

اثر لاکتوفرین شیر شتر ریزپوشانی شده با کمپلکس های ایزوله پروتئین آب پنیر-پکتین بر رشد و زندهمانی رده سلولی استئوبلاست MG63

معصومه راعی^۱، فخری شهیدی^{۲*}، مجید فرهودی^۳، سیدمهدی جعفری^۴، علی رافع^۵

- ۱- دانشجوی دکتری صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
- ۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
* نویسنده مسئول (niloofar1373@yahoo.com)
- ۳- استادیار، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی - شعبه شمال شرق، مشهد، ایران
- ۴- دانشیار، گروه مهندسی مواد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- ۵- دانشیار، گروه فرآوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۳۱

واژه‌های کلیدی

آب پنیر ایزوله

استئوبلاست

پکتین

لاکتوفرین

نوشیدنی

چکیده

لاکتوفرین یکی از مهم‌ترین ترکیبات زیست‌فعال بشمار می‌رود که قادر به افزایش فعالیت سیستم ایمنی و استخوان‌سازی می‌باشد. اما این ترکیب نسبت به استرس‌های محیطی حساس است. از این رو، تولید نوشیدنی فراسودمند از لاکتوفرین ریزپوشانی شده توسط نانوکمپلکس‌های حاوی پکتین/ایزوله پروتئین آب پنیر (WPI/HMP) در پژوهش حاضر مورد بررسی قرار گرفت. تشکیل نانوکمپلکس در غلظت کلی بیوپلیمر (w/w) ۰/۴ درصد در pHهای اسیدی (۳، ۳/۵ و ۴) با دو روش اسیدی‌سازی قبل از اختلاط (Pt-A)، و اسیدی‌سازی بعد از اختلاط (Po-A) انجام گرفت. به منظور ریزپوشانی لاکتوفرین این ترکیب به کمپلکس WPI/HMP که در روش (Pt-A) با نسبت ۲:۱ تشکیل شده بود، افزوده شد. نتایج ارزیابی پتانسیل زتا و بررسی قطر ذرات نشان داد که با افزایش نسبت پکتین میزان بار منفی بیشتر شده و اندازه نانوذرات افزایش یافت. بررسی اثر لاکتوفرین ریزپوشانی شده توسط نانوکمپلکس بر ازدیاد سلول استئوبلاست MG63 با استفاده از آزمایش MTT نشان داد که لاکتوفرین ریزپوشانی شده با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر رشدی معادل کنترل مثبت داشته و به دلیل اینکه نمونه لاکتوفرین خالص با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دارای ۱۶ درصد افزایش رشد نسبت به کنترل مثبت بوده است می‌توان نتیجه گرفت که تقریباً تمامی لاکتوفرین در ترکیب یادشده ریزپوشانی شده و یا با اتصال به کمپلکس از دسترس سلول دور مانده است. لاکتوفرین ریزپوشانی شده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر توسط نانوکمپلکس، رشدی معادل ۱۱۳ درصد دارد و از نظر آماری در سطح لاکتوفرین خالص با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر قرار می‌گیرد.

درصد مردان بالای ۵۰ سال به پوکی استخوان مبتلا هستند (Aala et al., 2009). استئوپروز^۱ یکی از علل اصلی هزینه‌های نگهداری و نیز مرگ در جمعیت

مقدمه

پوکی استخوان یک بیماری شایع بوده و مشخصه آن کاهش توده استخوانی است (García-Montoya et al., 2011). در ایران بیش از ۷۰ درصد زنان و ۵۰

^۱ Osteoporosis

به دلیل مزایای زیاد لاکتوفرین استفاده از آن برای جلوگیری از استئوپورز ناشی از افزایش سن در یک نوشیدنی فراسودمند می‌تواند به کاهش خطر در افراد کهنسال کمک نماید. آب‌پنیر به دلیل داشتن پروتئین‌های زیست‌فعال، دارای ارزش تغذیه‌ای بالایی است (Ferreira *et al.*, 2006). این پروتئین‌ها در مقیاس صنعتی به صورت ایزوله یا کنسانتره پروتئین آب‌پنیر، تولید شده و مورد استفاده قرار می‌گیرند (Smithers, 2008). به دلیل خصوصیات مهم صمغ پکتین، از این هیدروکلوئید به عنوان پایدارکننده نوشیدنی‌ها استفاده می‌گردد (Jensen *et al.*, 2015; Sejersen *et al.*, 2007; Surh *et al.*, 2006; Tromp *et al.*, 2004).

لاکتوفرین ماده زیست‌فعالی است که علی‌رغم تمامی فعالیت‌های مهم و چندگانه، در برابر استرس‌های محیطی حساس بوده و نیاز به ریزپوشانی دارد. در بخش‌های مواد غذایی و دارویی، ریزپوشانی یک روش مطلوب برای حفاظت و انتقال ترکیبات زیست‌فعال حساس محسوب می‌گردد (Jafari, *et al.*, 2008).

ریزپوشانی شامل روش‌های مختلف فیزیکی (کواسرواسیون) و مکانیکی (خشک‌کردن پاششی، سردکردن پاششی، لیپوزوم، پوشش‌دهی بستر سیال و اکستروژن) می‌باشد. روش کواسرواسیون تکنیک نسبتاً ساده‌ای است که از طریق جاذبه الکترواستاتیک بین ترکیبات با بار الکتریکی مخالف باعث ایجاد دیواره چندلایه در اطراف ریزکپسول‌ها شده و آنها را مقاوم می‌نماید. جهت ریزپوشانی ترکیبات زیست‌فعال می‌توان از بیوپلیمرها استفاده نمود.

نانوذرات بیوپلیمری یا به تنهایی از طریق تجمع و به هم پیوستگی زنجیرهای یک نوع بیوپلیمر (پروتئین یا پلی‌ساکارید) و یا از طریق کنترل اتصال و کمپلکس شدن مولکول‌های پروتئین و پلی‌ساکارید، می‌توانند، تولید گردند (Esfanjani & Jafari, 2016; Katouzian & Jafari, 2016).

پروتئین آب‌پنیر به عنوان یک امولسیفایر طبیعی و تثبیت‌کننده با توانایی تولید سیستم جنبشی پایدار و خواص ترمودینامیکی و تجمع آن با پلی‌ساکاریدها ایجاد یک کمپلکس غلیظتر و رفتارهای تثبیت‌شده فضایی می‌نماید (Dickinson, 2008). پکتین یکی از

کهنسال می‌باشد (Cummings & Melton, 2002) سلول‌های بافت استخوانی از استئوسیت‌ها، استئوبلاست‌ها و استئوکلاست‌ها تشکیل شده‌اند (Garnero *et al.*, 2002).

استئوسیت‌ها^۱ ستاره‌ای شکل‌اند (Tate *et al.*, 2004). استئوبلاست‌ها^۲ چندضلعی هستند این سلول‌ها در محلی که فعالیت سازندگی استخوان زیاد است به مقدار فراوان حضور دارند (Arnett, 2003). استئوکلاست‌ها^۳ مسئول تجزیه ماده زمینه استخوان در هنگام استخوان‌سازی هستند. نقش استئوکلاست‌ها عکس استئوبلاست‌ها می‌باشند (Wang & Mc Cauley, 2011).

کاهش حجم استخوان در نتیجه عدم تعادل بین فعال‌سازی استئوبلاست و استئوکلاست می‌باشد تحقیق‌ها نشان داده که لاکتوفرین در استخوان‌سازی مؤثر است، هرچند مکانیسم عمل آن دقیقاً معلوم نشده، ولی نتایج مطالعه‌ها حاکی از این است که لاکتوفرین^۴ باعث افزایش تکثیر و تمایز استئوبلاست‌ها و مهار رشد استئوکلاست‌ها می‌گردد (Plotkin *et al.*, 2009; Jeney, 2017; Bharadwaj *et al.*, 1999).

