*Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*

**Online ISSN: 2345-427X**
**Print ISSN: 2345-4288**

# Extraction of phycocyanin from *spirulina* microalgae and evaluation of the stability of nanoliposomes incorporated with pigment against environmental conditions

**Mahin Rigi[1] | Seyed Mahdi Ojagh[*2] | Alireza Alishahi[3] | Shirin Hasani[4]**

1. Ph.D. Student of Sea Food Processing, Faculty of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: mahin.rigi@uoz.ac.ir
2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Sea Food Processing, Faculty of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: mahdi_ojagh@yahoo.com
3. Associate Prof., Dept. of Sea Food Processing, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: alishahi@gau.ac.ir
4. Ph.D. Graduate of Sea Food Processing, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: shirin.hasani88@gmail.com

**Article Info**

**Article type:**
Full Length Research Paper

**Article history:**
Received: 11.22.2021
Revised: 12.09.2021
Accepted: 12.14.2021

**Keywords**:
Morphology,
Nanoliposomes,
Phycocyanin,
*Spirulina platensis*,
Stability

**ABSTRACT**

The encapsulation technique in lipid nanocarriers can be an effective way to resolve the limitations in the utilization of phycocyanin pigment extracted from *Spirulina platensis* due to special taste and odor, high sensitivity of these compounds, and undesirable color in products. Therefore, in the present study, phycocyanin was extracted from *Spirulina platensis* and its concentration was investigated. Nanoliposomes with chitosan coating (0 and 1% w/v) containing pigment were prepared and its physicochemical properties, morphology, and stability to different environmental conditions (relative humidity, temperature, and light) were evaluated. The mean size of nanoliposomes and polydispersity index ranged from 322.21 to 426.31 nm and from 0.27 to 0.28 in nanocarriers, respectively. The highest values of encapsulation efficiency of nanoliposome containing phycocyanin (81.4%) were obtained under optimal conditions in nanoliposomes with chitosan coating. Evaluation of the stability of liposomes against light, relative humidity, and different temperatures over storage showed an increase in the stability of phycocyanin encapsulated in lipid carriers and chitosan as a liposome coating increased the stability and controlled release of phycocyanin.

Cite this article: Rigi, Mahin, Ojagh, Seyed Mahdi, Alishahi, Alireza, Hasani, Shirin. 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.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2021.19704.1620
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا آنلاین: ۲۳٤٥-٤۲۷X
شاپا چاپی: ۲۳٤٥-٤۲۸۸

# استخراج فیکوسیانین از جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس و ارزیابی پایداری نانولیپوزوم‌های حامل رنگدانه در برابر شرایط محیطی

مهین ریگی[۱] | سید مهدی اجاق*[۲] | علی‌رضا عالیشاهی[۳] | شیرین حسنی[٤]

۱. دانشجوی دکتری فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.
رایانامه: mahin.rigi@uoz.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، دانشیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.
رایانامه: mahdi_ojagh@yahoo.com

۳. دانشیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.
رایانامه: alishahi@gau.ac.ir

٤. دانش‌آموخته دکتری فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.
رایانامه: shirin.hasani88@gmail.com

**اطلاعات مقاله**

**نوع مقاله:**
مقاله کامل علمی- پژوهشی

**تاریخ دریافت:** ۱٤۰۰/۰۹/۰۱
**تاریخ ویرایش:** ۱٤۰۰/۰۹/۱۸
**تاریخ پذیرش:** ۱٤۰۰/۰۹/۲۳

**واژه‌های کلیدی:**
اسپیرولینا *پلاتنسیس*،
پایداری،
فیکوسیانین،
مورفولوژی،
نانولیپوزوم

**چکیده**

تکنیک درون‌پوشانی در نانوحامل‌های لیپیدی می‌تواند روشی کارآمد برای برطرف نمودن محدودیت‌های موجود در استفاده از رنگدانه فیکوسیانین مستخرج از ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* به دلیل طعم و بوی خاص، حساسیت بالای این ترکیبات و ایجاد رنگ نامطلوب در محصولات باشد. بنابراین، در مطالعه حاضر رنگدانه فیکوسانین از جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* استخراج و غلظت آن مورد بررسی قرار گرفت. نانولیپوزوم‌های حاوی رنگدانه با پوشش کیتوزان (۱ درصد) و فاقد پوشش تهیه شد و خصوصیات فیزیکوشیمیایی، مورفولوژی و پایداری آن نسبت به شرایط مختلف محیطی (رطوبت، دما و نور) ارزیابی گردید. میانگین اندازه نانولیپوزوم‌ها و شاخص پراکندگی به‌ترتیب از محدودخ ۳۲۲/۲۱ تا ٤۲٦/۳۱ نانومتر و ۰/۲۷ تا ۰/۲۸ در نانوحامل‌ها متغیر بود. بالاترین مقادیر راندمان نانوپوشانی نانولیپوزوم حاوی فیکوسیانین (۸۱/٤ درصد) تحت شرایط بهینه در نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان به‌دست آمد. ارزیابی ثبات لیپوزوم‌ها در برابر نور، رطوبت نسبی و دماهای مختلف نگهداری طی زمان بیانگر افزایش پایداری فیکوسیانین محصور شده در نانوحامل‌های لیپیدی بوده و کیتوزان به عنوان پوشش لیپوزوم، سبب افزایش ثبات و کنترل انتشار پایدار فیکوسیانین گردید.

**استناد**: ریگی، مهین، اجاق، سید مهدی، عالیشاهی، علی‌رضا، حسنی، شیرین (۱۴۰۱). استخراج فیکوسیانین از جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس و ارزیابی پایداری نانولیپوزوم‌های حامل رنگدانه در برابر شرایط محیطی. *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۱ (۱)، ۳۰-۱۷.
DOI: 10.22069/japu.2021.19704.1620

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

## مقدمه

تقاضا برای تولید و توسعه فرآورده‌های غذایی سلامتی‌بخش باعث توجه هرچه بیش‌تر به منابع طبیعی نوین گردیده است. ریزجلبک‌ها به‌علت دارا بودن ترکیبات زیست‌فعال منحصر به فرد، جزء غذاهای فراسودمند به شمار می‌آیند. اسپیرولینا منبع غنی از پروتئین با کیفیت و قابلیت هضم بالا (حاوی ۶۰-۵۵ درصد اسیدهای آمینه)، انواع ویتامین‌ها مانند A، E، ویتامین‌های گروه B و مواد معدنی چون کلسیم، آهن، منیزیوم، پتاسیم، روی و سلنیوم، اسیدهای چرب ضروری امگا-۳، امگا-۶ و گاما لینولنیک اسید (GLA[1])، رنگدانه‌های فتوسنتزی مانند کاروتنوئیدها و کلروفیل، بتاکاروتن، فیکوسیانین، لوتئین و حاوی سایر ترکیبات منحصر به فرد با خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی می‌باشد (ینگ و همکاران، ۲۰۱۶؛ دوی و همکاران، ۲۰۱۸)

