Archive of SID

بررسی رهایش لاکتو فرین خالص شده ازشیر شتر تک کوهانه از نانوکپسولهای آلژینات کلسیم در pH و زمان مختلف

معصومه راعی[۱] ، سعید ز یبائی[۲]، قدیر رجب زاده [۳] ، علی محمدی ثانی[۴]

۱ - کارشناس ارشد پژوهشکده علوم وصنایع غذایی- مشهد، ۲ - عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی شعبه شمال شرق- مشهد، ۳ - عضو هیئت علمی پژوهشکده علوم وصنایع غذایی- مشهد و ۴ - عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان

Corresponding author: s.zibaee@mrazi.ac.ir

چکیده

لاکتوفرین بیو اکتیوی با خاصیت بسیار مهم می باشد.در این تحقیق لاکتوفرین شیر شتر خالص شده به روش کروماتوگرافی تعویض یونی با غلظت ۱ درصد توسط ۰/۵د رصد وزنی/حجمی از آلژینات کلسیم ریزپوشانی شد انجام شد. نتایج نشان داد که روش مورد استفاده برای ریز پوشانی مناسب بوده و میزان کارآئی ریزپوشانی برای غلظت های ۷۰/۰۸درصد بدست آمد. بررسی قطر ذرات نشان داد که کپسول هایی درمقیاس نانو (با ۲۵/۱ نانومتر- به نسبت ۱۵/۳ درصد) تشکیل شده است. مقادیر پتانسیل زتا ۵/۱۱- بوده که نشان از پایداری نسبی امولسیونهای تشکیل شده دارد. بررسی اندازه و مورفولوژی محصول با میکروسکوپ الکترونی روبشی(SEM)، تشکیل نانوکپسول ها را در روش حاضر تایید نمود. نتایج حاصل از رهایش لاکتو فرین از نانوکپسولهای آلژینات کلسیم در pH و زمان مختلف نشان می دهد که لاکتوفرین در نمونه های نگهداری شده در pH=2 و ۱۲۰ دقیقه و نیز در این pH در زمانهای ۶۰ آزاد شده است ، این موضوع نشان دهنده که تا ۳۰ دقیقه در این pH که pH معده می باشد نانوکپسول ها توانسته اندکه از رهایش لاکتو فرین از کپسول جلوگیری نمایند . در این تحقیق این عدم تجزیه در pH دو تا ۱۲۰ دقیقه نیز دیده شد است . شاید

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده از آلژینات کلسیم سبب مقاومت بیشتر شده و یا لاکتوفرین شیر شتر نسبت به لاکتوفرین شیر گاو از مقاومت بیشتری نسبت به pH برخوردار می باشد.

لغات کلیدی : شتر؛ لاکتو فرین ، آلژینات کلسیم ، رهایش

مقدمه

شیر شتر دارای ترکیبات با اهمیت و قابل توجه ای نظیر پروتئین اسیدی آب پنیر (WAP)و پپتید های شبه انسولینی می باشد. و نیز بدلیل فقدان بتا دو لاکتوگلوبولین ایجاد آلرژی در بچه هایی که شیر مصرف می کنند نخواهد نمود. این محصول مهم دارای بیو اکتیو هایی است که هر کدام بنوبه خود بسیار با ارزش بوده و عملکرد بیولوژیکی خاصی دارند. بیو اکتیو های شیر به چهار گروه عمده تقسیم می شوند. بیواکتیو هایی که موجب فعالیت بهتر سیستم گوارشی می شوند: (مانندβو α-کازئین ، κ-کازئین ولاکتو فرین) ، بیو اکتیو هایی که سبب رشد می گردند :(مانند α و β-لاکتو گلوبولین، پاراتورمونP ، هورمون رشد، لاکتو فرین) ، بیواکتیو هایی که سبب تقویت سیستم ایمنی می شوند: (مانند ایمونوگلوبولین های GوA ، لاکتو فرین،پرولاکتین ،سایتوکائین ها)و بیو اکتیو هایی که نقش ضد میکروبی داشته بعنوان پروبیوتیک عمل می نمایند:(مانند لاکتوفرین، ،لیزوزیم،لاکتوپراکسیداز)(Gobbetti et al .,.2007) ، لاکتوفرین یکی از مهم ترین بیواکتیو های شیر محسوب می گردد که عملکرد های متنوع و بسیار با ارزش دارد. لاکتوفرین) گلیکوپروتئین از خانواده ترانسفرین است که وزن مولکولی حدود ۷۹ کیلودالتون دارد و دارای ۷۰۳ اسید آمینه می باشد . از یک زنجیره ی پلی پپتیدی منفرد تشکیل شده که به صورت دو لوب متقارن (C-lobe , N- lobe) در آمده است. (Isui et al. 2001). لاکتوفرین شیر شتر در مقایسه با لاکتوفرین گونه های دیگر در برخی خصوصیات ساختمانی و عملکردی متفاوت می باشد. بعنوان مثال ، مکان گلیکوزیله شدن لاکتوفرین در شیر شتر با بقیه حیوانات تفاوت دارد (Khan et al., 2001).