لاکتوفرین بالقوه به عنوان یک فاکتور رشد استخوان و یک گلیکوپروتئین^۵ باندشونده به آهن از اعضای خانواده ترانسفرین^۶ است. وزن مولکولی آن حدود ۸۰ کیلودالتون است (Kanwar, *et al.*, 2015). غلظت لاکتوفرین در شیر شتر ۶-۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، شیر انسان (۵-۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و شیر گاو (۴۰-۰/۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) می‌باشد (Du *et al.*, 2017). لاکتوفرین دارای فعالیت‌های زیستی مهم از جمله فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، ضدقارچ، ضدویروسی، ضدباکتریایی، افزایش فعالیت سیستم ایمنی و استخوان‌سازی می‌باشد (Du *et al.*, 2017). امروزه استفاده از لاکتوفرین در دنیا روبه‌افزایش بوده و مکان به‌کارگیری آن در مقیاس تجاری وجود دارد (Tomita *et al.*, 2009).

¹ Osteocyte

² Osteoblast

³ Osteoclast

⁴ Lactoferrin

⁵ Glycoprotein

⁶ Transferrin

سلولی استئوبلاست MG63 از آزمایش MTT استفاده گردید.

مواد و روش ها

شیر شتر از استان گلستان تهیه شد. ایزوله پروتئین آب پنیر (پروتئین ۹۶/۲ درصد) از (شرکت بین المللی مواد غذایی دیویس، آمریکا) و پکتین با درجه متوکسیل بالا، و نیز کلرورسدیم، تریپسین، سفادکس، سولفات آمونیوم، پراکسید هیدروژن ۳ درصد، تترامتیل بنزیدین (TMB)، تترازولیوم (دی متیل سولفوکساید، اسید کلریدریک، آنتی بیوتیک NaH₂PO₄ 2H₂O، X liquid 100 و Na₂HPO₄ 12H₂O، تریس، استات سدیم، گلیسین، سدیم دودسیل سولفات، نیترات نقره، کربنات سدیم و متانول از شرکت مرک (آلمان) تهیه گردید. آلبومین سرم گوساله (BSA^۵)، CM Sephadex C-50، آکریل آمید، بیس آکریل آمید از شرکت سیگما و RPMI 1640، تیوسولفات سدیم از شرکت روش آلمان خریداری شد.

خالص سازی لاکتوفرین شیر شتر

خالص سازی لاکتوفرین براساس روش Raici و همکاران (۲۰۱۵) انجام پذیرفت. مراحل استخراج به طور خلاصه به قرار ذیل می باشد. پس از چربی زدایی توسط سانتریفیوژ (۳۰۰۰-۱۵ دقیقه) کازئین شیر شتر توسط سانتریفیوژ دور بالا (۲۵۰۰۰-۲۰ دقیقه) از آب پنیر جدا شده و پس از عبور از صافی توسط کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از رزین CM Sephadex C-50 خالص گردید. فراکسیون های حاصل از شست و شوی رزین توسط بافر فسفات حاوی غلظت های مختلف نمکی (۰/۴ تا ۰/۹ درصد) و سپس اندازه گیری میزان پروتئین در این فراکسیون ها با استفاده از اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر انجام پذیرفت، در ادامه با استفاده از SDS-PAGE وزن مولکولی و وجود تک باند با وزن مولکولی در محدوده ۸۰ کیلو دالتون در آنها مشخص شد. سپس با استفاده از تست برادفورد غلظت این پروتئین ها تعیین گردید. آنگاه با استفاده از آزمایش تولید رنگ

معروف ترین پلی ساکاریدهاست که به طور وسیعی در تشکیل کمپلکس با پروتئین های آب پنیر برای تولید سیستم های چندلایه درون پوشانی مورد استفاده قرار می گیرد (Esfanjan, et al., 2015; Esfanjan, et al., 2016; Mohammadi et al., 2017). پکتین پلی ساکارید غنی از اسید گالاتکتورنیک، رامانوگالاتارانان، هولو گالاتورونان و گزیلوگالاتارانان می باشد (Mohnen, 2008). در pH زیر نقطه ایزوالکتریک (pI) پروتئین ها، دارای بار مثبت بوده و با گروه های آنیونی پلی ساکاریدها که دارای بار منفی هستند، واکنش می دهند. این واکنش ها تحت تأثیر فاکتورهای زیادی از قبیل میزان pH، قدرت یونی، افزودن بیوپلیمر، تغییر شکل، دانسیته بار و غلظت پروتئین ها و پلی ساکاریدها می باشند (Ye, 2008).

به منظور بررسی عملکرد نوشیدنی فراسودمند در آزمایشگاه، از ارزیابی اثرات آن در سلول استئوبلاست استفاده می گردد. در بررسی مدل رشد استئوبلاست در آزمایشگاه چندین دودمان سلولی نظیر MG-63، Saos-2 و U-2 OS وجود دارد.

یکی از روش های بررسی تعداد سلول ها در محیط کشت سلولی، اندازه گیری متابولیسم اکسیداتیو سلولی به روش (MTT^۱) است. MTT نمک تترازولیوم محلول در آب می باشد. زمانی که این ترکیب در محلول نمکی فاقد فنل رد آماده سازی شود محلول زرد رنگی تولید می نماید. این ترکیب در میتوکندری سلول های زنده توسط آنزیم دهیدروژناز تبدیل به ترکیب نامحلولی به نام فورمازان^۲ می گردد که این محصول توسط حلال هایی مانند ایزوپروپانول اسیدی یا دی متیل سولفوکساید^۳ حل شده و رنگ ارغوانی-بنفش را ظاهر می سازد. جذب این رنگ در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری می شود (Mosmann, 1983).

در این پژوهش پس از ریزپوشانی لاکتوفرین توسط نانوکمپلکس پکتین-ایزوله پروتئین آب پنیر و ارزیابی تشکیل نانوکمپلکس، به منظور بررسی اثر لاکتوفرین ریزپوشانی شده بر رشد و زنده ماندن رده

^۱ 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

^۲ Formazan

^۳ Dimethylsulfoxide

^۴ 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

^۵ Bovine Serum Albumin

به کمپلکس WPI/HMP که با استفاده از روش اسیدی‌سازی قبل از اختلاط و با نسبت ۲:۱ تشکیل شده بودند، افزوده شد. به این ترتیب محلول نهایی شامل ۰/۲۷ درصد محلول ایزوله WPI، ۰/۱۳ درصد محلول HMP و ۰/۱ درصد محلول لاکتوفرین را شامل بود. میزان ۳۰ گرم از محلول نهایی با شرایط (g ۸۰۰۰، ۳۰ دقیقه، ۲۲ درجه سانتی‌گراد) سانتریفیوژ شده و رسوب به دست آمده لیوفلیزه^۵ گردید.

مطالعه‌های مورفولوژیکی

شکل ظاهری نمونه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (لئو، ساخت آلمان) مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی اثر نانوکمپلکس آب‌پنیر/پکتین بر سلول‌های

استئوبلاست رده MG-63 توسط آزمایش MTT

جهت انجام آزمایش در ابتدا سلول‌های استئوبلاست رشد یافته به مدت ۴۸ ساعت در فلاسک کشت سلولی آماده شده پس از تعیین تعداد توسط تریپان بلو^۶ مقدار ۱۰۰ هزار سلول به پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای منتقل گردید. اجزای آزمایش به قرار ذیل تعریف شدند:

الف- سلول به میزان ۱۰۰ هزار در تمامی چاهک‌های مورد آزمایش؛

ب- محیط کشت به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در تمامی چاهک‌های مورد آزمایش؛

ج- نمونه‌های مورد آزمایش به میزان ۱۰۰ میکرولیتر مطابق جدول شماره (۱) آماده و اضافه گردید.

