

(OPEN ACCESS)

Nanoencapsulation of Phycocyanin Using Protein-Carbohydrate Composite Shells: Evaluation of Stability, Controlled Release, and Surface Morphology under Simulated Gastrointestinal Conditions

Issa Bahramizade¹, Seyed Mahdi Ojagh^{*2}, Alireza Alishahi³,
Shirin Hasani⁴, Mehdi Zolfaghari⁵

1. Ph.D. Student of Seafood Processing, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: issabahrmy@yahoo.com
2. Corresponding Author, Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: ojagh@ut.ac.ir
3. Associate Prof., Dept. of Seafood Processing, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: seafood1144@yahoo.com
4. Ph.D. Graduate of Seafood Processing, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: shirin.hasani88@gmail.com
5. Assistant Prof., Dept. of Seafood Processing, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: zolfaghari.mz@gmail.com

Article Info	ABSTRACT
Article type: Full Length Research Paper	Background and Objectives: Phycocyanin, a natural pigment with antioxidant properties and wide applications in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries, is highly sensitive to environmental factors such as light, temperature, pH, and oxygen. Therefore, effective protection technologies are essential to enhance its stability and bioavailability. This study aimed to nanoencapsulate phycocyanin extracted from <i>Spirulina platensis</i> using different wall materials including soy protein isolate, whey protein, and maltodextrin. The main objectives were to evaluate the structural and physicochemical properties, thermal stability, and in vitro release behavior of the nanocapsules under simulated gastric and intestinal conditions, as well as to assess their application in bread fortification.
Article history: Received: 06.21.2025 Revised: 07.07.2025 Accepted: 07.11.2025	
Keywords: Controlled Release, In Vitro Digestion Model, Nanoencapsulation, Phycocyanin, Stability	Materials and Methods: Phycocyanin from <i>Spirulina platensis</i> , and encapsulated using various wall material combinations: soy protein isolate (SPI), whey protein (WP), and maltodextrin (MD). Nanocapsules were prepared using standard emulsion-based methods followed by drying. The formulations were characterized for particle size, polydispersity index (PDI), encapsulation efficiency, and zeta potential. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC) were used to analyze molecular interactions and thermal stability. In vitro release studies were conducted using simulated gastric and intestinal fluids.
	Results: This study demonstrated that the combination of soy protein isolate and maltodextrin, as the capsule wall material, provided the best structural, physicochemical, and functional properties for the nanoencapsulation of phycocyanin extracted from <i>Spirulina</i> . The resulting nanocapsules exhibited a small particle size (8.86 nm), suitable polydispersity index (0.48), high encapsulation efficiency (88.7%), and a negative zeta potential (-10.1 mV). FTIR and DSC analyses confirmed the

success of the encapsulation process and the enhanced thermal stability of the pigment. In vitro digestion studies also indicated controlled release (88-90% over 120 hours) and effective protection of the pigment under gastrointestinal conditions.

Conclusion: The findings of this study suggest that phycocyanin-loaded nanocapsules formulated with soy protein isolate and maltodextrin offer an effective strategy for improving the stability, controlled release, and functional performance of this natural pigment. Their application in food products, such as bread, could enhance nutritional quality while maintaining pigment integrity during digestion.

Cite this article: Bahramizade, Issa, Ojagh, Seyed Mahdi, Alishahi, Alireza, Hasani, Shirin, Zolfaghari, Mehdi. 2025. Nanoencapsulation of Phycocyanin Using Protein-Carbohydrate Composite Shells: Evaluation of Stability, Controlled Release, and Surface Morphology under Simulated Gastrointestinal Conditions. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 14 (3), 13-32.



© The Author(s).

Doi: 10.22069/japu.2025.23802.1964

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نانوکپسوله‌سازی فیکوسیانیین با پوشش‌های پروتئینی - کربوهیدراتی: تحلیل پایداری، رهایش کنترل‌شده و ساختار سطحی در مدل هضم آزمایشگاهی

عیسی بهرامی‌زاده^۱، سید مهدی اجاق^{۲*}، علیرضا عالیشاهی^۳، شیرین حسنی^۴، مهدی ذوالفقاری^۵

۱. دانشجوی دکتری فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: issabahrmy@yahoo.com
۲. نویسنده مسئول، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: ojagh@ut.ac.ir
۳. دانشیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: alishahi@gau.ac.ir
۴. دانش‌آموخته دکتری فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: shirin.hasani88@gmail.com
۵. استادیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: zolfaghari.mz@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی-پژوهشی تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۳۱ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۰۴/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۲۰ واژه‌های کلیدی: پایداری، رهایش کنترل‌شده، فیکوسیانیین، مدل هضم آزمایشگاهی، نانوکپسوله‌سازی	سابقه و هدف: فیکوسیانیین، یک رنگدانه طبیعی با خواص آنتی‌اکسیدانی و کاربرد گسترده در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی است. این ترکیب به‌شدت نسبت به عوامل محیطی مانند نور، دما، pH و اکسیژن حساس بوده و به همین دلیل نیازمند فناوری‌های محافظتی مؤثری برای افزایش پایداری و فراهمی زیستی آن می‌باشد. هدف این پژوهش، نانوکپسوله‌سازی فیکوسیانیین از جلبک <i>Spirulina platensis</i> با استفاده از ترکیبات دیواره‌ای مختلف شامل ایزوله پروتئین سویا، پروتئین آب‌پنیر و مالتودکسترین بود. اهداف اصلی مطالعه شامل بررسی ویژگی‌های ساختاری، فیزیکوشیمیایی، پایداری گرمایی و رهایش کنترل‌شده نانوکپسول‌ها در شرایط شبیه‌سازی‌شده دستگاه گوارش و همچنین ارزیابی کاربرد آن‌ها در غنی‌سازی نان بود. مواد و روش‌ها: فیکوسیانیین از جلبک <i>Spirulina platensis</i> و با استفاده از ترکیب‌های مختلف دیواره‌ای شامل ایزوله پروتئین سویا (SPI)، پروتئین آب‌پنیر (WP) و مالتودکسترین (MD) نانوکپسوله شد. نانوکپسول‌ها به روش امولسیون‌سازی و خشک‌سازی تهیه شدند و ویژگی‌هایی مانند اندازه ذرات، شاخص پراکندگی (PDI)، راندمان درون‌پوشانی و زتاپتانسیل مورد ارزیابی قرار گرفتند. هم‌چنین، طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR) و آنالیز گرمایی روبشی تفاضلی (DSC) برای بررسی برهم‌کنش‌های مولکولی و پایداری حرارتی استفاده شد. آزمون‌های رهایش کنترل‌شده در محیط‌های شبیه‌سازی‌شده معده و روده انجام گرفت.

یافته‌ها: این مطالعه نشان داد که ترکیب ایزوله پروتئین سویا و مالتودکسترین، به‌عنوان دیواره کپسول، بهترین ویژگی‌های ساختاری، فیزیکوشیمیایی و عملکردی را در نانوکپسوله‌سازی فیکوسیانیین از جلبک اسپیرولینا ارائه می‌دهد. نانوکپسول‌های حاصل دارای اندازه ذره کوچک (۸/۸۶ نانومتر)، شاخص پراکندگی مناسب (۰/۴۸)، راندمان بالا (۸۸/۷ درصد) و زتاپتانسیل منفی (۱۰/۱ mV-) بودند. آزمون‌های FTIR و DSC موفقیت فرآیند کپسوله‌سازی و افزایش پایداری حرارتی رنگدانه را تأیید کردند. بررسی رهایش در شرایط هضم آزمایشگاهی نیز بیانگر آزادسازی کنترل‌شده (۸۸-۹۰ درصد طی ۱۲۰ ساعت) و محافظت مؤثر رنگدانه در برابر شرایط گوارشی بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که نانوکپسول‌های حاوی فیکوسیانیین با فرمولاسیون بهینه بر پایه ایزوله پروتئین سویا و مالتودکسترین می‌توانند به‌عنوان یک راهکار مؤثر جهت افزایش پایداری، کنترل رهایش و بهبود عملکرد عملکردی رنگدانه‌های طبیعی در محصولات غذایی مورد استفاده قرار گیرند.

استناد: بهرامی‌زاده، عیسی، اجاق، سید مهدی، عالیشاهی، علیرضا، حسنی، شیرین، ذوالفقاری، مهدی (۱۴۰۴). نانوکپسوله‌سازی فیکوسیانیین با پوشش‌های پروتئینی-کربوهیدراتی: تحلیل پایداری، رهایش کنترل‌شده و ساختار سطحی در مدل هضم آزمایشگاهی. نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۴ (۳)، ۳۲-۱۳.