یکی دیگر از دلایل علاقه‌مندی به ریزجلبک‌ها فعالیت‌های ضد قارچی و ضد ویروسی آن‌ها می‌باشد، که عمدتاً در جلبک‌های سبزآبی دیده می‌شود (بهشتی‌پور و همکاران، ۲۰۱۳). در تمامی مطالعات انجام شده پارامترهای رنگ و طعم محصول نهایی در حضور زیست‌توده اسپیرولینا، شامل محدودیت‌هایی بوده و تنها استفاده از مقادیر اندک از این ریزجلبک مقبولیت و پذیرش مصرف‌کنندگان را در پی داشت. یکی از رویکردهای مناسب، استفاده از مولکول‌های زیستی مؤثر به جای استفاده از کل زیست‌توده است. استخراج مولکول‌های زیستی و ترکیباتی چون اسیدهای چرب چند غیراشباع، رنگدانه‌ها و انواع ترکیبات با خاصیت آنتی‌اکسیدانی به عنوان جایگزین افزودنی‌های شیمیایی و سایر مکمل‌ها یکی از روش‌های نوین در خصوص به‌کارگیری ترکیبات زیست‌فعال موجود در آن‌هاست (دانشی و همکاران، ۲۰۱۰). تأثیر زیست‌توده ریزجلبکی در سیستم‌های غذایی تحت‌تأثیر شرایط فرآوری، نوع و شدت فرآیند (مکانیکی و حرارتی) و برهم‌کنش با سایر ترکیبات مواد غذایی قرار دارد. علاوه بر ویژگی‌های تغذیه‌ای و ایجاد رنگ، افزودن ریزجلبک‌ها به سیستم‌های غذایی نقش مؤثری در ویژگی‌های رئولوژیک فراورده نهایی ایفا می‌کند، بنابراین توجه به برهم‌کنش آن‌ها در سیستم‌های غذایی و ارزیابی فیزیکوشیمیایی ریزساختاری امری ضروری به نظر می‌رسد.

جلبک سبزآبی *اسپیرولینا پلاتنسیس*[2] علاوه بر کاربرد در صنایع غذایی، به‌عنوان تولیدکننده رنگدانه آبی نیز دارای اهمیت بوده که ناشی از وجود فیکوسیانین می‌باشد. گرایش به استفاده تجاری از فیکوسیانین، به دلیل ماهیت پروتئینی و روش‌های آسان استخراج آن می‌باشد. از این‌رو به‌کارگیری فیکوسیانین جهت افزایش امنیت غذایی همواره مدنظر می‌باشد. هم‌چنین، فیکوسیانین به‌دلیل دارا بودن خصوصیات منحصر به فرد در پیشگیری ودرمان انواع بیماری‌ها و نیز ویژگی آنتی‌اکسیدانی بالا، به‌عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی در انواع فرآورده‌ها قابلیت استفاده داشته است. هم‌چنین فساد اکسیداسیونی را به تاخیر انداخته و از این طریق مدت ماندگاری مواد غذایی را افزایش می‌دهد.

با این وجود، استفاده از فیکوسیانین در غذا با محدودیت‌هایی مانند؛ حساسیت بالای این ترکیبات به حرارت، نور، واکنش‌های شیمیایی و اکسیداسیون، فراریت و تخریب آن‌ها در طول فرآوری و نگهداری، توزیع ناهمگن مواجه شود. هم‌چنین عطر و طعم آن‌ها ممکن است سبب تغییراتی در خواص حسی محصول غذایی گردد (اسبهانی و همکاران، ۲۰۱۵). بر این اساس، درون‌پوشانی ترکیبات زیست‌فعال موجود در ریزجلبک در مقیاس نانو می‌تواند روش مناسبی

1- Gama-Linoleic acid

2- *Spirulina platensis*

به‌منظور متعادل ساختن طعم و بو و جلوگیری از تخریب سریع آن باشد. اخیراً، جایگزینی و یا افزودن نانو ذرات و نانو کپسول‌ها به عنوان یک تغییر ساده در فرمولاسیون مواد غذایی در نظر گرفته می‌شود، که به‌طور بالقوه می‌تواند کارایی بهتری به حالت معمول ایجاد کند (سوزا و همکاران، ۲۰۱٤). یکی از انواع حامل‌های لیپیدی که برای درون‌پوشانی مواد زیست‌فعال و غذا- دارو استفاده می شود، لیپوزوم‌ها می‌باشد.

لیپوزوم‌ها وزیکول‌های کلوئیدی متشکل از لیپیدهای قطبی به ویژه فسفولیپیدها بوده که در حضور مولکول‌های آب ساختارهای کروی دولایه ای را ایجاد می‌کنند (قربانزاده و همکاران، ۲۰۱۷). این ترکیبات به دلیل خاصیت آمفی‌فیلیک توانایی کپسوله کردن طیف وسیعی از ترکیبات آبدوست، چربی‌دوست و آمفی‌فیل را دارند. با این وجود از آن‌جایی‌که سیستم‌های تحویل مبتنی بر لیپید به دلیل کم ثباتی آن‌ها در محیط اسیدی نمک‌های صفراوی و لیپاز معده مناسب نمی‌باشند (پگ و کودمور، ۲۰۰۱). استفاده از سیستم‌های پلی‌مری چسبنده مخاطی مانند کیتوزان مهم‌ترین گام در جهت افزایش تحویل لیپوزومی ترکیبات زیست‌فعال به شکل خوراکی می‌باشد. به‌طوری‌که ثبات حامل لیپوزومی و راندمان جذب در دستگاه گوارش می‌تواند تا حدود زیادی توسط یک لایه پوشش کیتوزانی افزایش یابد که می‌توان به اتصال کیتوزان و لیپوزوم از طریق واکنش‌های الکترواستاتیک بین گروه‌های کاتیونی کیتوزان و گروه‌های آنیونی فسفولیپید نسبت داد. اهمیت موجودات دریایی به‌عنوان منبعی از ترکیبات زیست‌فعال غیرقابل انکار است (رمضان‌زاده و همکاران، ۲۰۱۸). به‌علاوه، ارتقاء سطح آگاهی مصرف‌کنندگان از ارتباط بین رژیم غذایی و سلامت، تقاضا برای مواد غذایی فراسودمند و غذا- داروها را افزایش داده است. نقش غذا به‌عنوان عاملی برای بهبود سلامتی سبب تولید نسل جدیدی از غذاها تحت عنوان غذاهای فراسودمند گردید، که موجب بهبود شرایط عمومی بدن و کاهش خطر ابتلا به بیماری می‌گردد. در حال حاضر ترکیبات زیست‌فعال به عنوان اجزای طبیعی و یا به عنوان مکمل در مواد غذایی با پتانسیل بهبود سلامت، ارزش تغذیه‌ای فراتر از محصول ارائه می‌دهند (سگورا- کامپوس، ۲۰۱۱). سوزی و همکاران (۲۰۱۵) میزان پایداری فیکوسیانین استخراج شده از ریزجلبک اسپیرولینا را ارزیابی کرده و نشان دادند پایداری این آنتی‌اکسیدان با تغییرات دما و pH تحت‌تأثیر قرار می‌گیرد. آن‌ها دریافتند ریزپوشانی این ترکیبات در آلژینات و کیتوزان به روش اکستروژن سبب افزایش پایداری رنگدانه گردید.

با توجه به خصوصیات منحصر به فرد دارویی و تغذیه‌ای فیکوسیانین، در پژوهش حاضر استخراج فیکوسیانین از جلبک اسپیرولینا و امکان تولید و ارزیابی نانولیپوزوم‌های حامل رنگدانه با پایداری بالا در شرایط مختلف محیطی برای غلبه بر چالش‌های موجود در مسیر استفاده از این ترکیبات ارزشمند در صنایع غذایی و دارویی، مورد توجه قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* از بانک ملی جلبک ایران (شیراز) خریداری گردید. روغن آفتابگردان از بازار محلی تهیه شد. لسیتین سویا و گلیسرول از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد. کیتوزان با وزن مولکولی پایین (۵۰-۱۹۰ کیلودالتون) و (درجه داستیلاسیون ۸۵-۷۵ درصد) از شرکت سیگما آلدریچ (آمریکا) و سایر مواد شیمیایی موردنیاز با درجه خلوص بالا از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. برای تهیه و آماده‌سازی تمام محلول‌ها از آب دیونیزه استفاده شد.