از هر نمونه تعریف شده ۷ تکرار مورد آزمایش قرار گرفت و پس از ۲۴ ساعت آزمایش MTT انجام پذیرفت. ابتدا سلول‌های موجود در پلیت، توسط PBS در ۳ مرحله شست‌وشو داده شدند. سپس به چاهک ۲۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه و پلیت به مدت ۴ ساعت در شرایط تاریکی در انکوباتور قرار گرفت. آنگاه ۱۰۰ میکرولیتر DMSO داخل تمام چاهک‌های پلیت اضافه و پلیت به مدت ۱۵ دقیقه همزده شد. سپس میزان جذب نوری در طول موج‌های ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

در حضور تترامیتیل بنزیدین وجود لاکتوفرین و یا لاکتوپراکسیداز در فراکسیون‌ها مورد بررسی قرار گرفت. لاکتوفرین خالص شده با استفاده از کیسه دیالیز تغلیظ و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تشکیل نانوکمپلکس آب‌پنیر/پکتین

در ابتدا محلول‌های جداگانه ۲ درصد (w/v) از ایزوله پروتئین آب‌پنیر (WPI)^۱ و متوکسی پکتین با درجه متیلاسیون بالا (HMP)^۲ تهیه شدند. جهت تشکیل نانوکمپلکس ایزوله پروتئین آب‌پنیر/پکتین بر اساس روش Singh و Burgess (۱۹۸۹) غلظت کلی بیوپلیمر ۰/۴ درصد (w/w) در pHهای اسیدی (۳، ۳/۵ و ۴) با دو روش اسیدی‌سازی قبل از مخلوط کردن^۳ (Pr-A) و روش اسیدی‌سازی پس از اختلاط^۴ (Po-A) مورد استفاده قرار گرفت. برای تشکیل کمپلکس به روش (Po-A)، محلول‌های ذخیره پروتئین آب‌پنیر و پکتین با متوکسیل بالا در ابتدا با نسبت‌های مشخص ۲:۱، ۱:۱ و ۱:۲ رقیق‌سازی شده تا به غلظت نهایی ۰/۴ درصد برسند. پروتئین آب‌پنیر و با نسبت‌های معین مخلوط و pH نهایی از ۷ به تدریج کاهش یافته و توسط اسیدکلریدریک ۰/۵ نرمال به ۴، ۳/۵ و ۳ رسید. به منظور تشکیل کمپلکس اسیدی‌سازی با روش (Pr-A)، محلول‌های رقیق شده WPI و HMP به صورت جداگانه در مقادیر تعیین شده یعنی ۴، ۳/۵ و ۳ توسط اسیدکلریدریک ۰/۵ نرمال تنظیم و سپس با نسبت‌های معین با یکدیگر ترکیب و به مدت ۳ دقیقه همزده (۷۵۰ دور در دقیقه) شدند.

ارزیابی تشکیل نانوکمپلکس ایزوله پروتئین

آب‌پنیر/پکتین

اندازه‌گیری قطر ذرات و پتانسیل زتا

قطر ذرات و پتانسیل زتای نمونه‌ها و کمپلکس توسط دستگاه زتاسایز (مدل ۲۰۰۰ Malvern، شرکت مالورن، ساخت انگلستان) اندازه‌گیری شد.

ریزپوشانی لاکتوفرین توسط کمپلکس WPI/P

جهت ریزپوشانی لاکتوفرین با غلظت نهایی ۰/۴ درصد

¹ Whey Protein Isolate

² High Methoxyl Pectin

³ Pre-Blending Acidification

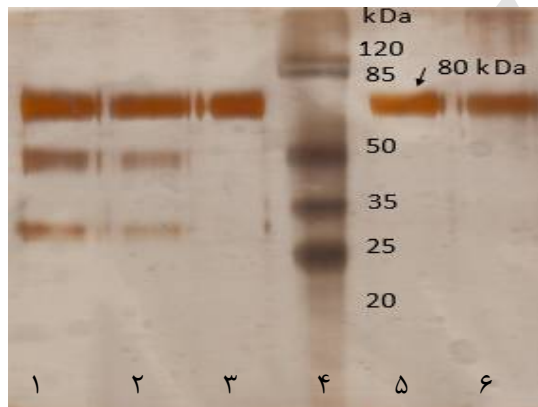
⁴ Post-Blending Acidification

⁵ Freeze Dried

⁶ Trypan Blue

جدول ۱ - نام و اجزاء نمونه مورد استفاده برای بررسی اثر لاکتوفرین ریزپوشانی شده با نانوکمپلکس ایزوله پروتئین آب پنیر/پکتین روی سلول استئوبلاست با استفاده از آزمایش MTT

ردیف	نمونه	اجزاء	ردیف	نمونه	اجزاء
۱	HMP	پکتین خالص به میزان به کاررفته برای تشکیل کمپلکس	۸	WPI	آب پنیر خالص به میزان به کاررفته برای تشکیل کمپلکس
۲	WPI+LF50	آب پنیر خالص به میزان به کاررفته برای تشکیل کمپلکس همراه با لاکتوفرین خالص با غلظت نهایی ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر	۹	LF50	لاکتوفرین خالص با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر
۳	WPI+LF100	آب پنیر خالص به میزان به کاررفته برای تشکیل کمپلکس همراه با لاکتوفرین خالص با غلظت نهایی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر	۱۰	WPI+HMP+LF100	پکتین و آب پنیر همراه با لاکتوفرین با غلظت نهایی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (کمپلکس تشکیل شده با غلظت ۱۰۰ لاکتوفرین)
۴	CO -	نمونه ها قبل از آزمایش MTT از مرگ سلول ها توسط DMSO	۱۱	LF100	لاکتوفرین خالص با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر
۵	WPI+HMP	پکتین و آب پنیر با آب به میزان به کاررفته برای تشکیل کمپلکس	۱۲	HMP+LF50	پکتین خالص به میزان به کاررفته برای تشکیل کمپلکس همراه با لاکتوفرین خالص با غلظت نهایی ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر
۶	WPI+HMP+LF50	پکتین و آب پنیر همراه با لاکتوفرین با غلظت نهایی ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر (کمپلکس تشکیل شده با غلظت ۵۰ لاکتوفرین)	۱۳	HMP+LF100	پکتین خالص به میزان به کاررفته برای تشکیل کمپلکس همراه با لاکتوفرین خالص با غلظت نهایی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر
۷	CO+	PBS			



شکل ۱ - نتایج حاصل از الکتروفورز فراکسیون های خالص شده توسط کروماتوگرافی تعویض یونی دیدن باندهای خالص در ناحیه ۸۰ کیلودالتون شماره ۴ مارکر پروتئین (۱۲۰ کیلودالتون)، شماره ۱ (فراکسیون ۰/۴ مولار درصد کلوروسدیم)، شماره ۲ (فراکسیون ۰/۵ مولار)، شماره ۳ (فراکسیون ۰/۶ مولار)، شماره ۵ (فراکسیون ۰/۷ مولار) و شماره ۶ (فراکسیون ۰/۸ مولار)

آنالیزهای آماری

داده های حاصل با استفاده (ANOVA) و مقایسه میانگین ها از طریق آزمون دانکن در سطح ۹۵ درصد و از طریق SPSS نسخه ۲۱ آنالیز گردیدند.

