



نشریه آموزشی - پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی

شماره ۲۴، پاییز ۱۳۹۶

ص: ۵۱-۵۶

بررسی مورفولوژی و ریز ساختار ذرات حاصل از انکپسولاسیون لاکتوفرین شیر شتر به وسیله پلیمر آلژینات کلسیم

• معصومه راعی (نویسنده مسئول)

کارشناس ارشد پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد

• سعید زیبائی

دانشیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق، بخش تحقیقات دامپزشکی و بیوتکنولوژی،

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

• قدیر رجبزاده

دانشیار پژوهشکده علوم و صنایع غذایی

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۵۳۰۴۵۹۱۹

Email: a_btrf@yahoo.com

چکیده:

در این پژوهش امکان ریزپوشانی لاکتوفرین با استفاده از آلژینات کلسیم مورد بررسی قرار گرفت. لاکتوفرین مورد استفاده در این بررسی با روش کروماتوگرافی تعویض یونی از شیر شتر استخراج و خالص سازی شد. ریزپوشانی لاکتوفرین با دو غلظت ۱ و ۵ درصد وزنی/حجمی از آلژینات کلسیم انجام شد. نتایج نشان داد که روش مورد استفاده برای ریزپوشانی مناسب است. بررسی اندازه و شکل شناسی ذرات با میکروسکوپ الکترونی رویشی (SEM)، تشکیل نانوکپسول ها را تایید نمود.

واژه‌های کلیدی: آلژینات کلسیم، کپسوله کردن، لاکتوفرین، نانوکپسول

Applied Animal Science Research Journal No 24 pp: 51-56

Evaluation of Morphological and Particle Size Performed From Caml Milk Lactoferrin Encapsulation by Calcium Alginate

By: M. Raei¹, S. Zibaei², Gh. Rajab-Zadeh³

1: Department of Food Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2: Associate professor Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO) Mashhad, Iran.

3: Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

In this study, the possibility of using calcium alginate for isolated lactoferrin from camel milk was examined. lactoferrin from camel milk have been captured and purified by ion-exchange chromatography step. lactoferrin encapsulated by alginate concentration (1.0 and 0.5 W/v %). The SEM was used for the size and morphological traits of particle and formation of the lactoferrin nanoencapsulate confirmed. Our results revealed that lactoferrin encapsulated by alginate was an efficient technique.

Key words: Calcium alginate, Emulsion, Lactoferrin, Nanocapsuls

مقدمه

می شوند، مانند ایمونوگلوبولین های G و A، لاکتوفرین، پرولاکتین و سایتوکائین و دیگر بیواکتیوهای مانند لاکتوفرین، لیزوزیم و لاکتوپراکسیداز که نقش ضد میکروبی داشته و به عنوان پروبیوتیک عمل می نمایند.

لاکتوفرین (لاکتوترانسفرین) گلیکوپروتئین متصل شونده به آهن از اعضای خانواده ترانسفرین است که وزن مولکولی حدود ۸۰ کیلودالتون داشته و تقریباً دارای ۷۰۰ اسید آمینه می باشد و از یک زنجیره ی پلی پتیدی منفرد تشکیل شده که به صورت دو لوب متقارن (C-lobe و N-lobe) در آمده است (Isui, et al.,).

شیر شتر دارای ترکیبات با اهمیت و قابل توجه ای نظیر پروتئین اسیدی آب پنیر و پپتیدهای شبه انسولینی می باشد. هم چنین این محصول مهم دارای بیواکتیوهای است که هر کدام به نوبه خود بسیار با ارزش بوده و عملکرد بیولوژیکی خاصی دارند. بیواکتیوهای شیر به چهار گروه عمده تقسیم می شوند. بیواکتیوهای مانند β و α -کازئین، K-کازئین و لاکتوفرین که موجب فعالیت بهتر دستگاه گوارشی می شوند. بیواکتیوهای α و β -لاکتوگلوبولین، پاراتورمون P، هورمون رشد و لاکتوفرین که سبب رشد می گردند. بیواکتیوهای که سبب تقویت سیستم ایمنی

(Lagoa and Rodrigues, 2007).

این بررسی به منظور انکپسوله کردن لاکتوفرین شیر شتر با استفاده از آلژینات کلسیم انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

لاکتوفرین مورد استفاده در این بررسی با روش کروماتوگرافی تعویض یونی از شیر شتر استخراج و خالص سازی شد (Lindstrom, Morimoto and Cante, 1992).