**استخراج و خالص‌سازی فیکوسیانین:** به منظور استخراج رنگدانه از روش اولتراسوند استفاده شد. بدین‌ترتیب که ابتدا ۲ گرم از توده خشک اسپیرولینا به ٤٠ میلی‌لیتر از بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار اضافه شد و با قرار دادن بر روی هیتر مگنت (به مدت ۳۰ دقیقه)، سوسپانسیون هموژنی از آن تهیه شده و جهت انجام فرآیند استخراج آماده گردید. در روش اولتراسوند، سوسپانسیون حاوی جلبک به مدت ۱۰ دقیقه و با فرکانس ۲۰ کیلوهرتز سونیکه شد (پراباکاران و راویندران، ۲۰۱۳). پس از انجام فرآیند، نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت تکان داده شد. پس از انجام مراحل فوق، نمونه‌ها با ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ (مدل Z323K، Hermle، ساخت آلمان) شده و مایع رویی (رنگ آبی تیره) برای اندازه‌گیری رنگدانه جمع‌آوری شدند (صفری و همکاران، ۲۰۲۰). به منظور خالص‌سازی نسبی فیکوسیانین از سولفات امونیوم با درجه اشباعیت ٤٠ درصد استفاده شد. این ماده به آرامی به محلول حاوی فیکوسیانین اضافه شده و به مدت یک ساعت هم‌زده شد. نمونه در مکان تاریک و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه‌روز قرار داده شد. سپس نمونه تحت فرآیند سانتریفوژ (g۱۵۰۰۰، ۱۵ دقیقه) قرار گرفت. مایع بی‌رنگ حاصل از سانتریفوژ دور ریخته شد و به رسوب آبی‌رنگ کمی محلول بافر فسفات (pH=۷) اضافه شد و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (ماری‌لیما و همکاران، ۲۰۱۰).

**محاسبه غلظت فیکوسیانین:** برای محاسبه غلظت فیکوسیانین، جذب نوری محلول در طول موج‌های ٦٢٠ و ٦٥٢ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل 6800 UV/VIS، شرکت Jenway، ساخت آلمان) قرائت شده و غلظت فیکوسیانین بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر طبق رابطه زیر محاسبه گردید (کومار و همکاران، ٢٠١٤).

$$\text{C-PC} = \frac{\text{A620}-0.474\times\text{A652}}{5.34} \qquad (۱)$$

که در آن، C-PC mg/ml غلظت فیکوسیانین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، A620 جذب در طول موج ٦٢٠ نانومتر، A652 جذب در طول موج ٦٥٢ نانومتر، عدد ثابت: ٥/٣٤.

جهت تعیین مقدار فیکوسیانین بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن خشک جلبک از رابطه زیر استفاده گردید (سیلوریا و همکاران، ۲۰۰۷)

$$= \frac{\text{C}-\text{PC}-V}{\text{DB}} \qquad (۲)$$

مقدار فیکوسیانین بر حسب میلی‌گرم بر وزن خشک

که در آن، V حجم حلال، DB وزن خشک جلبک (گرم)

**تهیه نانولیپوزوم حاوی فیکوسیانین:** نانولیپوزوم‌های حاوی رنگدانه فیکوسیانین با اندکی تغییرات بر اساس روش راستی و همکاران (۲۰۱۲) تهیه شدند. ابتدا لسیتین و روغن آفتابگردان در یک حمام حرارتی (۳۰ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند تا اطمینان حاصل شود که لسیتین به‌طور کامل در روغن حل شده است. سپس رنگدانه به مخلوط لسیتین-روغن اضافه شده در حالی‌که به‌طور مداوم بر روی هیتر مخلوط گردید. محلول با افزودن آب دیونیزه و گلیسرول (غلظت نهایی ۲ درصد حجمی/حجمی، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد) هیدراته شد و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه همگن شد. لیپوزوم‌های بدون پوشش و پوشش داده شده با کیتوزان (۱ درصد وزنی/حجمی) (محلول کیتوزان با حل‌شدن کیتوزان در اسید استیک ۱ درصد حجمی/حجمی تهیه گردید)

تحت فشار بالا همگن شدند. برای دستیابی به ذرات لیپوزوم با اندازه کوچک‌تر، سوسپانسیون لیپوزومی با استفاده از یک پروب (Sonicator, 200 UPS, Dr. Heischler, Germany) در یک حمام یخ (۷ دقیقه، ۱ ثانیه روشن و ۱ ثانیه خاموش) تحت امواج فراصوت قرار گرفت. در نهایت، نمونه‌ها در معرض گاز نیتروژن قرار گرفت و در نهایت، وزیکول‌های لیپیدی چندلایه‌ای با خشک کردن انجمادی تهیه گردید (راستی و همکاران، ۲۰۱۲).

## تعیین خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و ساختاری نانولیپوزوم‌ها

**اندازه نانوذرات، توزیع اندازه ذره‌ای (PDI[1]) و پتانسیل زتا:** اندازه ذره‌ای، توزیع اندازه ذره‌ای و پتانسیل زتای لیپوزوم‌ها پس از رقیق‌کردن نمونه به‌میزان ۱۰ برابر با بافر به روش تفرق نور پویا[2] توسط دستگاه زتاسایزر (شرکت Malvern، انگلستان) (Nano ZS) انجام شد.

**راندمان درون‌پوشانی (Encapsulation Efficiency):** به‌منظور تعیین کارایی درون‌پوشانی نانولیپوزوم‌های حاوی فیکوسیانین از روش غیرمستقیم (روش اولترافیلتراسیون توسط فالکون‌های فیلتردار ۵۰ میلی‌لیتر) استفاده شد. به این منظور مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر از نانولیپوزوم به قسمت فوقانی فیلتر اضافه شده، سپس درب فالکون کاملاً بسته شده و درون روتور دستگاه قرار داده شده و با سرعت ۱۲۰۰۰ g به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس مقدار مایع عبور داده شده از فیلتر جدا شد و مقدار جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (فتحی و همکاران، ۲۰۱۳).

درصد راندمان درون‌پوشانی مطابق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$EE\ (\%) = W_T\text{-}W_F/\ W_T \qquad (۳)$$

که در آن، $W_T$ معادل وزن کل فیکوسیانین به‌کار رفته در فرمولاسیون نانولیپوزوم، WF معادل مقدار فیکوسیانین آزاد در فاز فیلتر شده و WL معادل وزن لیپید به‌کار رفته در فرمولاسیون می‌باشد.

**بررسی مورفولوژی نانولیپوزوم‌ها:** بررسی سطوح خارجی و مورفولوژی سطحی نانولیپوزوم تولید شده با تهیه تصویر توسط میکروسکوب الکترونی روبشی (SEM[3]) (مدل KYKY-EM3200، KYKY، چین) صورت گرفت. بدین‌منظور نمونه‌ها روی استاب‌های آلومینیومی دستگاه ثابت شده و با استفاده از طلا: پالادیوم (۴۰:۶۰) پوشانده شدند. جهت بررسی شکل و ویژگی‌های سطحی (شکستگی، فرورفتگی، چین‌خوردگی و غیره) از سطح نانولیپوزوم‌ها تصویر تهیه گردید.