نتایج

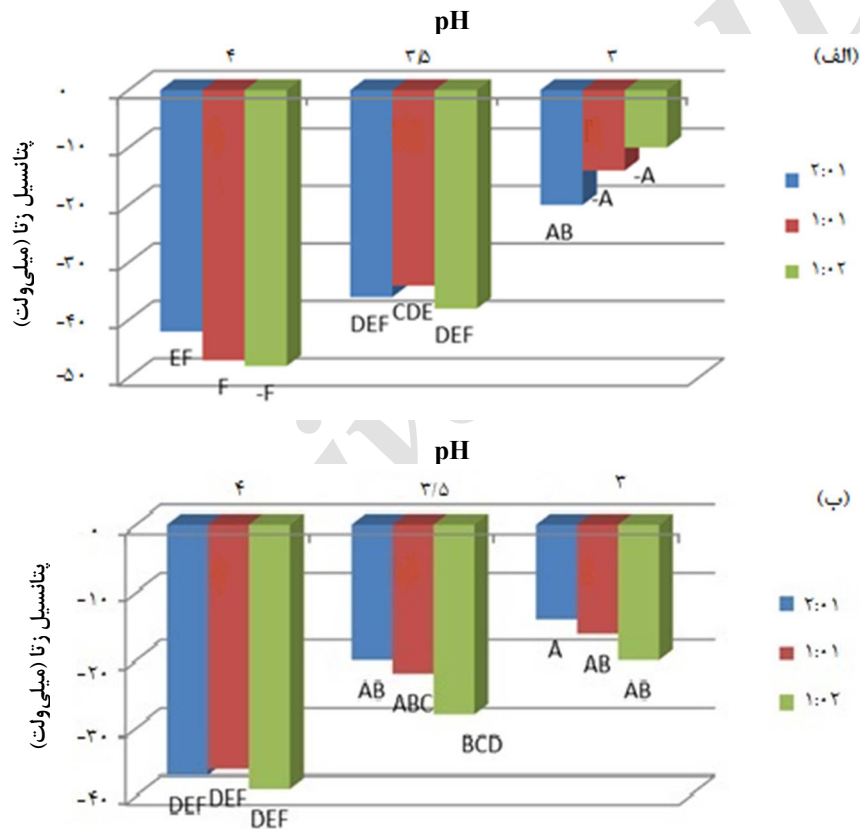
نتایج حاصل از خالص ساز لاکتوفرین شیر شتر

نتایج نشان داد که باند مورد نظر در محدوده وزن مولکولی ۸۰ کیلودالتون، در گرادپان های (۰/۴ تا ۰/۸ درصد کلوروسدیم) مشاهده می شود که نشان دهنده لاکتوفرین و یا لاکتوپراکسیداز در این فراکسیون ها می باشد (شکل ۱).

پروتئین آب پنیر میزان بار منفی بیشتر شده که به افزایش سطح شارژ منفی نانوذرات تشکیل شده در پی افزایش پتانسیل بار منفی مربوط می‌گردد (شکل ۲). نتایج مشابه‌ای برای فرمولاسیون امولسیون‌ها توسط Mirhosseini و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شده است. در حقیقت میزان پتانسیل زتای بالا (مثبت یا منفی) با ایجاد شارژ الکتریکی بالاتر روی سطح قطره‌های امولسیون و ایجاد نیروهای دافعه قوی در بین قطره‌ها از تجمع آنها در محلول محافظت نموده و سیستم را پایدار می‌نماید (Honary & Zahir, 2013).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری پروتئین به روش برادفورد نشان داد که غلظت پروتئین در فراکسیون‌های ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷ و ۰/۸ به ترتیب ۲۲۳، ۲۵۰، ۲۴۴، ۲۰۴ و ۱۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. نتایج حاصل آزمایش TMB نشان می‌دهد که فراکسیون‌های ۰/۶ و ۰/۷ در حضور ترامتیل بنزیدین تغییر رنگ نداشته بنابراین لاکتوفرین خالص می‌باشد.

نتایج حاصل از ارزیابی تشکیل نانوکمپلکس آب پنیر/پکتین پتانسیل زتا و اندازه نانوکمپلکس ایزوله پروتئین آب پنیر/پکتین نتایج نشان داد با افزایش نسبت پکتین به ایزوله



شکل ۲ - نتایج حاصل از اندازه‌گیری پتانسیل زتای (میلی‌ولت) نانوکمپلکس WPI-HMP در نسبت‌های مختلف مقایسه میانگین‌ها با حروف نشان داده شده است. الف) اسیدی‌سازی با روش قبل از ساخت (Pr-A) و ب) اسیدی‌سازی با روش بعد از ساخت (Po-A)

نسبت WPI-HMP تأثیری بر پتانسیل زتا ندارد ($P < 0.05$). اما در $pH = 3$ و $pH = 3.5$ تأثیر معنی‌داری دیده شد ($P > 0.05$). کمترین پتانسیل زتا در کمپلکس تشکیل‌شده WPI-HMP در نسبت ۲:۱ و $pH = 3$ دیده شده است (شکل ۲).

در نانوکمپلکس‌های تشکیل‌شده از طریق روش اسیدی‌سازی قبل از اختلاط (Pr-A) پایین‌ترین پتانسیل زتا مربوط به تشکیل WPI-HMP در نسبت ۱:۲ و $pH = 3$ می‌باشد. همچنین نتایج نشان داد که در روش اسیدی‌سازی بعد از اختلاط (Po-A) در $pH = 4$

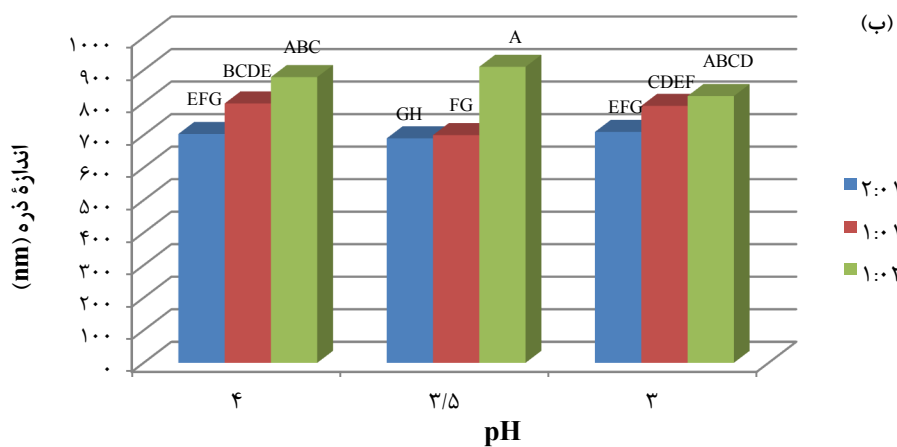
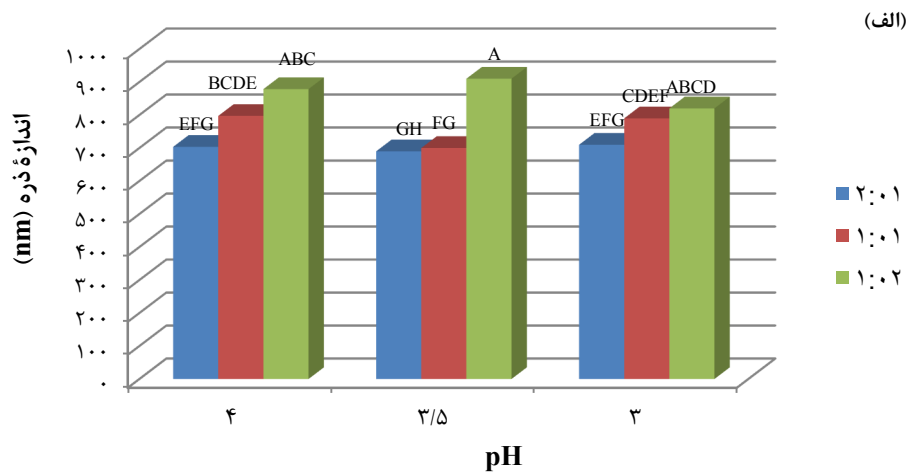
ضخامت لایه بیرونی با به کارگیری غلظت های بیشتر بیوپلیمر باشد.

در تأیید نتایج به دست آمده، Peinado و همکاران (۲۰۱۰) گزارش نمودند که افزودن پلی ساکاریدها به سوسپانسیون نانوذرات پروتئین سبب افزایش قطر ذراتی می گردد که تمایل به ایجاد رسوب دارند و این امر به خاطر تجمع لایه پلی ساکارید اطراف ذرات پروتئینی و یا به دلیل ایجاد پل های عرض بین تجمع های پروتئینی تشکیل شده می باشد (شکل ۳-ب). به طور کلی روش اسیدی سازی (Po-A) در مقایسه با روش دیگر ایجاد کمپلکس هایی با ذرات بزرگ تر می نماید که این مسئله را می توان این گونه توضیح داد که روش تدریجی اسیدی نمودن به کمپلکس ها زمان بیشتر به منظور بازآرایی ساختار فشرده خود می دهد (Bédié et al., 2008).

نتایج حاصل از اندازه گیری قطر ذرات نانوکمپلکس WPI/HMP

نتایج حاصل از اندازه گیری قطر ذرات نشان می دهد (شکل ۲)، در هر دو روش (Pr-A) و (Po-A)، اندازه نانوذرات با کاهش نسبت پروتئین به پکتین، افزایش می یابد. کمپلکس WPI-HMP در روش (Pr-A)، در نسبت ۲:۱ و pH=۳ نانوذراتی با اندازه کوچک (۷۱۰ نانومتر) تولید می گردد. در حالی که بزرگ ترین اندازه ذرات در روش (Po-A)، نسبت ۱:۲ و در pH=۳/۵ بود (شکل ۳-الف).

نتایج نشان می دهد که با کاهش pH افزایش شارژ مثبت ایزوله پروتئین آب پنیر و بار منفی مولکول های پکتین اتفاق می افتد که در نتیجه نانوذراتی با اندازه کوچک تر ایجاد می گردد. از طرف دیگر، اندازه نانوذرات با افزایش نسبت پکتین به ایزوله آب پنیر افزایش می یابد. این حالت ممکن است در نتیجه افزایش



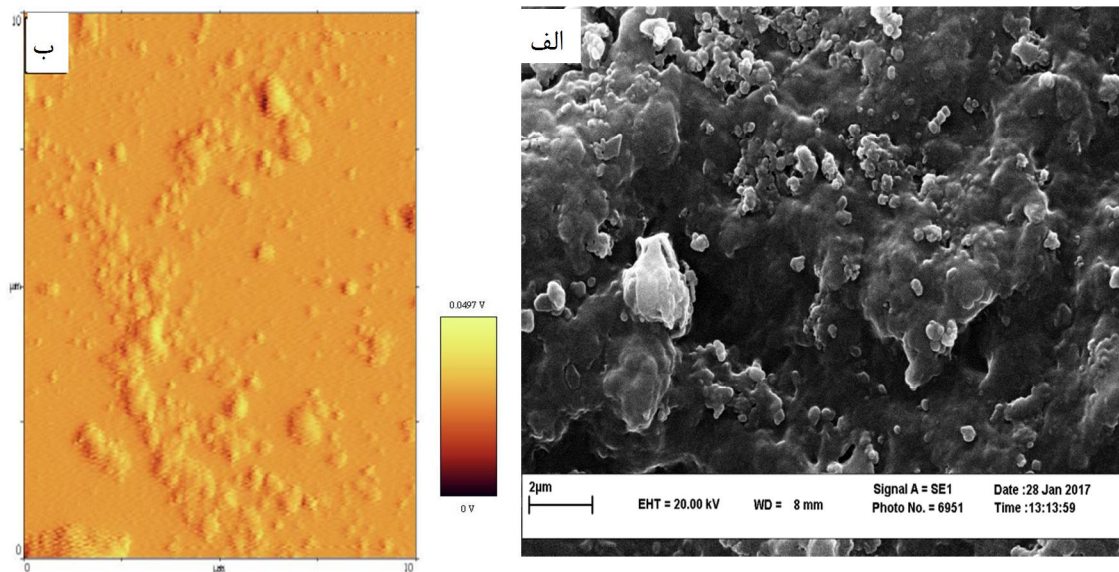
شکل ۳ - نتایج حاصل از اندازه گیری قطر ذرات (نانومتر) نانوکمپلکس WPI-HMP در نسبت های مختلف مقایسه میانگین ها با حروف نشان داده شده است. (الف) اسیدی سازی با روش قبل از ساخت (Pr-A) (ب) اسیدی سازی با روش بعد از ساخت (Po-A)

نشان داد که بالاترین و پایین‌ترین میزان لاکتوفیرین در نسبت ۲:۱ در روش (Po-A) و در $\text{pH}=4$ و نیز در هر دو روش در $\text{pH}=3$ مشاهده شد.

نتایج نشان داد که بازده ریزپوشانی در روش اسیدی‌سازی قیل (Pr-A) به‌طور معنی‌داری ($P < 0.005$) بیشتر از این بازده در روش دیگر می‌باشد. شباهت زیادی در توزیع سایز نانوذرات مشاهده‌شده در هر دو تصویر AFM و SEM مشاهده می‌گردد (شکل ۴).

نتایج حاصل از ریزپوشانی لاکتوفیرین توسط نانوکمپلکس WPI-HMP در pHهای مختلف

نتایج حاصل از بازده رسوب کمپلکس در هر دو روش مورد استفاده با افزایش نسبت WPI با افزایش pH از ۳ به ۴ کاهش می‌یابد این امر می‌تواند ناشی از تأثیر متقابل بهتر ناشی از افزایش بار منفی پکتین و بار مثبت WPI در اثر کاهش pH باشد (Bédié *et al.*, 2008). نتایج حاصل از کارایی ریزپوشانی لاکتوفیرین



شکل ۴ - نتایج حاصل از SEM و AFM نانوکمپلکس WPI-HMP در نسبت ۲:۱ در $\text{pH}=3$

مثبت داشته است و از آنجاکه نمونه لاکتوفیرین با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای ۱۶ درصد افزایش رشد نسبت به کنترل مثبت بوده است، می‌توان نتیجه گرفت که تقریباً تمامی لاکتوفیرین در ترکیب یادشده ریزپوشانی‌شده و یا با اتصال به کمپلکس از دسترس سلول دور مانده است، اما نتایج حاصل از لاکتوفیرین ریزپوشانی‌شده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر توسط نانوکمپلکس WPI/HMP رشدی معادل ۱۱۳ درصد را نشان می‌دهد و بیان‌کننده این مطلب است که ۱۳ درصد افزایش رشد نسبت به کنترل مثبت بوده و از نظر آماری در سطح لاکتوفیرین با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد (شکل ۵). بنابراین با مقایسه نتایج ذکرشده می‌توان نتیجه گرفت حدود نیمی از لاکتوفیرین‌ها در WPI/HMP+LF100 ریزپوشانی‌شده

نتایج حاصل از SEM و AFM نانوکمپلکس HMP-WPI

نتایج حاکی از این است که نانوذرات کمپلکس اشکال کروی و اندازه ذراتی در حد نانو داشته و طیف گسترده‌ای از اندازه ذرات را نشان می‌دهند.

نتایج حاصل از بررسی اثر نانوکمپلکس ایزوله پروتئین آب‌پنیر/پکتین روی سلول استئوبلاست MG63 توسط آزمایش MTT

نتایج حاصل از بررسی اثر نانوکمپلکس ایزوله آب‌پنیر/پکتین روی سلول استئوبلاست MG63 توسط آزمایش MTT نشان می‌دهد که سلول‌های استئوبلاست در مجاورت با لاکتوفیرین و ایزوله پروتئین آب‌پنیر افزایش رشد و تکثیر داشته‌اند. لاکتوفیرین ریزپوشانی‌شده با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر توسط نانوکمپلکس WPI/HMP رشدی معادل کنترل

استئوبلاست نیز تأثیر لاکتوفرین بر ساخت ماتریکس خارج سلولی افزایش می‌یابد. Comish و همکاران (۲۰۰۴) و Takayama و همکاران (۲۰۰۸) به علاوه نشان داده شده که لاکتوفرین باعث افزایش طول عمر استئوبلاست‌ها نیز می‌شود و آپوپتوز استئوبلاست‌ها در حضور لاکتوفرین کاهش می‌یابد به طوری که در حضور غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لاکتوفرین، این میزان به کمتر از ۵۰ درصد می‌رسد و وابسته به مقدار کاهش می‌یابد (Cornish et al., 2004; Grey et al., 2006).

مطالعه‌های آزمایشگاهی نشان داده است که لاکتوفرین از طریق افزایش استئوبلاست‌ها و کاهش آپوپتوز آنها و نیز از طرق افزایش آپوپتوز سلول‌های استئوکلاست سبب افزایش تراکم استخوان گردد (Cornish et al., 2004). همچنین نتایج محققین بیان‌کننده این مطلب است که آپوپتوز استئوبلاست‌ها در غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لاکتوفرین مهار می‌گردد (Hou et al., 2014).

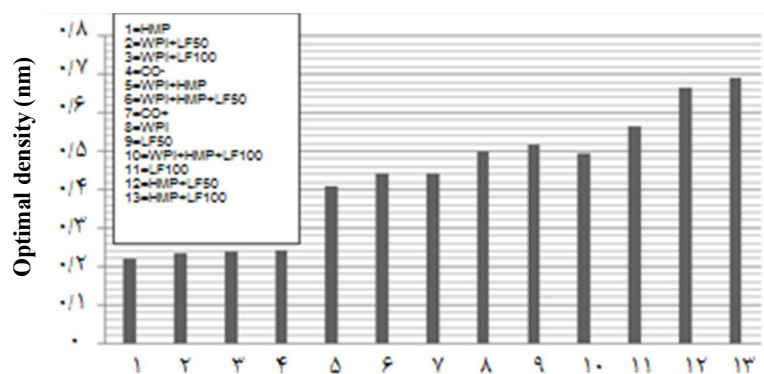
نتایج مربوط به نمونه‌های کنترل مثبت، ترکیب پکتین با WPI و نیز ترکیب پکتین با WPI همراه با ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر لاکتوفرین نشان می‌دهند که این نمونه‌ها در یک سطح قرار دارند و اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند ($P < 0.05$) این نتایج می‌تواند بحث مربوط به دخالت بارهای سطحی در رشد سلولی را تأیید نماید بدین‌منظور که بارهای منفی HMP با بارهای مثبت WPI خنثی شده است تا سلول بتواند به‌طور عادی رشد نماید. درخصوص نمونه‌های WPI، LF50 و WPI+HMP+LF100 که از نظر آماری در یک سطح می‌باشند. ضریب رشد در مقایسه با کنترل مثبت به ترتیب ۱۱۲/۴، ۱۱۳ و ۱۱۶ درصد می‌باشد. نمونه LF100 دارای ضریب رشدی معادل ۱۲۷/۵ درصد بوده که از نظر آماری با سایر نمونه‌ها تفاوت معنی‌داری دارد ($P < 0.05$).

و نیمی آزاد باقی می‌ماند تا موجب افزایش رشد سلولی گردد.

میزان رشد برای ترکیب لاکتوفرین و پکتین در هر دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفرین بیشتر از تمامی نمونه‌های مورد بررسی بوده است که علی‌رغم داشتن تفاوت عددی از نظر آماری با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند، اما با سایر نمونه‌های مورد آزمایش اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) مشاهده شد. این امر شاید به دلیل این باشد که ترکیب پکتین با لاکتوفرین به لاکتوفرین بار منفی می‌دهد (Bengoechea et al., 2011) و لاکتوفرین می‌تواند بهتر در دسترس سلول قرار گیرد. نتایج حاصل از نمونه‌های حاوی ترکیب لاکتوفرین و آب‌پنیر در هر دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفرین که هیچ رشد سلولی را نشان نمی‌دهد این تحلیل را ثابت می‌نماید یعنی اینکه ترکیب هر دو پروتئین با بارهای مثبت سبب افزایش بار مثبت در محلول شده و از تکثیر سلول استئوبلاست جلوگیری نموده است.

نتایج سایر محققین نشان می‌دهد که لاکتوفرین در شرایط آزمایشگاهی باعث افزایش بقا و تمایز سلول‌های استئوبلاست و مهار تشکیل استئوکلاست می‌شود و در زمان کمبود استروژن از کاهش بافت استخوان جلوگیری می‌نماید (Naot et al., 2012). همچنین مطالعه‌های آزمایشگاهی نشان می‌دهد که تکثیر سلول‌های استئوبلاست در مجاورت لاکتوفرین افزایش می‌یابد، به طوری که در غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لاکتوفرین، تقسیم هسته ۲ برابر شده و در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۵ برابر خواهد شد (Cornish et al., 2004).

تحقیق‌ها روی تمایز، تکثیر و فعالیت استئوبلاست‌ها نشان می‌دهد که در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و بالاتر لاکتوفرین، سطح معدنی‌شدن افزایش داشته و با میزان ثابت سلول



شماره نمونه‌های مختلف

شکل ۵ - نتایج حاصل از بررسی اثر لاکتوفیرین ریزبوشانی‌شده با نانوکمپلکس ایزوله پروتئین آب‌پنیر/پکتین روی سلول استئوبلاست MG63 با استفاده از آزمایش MTT

درون سلولی^۱ دیده شد که تزریق لاکتوفیرین در همی‌کالواریا^۲ موش‌های نر باعث افزایش ضخامت استخوان در سمت مورد نظر می‌شود. به‌ویژه در غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر این ضخامت ۴ برابر گروه کنترل بوده است (Cornish *et al.*, 2004).

همچنین توسط Grey و همکاران (۲۰۰۴) نیز گزارش کرده‌اند که در سطح (LRP1) و (LRP2) گیرنده‌هایی وجود دارند که در اثر اتصال لاکتوفیرین به این گیرنده‌ها لاکتوفیرین پس از ۳۰ دقیقه اندوسیتوز می‌گردد. همچنین لاکتوفیرین قادر است فسفوریلاسیون MAP kinases p42/44 را تحریک نموده و از این طریق سبب تکثیر بیشتر سلول استئوبلاست گردد.

گزارش شده است Hill و همکاران (۱۹۹۷) که رشد و تزاید سلول‌های استئوبلاست و الیگوندروسیت‌ها نیاز به فاکتورهای رشد اختصاصی نظیر IGF-I و IGF-II دارند هنگامی که این سلول‌ها از فاکتور رشد محروم می‌شوند به‌نظر می‌رسد مسیرهای مرگ سلولی فعال می‌شود و این سلول‌ها خودشان را می‌کشند یعنی آپاپتوزیس اتفاق می‌افتد. اینکه در نمونه‌های WPI+LF50، WPI+LF100 و HMP تجمع زیاد بارهای هم‌نام برای WPI+LF50 و WPI+LF100 بار مثبت و برای HMP بار منفی چگونه سبب فعال شدن مرگ برنامه‌ریزی سلول می‌شوند و یا

Hou و همکاران (۲۰۱۵) و Takaoka و همکاران (۲۰۱۱) به بررسی اثر لاکتوفیرین در تکثیر و تمایز سلول‌های استئوبلاست موش از طریق تنظیم افزایشی انسولین و بیان فاکتور رشد پرداختند، نتایج نشان داد که رشد سلول‌های استئوبلاست افزایش یافته‌اند نتایج تحقیق حاضر با نتایج این محققین همخوانی دارد. این‌طور به‌نظر می‌رسد که لاکتوفیرین می‌تواند همانند عوامل رشد دیگر در استخوان‌سازی مؤثر باشد و کیفیت و کمیت ترمیم استخوان را بهبود بخشد. مشاهده شده است که لاکتوفیرین گاوی در شرایط آزمایشگاهی در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تشکیل استئوکلاست‌ها را متوقف می‌نماید (Cornish *et al.*, 2004).