روش انکپسوله کردن لاکتوفرین

جهت انکپسوله کردن لاکتوفرین با استفاده از آلژینات کلسیم از روش تهیه امولسیون آب در آب استفاده شد.

روش تهیه محلول لاکتوفرین - آلژینات

با توجه به آزمایش‌های قبلی و براساس منابع (Tatyana, et al., 2013; Zuidam, and Nedovic, 2010) از لاکتوفرین در غلظت نهایی ۰/۱ درصد و نیز آلژینات کلسیم با غلظت ۰/۵ و ۱ درصد وزنی/حجمی استفاده گردید. بدین منظور لاکتوفرین محلول در بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار و 8 PH به تدریج (قطره قطره) در دمای محیط به محلول آلژینات افزوده و با هم زدن در شرایط (۶۵۰ آر پی ام، به مدت ۶۰ دقیقه، حرارت ۲۵ درجه سلسیوس) محلول لاکتوفرین - آلژینات به عنوان فاز آبی اول امولسیون، تهیه گردید.

تهیه محلول گلیسرول - توئین ۸۰

برای تهیه این محلول از ۲۷ درصد (V/V) گلیسرول، و ۴ درصد (W/V) توئین ۸۰ (به عنوان سورفاکتانت) در دمای اتاق تهیه شد.

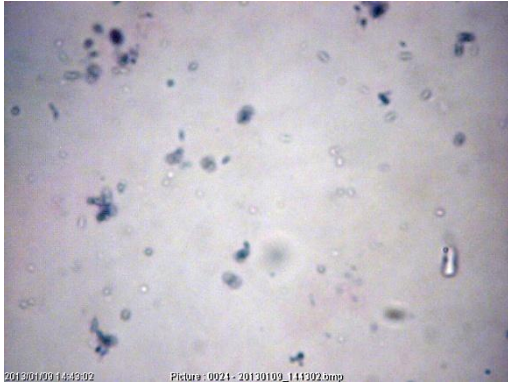
تهیه امولسیون

برای تهیه امولسیون محلول لاکتوفرین - آلژینات تهیه شده به وسیله هم زدن مغناطیسی به هم زده شد (۷۰۰ آر پی ام، حرارت ۲۵ درجه سلسیوس) و محلول آبی حاوی گلیسرین به تدریج به فاز آبی اول حاوی آلژینات افزوده گردید و در شرایط (۷۰۰ آر پی ام، حرارت ۲۵ سلسیوس، ۶۰ دقیقه) هم زده شد.

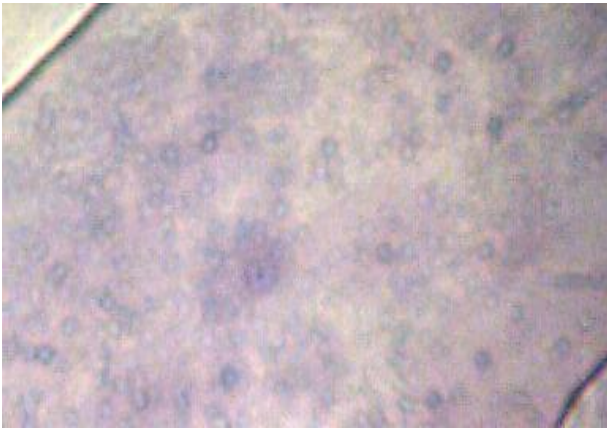
۲۰۰۱ لاکتوفرین شیر شتر در مقایسه با لاکتوفرین گونه‌های دیگر در برخی خصوصیات ساختمانی و عملکردی متفاوت می‌باشد. به عنوان مثال، مکان گلیکوزیله شدن لاکتوفرین در شیر شتر با بقیه حیوانات تفاوت دارد. فعالیت ضد میکروبی لاکتوفرین ناشی از دو مکانیسم، اتصال به آهن و میانکشی مستقیم با میکروارگانیزم است (Isui, et al., 2011). لاکتوفرین با مهار گیرنده‌های ویروس و اتصال به DNA و یا RNA اثرات ضد ویروس خود را اعمال می‌نماید. هم چنین قادر به توقف رشد سلول‌های سرطانی بوده و باعث تقویت سیستم ایمنی می‌شود (Al haj and Al Kanhal, 2010; González, et al., 2009).