**ثبات نانولیپوزوم‌های حامل رنگدانه:** تأثیر عوامل محیطی از جمله رطوبت نسبی (۰ و ۲۵ درصد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی)، نور (زیر هود مجهز به دو لامپ ۴۰ وات) و دما (۴۰ درجه سانتی‌گراد و ۶۰ درجه سانتی‌گراد بدون نور) بر پایداری رنگدانه نانوپوشانی شده در طول نگهداری ارزیابی شد. میزان حفظ فیکوسیانین برابر با میزان فیکوسیانین باقی‌مانده پس از یک دوره نگهداری (۴۰ روز) در نانولیپوزوم‌ها به وزن اولیه فیکوسیانین در نانولیپوزوم‌ها می‌باشد. ارزیابی میزان ثبات نانولیپوزوم‌ها به فاصله هر پنج روز یکبار در نظر گرفته شد (یان و همکاران، ۲۰۱۴).

1- Particle dispersity index
2- Dynamic light scattering
3- Scanning electron microscope

**تجزیه و تحلیل آماری:** جهت بررسی حاضر برای هر یک از تیمارها، سه تکرار در نظر گرفته شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها، از تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و هم‌چنین برای تعیین وجود تفاوت معنی‌دار بین مقادیر میانگین تیمارهای مختلف از آزمون دانکن در سطح P≤۰/۰۵ استفاده شد. همه تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار SPSS 26 و رسم نمودارهای موجود با استفاده از نرم‌افزار Excel 2019 انجام پذیرفت.

## نتایج و بحث

**غلظت فیکوسیانین:** میزان غلظت فیکوسیانین استخراج شده به روش اولتراسوند ۰/۰۸± ۲/۸٤ میلی‌گرم در گرم تعیین گردید. در روش اولتراسوند، به‌دنبال استفاده از امواج اولتراسونیک، سلول‌های جلبک متلاشی شده و متابولیت‌های مختلف آزاد می‌شوند. روش اولتراسوند مشابه روش‌های انجماد و حلال معدنی، به‌طور غیرانتخابی عمل کرده در نتیجه در عصاره به‌دست آمده علاوه بر فیکوسیانین رنگدانه‌های دیگر مثل آلوفیکوسیانین، فیکواریترین، زئاگزانتین، آستاگزانتین، لوتئین و کلروفیل نیز وجود دارند (یو و همکاران، ۲۰۱٦). مطالعات مختلفی در خصوص استخراج رنگدانه‌های جلبکی به‌خصوص فیکوسیانین و بهره‌گیری از روش‌های مختلف اولتراسوند، ترکیبی از اولتراسوند و غوطه‌وری در حلال آلی، اولتراهموژنیزاسیون، انجماد و انجمادزدایی، سیال فوق بحرانی، ماکروویو، حلال‌های آلی و معدنی انجام شده است (یو و همکاران، ۲۰۱٦). نتایج آن‌ها نشان داد که روش اولتراسوند دارایی کارآیی بالاتری بوده و بعد از آن روش انجماد و انجمادزدایی قرار داشته که نتایج روش اولتراسوند با مطالعه حاضر همخوانی داشته است.

**ارزیابی فیزیکوشیمیایی نانولیپوزوم‌های حامل رنگدانه**

**بررسی اندازه ذرات و شاخص پراکندگی (PDI):** میانگین اندازه ذرات در نانولیپوزوم‌های پوشش‌دهی شده با کیتوزان و فاقد پوشش بین ۳۲۲/۲۱ تا ٤۲٦/۳۱ نانومتر متغیر بود. هم‌چنین شاخص پراکندگی در نانولیپوزوم‌ها از ۰/۲۷ تا ۰/۲۸ متغیر بود که نشان‌دهنده پراکندگی کم‌تر و همگن بودن اندازه ذرات می‌باشد. مقادیر PDI نانوذرات در محدوده ۰ تا ۱ گزارش شده است به‌طوری‌که مقادیر بیش‌تر از ۰/۵ منعکس‌کننده پراکندگی وسیع اندازه ذرات است (حسنی و همکاران، ۲۰۱۸). این پژوهش نشان داد که PDI همه نانولیپوزوم‌ها دارای توزیع اندازه یکنواختی است که حاصل تولید موفقیت‌آمیز نانولیپوزوم و نمونه‌های پوشش داده شده با کیتوزان است. بر اساس نتایج، استفاده از کیتوزان (۱ درصد) در نانولیپوزوم‌ها در مقایسه با تیمارهای فاقد کیتوزان، اندازه کوچک‌تری را نشان داد. با توجه به نتایج به نظر می‌رسد استفاده از کیتوزان در ساختار نانولیپوزوم‌ها باعث ایجاد نیروهای انقباضی توسط کشش یونی می‌شود. هم‌چنین، مطالعات پیشین نشان دادند ترکیبات مختلف دیواره و تکنیک ریزپوشانی فاکتورهای مؤثر بر اندازه ذرات و مورفولوژی کپسول‌ها است (هاندر و همکاران، ۲۰۱۵؛ کورتس-کامارگو و همکاران، ۲۰۱۷).

**ارزیابی راندمان نانوپوشانی نانولیپوزوم‌های حامل رنگدانه:** راندمان درون‌پوشانی نانولیپوزوم‌ها در جدول ۱ مقادیر ۷۳/٦±۲/۲٤ و ۸۱/۲±٤/۲۰ را به‌ترتیب در نانولیپوزوم فاقد پوشش و دارای پوشش کیتوزان نشان می‌دهد. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، بین لیپوزوم‌های پوشش داده شده با کیتوزان و لیپوزوم فاقد پوشش تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵) که به وضوح نشان می‌دهد که

کیتوزان توانایی بالایی در کپسوله کردن ترکیبات فعال زیستی موجود در عصاره‌های فنلی دارد. مقادیر راندمان درون‌پوشانی نانولیپوزوم‌ها بسته به ترکیبات دیواره، نسبت فسفولیپید/هسته/پلی‌مر، روش کپسوله‌سازی و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی مانند ویسکوزیته و اندازه ذرات لیپوزوم‌ها می‌تواند از ۰ درصد تا بیش از ۹۵ درصد متغیر باشد (توکلی و همکاران، ۲۰۱۸). یافته‌های مشابهی توسط سوزری و همکاران (۲۰۱۷) در ریزپوشانی فیکوسیانین با کیتوزان گزارش شده و نتایج نشان داد که کیتوزان در غلظت ۳ درصد دارای بیش‌ترین راندمان ریزپوشانی بوده که نتایج پژوهش فوق با مطالعه حاضر کاملاً همخوانی دارد. کیتوزان به لحاظ داشتن ساختمان کاملاً فشرده، علاوه بر داشتن ویسکوزیته بالا، باعث افزایش پایداری فیکوسیانین در مقایسه با تیمار شاهد می‌گردد.

**جدول ۱- خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش و پوشش‌دهی شده با کیتوزان حامل رنگدانه.**

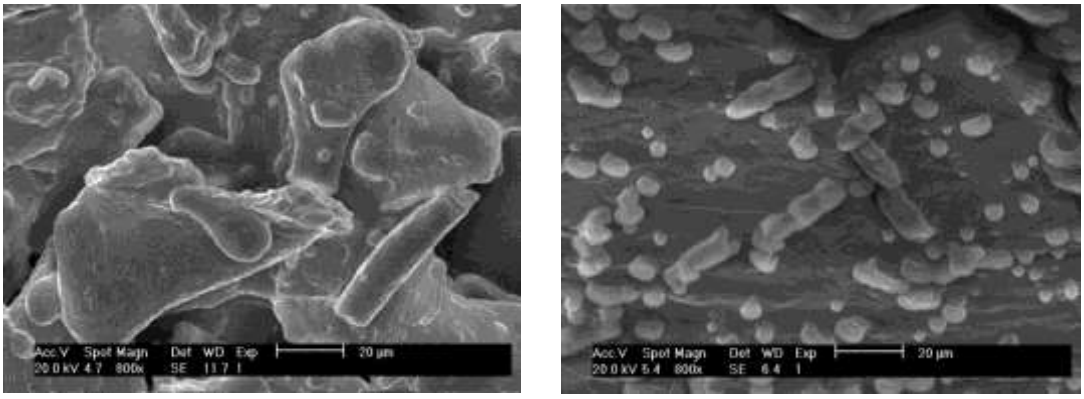
| تیمارها | راندمان درون‌پوشانی (درصد) | میانگین اندازه ذرات (نانومتر) | شاخص پراکندگی | پتانسیل زتا (میلی‌ولت) |
|---|---|---|---|---|
| نانولیپوزوم فاقد پوشش کیتوزان | ۷۳/٦±۲/۲٤$^{b}$ | ٤۲٦/٦±۳۱/۷۱$^{a}$ | ۰/۰±۲۸/۰۰$^{a}$ | -۱٤/۲±۸/٤٥$^{b}$ |
| نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان | ۸۱/۲±٤/۲۰$^{a}$ | ۳۲۲/۳±۲۱/۲۰$^{b}$ | ۰/۰±۲۷/۰۱$^{a}$ | ۳۱/٥±٤/۸۰$^{a}$ |

داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار است

حروف کوچک در هر ستون نشان‌دهنده معنی‌داری بین تیمارهای مختلف می‌باشد

**ارزیابی پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌های حامل رنگدانه:** پتانسیل زتا بهترین شاخص برای تعیین وضعیت الکتریکی سطحی سیستم‌های کلوئیدی است. مقادیر پتانسیل زتا در نانولیپوزوم‌های حاوی فیکوسیانین به‌ترتیب ۲/٤٥±۱٤/۸- و ٥/۸±۳۱/٤ میلی‌ولت در فرمولاسیون‌های لیپوزوم فاقد پوشش و لیپوزوم پوشش‌دهی شده با کیتوزان بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده، پایداری نانولیپوزوم‌های تهیه شده با پوشش کیتوزان بیش‌تر از سایر نانولیپوزوم‌ها می‌باشد که نشان‌دهنده نقش نیروهای مقاومت الکترواستاتیک در پایداری نانوکپسول‌ها و مانع از تجمع در طول زمان می‌باشد. نتایج نشان داد که بار سطحی لیپوزوم‌ها و واکنش یونی بین لیپوزوم‌ها و کیتوزان با حضور کیتوزان در نانولیپوزوم‌های پوشش داده شده به طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۱). کیتوزان در شرایط اسیدی به دلیل داشتن گروه‌های آمین آزاد دارای بار مثبت است (گوستینینتیاس و همکاران، ۲۰۲۰). پس از فرآیند پوشش، پیوندهای یونی بین این گروه‌ها و سطح لیپوزوم پتانسیل زتا را از منفی به مثبت تغییر می‌دهد.

**مورفولوژی سطحی نانولیپوزوم‌ها:** مورفولوژی سطحی نمونه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی گردید. شکل ۱ (الف و ب) تصاویر میکروسکوپ الکترونی را برای هر یک از نانولیپوزوم‌ها نشان می‌دهد. مطابق اشکال مذکور، ذرات نانو پوشانی‌شده با ابعاد مختلف در گسترش میکروسکوپی پراکنده بوده به‌طوری‌که ذرات در اندازه‌های مختلف قابل مشاهده می‌باشد.



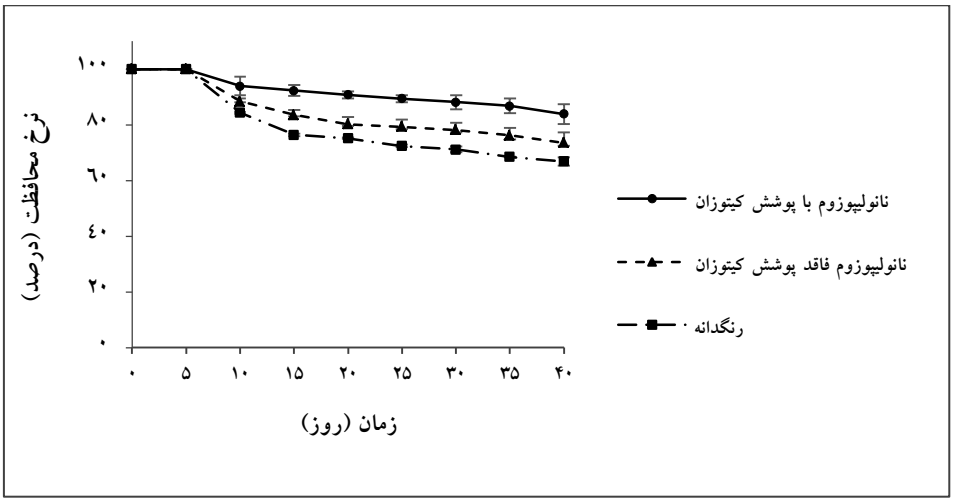

(ب) (الف)

**شکل ۱- ساختار سطحی پودرهای حاصل از نانوپوشانی فیکوسیانین (الف) نانولیپوزوم فاقد پوشش، (ب) نانولیپوزوم دارای پوشش کیتوزان توسط خشک‌کن انجمادی.**

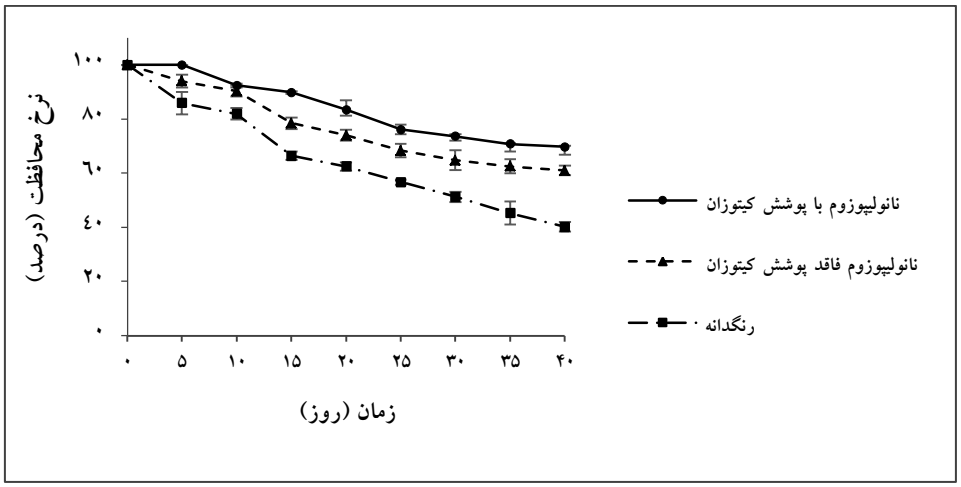
مطالعات پیشین گزارش کردند که به هنگام استفاده از خشک‌کن انجمادی جهت خشک کردن ترکیبات زیست‌فعال، به‌دلیل تصعید یخ در هنگام خشک کردن محصول، تولید حفره‌های ریزی بر روی سطح محصول شده و باعث تسریع روند اکسیداسیون در آن می‌شود (بلن گارسیا و همکاران، ۲۰۲۱). بنابراین باید پوشش‌هایی انتخاب شوند که بیش‌ترین حفاظت از هسته در برابر اکسیداسیون را داشته باشند. همان‌طور که در تصاویر مشاهده می‌گردد هیچ‌گونه حفره، ترک‌خوردگی و یا چین‌خوردگی ناشی از استرس‌های مکانیکی طی فرآیند خشک کردن، بر روی کپسول‌ها وجود نداشت.