Doi: 10.22069/japu.2025.23802.1964



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

رنگدانه های طبیعی استخراج شده از منابع زیستی دریایی، به ویژه فیکوسیانیین حاصل از سیانوباکتری هایی مانند *Spirulina platensis*، در سال های اخیر توجه فراوانی در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی-بهداشتی به خود جلب کرده اند (۱، ۲). فیکوسیانیین یک فیکوبیلی پروتئین محلول در آب با رنگ آبی شاخص، ویژگی های آنتی اکسیدانی قوی و پتانسیل ضدالتهابی و فلورسنت است که به دلیل ساختار پروتئینی پیچیده اش در انتقال انرژی نوری در فتوسنتز نقش دارد (۳، ۴). با این حال، پایداری این رنگدانه در برابر عوامل محیطی مانند نور، حرارت، pH و اکسیداسیون محدود است و استفاده مستقیم آن در فرآورده های غذایی و دارویی را با چالش مواجه می سازد (۵). فناوری نانوکپسوله سازی به عنوان راهکاری نوین برای محافظت از ترکیبات زیست فعال ناپایدار و افزایش فراهمی زیستی آنها، مورد توجه گسترده قرار گرفته است. این فناوری با استفاده از مواد دیواره ای زیست سازگار پروتئین های جانوری و یا گیاهی، ضمن فراهم کردن ماتریسی محافظ برای رنگدانه، امکان رهایش کنترل شده و هدفمند آن را در محیط های شبیه سازی شده دستگاه گوارش فراهم می آورد (۶، ۷). مطالعات اخیر نشان داده اند که ترکیب دیواره های پروتئینی و کربوهیدراتی می تواند نقش مؤثری در افزایش پایداری فیکوسیانیین و بهینه سازی خواص فیزیوشیمیایی نانوکپسول ها داشته باشد (۸، ۹). از منظر ساختاری، ویژگی هایی مانند اندازه ذره، مورفولوژی سطح، رفتار گرمایی و پایداری در برابر شرایط محیطی از جمله فاکتورهای کلیدی در اثربخشی نانوکپسول ها هستند که براساس ترکیب مواد دیواره ای و فرآیند تهیه، دستخوش تغییر می شوند (۱۰). افزون بر این، بررسی رهایش برون تنی فیکوسیانیین در شرایط شبیه سازی شده معده و روده نشان داد که

طراحی فرمولاسیون مناسب می تواند موجب کاهش رهایش در محیط اسیدی معده و افزایش آن در محیط قلیایی روده شود و از این طریق جذب و کارایی زیستی رنگدانه را بهبود بخشد (۷، ۱۱). نتایج این مطالعه با یافته های پژوهش های پیشین از جمله لی و همکاران (۳۷)، تیکس- رویج و همکاران (۳۷) و کیانو و همکاران (۴۷) مطابقت دارد که در آن ها نیز استفاده از دیواره های دوگانه یا ترکیبی منجر به محافظت مؤثر رنگدانه ها در pH اسیدی و آزادسازی هدفمند در روده گزارش شده است. از سوی دیگر، غنی سازی نانوکپسول های فیکوسیانیین در محصولات غذایی، علاوه بر ارتقای ارزش تغذیه ای و عملکردی، می تواند ویژگی های کیفی و پایداری محصول را نیز بهبود بخشد. در همین راستا، این پژوهش با هدف نانوکپسوله سازی رنگدانه فیکوسیانیین و بررسی ساختار، پایداری و عملکرد کپسول های تهیه شده با فرمولاسیون های مختلف شامل مالتودکسترین، ایزوله پروتئین سویا و پروتئین آب پنیر انجام می گیرد. همچنین، پایداری این کپسول ها در شرایط شبیه سازی شده معده و روده ارزیابی و در گام بعدی از نانوکپسول ها برای غنی سازی نان و بهبود ویژگی های کیفی آن استفاده می شود.

مواد و روش ها

آماده سازی نانوامولسیون حاوی فیکوسیانیین: برای انجام این پژوهش، فیکوسیانیین از شرکت مجموعه تولیدی بازرگانی ققنوس (biogreens)، پروتئین آب پنیر و ایزوله پروتئین سویا (۹۰ درصد پروتئین) از گروه بازرگانی پارس بالک، ترانس گلو تامیناز میکروبی (TGase) و مالتودکسترین (DE=۱۸-۲۰) از شرکت سیگما آلد ریچ و سایر مواد شیمیایی مورد نیاز با درجه خلوص بالا از شرکت مرک خریداری شد. تمام نمونه ها با استفاده از آب دیونیزه تهیه شدند. ابتدا

محلول‌های ایزوله پروتئین سویا و آب‌پنیر با غلظت ۱۰ درصد (وزنی/حجمی) در آب دیونیزه حاوی فیکوسیائین و مالتودکسترین تهیه و pH هر دو محلول روی ۷ تنظیم شد. مخلوط پروتئینی با نسبت ۱:۱ به مدت ۳۰ دقیقه با همزن مغناطیسی همگن شد. سپس به منظور ایجاد پیوندهای عرضی بین مولکول‌های پروتئینی و افزایش پایداری ساختار نانوامولسیون، ۵ واحد آنزیم ترانس‌گلوتامیناز (TGase) به ازای هر گرم پروتئین به مخلوط افزوده شد. نمونه‌ها در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند تا فرآیند اتصال عرضی کامل شود. پس از آن، ۰/۵ درصد مالتودکسترین به مخلوط افزوده و مجدد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط هم زده شد. در مرحله فاز روغنی، ۰/۴ گرم فیکوسیائین در ۱۰۰ گرم روغن کلزا حل شده و پس از ۳۰ دقیقه گرمایش در ۴۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۳۰ دقیقه تحت امواج فراصوت قرار گرفت. این فاز روغنی (۵ درصد v/v) به فاز آبی (۹۵ درصد) اضافه و امولسیون درشت با هموژنایزر با دور ۷۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه تهیه شد. در نهایت، نمونه‌ها با هموژنایزر فشار بالا در ۵۰ مگاپاسکال و طی ۳ پاس همگن شده و سپس با سونیکاتور پروبی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به نانوامولسیون یکنواخت تبدیل شدند (۱۲). فرمولاسیون تیمارهای مختلف نانوامولسیون (F1 تا F7) بر اساس ترکیبات مختلف دیواره شامل ایزوله پروتئین سویا، پروتئین آب‌پنیر و مالتودکسترین طراحی شد که شرح دقیق آن‌ها در جداول مربوطه و تصاویر نتایج (مانند SEM) ارائه شده است.

خشک کردن انجمادی: امولسیون تهیه شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شده و پس از آن در خشک‌کن انجمادی در دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد و فشار ۰/۷ میلی‌بار به مدت ۷۲ ساعت خشک شد. این پودرها در کیسه‌های پلاستیکی

کاملاً درب بسته در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا آزمایش‌های فیزیکوشیمیایی لازم بر روی آن‌ها صوت بگیرد.

میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال: تصاویر هم‌کانونی نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ کانفوکال اسکن لیزری (CLSM) با وضوح ۱۲۰ نانومتر در صفحه XY و ۳۵۰ نانومتر در محور Z در دمای محیط انجام شد. امولسیون‌های تازه تهیه شده برای گرفتن تصاویر با میکروسکوپ کانفوکال استفاده گردید.

تعیین خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و ساختاری نانوکپسول‌ها

توزیع اندازه قطرات و شاخص پراکندگی (PDI): اندازه ذره‌ای و توزیع اندازه ذره‌ای لیپوزوم‌ها پس از رقیق کردن نمونه به میزان ۱۰ برابر با بافر به روش تفرق نور پویا توسط دستگاه Zetasizer (Nano ZS) انجام شد (۱۳).

پتانسیل زتا: پتانسیل زتای ذرات به روش Laser Doppler Micro-electrophoresis توسط دستگاه Zetasizer (Nano ZS) انجام شد. نمونه‌ها توسط بافر فسفات (۵۰ mM، pH=۷/۴) به میزان ۱۰ برابر رقیق شده و ارزیابی در زاویه پراکندگی ۱۷۳° و طول موج هلیوم-تنگستن ۶۳۳ نانومتر و در دمای اتاق صورت گرفت (۱۴).

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM): تصاویر با وضوح بالا از کپسول‌های فوکوسیائین با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی تهیه شد (۱۵).

طیف‌سنجی ATR-FTIR مبتنی بر آزمایشگاه: ساختار شیمیایی مواد خام (مانند پروتئین ایزوله سویا، پروتئین آب‌پنیر، مالتودکسترین، فیکوسیائین، سوسپانسیون‌های مخلوط پروتئینی فریزدرای شده با، بدون مالتودکسترین

آنالیز گرمایی روبشی تفاضلی (DSC): برای بررسی رفتار حرارتی نمونه های تهیه شده، فیکوسیانیین خام و کپسول های حامل فیکوسیانیین با فرمولاسیون های مختلف، با استفاده از دستگاه گرماسنج پویشی تفاضلی (DSC) تا دمای ۳۰۰ درجه سانتی گراد آزمایش شدند.

مطالعه رهایش در محیط آزمایشگاهی: برای تعیین پروفایل رهایش رنگدانه از کپسول ها، ۲۰ میلی گرم کپسول حاوی فیکوسیانیین به ۵ میلی لیتر از محیط رهایش (آب دیونیزه) اضافه گردید و به طور مداوم با همزن مغناطیسی هم زده شدند. به تعداد نمونه برداری ها در طی رهایش، بشرهایی از مخلوط کپسول و محلول رهایش تهیه شد و هر یک از آن ها به یکی از زمان های نمونه برداری اختصاص یافت. بعد از گذشت زمان های مورد نظر مقدار رنگدانه رهاشده از کپسول ها، غلظت رنگدانه (ppm) در محیط رهایش در فواصل زمانی نمونه برداری با استفاده از طیف سنج مرئی-فرابنفش در طول موج ۶۲۰ نانومتر (جذب بیشینه) اندازه گیری شده و به مقدار رهاشده (μg) با توجه به حجم محیط رهایش (ml) تبدیل گردید. درصد فیکوسیانیین رهاشده به وسیله تقسیم مقدار فیکوسیانیین رهاشده در هر نقطه زمانی نمونه به وزن اولیه فیکوسیانیین کپسوله شده در نمونه محاسبه شد (۲۱).