ریزپوشانی فرآیندی است که در آن به کمک یک یا چند ماده، ترکیب مورد نظر گرفتار گردیده و پوشانده می‌شود. ماده گرفتار را ماده فعال یا هسته و ماده‌ای که با آن پوشش ساخته می‌شود را دیواره می‌نامند. فن آوری ریزپوشانی امروزه توسعه زیادی یافته است و در صنایع مختلفی نظیر داروسازی، صنایع شیمیایی و غذایی کاربرد فراوانی دارد (Augustin, et al., 2001; Adem, et al., 2007). به دلیل سازگاری مناسب استفاده از ذرات بیوپلیمری برای ریزپوشانی، اخیراً به این مورد در صنعت غذا و دارو بیشتر توجه شده است (Bengoechea, et al., 2011).

آلژینات یک بیوپلیمر ارزان، در دسترس و غیر سمی است که از جلبک دریایی به دست می‌آید. امروزه این بیوپلیمر به دلیل داشتن ویژگی‌هایی چون تجزیه پذیری زیستی، خصوصیات هیدروفیلیکی و ماهیت طبیعی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. این صمغ یک هتروپلی ساکارید خطی است که در دیواره سلولی و فضای بین سلولی جلبک قهوه‌ای یافت می‌شود و قابلیت انعطاف و استحکام ساختمانی را برای گیاه فراهم می‌نماید. از نقطه نظر ساختمانی آلژینات‌ها از واحدهای اسید مانورونیک و اسید - گلوکونیک تشکیل شده‌اند که از طریق پیوندهای گلیکوزیدی به یکدیگر متصل شده‌اند. هم اکنون فرآوری ریزپوشانی توسط آلژینات کلسیم برای رهایش کنترل شده داروها با منشاء پپتیدی جهت جذب در دستگاه گوارش، به میزان زیاد به کار می‌رود



تصویر ۱: نمایش کپسول‌های آلزینات با میکروسکوپ نوری



تصویر ۲: نمایش کپسول‌های آلزینات با میکروسکوپ نوری

مشاهده نانو کپسول‌های تشکیل شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نشان داد که با روش‌های متفاوت و در دو غلظت مختلف آلزینات نانو ذرات تشکیل شده‌اند. اما در برخی از نمونه‌ها تشکیل ذرات تجمعی بیشتر بوده است و نیز شکل ذرات در نمونه‌ای با غلظت ۰/۵ درصد آلزینات از یک‌نواختی بهتری برخوردار بوده است و سطح خارجی کپسول‌ها صاف‌تر از کپسول‌ها با غلظت ۱ درصد بوده است (تصاویر ۳ و ۴).

تثبیت توسط یون کلسیم ۰/۵ درصد

بدین منظور از محلول کلسیم کلرید ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) با غلظت ۰/۵ درصد وزنی -حجمی استفاده گردید.

تعیین مرفولوژی ذرات و مشاهده ریزساختار تشکیل شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روشی

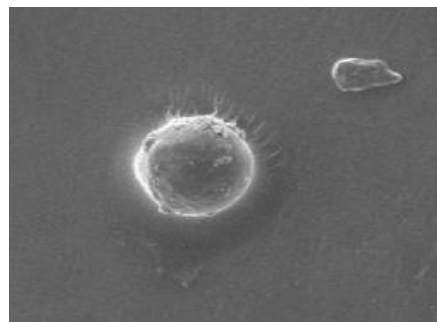
جهت تعیین مرفولوژی ذرات و مشاهده شکل ظاهری نانو کپسوله‌ای ایجاد شده از میکروسکوپ الکترونی آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد استفاده گردید. استاب نمونه‌ها پس از آماده‌سازی و پوشش به اتاقک نمونه تحت خلاء منتقل شدند. مشاهده کپسول‌ها به وسیله تابش الکترونی با ۲۰ کیلوولتاژ انجام گرفت و تصویر بر اساس شعاع الکترونی برگشتی از نمونه‌ها به دست آمد. بدین منظور کپسول‌های شسته شده در مرحله نهایی توسط سرم فیزیولوژی همراه ۰/۰۵ درصد (V/V) گلیسرول استریل دو بار (سانتریفوژ ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) شستشو شد و در مرحله آخر با آب مقطر فاقد یون استریل دو بار شسته شد. سپس ذرات با گلو تارالدئید ۲ درصد تثبیت شدند و سه مرحله آبگیری با استفاده الکل ۲۵، ۷۵ و ۹۶ درصد انجام گرفت. مقداری از نمونه‌ها بر روی یک استاب آلومینیومی پوشیده شده با لایه‌ای از کربن به قطر ۱۲ میلی متر پخش شدند. نمونه‌های اضافه با استفاده از هوای خشک فشرده جدا گردیدند و بقیه آن‌ها به وسیله یک لایه نازک رسانا از جنس طلا و پالادیم به مدت دو دقیقه پوشش داده شدند.