اثر لاکتوفیرین در بستر تیتانیوم توسط (Kim *et al.*, 2014) به‌منظور افزایش فعالیت سلول استئوبلاست رده MG-63 مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند که فعالیت استئوبلاست، باعث فعالیت آلکالین فسفاتاز شده و کلسیم در کشت بسترهای تیتانیوم و لاکتوفیرین نسبت به کشت سلول در بسترهای تیتانیوم تنها بیشتر رسوب کرده‌اند، این امر نشان می‌دهد که لایه تیتانیوم و لاکتوفیرین بی‌حرکت در افزایش فعالیت استئوبلاست مؤثر بوده است.

تشکیل استئوکلاست‌های جدید نیز به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد به‌طوری‌که در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لاکتوفیرین، تشکیل استئوکلاست‌ها متوقف می‌شود. ولی لاکتوفیرین تأثیری بر استئوکلاست‌های بالغ ندارد. در مطالعه‌های

¹ Invitro

² Hemicalvaria

(A)، اندازه نانوذرات با کاهش نسبت پروتئین به پکتین، افزایش یافت. نتایج نشان داد که با کاهش pH افزایش بار مثبت ایزوله پروتئین آب پنیر و بار منفی مولکول های پکتین اتفاق می افتد که در نتیجه نانوذراتی با اندازه کوچکتر ایجاد می گردد. از طرف دیگر، اندازه نانوذرات با افزایش نسبت پکتین به ایزوله آب پنیر افزایش یافت. این حالت در نتیجه افزایش ضخامت لایه بیرونی با به کارگیری غلظت های بیشتر بیوپلیمر است. نتایج حاصل از بررسی اثر نانوکمپلکس ایزوله آب پنیر/پکتین روی سلول استئوبلاست MG63 توسط آزمایش MTT نشان داد که سلول های استئوبلاست در مجاورت با لاکتوفرین و ایزوله پروتئین آب پنیر افزایش رشد و تکثیر داشته اند. لاکتوفرین ریزپوشانی شده با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر توسط نانوکمپلکس WPI/HMP رشدی معادل کنترل مثبت داشته است. لذا می توان نتیجه گرفت که لاکتوفرین ریزپوشانی شده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر توسط نانوکمپلکس، رشدی معادل ۱۱۳ درصد دارد و از نظر آماری در سطح لاکتوفرین خالص با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر قرار گرفت.

از سایر مسیرها از رشد سلول استئوبلاست جلوگیری نموده اند باید بیشتر مورد بررسی قرار گیرند. محقق دیگر Grey و همکاران (۲۰۰۶) بیان می دارد که لاکتوفرین گاوی علاوه بر مسیر وابسته به LPR1 که سبب فعال سازی PI3 kinase و مهار P42/44 MAP kinase می شود با مسیر دیگری سبب تکثیر استئوبلاست می گردد که نشان می دهد برای روشن شدن مسیر اثر لاکتوفرین بر سلول های استئوبلاست تحقیق های زیادی مورد نیاز می باشد.

نتیجه گیری

ریزپوشانی لاکتوفرین توسط نانوکمپلکس پکتین - ایزوله پروتئین آب پنیر و ارزیابی تشکیل نانوکمپلکس آن با هدف اثر لاکتوفرین ریزپوشانی شده بر رشد و زندهمانی رده سلولی استئوبلاست MG63 مورد بررسی قرار گرفت. با افزایش مقدار پکتین، میزان بار منفی بیشتر شده که به افزایش سطح بار منفی نانوذرات تشکیل شده استناط می شود. کمترین پتانسیل زتا در کمپلکس WPI-HMP در نسبت ۲:۱ و pH=۳ مشاهده شد. در هر دو روش (Pr-A) و (Po-)

منابع

- 1- Aala, M., Aghaei Meybodi HR, Peymani M, & Larijani B. 2009. Osteoporosis and exercise in postmenopausal women. *Iranian Journal of Endocrinology & Metabolism*, 11(2):209-217.
- 2- Arnett T. 2003. Regulation of bone cell function by acid-base balance. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(2):511-520.
- 3- Bédié, G.K., Turgeon, S.L., & Makhlof, J. 2008. Formation of native whey protein isolate-low methoxyl pectin complexes as a matrix for hydro-soluble food ingredient entrapment in acidic foods. *Food Hydrocolloids*, 22(5):836-844.
- 4- Bengoechea, C., Jones, O.J., Guerrero, A., & McClements, D.J. 2011. Formation and characterization of lactoferrin/pectin electrostatic complexes: Impact of composition, pH and thermal treatment. *Food Hydrocolloids*, 25(5):1227-1232.
- 5- Bharadwaj, S., Naidu, A.G.T., Betageri, G.V., Prasadarao, N.V., & Naidu, A.S. 2009. Milk ribonuclease-enriched lactoferrin induces positive effects on bone turnover markers in postmenopausal women. *Osteoporosis International*, 20(9):1603-1611.
- 6- Cornish, J., Callon, K.E., Naot, D., Palmano, K.P., Banovic, T., Bava, U., Watson, M., Lin, J.-M., Tong, P.C., Chan, Q.C.V.A., Reid, H.L., Fazzalari, N., Baker, H.M., Haggarty, N.W., Grey, A.B., & Reid, I.R. 2004. Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation *in vivo*. *Endocrinology*, 145(9):4366-4374.
- 7- Cummings, S.R., & Melton, L.J. 2002. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet*, 359(9319):1761-1767.
- 8- Dickinson, E. 2008. Interfacial structure and stability of food 355 emulsions as affected by protein-polysaccharide interactions. *Soft Matter*, 4(5):932-942.