میزان ثبات کپسول ها در محیط های شبیه سازی شده معده و روده: به منظور ارزیابی پایداری و اثرات محافظتی، کپسول های تهیه شده با فرمولاسیون مختلف (با و بدون مالتودکسترین) در محیط های شبیه سازی شده SGF، SIF و PBS انکوباسیون شدند. برای آماده سازی محیط معده ۱۰۰ میلی گرم پپسین در ۵ میلی لیتر آب مقطر حاوی ۰/۳۵ میلی لیتر اسید

با استفاده از یک طیف سنج FT-NIR/IR مجهز به یک ماژول نمونه برداری ATR الماس بازتابی به دست آمد (۱۷).

میکروسپکتروسکوپی ماکرو سنکروترون ATR-FTIR: آزمایش سنکروترون-FTIR بر روی خط پرتو میکرو طیف مادون قرمز با استفاده از یک طیف سنج مجهز به میکروسکوپ و دتکتور انجام شد. تمام طیف سنکروترون-FTIR در محدوده طیفی ۷۰۰-۳۸۰۰ سانتی متر-۱ ثبت شد (۱۸).

تعیین کارایی درون پوشانی (EE): برای تعیین کارایی درون پوشانی فیکوسیانیین در نانوکپسول ها، از روش غیرمستقیم استفاده شد (روش فیلتراسیون توسط فالكون های فیلتردار ۵۰ میلی لیتر با وزن مولکولی برابر ۱۰۰ کیلو دالتون). به این منظور مقدار ۱۰۰۰ میکرو لیتر از نانوکپسول های حاوی فیکوسیانیین به قسمت فوقانی اضافه شده، سپس درب فالكون کاملاً بسته شده و درون روتور دستگاه قرار داده شد. سپس با سرعت $g \times 12000$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ مقدار مایع عبور داده شده از فیلتر جدا شده و مقدار جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت شد. درصد کارایی درون پوشانی (EE) مطابق رابطه زیر محاسبه شد:

$$EE (\%) = \frac{WT-WF}{WT}$$

که در آن، WT معادل وزن کل فیکوسیانیین به کار رفته در فرمولاسیون، WF معادل مقدار فیکوسیانیین آزاد در فاز فیلتر شده است.

جهت تبدیل میزان جذب به غلظت، منحنی کالیبراسیون بر اساس غلظت های مختلف کپسول های حاوی فیکوسیانیین رسم شد (۱۹، ۲۰).

نتایج و بحث

تعیین اندازه ذرات و شاخص پراکندگی (PDI): ارزیابی فرمولاسیون‌های مختلف نشان داد که پروتئین ایزوله سویا و مالتودکستین دارای کم‌ترین اندازه ذره $8/86$ نانومتر (میانگین سه تکرار، با دو رقم اعشار اندازه‌گیری) بود. این تیمار از نظر پایداری فیزیکی و رهایش کنترل‌شده عملکرد بهتری نشان داد. همچنین در شرایط شبیه‌سازی‌شده معده و روده نیز، اندازه ذرات این تیمار به ترتیب $8/38$ و $8/04$ نانومتر اندازه‌گیری شد که بیانگر پراکندگی یکنواخت و حفظ ساختار نانوذرات در محیط‌های بیولوژیکی است (۲۵، ۲۶). در مقابل، بزرگ‌ترین ذرات مربوط به فرمولاسیون با پروتئین آب پنیر و مالتودکستین بود که با میانگین اندازه $534/20$ نانومتر، بیانگر تجمع ذرات و احتمال رهایش سریع‌تر رنگدانه است (۶) (جدول ۱).

شاخص پراکندگی (PDI) نیز در تیمارهای مختلف، مقادیری پایین‌تر از $0/5$ را نشان داد که بیانگر توزیع یکنواخت اندازه ذرات در ترکیب منتخب پروتئین ایزوله سویا و مالتودکستین (F6) است (۲۷، ۲۸). یافته‌های حاضر با گزارش باقری و همکاران مطابقت دارد که نشان دادند استفاده هم‌زمان از مالتودکستین و پروتئین‌های ایزوله می‌تواند به تولید نانوذرات کوچک‌تر با عملکرد بهتر در کپسوله‌سازی منجر شود (۹).

شاخص پراکندگی نانوذرات (PDI) در شرایط مختلف: شاخص پراکندگی (PDI) معیاری کلیدی برای سنجش توزیع اندازه ذرات در نانوکپسول‌ها است. مقادیر PDI کم‌تر از $0/5$ نشان‌دهنده توزیع یکنواخت و پایداری بالاتر نانوذرات است (۷). در این پژوهش، تیمار پروتئین ایزوله سویا و مالتودکستین

هیدروکلریک غلیظ حل گردید. سپس 100 میلی‌گرم کلرید سدیم به محلول اضافه شد. حجم نهایی محلول توسط آب مقطر به 50 میلی‌لیتر رسانده شد. pH نهایی محلول با استفاده از اسید هیدروکلریک غلیظ به $1/2$ تنظیم گردید. آماده‌کردن محیط روده با حل نمودن 340 میلی‌گرم از پتاسیم فسفات مونوبازیک در 10 میلی‌لیتر آب مقطر انجام گرفت. سپس 4 میلی‌لیتر از محلول هیدروکسید سدیم $0/2$ مولار و 500 میلی‌گرم پانکراتین به محلول تهیه‌شده افزوده گردید. حجم نهایی محلول به 50 میلی‌لیتر و pH نهایی به $6/8$ رسانده خواهد شد. برای انجام آزمایش 200 میکرولیتر از نمونه کپسول تا رسیدن به حجم 10 میلی‌لیتر رقیق‌شده و در تیوب‌های میکروسانتریفیوژ با هر دو محلول شبیه‌سازی‌شده توسط ترمومیکسر به‌طور مداوم در دمای 37 درجه سانتی‌گراد با $pH: 7/4$ انکوبه شدند. مدت زمان انکوباسیون برای محیط SGF، 4 ساعت، محیط SIF، 2 ساعت و 6 ساعت برای PBS در نظر گرفته شد. تأثیرات این شرایط بر روی اندازه، پتانسیل زتا و شاخص توزیع ذرات مطابق با روش‌های ذکرشده فوق مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۲).

آنالیزهای آماری: از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ به‌منظور آنالیز آماری استفاده می‌گردد. آزمون شاپیرو-ویلک به‌منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها استفاده خواهد شد و در مقایساتی که دارای چند گروه و یک متغیر باشند از آزمون ANOVA یک‌طرفه و در صورتی که دارای چند گروه و دو متغیر باشند آزمون ANOVA دوطرفه استفاده می‌شود. برای بررسی مقایسه میانگین‌ها نیز آزمون دانکن انجام می‌شود. سطح معنی‌داری در آنالیزها ($P < 0/05$) در نظر گرفته خواهد شد.

(F6) با مقدار PDI حدود ۰/۴۸، بهترین عملکرد را نشان داد (جدول ۲). این ترکیب به دلیل تعاملات مؤثر بین پروتئین و پلی ساکارید، از تجمع ذرات جلوگیری کرده و توزیع یکنواختی را در شرایط معده و روده فراهم کرده است. در مقابل، تیمارهای پروتئین ایزوله سویا و پروتئین آب پنیر ($PDI=0.92$) و پروتئین آب پنیر و مالتودکسترین ($PDI=1.00$) نشان دهنده پراکندگی ضعیف و عدم یکنواختی در اندازه ذرات بوده اند که بیانگر کاهش پایداری و احتمال بالای تجمع است (۲۹، ۳۰).

جدول ۱- ارزیابی اندازه ذرات، شاخص پراکندگی (PDI) و پایداری فیزیکی نانو ذرات (پتانسیل زتا) در تیمارهای مختلف نانوپوشانی شده برحسب نانومتر.

Table 1. Evaluation of Particle Size, Polydispersity Index (PDI), and Physical Stability (Zeta Potential) of Nanoparticles in Different Coated Treatments (nm).