نتایج و بحث

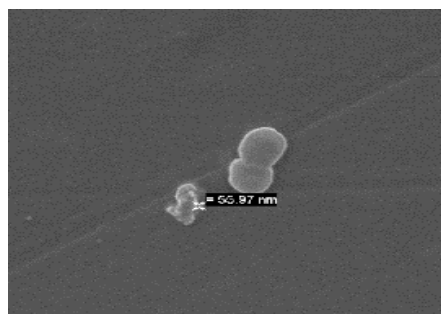
خواص ظاهری کپسول‌های آلزینات با میکروسکوپ نوری نشان داد که در هر دو نمونه مورد آزمایش ذرات رنگ شده پراکنده با استفاده از بزرگنمایی X40 قابل مشاهده است (تصاویر ۱ و ۲).

منابع

- Adem, G., Gaele, R. Odile, C. André'e, V. and Rémi, S. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients. An overview, *Food Research International*, 40:1107–1121.
- Al haj, O A. and Al Kanhal, H. A. (2010). Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk. Department of Food Science and Nutrition, College of Food and Agricultural Sciences, King Saud University, Saudi Arabia.
- Augustin, M .A., Sanguansri, L. Margett, C. and Young, B. (2001). Microencapsulation of food ingredients. *Food Australian*, 53:220-223.
- Bengoechea, C., Jones, O. G. Guerrero, A. and Mc Clements, D. J. (2011). Formation and characterization of lactoferrin/pectin electrostatic complexes: impact of composition, pH and thermal treatment. *Food Hydrocolloids*, 25(5): 1227 -1232.
- González, C., Susana, A. Sigifredo, A.G. Quintín, R. C. (2009). Lactoferrin: structure, function and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33: 301–308.
- Isui, A., García, M. Siqueiros, T. C. Arévalo, G. S. and Rascón-Cruz, Q. (2011). Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview *Biochemical et Biophysica Acta*.
- Lagoa, R., Rodrigues, J.R. (2007). Evaluation of dry protonated calcium alginate beads for biosorption applications and studies of lead uptake. *Appl Biochem Biotechnol*.143: 115-128.
- Lindstrom, T.R., Morimoto, K. Cante, C. J. (1992). Edible films and coatings. In: *Encyclopedia of food Science and Technology* (Vol. 2). Hui, Y.H. (ed.). New York: John Wiley and Sons. Pp:59-663.
- Sucklking, C.J. (1990). *Enzyme chemistry, Impact and applications*. (2nd ed.) Chapman & Hall. London, UK .



A



B

اشکال ۳ و ۴: مشاهده نانو کپسول‌های تشکیل شده توسط میکروسکوپ الکترونی (مقایسه قطر و شکل گیری ذرات) (A) با غلظت ۱ درصد آلژینات که نشان دهنده ذرات منظم و در برخی موارد نامنظم کروی است.

(B) با غلظت ۵/۰٪ آلژینات که نشان دهنده تجمع ذرات کوچک و نامنظم است.

نتایج نشان داد که سطح کپسول‌های تشکیل شده با قطر کمتر از ۲۰۰ میکرون، نسبتاً صاف با بهم چسبیدگی کم و با شکلی نسبتاً کروی هستند. لذا نتیجه گرفته می‌شود که پلیمر آلژینات حاملی مناسب برای تثبیت آنزیم لاکتوپراکسیداز است. زیرا آلژینات یک پلیمر طبیعی و فاقد هر گونه مواد سمی بوده و بر روی ساختار آنزیم تاثیر نمی‌گذارند. در این مطالعه برای بهبود خواص فیزیکی کپسول‌ها از گلیسرول و توئین استفاده شد که نسبت به سایر نرم‌کننده‌ها (پلاستی‌سایزرها) که برای اصلاح ساختار کپسول‌ها به کار می‌روند و موجب کاهش شکنندگی پیوندهای هیدروژنی بین زنجیره‌های پلیمر و افزایش فضاها بین ملکولی می‌شوند، عملکرد بهتری دارد (Sucklking, 1990).

Zuidam, N. J., and Nedovic, V. A. (2010).
Material for encapsulation. In:
Encapsulation Technologies for Active Food
Ingredients and Food Processing. Springer,
New York.

□ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □