدانه اعمال کند. به همین منظور در تحقیق حاضر جهت حفاظت از ساختار مولکولی آستاگزانتین، از تکنیک نانو ریزپوشانی با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم استفاده شد تا از طریق قرارگیری رنگدانه در نانوکپسول، از تغییر ساختار آن در شرایط مختلف جلوگیری شود [۲ و ۲۲-۲۵].

یکی از مهم ترین خصوصیات فیزیکی نانوکپسول ها، میانگین سایز است. این شاخص بر پایداری آن ها، بازده ریزپوشانی و نرخ رهایش هسته اثرگذار است. نانوکپسول های تولید شده در پژوهش پیش رو میانگین سایزی معادل $269/1$ نانومتر داشتند. در تحقیقی که رنگدانه فیکوسیانین استخراج شده از میکروجلبک اسپیرولینا با پوشش مالتودکسترین-کازئینات سدیم نانو ریزپوشانی شد، نانوکپسول های حاصل دارای میانگین سایزی معادل $397/1$ نانومتر بودند [۲۸]. این شاخص در نانولیپوزوم های حامل پپتیدهای حاصل از آبکافت ژلاتین پوست ماهی قزل آلائی رنگین کمان با پوشش کیتوزان از $169/2$ تا 234 نانومتر متغیر گزارش شد [۲۵]. شاخص توزیع اندازه ذره ای نشان دهنده میزان یکنواختی یا غیر یکنواختی سیستم های کلوئیدی است. مقادیر بالای این شاخص نشان می دهد ذرات بزرگ و غیر یکنواخت در سیستم کلوئیدی وجود دارند [۲۲]. میزان این شاخص در تیمارهای تحقیق حاضر حاکی از یکنواختی نانوکپسول ها است. سایر تحقیقاتی که در این زمینه و زمینه های مشابه انجام شدند [۲۲-۲۵]، مقادیر تقریباً هم سطح با پژوهش حاضر برای شاخص توزیع اندازه ذره ای گزارش کرده اند. در تحقیق موسکوئرا و همکاران (۲۰۱۴)، شاخص توزیع اندازه ذره ای لیپوزوم های حامل پپتیدهای حاصل از کلاژن ماهی، $0/25$ ثبت شد [۲۶]. پتانسیل زتا شاخصی برای تعیین وضعیت الکتریکی سیستم های کلوئیدی است. کاهش پتانسیل زتا به کمتر از مقدار بحرانی، لایه دوگانه باردار اطراف ذرات را تخریب کرده و موجب تجمع ذرات (توده ای شدن)

می گردد. به طور کلی ذراتی که پتانسیل زتای آن ها بالاتر از $+30$ و یا کمتر از -30 میلی ولت باشد، در بالاترین حد پایداری قرار دارند [۲۲]. نانوکپسول های تولید شده در تحقیق حاضر، پتانسیل زتایی معادل $46/71 \pm 2/88$ میلی ولت دارند که با توضیحات داده شده، میزان قابل قبولی است. بازده ریزپوشانی یکی از مهم ترین شاخص های پایداری ترکیبات کپسوله شده است؛ زیرا نشان دهنده توانایی نانوکپسول ها در جلوگیری از خروج هسته درونی می باشد. میزان بازده فرایند در تحقیق حاضر $85/19 \pm 4/09$ درصد بود که میزان قابل توجهی است. در تحقیقی که پپتیدهای حاصل از آبکافت ژلاتین پوست ماهی قزل آلا با استفاده از نانولیپوزوم و غلظت-های $0/2$ تا 1 درصد کیتوزان کپسوله شدند، بازده ریزپوشانی تیمارها از $46/1$ تا $80/2$ درصد متغیر بود [۲۵]. بازده ریزپوشانی فرایند تولید نانوکپسول های حامل رنگدانه فیکوسیانین استخراج شده از میکروجلبک اسپیرولینا با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم، $73/41$ درصد گزارش شد [۲۸].