## بررسی ثبات نانولیپوزوم‌های حامل رنگدانه طی دوره نگهداری

**اثر رطوبت نسبی محیط بر میزان ثبات نانولیپوزوم‌ها:** رطوبت نسبی به عنوان یک عامل مهم در کیفیت و ماندگاری محصول طی دوره ذخیره‌سازی در نظر گرفته می‌شود (پورناما و همکاران، ۲۰۲۰). شکل ۲ اثر رطوبت نسبی را بر ثبات فیکوسیانین آزاد و نانوپوشانی نشان می‌دهد. پس از ٤٠ روز ذخیره‌سازی در رطوبت نسبی صفر درصد، میزان حفظ فیکوسیانین در نانولیپوزوم پوشش‌دهی شده با کیتوزان، نانولیپوزوم فاقد پوشش و رنگدانه فیکوسیانین آزاد به ترتیب ۸۳/۸٤، ۷۳/٥٦ و ٦٦/۸ درصد گزارش گردید. در حالی‌که در رطوبت ۲٥ درصد میزان ثبات رنگدانه کاهش قابل‌ملاحظه‌ای داشت و در انتهای دوره نگهداری به ترتیب به ٦۹/۷۱، ٦۱ و ٤۰/۱٥ درصد رسید. با توجه به نتایج می‌توان دریافت که فیکوسیانین محصور و غیرمحصور شده باید در شرایط محیطی با رطوبت نسبی پایین حفظ شود. هم‌چنین با وجود پایداری بیش‌تر فیکوسیانین در نانولیپوزوم‌های با پوشش کیتوزان در رطوبت‌های نسبی صفر و ۲٥ درصد قابل توجه است که پوشش کیتوزان نقش مهمی در جلوگیری از ورود آب دارد که ممکن است مربوط به ساختار فشرده ناشی از اثر متقابل فسفولیپید و کیتوزان باشد. بااین‌حال، مقادیر بالاتری در میزان حفظ فیکوسیانین در نمونه‌های با پوشش کیتوزان در مقایسه با فیکوسیانین آزاد مشاهده شد، که احتمالاً به خصوصیت هیگروسکوپی کیتوزان نسبت داده می‌شود (یان و همکاران، ۲۰۱٤). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مواد دیواری نامحلول در آب برای محصورسازی فیکوسیانین مناسب‌تر است.




(الف)

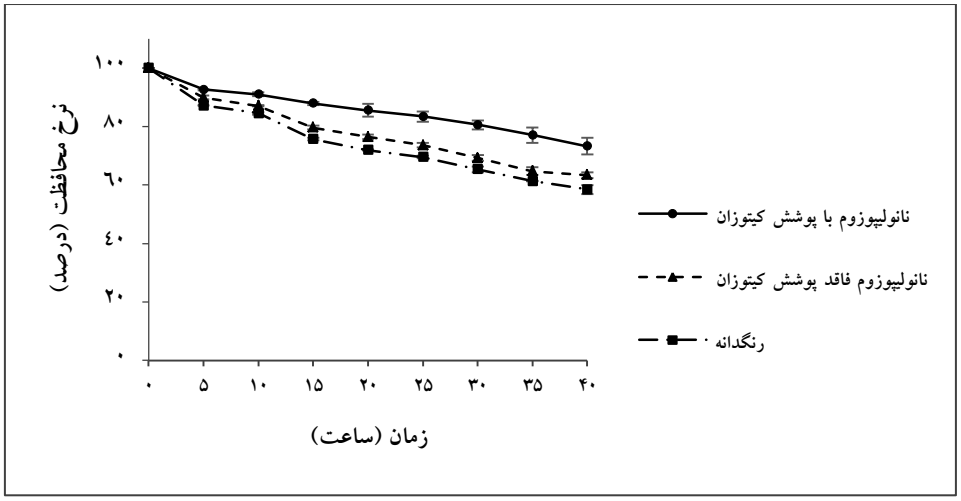



(ب)

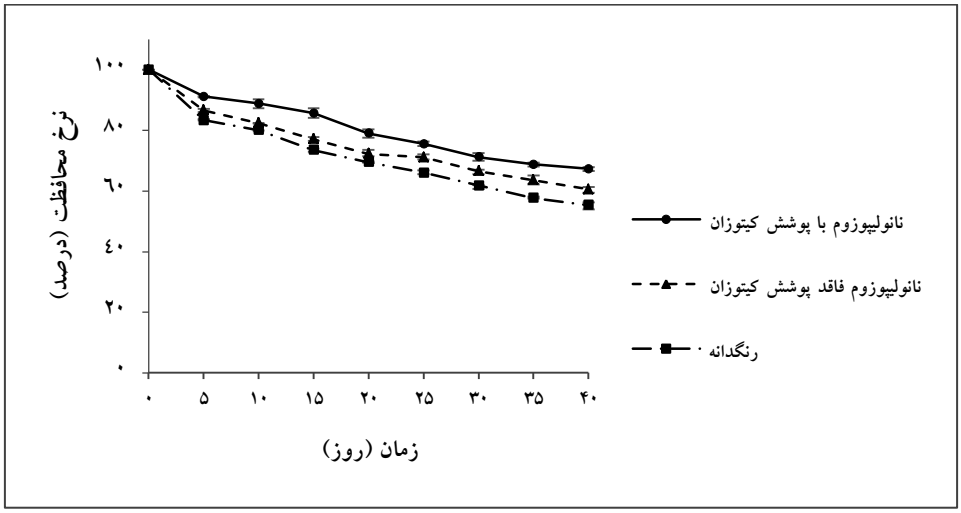
**شکل ۲- پایداری فیکوسیانین آزاد و نانوپوشانی شده در شرایط مختلف نگهداری (الف) اثر رطوبت نسبی صفر درصد، (ب) رطوبت نسبی ۲۵ درصد.**