شرایط های مختلف Different Conditions			تیمارها Treatments	آنالیزها Analyses
روده Intestine	معده Stomach	تیمار Treatment		
2.42±0.33 ^a	3.61±0.15 ^a	4.80 ±0.01 ^a	F1 رنگدانه خام (تیمار شاهد) Raw Pigment (Control Treatment)	
10.60±0.33 ^d	11.25±0.22 ^d	13.04±0.05 ^d	F2 نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین ایزوله سویا Pigment-loaded nanocapsules coated with soy protein isolate	
286.23±2.04 ^f	321.50±5.47 ^f	323.73±0.25 ^f	F3 نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین آب پنیر Pigment-loaded nanocapsules coated with whey protein	
6.326±0.06 ^b	8.78±0.30 ^c	9.78±0.02 ^c	F4 نانوکپسول حاوی رنگدانه با مالتودکسترین Pigment-loaded nanocapsules coated with maltodextrin	
54.57±0.32 ^e	61.08±0.69 ^e	83.78±0.25 ^e	F5 نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین ایزوله سویا+ پروتئین آب پنیر Pigment-loaded nanocapsules coated with a combination of soy protein isolate and whey protein	اندازه ذرات Size
8.04±0.06 ^c	8.38±0.33 ^b	8.86±0.04 ^b	F6 نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین ایزوله سویا+ مالتودکسترین Pigment-loaded nanocapsules coated with a combination of soy protein isolate and maltodextrin	
534.20±8.06 ^g	723.10±8.03 ^g	828.67±2.99 ^g	F7 نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین آب پنیر+ مالتودکسترین Pigment-loaded nanocapsules coated with a combination of whey protein and maltodextrin	

اعداد بیانگر میانگین ± انحراف می باشند. حروف مختلف کوچک در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار میان تیمارهای مختلف در یک زمان نمونه برداری می باشد

جدول ۲- ارزیابی اندازه ذرات، شاخص پراکندگی (PDI) و پایداری فیزیکی نانو ذرات (پتانسیل زتا) در تیمارهای مختلف نانوپوشانی شده برحسب نانومتر.

Table 2. Evaluation of Particle Size, Polydispersity Index (PDI), and Physical Stability (Zeta Potential) of Nanoparticles in Different Coated Treatments (nm).

شرایط‌های مختلف Different Conditions			تیمارها Treatments	آنالیزها Analyses
روده Intestine	معهده Stomach	تیمار Treatment		
0.59±0.07 ^a	0.48±0.01 ^a	0.38 ±0.00 ^a	F1 رنگدانه خام (تیمار شاهد) Raw Pigment (Control Treatment)	
0.73±0.01 ^c	0.52±0.00 ⁿ	0.47±0.00 ^c	F2 نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین ایزوله سویا Pigment-loaded nanocapsules coated with soy protein isolate	
0.70±0.07 ^{bc}	0.58±0.01 ^c	0.48±0.00 ^{cd}	F3 نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین آب پنیر Pigment-loaded nanocapsules coated with whey protein	
0.66±0.00 ^b	0.54±0.01 ^{bc}	0.41±0.01 ^b	F4 نانوکپسول حاوی رنگدانه با مالتودکسترین Pigment-loaded nanocapsules coated with maltodextrin	تعیین اندازه ذرات و شاخص پراکندگی PDI
0.92±0.01 ^d	0.91±0.02 ^d	0.87±0.00 ^e	F5 نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین ایزوله سویا + پروتئین آب پنیر Pigment-loaded nanocapsules coated with a combination of soy protein isolate and whey protein	
0.57±0.01 ^a	0.52±0.01 ^b	0.48±0.01 ^{cd}	F6 نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین ایزوله سویا + مالتودکسترین Pigment-loaded nanocapsules coated with a combination of soy protein isolate and maltodextrin	
1.00±0.00 ^e	0.92±0.01 ^d	0.86±0.03 ^e	F7 نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین آب پنیر + مالتودکسترین Pigment-loaded nanocapsules coated with a combination of whey protein and maltodextrin	

اعداد بیانگر میانگین $\pm$ انحراف معیار می‌باشند. حروف مختلف کوچک در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار میان تیمارهای مختلف در یک زمان نمونه‌برداری می‌باشد

تعیین پتانسیل زتا نانوکپسول‌های حاوی رنگدانه فیکوسیانین: زتا پتانسیل شاخص مهمی برای ارزیابی پایداری الکتروستاتیکی نانوذرات است؛ مقادیر بالاتر از ± 30 mV میلی‌ولت نشان‌دهنده پایداری مطلوب ذرات به دلیل دافعه بین‌ذره‌ای است (۳۱). در این مطالعه، تیمار پروتئین ایزوله سویا و پروتئین آب پنیر بیشترین زتا پتانسیل را در محیط معده (8.73 mV) و روده (8.30 mV) نشان داد که اگرچه نسبت به سایر تیمارها بهتر بود، اما همچنان کم‌تر از آستانه پایداری مطلوب گزارش شد (جدول ۳). در شرایط اسیدی

معهده ($3-5$ pH)، ترکیب یادشده به دلیل تعاملات الکترواستاتیکی قوی‌تر، عملکرد بهتری در حفظ ساختار نانوذرات داشت. در محیط قلیایی روده ($5-7$ pH) نیز، علی‌رغم کاهش تراکم بارهای سطحی، این ترکیب به دلیل تنوع بارهای پروتئینی، ساختار نسبتاً پایداری ایجاد کرد. با این حال، مقادیر گزارش شده در این مطالعه نسبت به یافته‌های دیگر پژوهش‌ها که مقادیر بیش از ± 30 mV میلی‌ولت را گزارش کرده‌اند، پایداری کم‌تری را نشان می‌دهد (۳۱).

جدول ۳- ارزیابی اندازه ذرات، شاخص پراکندگی (PDI) و پایداری فیزیکی نانو ذرات (پتانسیل زتا) در تیمارهای مختلف نانوپوشانی شده برحسب نانومتر.

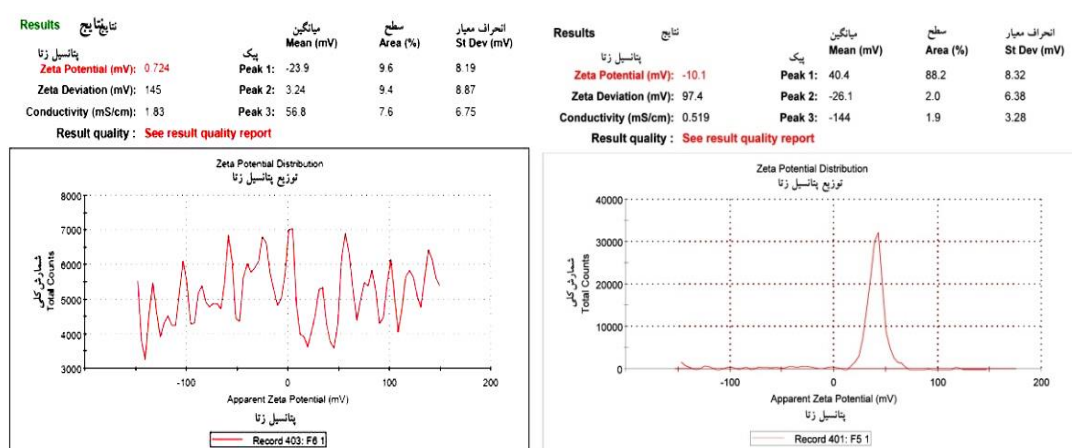
Table 3. Evaluation of Particle Size, Polydispersity Index (PDI), and Physical Stability (Zeta Potential) of Nanoparticles in Different Coated Treatments (nm).

شرایط های مختلف Different Conditions			تیمارها Treatments	آنالیزها Analyses
روده Intestine	معده Stomach	تیمار Treatment		
2.13±0.32 ^c	2.43±0.25 ^b	2.83 ±0.06 ^c	F1 رنگدانه خام (تیمار شاهد) Raw Pigment (Control Treatment)	
2.80±0.00 ^c	3.00±0.00 ^b	3.23±0.06 ^c	F2 نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین ایزوله سویا Pigment-loaded nanocapsules coated with soy protein isolate	
0.89±0.02 ^a	1.10±0.10 ^a	1.34±0.14 ^a	F3 نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین آب پنیر Pigment-loaded nanocapsules coated with whey protein	
3.73±0.25 ^d	4.40±0.10 ^c	4.59±0.09 ^d	F4 نانوکپسول حاوی رنگدانه با مالتودکسترین Pigment-loaded nanocapsules coated with maltodextrin	
8.30±0.36 ^e	8.73±0.25 ^d	9.23±0.68 ^e	F5 نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین ایزوله سویا + پروتئین آب پنیر Pigment-loaded nanocapsules coated with a combination of soy protein isolate and whey protein	زتا Zeta
0.90±0.00 ^a	0.93±0.06 ^a	1.07±0.12 ^a	F6 نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین ایزوله سویا + مالتودکسترین Pigment-loaded nanocapsules coated with a combination of soy protein isolate and maltodextrin	
1.25±0.18 ^b	1.30±0.10 ^a	1.80±0.10 ^b	F7 نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین آب پنیر + مالتودکسترین Pigment-loaded nanocapsules coated with a combination of whey protein and maltodextrin	

اعداد بیانگر میانگین ± انحراف معیار می باشند. حروف مختلف کوچک در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار میان تیمارهای مختلف در یک زمان نمونه برداری می باشد.

(mV) ۱۰/۱-، که نشان دهنده پایداری نسبی سیستم است. کمترین مقدار پتانسیل زتا در تیمار با دیواره پروتئین ایزوله سویا و مالتودکسترین (F6) (mV) ۰/۷۲ مشاهده شد که بیانگر پایداری ضعیف تر ذرات است (شکل ۱).