در تحقیق حاضر، به منظور ارزیابی کارایی تکنیک نانو ریزپوشانی و همچنین پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم در حفاظت از آستاگزانتین در محیط دستگاه گوارش، از محیط های اسیدی و آنزیمی مشابه شرایط معده و روده استفاده شد و نتایج نشان داد که میزان رهایش رنگدانه مورد مطالعه از نانوکپسول ها در شرایط خنثی (محیط مشابه روده)، بیشتر از شرایط اسیدی (محیط مشابه معده) است. به نظر می رسد pH های خنثی و همچنین آنزیم پانکراتین اثرگذاری و نفوذ بیشتری (نسبت به pH های اسیدی و آنزیم پپسین) به ساختار دیواره (مالتودکسترین-کازئینات سدیم) دارند و از طریق تخریب آن، موجب رهاسازی هسته (آستاگزانتین) می شوند. مطابق نتایج پژوهش حاضر، بخش قابل توجهی از آستاگزانتین طی فرایند هضم، در نانوکپسول ها سالم و دست نخورده باقی می ماند که این مورد، مطلوب و تحقق هدف پژوهش است. در تحقیقی که پروفیل رهایش فیکوسیانین از نانوکپسول های حامل با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم در دو محیط با pH های $1/2$ و $7/4$ (فاقد آنزیم های پپسین و پانکراتین) ارزیابی شد [۲]، میزان رهایش رنگدانه مانند تحقیق حاضر در محیط خنثی بیشتر از محیط اسیدی بود.

در تحقیق حاضر از سه آزمون (فعالیت مهار رادیکال آزاد

DPPH، قدرت کاهندگی یون فریک و فعالیت کلاته‌کنندگی) جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین در دو فرم خالص و نانو ریزپوشانی‌شده استفاده شد. چهار نتیجه در این بخش حاصل شد که بسیار حائز اهمیت هستند. نتیجه اول اینکه آستاگزانتین و بخصوص نانوکپسول‌های حامل آن (فرم نانو ریزپوشانی‌شده) دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار مطلوبی هستند. احتمالاً وجود مقادیر بالای اسیدهای چرب چندزنجیره غیر اشباع یکی از دلایل بالابودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی این رنگدانه است [۴۵]. دلیل دیگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطلوب آستاگزانتین، مربوط به ویژگی ذاتی رنگدانه می‌باشد. از آنجا آستاگزانتین دارای زنجیره بلند از پیوند دوگانه کونژوگه و گروه‌های کتونی و کربوکسیل است، توانایی مطلوبی در غیر فعال‌سازی رادیکال‌های آزاد دارد. همچنین وجود گروه‌های کتو و هیدروکسیل در حلقه‌های رنگدانه، دلیل دیگر بروز فعالیت آنتی‌اکسیدانی این رنگدانه می‌باشد [۴۶].

نتیجه دوم اینکه با افزایش غلظت رنگدانه و نانوکپسول‌های حامل آن از ۱۰۰ به ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی در هر سه آزمون به صورت معنی‌داری افزایش داشت که این امر تا حد بسیار زیادی بدیهی و قابل توجیه است. البته در برخی از پژوهش‌ها ثابت شد که با افزایش غلظت آستاگزانتین تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، روند فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن افزایشی است و بعد از آن روند افزایشی با کندی رو به رو می‌گردد [۱ و ۴۷] که چنین نتیجه‌ای در تحقیق حاضر ثبت نشد و با افزایش غلظت از ۱۰۰ به ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، افزایش قابل توجهی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین و نانوکپسول‌های حامل آن ثبت شد. تحقیق تان و همکاران (۲۰۲۱) نشان داد که نیاز به غلظت‌های بالای آستاگزانتین در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمی‌باشد و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به عنوان غلظتی جهت بروز حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی گزارش شد [۴۷].

نتیجه سوم مربوط به افزایش معنی‌دار فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین با انجام تکنیک نانو ریزپوشانی است. در واقع فعالیت آنتی‌اکسیدانی فرم نانو ریزپوشانی‌شده آستاگزانتین به صورت قابل توجهی بیشتر از فرم خالص آستاگزانتین است. این بخش نشان داد که فرایند نانو ریزپوشانی آستاگزانتین در افزایش کارایی (فعالیت آنتی‌اکسیدانی) آن بسیار موثر است.