**اثر دما بر میزان ثبات نانولیپوزوم‌ها:** یکی از روش‌های نگهداری مواد پروتیینی، قرار دادن آن در دمای انجماد بوده و در این شرایط کم‌ترین تغییرات در ساختار مولکولی پروتئین رخ می‌دهد. از این‌رو با افزایش نسبی دما، ساختمان پروتئین تحت‌تأثیر قرار گرفته و در نتیجه پایداری آن نیز کاهش می‌یابد. رنگدانه فیکوسیانین به لحاظ داشتن ماهیت پروتئینی به سرعت تحت‌تأثیر شرایط محیطی قرار خواهد گرفت. پژوهش‌گران دریافتند هنگامی که فیکوسیانین در دماهای بیش از ٤٥ تا ٧٥ درجه سانتی‌گراد قرار گیرد ساختار پروتئینی آن دناتوره شده و اگر این فرآیند غیرقابل برگشت باشد، پایداری آن کاهش می‌یابد. نتایج پژوهش حاضر بیانگر پایداری بیش‌تر فیکوسیانین نانوپوشانی شده در دماهای مورد استفاده، نسبت به فیکوسیانین آزاد، بوده ولی با این وجود تفاوت پایداری فیکوسیانین در دمای ٤٠ و ٦٠ درجه سانتی‌گراد در تمامی تیمارها معنی‌دار بوده است. هادییانتو و و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که پایداری فیکوسیانین کپسوله شده با پوشش آلژینات سدیم در دماهای ٤٥ تا ٥٥ درجه سانتی‌گراد بیش از

تیمار شاهد بوده و محصور نمودن فیکوسیانین ارتباط مستقیمی با پایداری حرارتی آن دارد. با افزایش دمای نگهداری، از ثبات و کیفیت ترکیبات با ماهیت پروتئینی کاسته شده و در دماهای بالاتر، با گسسته شدن پیوندهای بین و درون زنجیره‌ای، ساختار فضایی پروتئین تحت‌تأثیر قرار گرفته و دناتوره می‌شود (ایلتر و همکاران، ۲۰۲۱). بنابراین بین افزایش دما و تغییرات جذب نوری فیکوسیانین ارتباط معکوس وجود داشته و هرچه دما افزایش یابد روند تخریب فیکوسیانین در زمان کوتاه‌تری رخ خواهد داد. نتایج بیانگر آن بود که مولکول‌های کیتوزان به سطح لیپوزوم‌های پوشش‌دهی شده متصل می‌گردند و تشکیل پوسته‌ای سخت می‌دهند. در نتیجه غشای کپسول سخت‌تر و مقاوم شده و حساسیت پذیری آن نسبت به شرایط نامناسب محیطی مانند حرارت کاهش می‌یابد.



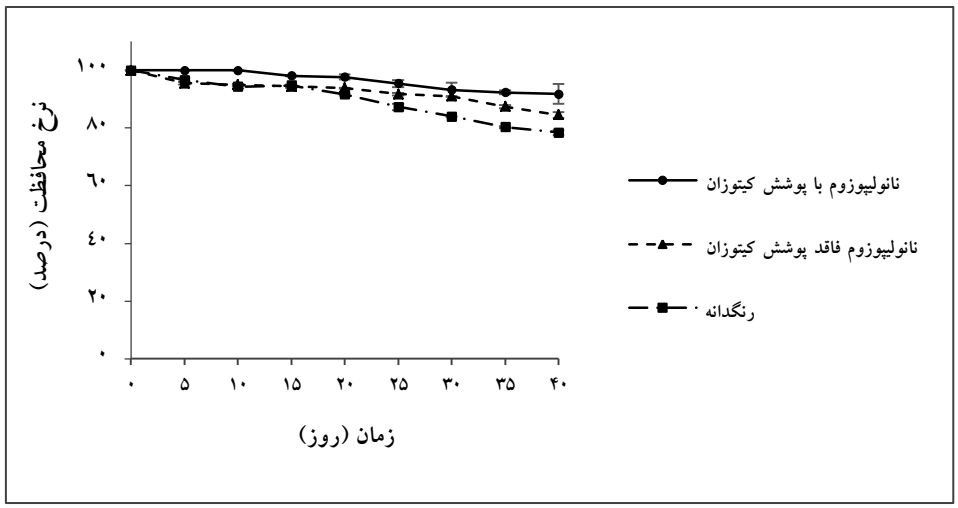

(الف)



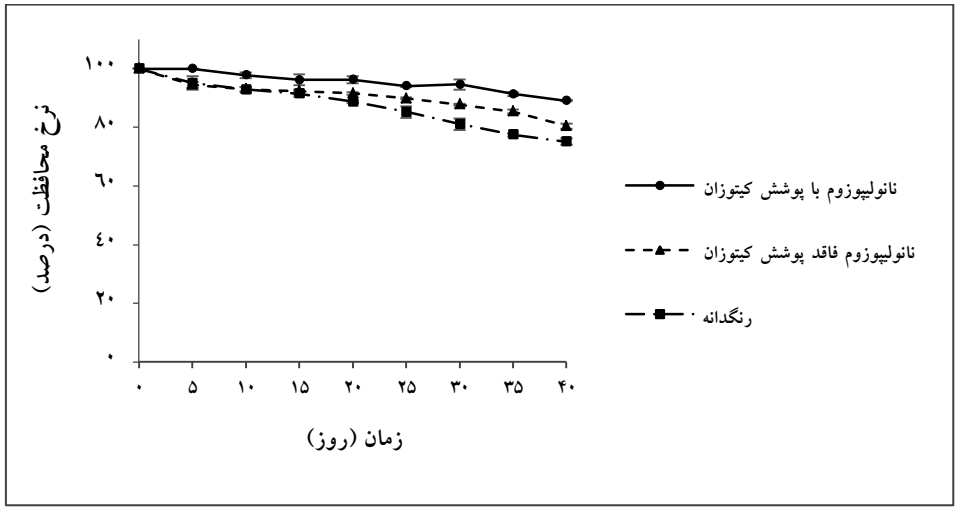

(ب)

**شکل ۳- پایداری فیکوسیانین آزاد و نانوپوشانی شده در دماهای مختلف نگهداری (الف) ٤٠ درجه سانتی‌گراد و (ب) ٦٠ درجه.**

**اثر نور محیط بر میزان ثبات نانولیپوزوم‌ها:** نتایج نشان داد که غلظت فیکوسیانین آزاد و نانوپوشانی شده با افزایش زمان نگهداری، روند کاهشی داشته و این مقادیر در حضور نور بیش‌تر از تاریکی بوده است (شکل ٤). همان‌طور که در شکل ٤ مشاهده می‌شود میزان کاهش در فیکوسیانین آزاد به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از فیکوسیانین نانوپوشانی‌شده بود و نمونه‌های پوشش‌دهی شده با کیتوزان مقاومت بیش‌تری نسبت به شرایط محیطی داشتند. یان و همکاران (۲۰۱٤) به تأثیر پارامترهای محیطی مثل نور بر پایداری رنگدانه فیکوسیانین اشاره داشته و بیان کردند که فرم محصور شده فیکوسیانین با کیتوزان و آلژینات، دارای پایداری بیش‌تری نسبت به فرم آزاد بوده که با مطالعه حاضر مطابقت داشت. مطالعات انجام شده به ویژگی‌های منحصر به فرد پوشش‌های مورد استفاده در فرآیند درون‌پوشانی و محافظت هسته در برابر شرایط محیطی اشاره نمودند. یان و همکاران (۲۰۱٤) دریافتند در فرایند درون‌پوشانی با پوشش‌های کامپوزیتی، درصد بازماندگی هسته در برابر نور و روشنایی در مقایسه با پوشش منفرد بیش‌تر بوده ولی با این وجود ماهیت پوشش از نظر ویسکوزیته نیز دارای اهمیت است.