- 9- Du, M., Liu, M., Fan, F., Shi, P., & Tu, M. 2017. Structure, function, and nutrition of lactoferrin. P. 33-61. In *Mineral Containing Proteins*, Springer.
- 10-Esfanjani, A.F., Jafari, S.M., Assadpour, E., & Mohammadi, A. 2015. Nano-encapsulation of saffron extract through double-layered multiple emulsions of pectin and whey protein concentrate. *Journal of Food Engineering*, 165:149-155.
- 11-Esfanjani, A.F., & Jafari, S.M. 2016. Biopolymer nano-particles and natural nano-carriers for nano encapsulation of phenolic compounds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146(1):532-543.
- 12-Esfanjani, A.F., Jafari, S.M., & Assadpour, E. 2017. Preparation of a multiple emulsion based on pectin-whey protein complex for encapsulation of saffron extract nanodroplets. *Food Chemistry*, 221:1962-1969.
- 13-Ferreira, S.E., Mello, M.T., Pompeia, S., & Souza-Formigoni, M.L. 2006. Effects of energy drink ingestion on alcohol intoxication. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 30(4):598-605.
- 14-García-Montoya, I.A., Cendón, T.S., Arévalo-Gallegos, S., & Rascón-Cruz, Q. 2011. Lactoferrin a multiple bioactive protein: a overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 23(3):112-120.
- 15-Garnero, P., & Delmas, P.D. 2002. Evaluation of risk for osteoporosis fractures. P.1291-1301. In: Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Rodan, G.A. editors. *Principles of bone biology*. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press.
- 16-Grey, A., Banovic, T., Zhu, Q., Watson, M., Callon, K., Palmano, K., Ross, J., Naot, D., Reid, I.R., & Cornish, J. 2004. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is a mitogenic receptor for lactoferrin in osteoblastic cells. *Molecular Endocrinology*, 18(9):2268-2278.
- 17-Grey, A., Zhu, Q., Watson, M., Callon, K., & Cornish, J. 2006. LF potently inhibits osteoblast apoptosis, via an LRP1-independent pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 251(1-2):96-102.
- 18-Hill, P.A., Tumber, A., & Meikle, M.C. 1997. Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis. *Endocrinology*, 138(9):3849-3858.
- 19-Honary, S., & Zahir, F. 2013. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems a review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(2):255-264.
- 20-Hou, J.M., Chen, E.Y., & Wei, S.C. 2014. Lactoferrin inhibits apoptosis through insulin-like growth factor I in primary rat osteoblasts. *Acta Pharmacol Sinica*, 35(4):523-530.
- 21-Hou, J.M., Chen, E.Y., Lin, F., Lin, Q.M., Xue, Y., Lan, X.H., & Wu, M. 2015. Lactoferrin induces osteoblast growth through IGF-1R. *International Journal of Endocrinology*, 1:282-286.
- 22-Jafari, S.M., Assadpour, E., He, Y., & Bhandari, B. 2008. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Drying Technology*, 26(7):816-835.
- 23-Jeney, V. 2017. Clinical impact and cellular mechanisms of iron overload-associated bone loss. *Front Pharmacol*, 8:77.
- 24-Jensen, E.V., Buch-Andersen, T., Ravn-Haren, G., & Dragsted, L.O. 2015. Mini-review: the effects of apples on plasma cholesterol levels and cardiovascular risk - a review of the evidence. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 84(6):34-41.
- 25-Kanwar, J.R., Roy, K., Patel, Y., Zhou, S.-F., Singh, M.R., Singh, D., Nasir, M., Sehgal, R., Sehgal, A., & Singh, R.S. 2015. Multifunctional iron bound lactoferrin and nanomedicinal approaches to enhance its bioactive functions. *Molecules*, 20(6):9703-9731.
- 26-Katouzian, I., & Jafari, S.M. 2016. Nano-encapsulation as a 386 promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. *Trends in Food Science & Technology*, 53:34-48.
- 27-Kim, S.E., Yuna, Y.P., Lee, J.Y., Park, K., & Suh, D.H. 2014. Osteoblast activity of MG-63 cells is enhanced by growth on a lactoferrin-immobilized titanium substrate. *Colloids Surface*, 123(1):191-198.

- 28-Mirhosseini, H., Tan, C.P., Hamid, N.S., & Yusof, S. 2008. Effect of arabic gum, xanthan gum and orange oil content on ζ -potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 315(1):47-56.
- 29-Mohammadi, A., Jafari, S.M., Esfanjani, A.F., & Akhavan, S. 2016. Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil. *Food Chemistry*, 190:513-519.
- 30-Mohnen, D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3):266-277.
- 31-Mosmann, T.R. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*; 65(1-2):55-63.
- 32-Naot, D., Palmano, K., & Cornish, J. 2012. Lactoferrin-A Potential Anabolic Intervention in Osteoporosis. *Osteoporosis. Yannis Dionyssiotis*, 39:803-820.
- 33-Peinado, I., Lesmes, U., Andrés, A., & McClements, J.D. 2010. Fabrication and morphological characterization of biopolymer particles formed by electrostatic complexation of heat treated lactoferrin and anionic polysaccharides. *Langmuir*, 26(12):9827-9834.
- 34-Plotkin, L.I., Weinstein, R.S., Parfitt, A.M., Roberson, P.K., Manolagas, S.C., & Bellido, T. 1999. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *Journal of Clinical Investigation*, 104:1363-1374.
- 35-Raei, M., Rajabzadeh, G., Zibaei, S., Jafari, S.M., & Sani, A.M. 2015. Nano-encapsulation of isolated lactoferrin from camel milk by calcium alginate and evaluation of its release. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79:669-673.
- 36-Sejersen, M.T., Salomonsen, T., Ipsen, R., Clark, R., Rolin, C., & Engelsen, S.B. 2007. Zeta potential of pectin-stabilised casein aggregates in acidified milk drinks. *International Dairy Journal*, 17(4):302-307.
- 37-Singh, O., & Burgess, D. 1989. Characterization of albumin-alginate acid complex coacervation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 41(10):670-673.
- 38-Smithers, G.W. 2008. Whey and whey proteins-from 'gutter-to-gold'. *International Dairy Journal*, 18(7):695-704.
- 39-Surh, J., Decker, E.A., & McClements, D.J. 2006. Influence of pH and pectin type on properties and stability of sodium-caseinate stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 20(5):607-618.
- 40-Takaoka, R., Hikasab, Y., Hayashic, K., & Tabata, Y. 2011. Bone regeneration by lactoferrin released from a gelatin Hydrogel. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 22(12):1581-1589.
- 41-Takayama, Y., & Mizumachi, K. 2008. Effect of bovine lactoferrin on extracellular matrix calcification by human osteoblast-like cells. *Biosci Biotechnol and Biochem*, 72(1):226-30.
- 42-Tate, M.L., Adamson, J.R., Tami, A.E., & Bauer, T.W. 2004. Cells in focus, the osteocyte. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(1):1-8.
- 43-Tomita, M., Wakabayashi, H., Shin, K., Yamauchi, K., Yaeshima, T., & Iwatsuki, K. 2009. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *Biochemistry*, 91(1):52-57.
- 44-Tromp, R.H., de Kruif, C.G., van Eijk, M., & Rolin, C. 2004. On the mechanism of stabilisation of acidified milk drinks by pectin. *Food Hydrocolloids*, 18(4):565-572.
- 45-Wang, Z., & McCauley, L.K. 2011. Osteoclasts and odontoclasts: signaling pathways to development and disease. *Oral Diseases*, 17(2):129-42.
- 46-Ye, A. 2008. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications-a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(3):406-415.

The Effect of Encapsulated Camel milk's Lactoferrin with Whey Protein Isolate-pectin Complexes on the Growth and Viability of MG63 Osteoblast Cell

Masoumeh Raei¹, Fakhri Shahidi^{2*}, Majid Farhoodi³,
Seid Mahdi Jafari⁴, Ali Rafe⁵

- 1- PhD Student, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
- 2- Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
- * Corresponding author (niloofar1373@yahoo.com)
- 3- Assistant Professor, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Mashhad, Iran
- 4- Associate Professor, Department of Food Materials and Process Design Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
- 5- Associate Professor, Department of Food Processing, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

Abstract

Lactoferrin is one of the most important bioactive compounds that can increase the activity of the immune system and osteogenicity. However, it is sensitive to environmental stresses. Hence, the production of functional beverage including encapsulated lactoferrin by noncomplex of WPI/HMP was investigated in the current work. Nanocomplex was prepared by a complexation of whey protein isolate (WPI)-high methoxyl pectin (HMP) at total biopolymer concentration of 0.4% (w/w) at pH values of 3, 3.5 and 4 through post and pre-blending acidification procedures. In order to encapsulate lactoferrin, it was inserted to the WPI/HMP complex in which formed by the ratio 2:1 and pre-acidification (Pr-A). The results of Zeta-potential and particle sizes showed that by increasing HMP, the negative sites of the complex increased as well as the size of nano-particles. The effect of entrapped lactoferrin in WPI/HMP nano-particles on osteoblastic proliferation by MTT assay showed WPI/HMP+LF50 $\mu\text{g/mL}$ a growth equal to the rate of positive control. For example the pure lactoferrin concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$ progressed 16% growth compared to the positive control. Therefore, it can be concluded that almost all lactoferrin in WPI/HMP+LF50 $\mu\text{g/mL}$ combined or complexed and the cell access failed. The lactoferrin entrapped by WPI/HMP+LF100 $\mu\text{g/mL}$ had a 113% growth and statistically occurred at level of pure lactoferrin 50 $\mu\text{g/mL}$.

Keywords: Beverage, Lactoferrin, Osteoblast, Pectin, Whey Protein Isolate