این یافته با نتایج تحقیقات دوی و همکاران (۲۰۱۶)، سوزری و همکاران (۲۰۱۷) و صفری و همکاران (۲۰۲۲) مطابقت دارد [۲۷، ۴۸ و ۴۹]. علت اصلی افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین در فرم نانو ریزپوشانی‌شده (نانوکپسول)، افزایش نسبی رنگدانه در این فرم (نانو) است (افزایش load). در واقع با انجام فرایند نانو ریزپوشانی، میزان لودینگ آستاگزانتین افزایش یافته و به دلیل رهش تدریجی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه نیز افزایش و تداوم می‌یابد [۲۷].

نتیجه چهارم در این بخش، حفظ و افزایش ثبات فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین در مقایسه با رنگدانه خالص است. به عبارت دیگر با افزایش زمان نگهداری در دمای یخچال، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین بدون تغییر معنی‌دار حفظ شد اما در فرم خالص، با گذشت زمان، فعالیت آنتی‌اکسیدانی به صورت معنی‌داری کاهش یافت. این نتیجه هم به افزایش کارایی رنگدانه با انجام فرایند نانو ریزپوشانی اشاره دارد. در تحقیقی که رنگدانه فیکوسیانین با استفاده از پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم نانو ریزپوشانی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوکپسول‌ها در کنار فرم آزاد رنگدانه ارزیابی شد (طی نگهداری در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ روز) نیز چنین نتیجه‌ای ثبت گردید [۲۷].

نتایج ارزیابی شاخص‌های رنگی آستاگزانتین در دو فرم خالص و نانو ریزپوشانی‌شده نشان داد که با تکنیک نانو ریزپوشانی می‌توان تا حد بسیار زیادی در طول دوره نگهداری (۳۰ روز در دمای یخچال) از تغییرات شاخص‌های رنگی رنگدانه جلوگیری کرد. چرا که بر اساس یافته‌ها، شاخص‌های رنگی نانوکپسول‌های حامل رنگدانه در طول مدت ذخیره‌سازی در دمای ۱±۴ درجه سانتی‌گراد، ثابت (بدون تغییر معنی‌دار) باقی ماندند اما چنین نتیجه‌ای برای فرم خالص ثبت نشد. در فرم خالص با گذشت زمان، شاخص روشنایی کاهش، اما نسبت شاخص قرمزی به زردی افزایش یافت. مطابق نتایج، با نانو ریزپوشانی آستاگزانتین با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم، شاخص روشنایی افزایش اما نسبت شاخص قرمزی به زردی کاهش یافت که این مورد احتمالاً به جنس ترکیبات دیواره مرتبط است.

۵- نتیجه گیری

روش ترکیبی اسید-استون جهت استخراج آستاگزانتین از میکروجلبک هماتوکوکوس پلوویالیس، روش مطلوبی است؛ ضمن اینکه انجام فرایند صابونی کردن و خالص سازی اولیه و ثانویه پس از استخراج اولیه، موجب افزایش راندمان استخراج و میزان رنگدانه تولید شده می گردد. آستاگزانتین استخراج شده از میکروجلبک هماتوکوکوس، دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی می باشد که این فعالیت با نانو ریزپوشانی رنگدانه با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم و همچنین افزایش غلظت از ۱۰۰ به ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ارتقا می یابد. با نانو ریزپوشانی آستاگزانتین (با پوشش ترکیبی مورد مطالعه)، ثبات فعالیت آنتی اکسیدانی رنگدانه در طول ۳۰ روز نگهداری در دمای یخچال حفظ می شود؛ اما این فعالیت در فرم خالص آستاگزانتین در طول دوره نگهداری، به صورت قابل توجهی کاهش می یابد. تکنیک نانو ریزپوشانی و پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم، به منظور حفاظت از ساختار آستاگزانتین در محیط مشابه معده و روده، کارا هستند و رهایش رنگدانه از نانوکپسول ها را در شرایط اسیدی و آنزیمی دستگاه گوارش کنترل می کنند. همچنین این تکنیک و پوشش، موجب حفظ و ثبات شاخص های رنگی آستاگزانتین در طول دوره نگهداری در دمای یخچال می گردند.

۶- تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تحت قرارداد با شماره ۰۳-۱۴۰۱-۰۳ انجام شد که به این وسیله سپاسگزاری می شود.

۷- منابع

- [1] Safari, R., Mirbakhsh, M., Ghaffari, H., Reyhani Poul, S., Rahmati, R., and Ebrahimzadeh, M. (2022). Effect of temperature, pH, and time factors on the stability and antioxidant activity of the extracted astaxanthin from haematococcus microalgae (*Haematococcus pluvialis*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 31 (1), 109-120 [In Persian].
- [2] Safari, R., Raftani Amiri, Z., and Esmailzadeh Kenari, R. (2018). Optimizing the extraction of phycocyanin pigment from *Spirulina platensis* algae and investigating the qualitative properties of the microcoated pigment. PhD thesis, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University [In Persian].
- [3] Gong, X., and Chen, F. (1998). Influence of medium components on astaxanthin content and production of *Haematococcus pluvialis*. *Process Biochemistry*, 33(4), 385-391.
- [4] Liu, Y. S., and Wu, J. Y. (2007). Optimization of cell growth and carotenoid production of *Xanthophyllomyces dendrorhous* through statistical experiment design. *Biochemical Engineering Journal*, 36(2), 182-189.
- [5] Gu, Z., Deming, C., Yongbin, H., Zhigang, C., and Feirong, G. (2008). Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. *LWT-Food Science and Technology*, 41(6), 1082-1088.
- [6] Zhang, B. Y., Geng, Y. H., Li, Z. K., Hu, H. J., and Li, Y. G. (2009). Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two-stage growth one-step process. *Aquaculture*, 295(3-4), 275-281.
- [7] Pu, J. (2010). Development of stable microencapsulated astaxanthin powders using extracted astaxanthin from crawfish and shrimp by products. M.Sc. Thesis, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.
- [8] Kobayashi, M., Kurimura, Y., Sakamoto, Y., and Tsuji, Y. (1997). Selective extraction of astaxanthin and chlorophyll from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Techniques*, 11(9), 657-660.
- [9] Mendes-Pinto, M. M., Raposo, M. F. J., Bowen, J., Young, A. J., and Morais, R. (2001). Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. *Journal of Applied Phycology*, 13(1), 19-24.
- [10] Kang, C. D., and Sim, S. J. (2008). Direct extraction of astaxanthin from *Haematococcus* culture using vegetable oils. *Biotechnology Letters*, 30(3), 441-444.
- [11] Machmudah, S., Shotipruk, A., Goto, M., Sasaki, M., and Hirose, T. (2006). Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using supercritical CO₂ and ethanol as entrainer. *Industrial and Engineering*