ارزیابی پتانسیل زتا نانوکپسول های حاوی دیواره های مختلف: پتانسیل زتا به عنوان شاخصی از پایداری فیزیکی نانوکپسول ها بررسی شد. بالاترین پتانسیل زتای منفی مربوط به تیمار حاوی رنگدانه با دیواره پروتئین ایزوله سویا و پروتئین آب پنیر بود



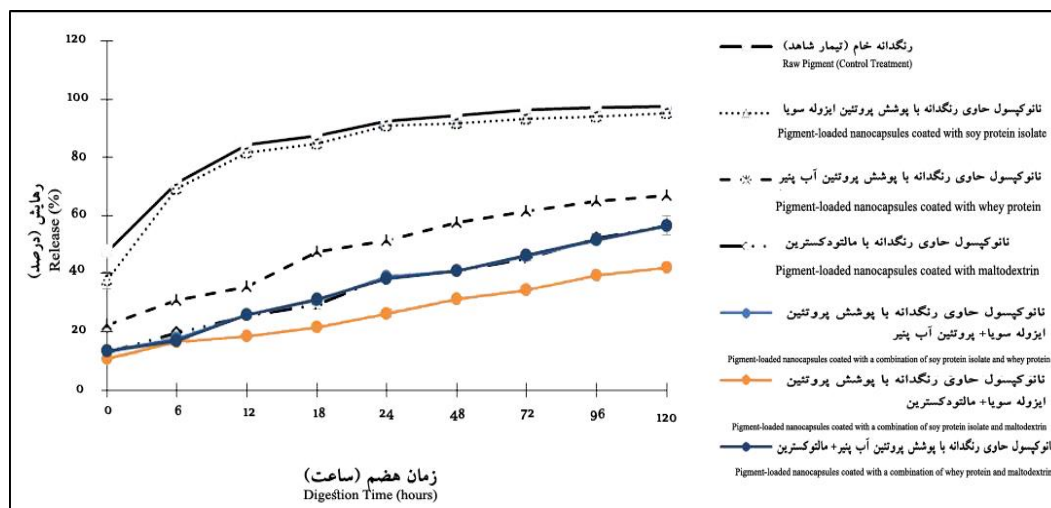
شکل ۱- نتایج پایداری فیزیکی نانوذرات فیکوسیانین در تیمارهای مختلف (پتانسیل زتا) با دیواره‌های مختلف مالتودکسترین، پروتئین ایزوله سویا و پروتئین آب پنیر (تیمار نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین ایزوله سویا + پروتئین آب پنیر).

Figure 1. Physical Stability (Zeta Potential) of Phycocyanin Nanoparticles in Different Treatments Using Various Wall Materials: Maltodextrin, Soy Protein Isolate, and Whey Protein (Treatment: Nanocapsules Containing the Pigment with Soy Protein Isolate + Whey Protein Coating).

مطالعه رهایش در محیط برون‌تنی (In vitro): رهایش ترکیبات زیست‌فعال در سیستم‌های کپسوله‌سازی، نقشی اساسی در کارایی بیولوژیکی و هدفمندی عملکرد آن‌ها دارد (۳۵). در این مطالعه، بررسی رهایش فیکوبیلی پروتئین فیکوسیانین در شرایط برون‌تنی نشان داد که تیمار شاهد (رنگدانه آزاد) طی مدت‌زمان کوتاهی، بیش از ۹۷ درصد ماده مؤثر را آزاد کرده و فاقد کنترل مؤثر رهایش است. در مقابل، تیمارهای کپسوله‌شده به‌ویژه پروتئین ایزوله سویا و مالتودکسترین (F6)، عملکرد مناسبی در کنترل سرعت رهایش داشتند؛ به‌گونه‌ای که طی ۱۲۰ ساعت، آزادسازی فیکوسیانین به‌تدریج به حدود ۸۸-۹۰ درصد رسید. این روند آهسته و یکنواخت مشابه نتایج گزارش‌شده با پوشش‌های آلزینات/کتوزان بوده است (۳۶) (شکل ۲). همچنین، تیمار پروتئین آب پنیر (F3) رهایش سریع‌تری در ساعات اولیه نشان داد که ناشی از انحلال‌پذیری بالای آب پنیر است، اما پس از آن، رهایش به‌صورت تدریجی ادامه یافت. این نتایج نشان می‌دهد که ترکیبات پوشش‌دهنده با رفتار

این نتایج با مطالعات باکر و همکاران (۳۲)، هاناری و همکاران (۱۷)، پتانسیل زتای بالای ± 30 mV میلی‌ولت را به عنوان معیار پایداری بالا معرفی کرده‌اند، که مقادیر به‌دست آمده در این مطالعه نسبت به این معیار پایین‌تر است. این اختلاف می‌تواند ناشی از تفاوت در ترکیب دیواره‌ها، شرایط سنجش و نوع سیستم نانوکپسول‌ها باشد. با وجود این، مقادیر منفی پتانسیل زتا اندازه‌گیری‌شده نشان‌دهنده وجود بار سطحی کافی برای جلوگیری از آگلومره شدن نانوکپسول‌ها و پایداری نسبی آن‌ها است. علاوه بر این، شاخص پراکندگی ذرات (PD) در محدوده ۰/۳۸ تا ۰/۸۷ در شرایط تیمار، ۰/۴۸ تا ۰/۹۲ در شرایط معده و ۰/۵۷ تا ۱/۰۰ در شرایط روده متغیر بود. مقادیر بالاتر از ۰/۵ نشان‌دهنده توزیع وسیع اندازه ذرات هستند (۳۳). نوع دیواره به‌ویژه ترکیب پروتئین ایزوله سویا با پروتئین آب پنیر نقش مؤثری در افزایش پایداری نانوکپسول‌ها از طریق افزایش پتانسیل منفی سطحی ایفا کرده است (۳۴).

کنترل‌شده مانند ترکیب پروتئین ایزوله سویا و مالتودکسترین (F6)، نسبت به پروتئین‌های منفرد عملکرد بهتری در افزایش پایداری و جلوگیری از تخریب زودهنگام فیکوسیانین دارند. هم‌راستایی این نتایج با مطالعات قبلی (۷، ۳۶ و ۳۷) اعتبار علمی آن را تأیید می‌کند.

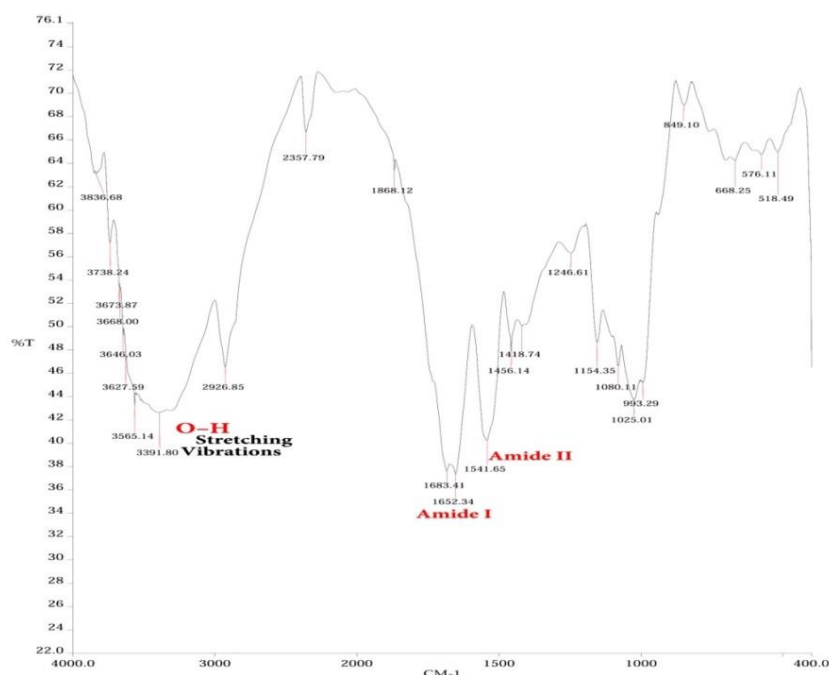


شکل ۲- مکانیسم رهائش رنگدانه نانوپوشانی فیکوسیانین در دیواره‌های مختلف (مالتودکسترین، پروتئین ایزوله سویا و پروتئین آب پنیر).

Figure 2. Mechanism of Phycocyanin Release from Nanocoated Structures Using Different Wall Materials (Maltodextrin, Soy Protein Isolate, and Whey Protein).

است. تغییر در شدت و موقعیت این باندها پس از کپسوله‌سازی، نشانه‌ی برقراری پیوندهای هیدروژنی جدید و تعاملات مولکولی بین فیکوسیانین و مواد پوششی است، که افزایش پایداری و کاهش تخریب رنگدانه را در پی داشته است. طیف FTIR نشان داد که نانوکپسول‌ها توانسته‌اند به‌خوبی فیکوسیانین را محصور کرده و ساختار آن را پایدارتر کنند. این یافته‌ها با مطالعات پیشین درباره برهم‌کنش‌های هیدروژنی و بهبود پایداری رنگدانه‌ها در نانوکپسول‌ها همخوانی دارد (۳۸، ۳۹ و ۴۰).

طیف‌سنجی FTIR: مطالعه طیف‌سنجی FTIR برای بررسی موفقیت درون‌پوشانی فیکوسیانین در نانوکپسول‌ها نشان داد که پیک‌های مشخص فیکوسیانین با طیف تیمارهای مختلف (F1 تا F7) همپوشانی دارند، که بیانگر برهم‌کنش مؤثر بین فیکوسیانین و پوشش نانوکپسول‌ها است (شکل ۳). پیک‌های مشاهده‌شده در نواحی آمید I ($1600-1700 \text{ cm}^{-1}$) و آمید II ($1500-1600 \text{ cm}^{-1}$) و همچنین باندهای کششی O-H ($3200-3400 \text{ cm}^{-1}$) نشان‌دهنده حضور پروتئین و گروه‌های هیدروکسیل

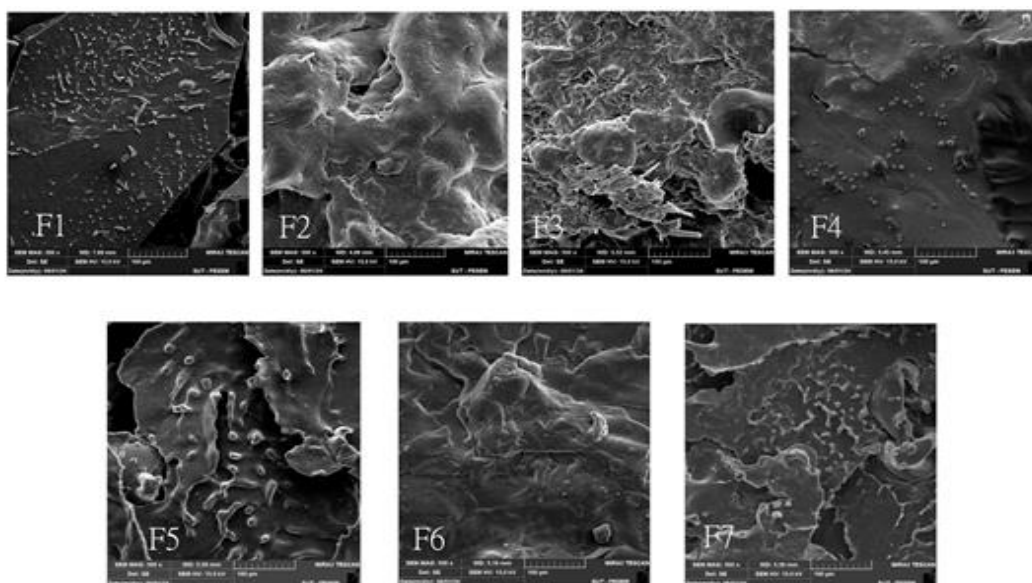


شکل ۳- طیف FTIR: ریزپوشانی کپسول‌های حاوی رنگدانه فیکوسیانین با دیواره‌های مختلف مالتودکسترین، پروتئین ایزوله سویا و پروتئین آب پنیر (تیمار نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین ایزوله سویا + مالتودکسترین).

Figure 3. FTIR Spectrum: Microencapsulation of Phycocyanin-Loaded Capsules Using Different Wall Materials: Maltodextrin, Soy Protein Isolate, and Whey Protein (Treatment: Nanocapsules Containing the Pigment with Soy Protein Isolate + Maltodextrin Coating).

پژوهش در محدوده گزارش‌شده توسط یان و همکاران (۱۵)، گلمکانی و همکاران (۴۱) و لی و همکاران (۳۷) قرار دارد و حتی در برخی موارد عملکرد بهتری داشته است. اندازه کوچک‌تر ذرات در تیمار (F3) مزیت‌های زیستی مانند افزایش زیست‌فراهمی و عبور از موانع بیولوژیکی را به همراه دارد، درحالی‌که اندازه بزرگ‌تر ذرات در تیمار (F6) منجر به محافظت مؤثرتر از رنگدانه در برابر اکسیداسیون و تخریب محیطی می‌شود. برخلاف برخی گزارش‌های قبلی مانند (۴۲) که ایجاد حفره‌های سطحی را پس از خشک‌کن انجمادی گزارش کرده‌اند، در این پژوهش هیچ‌گونه ترک یا حفره‌ای مشاهده نشد. این امر بیانگر اثربخشی بالای ترکیب پوشش‌های انتخاب‌شده در محافظت ساختاری از فیکوسیانین است (شکل ۴).

مورفولوژی سطحی نانوفیکوسیانین‌ها: بررسی‌های انجام‌شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان داد که نانوکپسول‌های حاوی فیکوسیانین دارای سطحی صاف، یکنواخت و بدون ترک و حفره هستند. تیمارهای مختلف با مواد پوششی گوناگون تأثیر قابل‌توجهی بر اندازه ذرات داشتند ($P < 0.05$). تیمار F3 (پروتئین آب پنیر) کوچک‌ترین ذرات (۵۲/۹۶ نانومتر) و تیمار F6 (پروتئین ایزوله سویا و مالتودکسترین) بزرگ‌ترین ذرات (۹۸/۲۸ نانومتر) را ایجاد کرد. اندازه ذرات به‌وضوح تحت‌تأثیر نوع دیواره نانوکپسول بود، به‌طوری‌که پروتئین آب پنیر منجر به تشکیل ذرات کوچک‌تر و پروتئین سویا به تشکیل ذرات بزرگ‌تر شد. با این‌حال، تیمار (F6) با وجود اندازه بزرگ‌تر ذرات، به دلیل ساختار پوششی قوی‌تر، پایداری بالاتری ارائه داد. هم‌چنین با مقایسه مطالعات پیشین نشان داد که اندازه ذرات در این



شکل ۴- مورفولوژی سطحی پودرهای حاصل از نانوپوشانی رنگدانه فیکوسیانین با دیواره‌های مختلف مالتودکسترین، پروتئین ایزوله سویا و پروتئین آب پنیر.

Figure 4. Surface Morphology of Powders Obtained from Phycocyanin Nanoencapsulation Using Different Wall Materials: Maltodextrin, Soy Protein Isolate, and Whey Protein.

دیواره‌های به کاررفته در فرمولاسیون‌های مختلف نانوپوشانی فیکوسیانین در شکل فوق (F1 تا F7) شرح زیر هستند:

The wall materials used in the different formulations of phycocyanin nanoencapsulation shown in the figure above (F1 to F7) are as follows:

- F1: رنگدانه خام (تیمار شاهد) (Raw Pigment Control Treatment)
- F2: نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین ایزوله سویا (Pigment-loaded nanocapsules coated with soy protein isolate)
- F3: نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین آب پنیر (Pigment-loaded nanocapsules coated with whey protein)
- F4: نانوکپسول حاوی رنگدانه با مالتودکسترین (Pigment-loaded nanocapsules coated with maltodextrin)
- F5: نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین ایزوله سویا + پروتئین آب پنیر (Pigment-loaded nanocapsules coated with a combination of soy protein isolate and whey protein)
- F6: نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین ایزوله سویا + مالتودکسترین (Pigment-loaded nanocapsules coated with a combination of soy protein isolate and maltodextrin)
- F7: نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین آب پنیر + مالتودکسترین (Pigment-loaded nanocapsules coated with a combination of whey protein and maltodextrin)

به دلیل خاصیت امولسیفایری و محافظتی، از نشت رنگدانه جلوگیری کرده و پایداری بالاتری ایجاد می‌کند. این پوشش‌ها باعث تولید ذرات یکنواخت با سطح صاف شده و چسبندگی در فرآیند خشک کردن انجامادی را کاهش می‌دهند. استفاده از این نوع پوشش‌ها در قالب سامانه‌های نانوکپسوله‌سازی، نمونه‌ای از کاربرد فناوری نانو در تثبیت رنگدانه‌ها

راندمان درون‌پوشانی (Encapsulation Efficiency):

در این پژوهش، نانوکپسول‌های حاوی رنگدانه فیکوسیانین با پوشش پروتئین ایزوله سویا و مالتودکسترین (F6) بیش‌ترین راندمان درون‌پوشانی را با مقدار ۸۸/۷۰ درصد نشان دادند، در حالی‌که رنگدانه خام (تیمار شاهد) کم‌ترین راندمان را داشت. ترکیب پروتئین ایزوله سویا و مالتودکسترین (F6)

است. فناوری نانو نقش مهمی در بهبود پایداری رنگدانه‌ها در برابر نور، حرارت و pH ایفا می‌کند و به همین دلیل، کاربردهای گسترده‌ای در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی دارد. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که راندمان ریزپوشانی فیکوسیانین به روش‌های مختلف معمولاً بین ۷۰ تا ۹۰ درصد است. نتایج این پژوهش با مطالعات مشابه یان و همکاران (۱۵)، گلمکانی و همکاران (۴۱) هم‌خوانی دارد و حداکثر راندمان به‌دست آمده (۸۸/۷۰ درصد) نزدیک

به مقادیر بالای گزارش شده برای پوشش‌های زیستی است. بنابراین، پوشش پروتئین ایزوله سویا و مالتودکسترین (F6) عملکردی مشابه پوشش‌های زیستی محافظ دارد (جدول ۴). علاوه بر راندمان بالا، این پوشش‌ها به افزایش پایداری فیکوسیانین در شرایط محیطی مختلف کمک کرده و باعث حفظ رنگ و خواص زیستی آن می‌شوند. هم‌چنین کاهش نیاز به افزودنی‌های شیمیایی از مزایای مهم این روش است.

جدول ۴- نتایج راندمان ریزپوشانی (EE) کپسول‌های حاوی رنگدانه فیکوسیانین با دیواره‌های مختلف مالتودکسترین، پروتئین ایزوله سویا و پروتئین آب پنیر برحسب (درصد).

Table 4. Encapsulation Efficiency (EE %) of Phycocyanin-Loaded Capsules Using Different Wall Materials: Maltodextrin, Soy Protein Isolate, and Whey Protein (%).

ردیف Row	تیمارها Treatments	انحراف معیار $\pm$ میانگین Mean $\pm$ standard deviation
1	F1 رنگدانه خام (تیمار شاهد) Raw Pigment (Control Treatment)	68.20 $\pm$ 0.72 ^e
2	F2 نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین ایزوله سویا Pigment-loaded nanocapsules coated with soy protein isolate	73.00 $\pm$ 0.20 ^d
3	F3 نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین آب پنیر Pigment-loaded nanocapsules coated with whey protein	72.80 $\pm$ 0.80 ^d
4	F4 نانوکپسول حاوی رنگدانه با مالتودکسترین Pigment-loaded nanocapsules coated with maltodextrin	77.90 $\pm$ 0.26 ^b
5	F5 نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین ایزوله سویا + پروتئین آب پنیر Pigment-loaded nanocapsules coated with a combination of soy protein isolate and whey protein	76.70 $\pm$ 0.66 ^c
6	F6 نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین ایزوله سویا + مالتودکسترین Pigment-loaded nanocapsules coated with a combination of soy protein isolate and maltodextrin	88.70 $\pm$ 0.66 ^a
7	F7 نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین آب پنیر + مالتودکسترین Pigment-loaded nanocapsules coated with a combination of whey protein and maltodextrin	78.90 $\pm$ 0.46 ^b

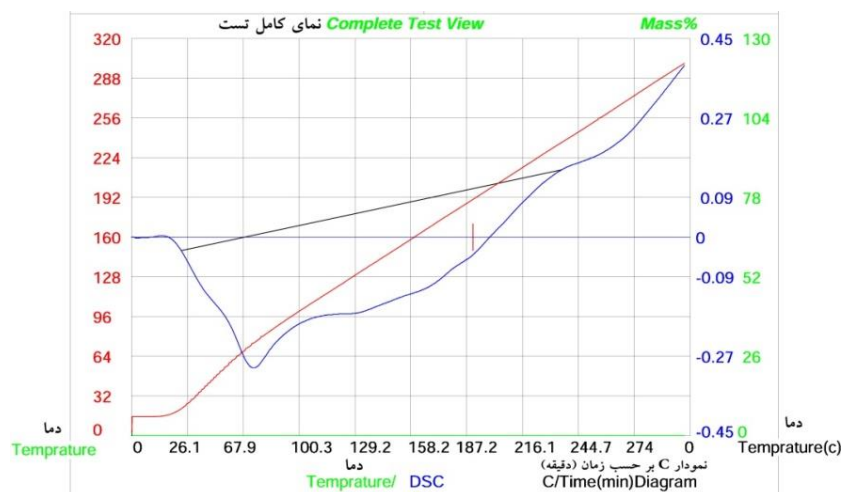
اعداد بیانگر میانگین $\pm$ انحراف معیار می‌باشند. حروف مختلف کوچک در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار میان تیمارهای مختلف در یک زمان نمونه‌برداری می‌باشد.

آنالیز گرمایی روبشی تفاضلی (DSC): نتایج نشان می‌دهد که فیکوسیانین یک پروتئین حساس به دماست که با کپسوله‌سازی در ترکیب با پروتئین‌های

ایزوله سویا و مالتودکسترین (F6)، پایداری حرارتی و نوری بهتری پیدا می‌کند (۴۳، ۴۴). مطابق نمودار DSC (شکل ۵)، تیمار ترکیبی ایزوله سویا و

پوشش بالاتر مطابقت داشته و نشان می دهد که این تیمار بهترین عملکرد را در حفظ فیکوسیانین و رهایش کنترل شده آن طی زمان دارد. همچنین این ترکیب نسبت به پروتئین آب پنیر مقاوم تر به تغییرات محیطی است و طول عمر محصول را افزایش می دهد.

مالتودکسترین (F6)، با کاهش آنتالپی (سطح زیر پیک) و جابه جایی پیک دمایی به دمای بالاتر در مقایسه با سایر تیمارها (F1 تا F7)، پایداری حرارتی بیشتری از خود نشان داد. این نتایج با سایر شاخص ها مانند اندازه ذرات کوچک تر و راندمان



شکل ۵- نمودار آنالیز DSC، ریزپوشانی کپسول های حاوی رنگدانه فیکوسیانین با دیواره های مختلف مالتودکسترین،

پروتئین ایزوله سویا و پروتئین آب پنیر (تیمار بهینه نانوکپسول حاوی رنگدانه با پوشش پروتئین ایزوله سویا + مالتودکسترین).

Figure 5. DSC Analysis Chart: Microencapsulation of Phycocyanin-Loaded Capsules Using Different Wall Materials: Maltodextrin, Soy Protein Isolate, and Whey Protein (Treatment: Nanocapsules Containing the Pigment with Soy Protein Isolate + Maltodextrin Coating).

بهبود پایداری ساختاری و حرارتی سیستم بودند. بررسی های رهایش در شرایط شبیه سازی شده گوارشی نشان داد که این فرمولاسیون قادر به آزادسازی کنترل شده فیکوسیانین در طول زمان است و نقش حفاظتی مؤثری در برابر تخریب در محیط گوارشی ایفا می کند. در مجموع، نانوکپسوله سازی فیکوسیانین با دیواره ترکیبی ایزوله سویا و مالتودکسترین، رویکردی نوآورانه و ایمن برای ارتقاء کیفیت، ماندگاری و سلامت رنگدانه های طبیعی به شمار می رود و می تواند به عنوان جایگزینی مؤثر برای رنگ های مصنوعی در محصولات غذایی، دارویی و آرایشی مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه گیری کلی

در این پژوهش، رنگدانه طبیعی فیکوسیانین استخراج شده از جلبک اسپیرولینا با هدف افزایش پایداری، اثربخشی و قابلیت کاربرد در صنایع غذایی، از طریق نانوکپسوله سازی با دیواره های پلیمری مختلف پایدارسازی شد. نتایج نشان دادند که ترکیب ایزوله پروتئین سویا و مالتودکسترین، در مقایسه با سایر تیمارها، به دلیل خواص مکمل ساختاری، منجر به تشکیل نانوکپسول هایی با اندازه ذرات بسیار کوچک، یکنواختی توزیع مناسب (PDI پایین)، راندمان بالای درون پوشانی و زتاپتانسیل پایدار شد. آنالیزهای طیف سنجی FTIR و حرارتی DSC نیز تأییدکننده برهم کنش مؤثر بین دیواره و رنگدانه و

منابع

1. Altmann, B. A., & Rosenau, S. (2022). Spirulina as animal feed: Opportunities and challenges. *Foods*, 11(7), 965.
2. Fratelli, C., Bürck, M., Silva-Neto, A. F., Oyama, L. M., De Rosso, V. V., Braga, A. R. C. (2022). Green Extraction Process of Food Grade C-phycoerythrin: *Biological Effects and Metabolic Study in Mice. Processes*. 10, 1793. <https://doi.org/10.3390/pr10091793>.
3. Aoki, J., Sasaki, D., & Asayama M. (2021). Development of a method for phycocyanin recovery from filamentous cyanobacteria and evaluation of its stability and antioxidant capacity. *BMC Biotechnol.* 21, 40.
4. Li, W., Su, H. N., Pu, Y., Chen, J., Liu, L. N., & Liu Q., et al. (2019). Phycobiliproteins: Molecular structure, production, applications, and prospects. *Biotechnol. Adv.* 37, 340-353.
5. Zhang, S., Zhang, Z., Dadmohammadi, Y., Li, Y., Jaiswal, A., & Abbaspourrad, A. (2021). Whey protein improves the stability of C-phycoerythrin in acidified conditions during light storage. *Food Chemistry*, 344, 128-642.
6. Mogany, T., Kumari, S., Swalaha, F. M., Bux, F. (2019). Extraction and characterisation of analytical grade C-phycoerythrin from *Euhaliotice* sp. *J. Appl. Phycol.* 31, 1661-1674.
7. Safari, R., Raftani Amiri, Z., Reyhani Poul, S., & Ghaffari, H. (2022). Nanoencapsulation of phycocyanin extracted from the alga *Spirulina* (*Spirulina platensis*) and use of nanoparticles in ice cream formulation. *Journal of food science and technology (Iran)*, 19(123), 145-159.
8. Adjali, A., Clarot, I., Chen, Z., Marchioni, E., & Boudier, A. (2022). Physicochemical degradation of phycocyanin and means to improve its stability: A short review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 12(3), 406-414.
9. Bagheri, F., Amiri, S., & Radi, M. (2022). Comparing the effect of soy protein isolate coating with sodium and calcium alginate polysaccharide coatings on the oil absorption of eggplant slices during frying. *FSCT*; 19(122), 83-100.
10. Karazhyan, R., Ameri, M., Noshahri, N. G., & Ehtiati, A. (2022). Effects of copigmentation on the stability of phycocyanin pigments extracted from *Spirulina platensis* using spray dryer. *Applied Food Biotechnology*, 9(3), 227-237.
11. Suzery, M., Majid, D., Setyawan, D., & Sutanto, H. (2017). Improvement of stability and antioxidant activities by using phycocyanin-chitosan encapsulation technique. In IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science* (55(1), p. 012052). IOP Publishing.
12. Kim, W., Wang, Y., Ye, Q., Yao, Y., & Selomulya, C. (2023). Enzymatic cross-linking of pea and whey proteins to enhance emulsifying and encapsulation properties. *Food and Bioproducts Processing*.
13. Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J., & Nasirpour, A. (2014). Design and characterization of astaxanthin-loaded nanostructured lipid carriers. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 21, 366-374.
14. Joye, I. J., Davidov-Pardo, G., & McClements, D. J. (2015). Encapsulation of resveratrol in biopolymer particles produced using liquid antisolvent precipitation. Part 2: stability and functionality. *Food Hydrocolloids*, 49, 127-134.
15. Yan, M., Liu, B., Jiao, X., & Qin, S. (2014). Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties. *Food and bioproducts processing*, 92(1), 89-97.
16. Marty, S., Baker, K. W., & Marangoni, A. G. (2009). Optimization of a scanner imaging technique to accurately study oil migration kinetics. *Food research international*, 42(3), 368-373.
17. Honary, S., Maleki, M., & Karami M. (2009). The effect of chitosan molecular weight on the properties of alginate/

- chitosan microparticles containing prednisolone, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8(1), 53-61.
18. Timilsena, Y. P., Vongsivut, J., Tobin, M. J., Adhikari, R., Barrow, C., & Adhikari, B. (2019). Investigation of oil distribution in spray-dried chia seed oil microcapsules using synchrotron-FTIR microspectroscopy. *Food Chemistry*, 275, 457-466.
 19. Mozafari, R. M., & Mortazavi, S. M. (2005). Nanoliposomes: From Fundamentals to Recent Developments, *Trafford Publishing, Ltd, Oxford, UK. ISBN 1-4120-5545-8*.
 20. Rajabia, H., Jafari, S. M., Rajabzadeh, G., Sarfarazi, M., & Sedaghatia, S. (2019). Chitosan-gum Arabic complex nanocarriers for encapsulation of saffron bioactive components. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 578.
 21. Agrawal, A., Harde, H., Thanki, K., & Jain, S. (2014). Improved Stability and Antidiabetic Potential of Insulin Containing Folic Acid Functionalized Polymer Stabilized Multilayered Liposomes Following Oral Administration. *Biomacromolecules*, 15, 350-360.
 22. Forutan, M., Hasani, M., Hasani, S., Salehi, N., & Sabbagh, F. (2022). Liposome System for Encapsulation of *Spirulina platensis* Protein Hydrolysates: Controlled-Release in Simulated Gastrointestinal Conditions, Structural and Functional Properties. *Materials*, 15, 85-81.
 23. Razavizadegan, J. S.H., Tabatabaee Yazdi, F., Mortazavi, S., Karimi, A., Ghiafeh Davoodi, M., Pourfarzad, M. A., & Hematian Soorki, A. (2009). Comparison and effect of formulated coating improving agents for shelf-life extension of Barbari bread. *Food and bioprocess technology, EJFPP*. 1(4), 43-62.
 24. Shahidi Noghabi, M., & Molaveisi, M. (2020). Using Arabic gum, maltodextrin and inulin for wall compounds microencapsulation and rapid release of the bioactive compounds from cardamom essential oil in saliva. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 9(1), 57-72.
 25. Azari, A., Ghaboos, S. H. H., Jafari, S. M., & Moghadam, V. E. (2023). The effect of storage conditions on the stability of chitosan-coated nanoliposomes containing phycocyanin.
 26. Sotoudeh, M. S., & Soltanizadeh, N. (2019). Studying the effect of adding soy protein isolate and changing the size of breadcrumb particles on the physicochemical properties of chicken nuggets. *Iranian Journal of Food Science and Technology Research*, 16(5), 629-641. **Doi: 10.22067/ifstrj.v16i5.82491.**
 27. Liu, Q., Huang, Y., Zhang, R., CAI, T., & CAI, Y. (2022). Medical application of *Spirulina platensis* derived C-phycocyanin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016(1), 7803846.
 28. Xie, S. H., Wang, Z. J., He, Z. Y., Zeng, M. M., Fang, Q. I. N., Adhikari, B., & Jie, C. H. E. N. (2023). The effects of maltodextrin/starch in soy protein isolate-wheat gluten on the thermal stability of high-moisture extrudates. *Journal of Integrative Agriculture*, 22(5), 1590-1602.
 29. Aziznia, S., Askari, G., Emamdjomeh, Z., & Salami, M. (2024). Effect of ultrasonic assisted grafting on the structural and functional properties of mung bean protein isolate conjugated with maltodextrin through maillard reaction. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254, 127616.
 30. Bani Bayat, S. (2018). Nanoencapsulation of anthocyanin-containing extract to increase its stability for use in the food industry as a natural pigment, *First International Congress and Exhibition of New Sciences and Technologies, Babylon*, <https://civilica.com/doc/821939>.
 31. Soliman, T. N., El-Dein, A. N., Abd Al-Diam, S., Allayeh, A., Awad, H., & Flef, N. S. (2024). Characterization of C-phycocyanin antioxidant, anti-

- inflammatory, anti-tumour, and anti-HCoV-229E activities and encapsulation for implementation in an innovative functional yogurt. *Heliyon*, 10(11).
32. Buecker, S., Grossmann, L., Loeffler, M., Leeb, E., & Weiss, J. (2022). Thermal and acidic denaturation of phycocyanin from *Arthrospira platensis*: Effects of complexation with λ -carrageenan on blue color stability. *Food Chemistry*, 380, Article 132157. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132157>.
33. Ojagh, S. M., & Hasani, S. (2018). Characteristics and oxidative stability of fish oil nano-liposomes and its application in functional bread. *Journal of Food measurement and Characterization*, 12, 1084-1092.
34. Rasti, B., Jinap, S., Mozafari, M. R., & Abd ul Rahman, R. (2012). Encapsulation of polyphenols – a review. *Food Research International*, 48(1), 456-466.
35. Rodriguez-Amaya, D. B., Esquivel, P., & Meléndez-Martínez, A. J. (2023). Comprehensive update on carotenoid colorants from plants and microalgae: challenges and advances from research laboratories to industry. *Foods*, 12(22), 4080.
36. Yan, M., Liu, B., Jiao, X., & Qin, S. (2014). Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties. *Food and bioproducts processing*, 92(1), 89-97.
37. Li, Y., Li, X., Liang, Z. P., Chang, X. Y., Li, F. T., Wang, X. Q., & Lian, X. J. (2022). Progress of microencapsulated phycocyanin in food and pharma industries: A review. *Molecules*, 27(18), 5854.
38. Al-Malki, A. (2020). In vitro cytotoxicity and pro-apoptotic activity of phycocyanin nanoparticles from *Ulva lactuca* (Chlorophyta) algae. *Saudi J. Bio. Sci.* 27, 894-898.
39. Husain, A., Farooqui, A., & Khanam, A. (2022). Physicochemical characterization of Cphycocyanin from *Plectonema* sp. and elucidation of its bioactive potential through in silico approach. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 67 (4), 68–82. <https://doi.org/10.14715/cmb/2021.67.4.8>.
40. Paramanya, A., Abiodun, A. O., Ola, M. S., & Ali, A. (2024). Enhancing the quality and antioxidant capacity of phycocyanin extracted from *Spirulina platensis* PCC 7345: A quality-by-design approach. *Arabian Journal of Chemistry*, 17(3), 105653.
41. Golmakani, M. T., Kiani, F., Hajjari, M. M., Sharif, N., Fazaeli, M., & Hosseini, S. M. H. (2023). Electrospun zein incorporating phycocyanin and *Spirulina* extract: Fabrication, characterization and potential application. *LWT*, 188, 115-408.
42. Belen Garcia, A., Longo, E., & Bermejo, R. (2021). The application of a phycocyanin extract obtained from *Arthrospira platensis* as a blue natural colorant in beverages. *Journal of Applied Phycology*, 33, 3059-3070.
43. Chen, H., Qi, H., & Xiong, P. (2022). Phycobiliproteins-a family of algae-derived biliproteins: productions, characterization and pharmaceutical potentials. *Marine Drugs*, 20(7), 450.
44. Rigi, M., Ojagh, S. M., Alishahi, A. R., & Hasani, Sh. (2022). Extraction of phycocyanin from spirulina microalgae and evaluation of the stability of nanoliposomes incorporated with pigment against environmental conditions. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 11(1), 17-30.
45. Takeungwongtrakul, S., Benjakul, S., & Aran, H. (2016). Characteristics and oxidative stability of bread fortified with encapsulated shrimp oil. *Ital. J. Food Sci.* 27(4), 476-86.
46. Teixé-Roig, J., Oms-Oliu, G., Ballesté-Muñoz, S., Odriozola-Serrano, I., & Martín-Belloso, O. (2022). Encapsulation and controlled release of phycocyanin during the in vitro digestion using polysaccharide-added double emulsions (W1/O/W2). *Food Structure*, 31, 100249.
47. Qiao, B. W., Liu, X. T., Wang, C. X., Song, S., Ai, C. Q., & Fu, Y. H. (2022). Preparation, characterization and antioxidant properties of phycocyanin complexes based on sodium alginate and lysozyme. *Frontiers in Nutrition*, 9, 890942.