(الف)




(ب)

**شکل ٤- پایداری فیکوسیانین آزاد و نانوپوشانی شده در شرایط مختلف نگهداری (الف) تاریکی و (ب) نور.**

## نتیجه‌گیری

مطالعه اخیرنشان داد که نانوحامل‌های لیپیدی سیستم‌های جدید و مؤثری در رنگدانه فیکوسیانین مشتق شده از ریزجلبک اسپیرولینا در نظر گرفته می‌شوند. با توجه به نتایج به‌دست آمده، راندمان نانوپوشانی بالا، توزیع یکنواخت اندازه ذرات و نیز مقادیر پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌ها پایداری بالای نانولیپوزوم‌ها به‌ویژه فرمولاسیون حاوی پوشش کیتوزان را نشان داد. هم‌چنین ارزیابی تغییرات شرایط محیطی شامل نور، دما و رطوبت نسبی بر ثبات لیپوزوم‌ها نشان داد پوشش دهی نانولیپوزوم‌ها با کیتوزان می‌تواند راه خوبی برای افزایش پایداری و کنترل آزادسازی پایدار فیکوسیانین باشد. به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت استفاده از فن‌آوری نانوحامل‌های لیپیدی با شرایط تولید و فرآوری آسان به عنوان یکی از سیستم‌های مؤثر در افزایش پایداری و محافظت رنگدانه‌های مستخرج از جلبک مطرح می‌باشد.

## منابع


Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Aït Addi, E.H., Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F.N.R., and Elaissari, A. 2015. Essential oils: from extraction to encapsulation. Inter. J. Pharm. 483: 1-2. 220-243.

Beheshtipour, H., Mortazavian, A.M., Mohammadi, R., Sohrabvandi, S., and Khosravi, K. 2013. Supplementation of *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* algae into probiotic fermented milks. CRFSFS. 12: 144-154.

Belén García, A., Longo, E., and Bermejo, R. 2021. The application of a phycocyanin extract obtained from Arthrospira platensis as a blue natural colorant in beverages. J. Appl. Phycol. 33: 3059-3070.

Cortés-Camargo, S., Cruz-Olivares, J., Barragán-Huerta, B.E., Dublán-García, O., Román-Guerrero, A., and Pérez-Alonso, C. 2017. Microencapsulation by spray drying of lemon essential oil: Evaluation of mixtures of mesquite gum–nopal mucilage as new wall materials. J. Microencapsul. 4: 6. 395-407.

Daneshi, E.D.G., Navacchi, M.F.P., Takeuchi, K.P., Frata, M.T., and Carvalho, J.C.M. 2010. Application of Spirulina platensis in protein enrichment of manioc based bakery products. J. Biotechnol. 150: 310-311.

Dewi, E., Kurniasih, R., and Purnamayanti, L. 2018. Physical Properties of Spirulina Phycocyanin Microencapsulated with Maltodextrin and Carrageenan. Philippine J. Sci. 147: 2. 201-207.

Fathi, M., Varshosaz, J., Mohebbi, M., and Shahidi, F. 2013. Hesperetin-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructure lipid carries for food fortification: preparation, characterization, and modeling. Food Bioprocess Technology. 6: 1464-1475.

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

Gustiningtyas, A., Setyaningsih, I., Hardiningtyas, S.D., and Susila, A.A.R. 2020. Improvement stability of phycocyanin from *Spirulina platensis* encapsulated by water soluble chitosan nanoparticles. Earth and Environmental Science. 414: 01200.

Hadiyanto, H., Suzery, M., Majid, D., Setyawan, D., and Sutanto, H. 2017. Encapsulation of phycocyanin-alginate for high stability and antioxidant activity. Earth and Environmental Science 55.doi:10.1088/1755-1315/55/ 1/ 012030, 1-8.

Hasani, S.H., Ojagh, S.M., and Ghorbani, M. 2018. Nanoencapsulation of lemon essential oil in Chitosan-Hicap system. Part 1: Study on its physical and structural characteristics. Int. J. Biol. Macromol. 115: 143-151.

Hundre, S.Y., Karthik, P., and Anandharamakrishnan, C. 2015. Effect of whey protein isolate and beta cyclodextrin wall systems on stability of microencapsulated vanillin by spray-freeze drying Method. Food Chemistry. 174: 1. 16-24.

İlter, I., Koç, M., Demirel, Z., Conk Dalay, M., and Kaymak Ertekin, F. 2021. Improving the Stability of Phycocyanin by Spray Dried Microencapsulation Phycocyanin Stability Improvement, 45: 7. 1-23.

Kumar, D., Wattal Dhar, D., and Pabbi, S. 2014. Extraction and purification of C-phycocyanin from Spirulina platensis (CCC540). Ind. J. Plant Physiol. 19: 2. 184-188.

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

Page, D.T., and Cudmore, S. 2001. Innovations in oral gene delivery: Challenges and potentials. Drug Discovery Today. 6: 92-101.

Prabakaran, P., and Ravindran, A.D. 2013. Efficacy of different extraction methods of phycocyanin from *Spirulina platensis*. Inter. J. Res. Pharm. Life Sci. 1: 1. 15-20.

Purnama, F.N.W., Agustini, T.W., and Kurniasih, RA. 2020. The effect of different temperature on the stability of phycocyanin on microcapsule Spirulina platensis. Earth and Environmental Science. 530: 012008.

Ramezanzade, L., Hosseini, S.F., and Nikkhah, M. 2018. Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. Food Chemistry. 234: 220-229.

Rasti, B., Jinap, S., Mozafari, M.R., and Yazid, A.M. 2012. Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari method. Food Chemistry. 135: 4. 2761-70.

Safari, R., Raftani Amiri, Z., and Esmaeilzadeh Kenari, R. 2020. Antioxidant and antibacterial activities of C-phycocyanin from common name Spirulina platensis. Iran. J. Fish. Sci. 19: 4. 1911-1927.

Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D., and Hernandez-Escalante, V.M. 2011. Bioavailability of bioactive peptides. Food Reviews International. 27: 3. 213-226.

Silveira, S.T., Burkert, J.F.M., Costa, J.A.V., Burkert, C.A.V., and Kalil, S.J. 2007. Optimization of phycocyanin extraction from Spirulina platensis using factorial design. Bioresource Technology. 98: 1629-1634.

Souzaa, J., Caldasa, A., Tohidib, SH., Molinac, J., Soutob, A., Fangueirob, R., and Zilleb, A. 2014. Properties and controlled release of chitosan microencapsulated limonene oil. Revista Brasileira de Farmacognosia. 24: 691-698.

Suzery, M., Hadiyanto, M., Setyawan, D., and Sutanto, H. 2017. Improvement of stability and antioxidant activities by using phycocyanin-chitosan encapsulation technique. Earth and Environmental Science, 55. doi:10.1088/1755-1315/55/1/012052. 1-7.

Tavakoli, F., Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, KH., Jabbari, M., Behzadi, R., Pilehvar-Soltanahmadi, Y., and Zarghami, N. 2018. Effects of nano-encapsulated curcumin-chrysin on telomerase, MMPs and TIMPs gene expression in mouse B16F10 melanoma tumour model. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. 46: 52. 572-586.

Wu, Q., Liu, L., Miron, A., and Klímová, B. 2016. The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: an overview. Archives of Toxicology, DOI 10.1007/s00204-016-1744-5. 1-27.

Yan, M., Liu, B., Jia, O.X., and Qin, S. 2014. Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties. Food and Bioproducts Processing. 92: 89-97.

Yeung, T.W., Uçok, E.F., Tiani, K.A., McClements, D.J., and Sela, D.A. 2016. Microencapsulation in alginate and chitosan microgels to enhance viability of Bifidobacterium longum for oral delivery. Front. Microbial. 9: 145-148.