- and Technology, 52(3), 1634-1641.
- [22] Hasani, Sh., Shahidi, M., and Ojagh. M. (2018). The production and evaluation of nanoliposomes containing bioactive peptides derived from fish wastes using the alkalase enzyme. *Research and Innovation in Food Science and Industry*, 8 (1), 31-44 [In Persian].
- [23] Sadeghian, Y., Sadeghi, A.R., Ghorbani, M., Alami, M. and Joshaghani, H. (2020). Investigation of the physical, chemical and antioxidant properties of nanoliposomes loaded with quinoa seed hydrolyzed proteins. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, 15 (2), 71-82 [In Persian].
- [24] Ojagh, M., Hasani, Sh. and Hasani, M. (2019). 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].
- [25] Ramezanzade, L., Hosseini, S. F., and Nikkhah, M. (2017). Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. *Food Chemistry*, 234, 220-229.
- [26] 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.
- [27] Safari, R., Raftani Amiri, Z., Reyhani Poul, S., and Esmailzadeh Kenari, R. (2022). Evaluation and comparison of antioxidant and antibacterial properties of phycocyanin extracted from spirulina algae (*Spirulina Platensis*) in both pure and nanoencapsulated forms with maltodextrin-sodium caseinate combination coating. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 19 (127), 345-358 [In Persian].
- [28] Safari, R., Raftani Amiri, Z., Reyhani Poul, S., and Ghaffari, H. (2022). Nanoencapsulation of phycocyanin extracted from the alga *Spirulina platensis* and use of resulting nanoparticles in ice cream formulation. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 123 (19), 145-159 [In Persian].
- [29] 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 Chemistry Research*, 45(10), 3652-3657.
- [12] Nobre, B., Marcelo, F., Passos, R., Beirão, L., Palavra, A., Gouveia, L., and Mendes, R. (2006). Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. *European Food Research and Technology*, 223(6), 787-790.
- [13] Pan, J. L., Wang, H. M., Chen, C. Y., and Chang, J. S. (2012). Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* by supercritical carbon dioxide fluid with ethanol modifier. *Engineering in Life Sciences*, 12(6), 638-647.
- [14] Ranga Rao, A. (2011). *Production of astaxanthin from cultured green alga Haematococcus pluvialis* and its biological activities (Doctoral dissertation, University of Mysore).
- [15] Dong, S., Huang, Y., Zhang, R., Wang, S., and Liu, Y. (2014). Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *The Scientific World Journal*, 1-7.
- [16] Zhou, T., Wang, X., Ju, Y., Shi, C., and Kan, G. (2018). Stability application and research of astaxanthin integrated into food. In IOP Conference Series: *Materials Science and Engineering* (Vol. 394, No. 2, p. 022007). IOP Publishing.
- [17] Tanaka, T., Makita, H., Ohnishi, M., Mori, H., Satoh, K., and HarÅ, A. (1995). Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin. *Cancer Research*, 55(18), 4059-4064.
- [18] Jacques. T. (1999). The potential preventive effects of vitamins for cataract and age-related macular degeneration. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 69(3), 198-205.
- [19] Tracy, R. P. (1999). Inflammation markers and coronary heart disease. *Current Opinion In lipidology*, 10(5), 435-441.
- [20] Guerra, B. A., and Otton, R. (2011). Impact of the carotenoid astaxanthin on phagocytic capacity and ROS/RNS production of human neutrophils treated with free fatty acids and high glucose. *International Immunopharmacology*, 11(12), 2220-2226.
- [21] Mezquita, P. C., Huerta, B. E. B., Ramírez, J. C. P., and Hinojosa, C. P. O. (2015). Milks pigmentation with astaxanthin and determination of colour stability during short period cold storage. *Journal of Food Science*

- forms through the small intestine. *Gut*, 27(8), 886-892.
- [40] Jerley, A., and Prabu D. M., (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.
- [41] Yen, G. C., and Wu, J. Y. (1999). Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry*, 65(3), 375-379.
- [42] Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315.
- [43] Decker, E. A., and Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 674-677.
- [44] Kunte, L. A., Gennadios, A., Cuppett, S. L., Hanna, M. A., and Weller, C. L. (1997). Cast films from soy protein isolates and fractions. *Cereal Chemistry*, 74(2), 115-118.
- [45] Sindhu, S., and Sherief, P. M. (2011). Extraction, characterization, antioxidant and anti-inflammatory properties of carotenoids from the shell waste of arabian red shrimp *Aristeus alcocki*, ramadan 1938. In *The open Conference Proceedings Journal* (Vol. 2, No. 1).
- [46] Miki, W. (1991). Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 63(1), 141-146.
- [47] Tan, Y., Ye, Z., Wang, M., Manzoor, M. F., Aadil, R. M., Tan, X., and Liu, Z. (2021). Comparison of different methods for extracting the astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*: Chemical composition and biological activity. *Molecules*, 26(12), 3569.
- [48] Dewi, E. N., Purnamayati, L., and Kurniasih, R. A. (2016). Antioxidant activities of phycocyanin microcapsules using maltodextrin and carrageenan as coating materials. *Journal Teknologi*, 78(4-2).
- [49] 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.
- Food Research Journal*, 21(6), 2201.
- [30] Sallam, K. I. (2007). Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*, 18(5), 566-575.
- [31] Sarada, R., Vidhyavathi, R., Usha, D., and Ravishankar, G. A. (2006). An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7585-7588.
- [32] Liu, Z. W., Zeng, X. A., Cheng, J. H., Liu, D. B., and Aadil, R. M. (2018). The efficiency and comparison of novel techniques for cell wall disruption in astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis*. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(9), 2212-2219.
- [33] Liu, X. J., Wu, Y. H., Zhao, L. C., Xiao, S. Y., Zhou, A. M., and Liu, X. (2011). Determination of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* by first-order derivative spectrophotometry. *Journal of AOAC International*, 94(6), 1752-1757.
- [34] Dewati, P. R., Rohman, A., and Budiman, A. (2020). A Preliminary Study of Extraction and Purification Processes of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* a Natural Antioxidant. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 778, No. 1, p. 012032). IOP Publishing.
- [35] Yuan, J. P., and Chen, F. (2000). Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Food Chemistry*, 68(4), 443-448.
- [36] Sun, W., Lin, H., Zhai, Y., Cao, L., Leng, K., and Xing, L. (2015). Separation, Purification, and Identification of (3S, 3' S)-trans-Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Separation Science and Technology*, 50(9), 1377-1383.
- [37] 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.
- [38] Cann, P. A., Read, N. W., Cammack, J., Childs, H., Holden, S., Kashman, R., and Weller, J. (1983). Psychological stress and the passage of a standard meal through the stomach and small intestine in man. *Gut*, 24(3), 236-240.
- [39] Davis, S. S., Hardy, J. G., and Fara, J. W. (1986). Transit of pharmaceutical dosage



Production of nanocapsules carrying astaxanthin extracted from *Haematococcus pluvialis* with maltodextrin-sodium caseinate combined coating and evaluation of physical, antioxidant and color properties of the product

Yeganeh, S.^{1*}, Reyhani Poul, S.²

1. Professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

2. 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	ABSTRACT
Article History: Received 2022/ 09/ 30 Accepted 2022/ 12/ 03	The aim of the present research in the first stage was to extract astaxanthin from <i>Haematococcus pluvialis</i> using acid-acetone combined method and evaluate the efficiency of the process. Then, extracted pigment was nanoencapsulated using maltodextrin-sodium caseinate combined coating and physical, antioxidant and color properties of carrier nanocapsules (and pure form of astaxanthin) were evaluated during storage time (30 days at refrigerator temperature). The results showed that by saponification and primary and secondary purification, the efficiency of astaxanthin extraction process increased and amount of the pigment during the mentioned steps increased from 8.11 to 21.76 mg/g. According to the findings, average size and zeta potential of the produced nanocapsules were 269.1 nm and +46.71 mV, respectively; In addition, efficiency of the nanoencapsulation process was recorded as 85.19%. The release profile of astaxanthin from nanocapsules in Simulated Gastric Fluid (SGF) and Simulated Intestinal Fluid (SIF) showed that the release of the pigment varies from 3.21 to 14.28 in SGF and from 18.49 to 41.89% in SIF. Based on the results, DPPH free radical scavenging activity of the pure pigment and carrier nanocapsules (at concentrations of 100 and 200 µg/ml and 0, 15 and 30 days) was ranged from about 21 to 57 and 53 to 70%, respectively. This amount for the reduction power of ferric ion was reported from 0.12 to 0.54 and 0.55 to 0.71 absorbance at 700 nm wavelength, respectively. In the metal chelating activity test, the range of changes was recorded from 23 to 52 and 52 to 75%, respectively. By the pigment nanoencapsulation and increasing the concentration, its antioxidant activity increased significantly ($p < 0.05$). Also, unlike the pure form of astaxanthin, the antioxidant activity of its carrier nanocapsules remained constant during storage time ($p > 0.05$). The product color evaluation showed that the brightness index (L^*) in carrier nanocapsules is significantly higher than the pure form of pigment ($p < 0.05$); in addition, the color indices of nanocapsules (unlike pure astaxanthin) did not change over time ($p > 0.05$). According to the findings, astaxanthin nanoencapsulation using maltodextrin-sodium caseinate combined coating has a favorable performance to improve and stability of antioxidant and color properties of the pigment.
Keywords: <i>Haematococcus pluvialis</i>, Astaxanthin, Carrier nanocapsules, Maltodextrin, Physical properties, Antioxidant activity.	
DOI: 10.22034/FSCT.19.131.303 DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.24.5	
*Corresponding Author E-Mail: s.yeganeh@sanru.ac.ir	