www.SID.ir

Archive of SID

لاکتوفین دارای فعالیت های ضد باکتری، ضد قارچی ، ضد ویروسی، ضد سرطانی،کمک برای استخوان زایی ، افزایش عملکرد سیستم ایمن و آنتی اکسیدانی می باشد.

فعالیت ضد میکروبی لاکتوفرین ناشی از دو مکانیسم ، اتصال به آهن و میانکنش مستقیم با میکرو ارگانیسم ، می باشد (Isui et al., 2011) . لاکتوفرین با مهار گیرنده های ویروس و اتصال به DNA و یا RNA اثرات ضد ویروس داشته وقادر به توقف رشد سلول های سرطانی بوده از طریق کنترل سیکل تکثیر سلولی و فعال نمودن آپاپتوزیس شده (González et al., 2009) و نیزباعث تقویت سیستم ایمنی می گردد (Al haj et al., 2010).و نیزاستخوانزایی سلول های استخوانی(استئوسیت ها) را تحت تاثیر قرار می دهد (González et al., 2009). ریز پوشانی فرآیندی است که در آن به کمک یک یا چند ماده، ترکیب مورد نظر پوشانده می شود.تکنولوژی ریز پوشانی امروزه توسعه زیادی یافته است و در صنایع مختلفی نظیر داروسازی،صنایع شیمیایی و غذایی کاربرد فراوانی دارد(Augustin et al,.2001 , Bengoechea et al., 2011).

آلژینات یک بیو پلیمر ارزان و غیر سمی است که بدلیل ارزان بودن، خاصیت تجزیه پذیری زیستی، خصوصیات هیدروفیلیکی برای انکپسوله نمودن مواد بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. این صمغ یک هترو پلی ساکارید خطی است که در دیواره سلولی و فضای بین سلولی جلبک قهوه ای یافت می شود. هم اکنون از تکنیک ریز پوشانی توسط آلژینات کلسیم برای رهایش کنترل شده داروها با منشاء پپتیدی جهت جذب در دستگاه گوارش، بمیزان زیاد استفاده می گردد(Lagoa et al., 2007, Pasparakis et al., 2006). ساختمان هیدروژل های آلژینات که به مواد ترشحی خارج سلولی در بافت های موجود زنده شباهت دارد موجب شده تا کاربرد زیادی از جمله در التیام زخم ها ، حمل دارو هاوبیواکتیو ها و پروتئین ها استفاده گردد(Lee and Mooney,.2012).

استفاده خوراکی از لاکتوفرین کاربرده ای وسیع ای در آینده نزدیک پیدا خواهد نمود اگر چه لاکتوفرین نسبت به pHمقاوم است اما شرایط معده(آنزیم ها ،pH ونمک ها) سبب تجزیه آن خواهند شد. ریز پوشانی لاکتوفرین می تواند

www.SID.ir

Archive of SID

موجب عبورآن از معده و سپس فعال شدن در روده گردد. که شرایط مناسب را برای جذب و نیز اعمال اثر آن درمحل فراهم می آورد . شرایط رهایش لاکتوفرین از نانوکپسول های تشکیل شده در زمانهای مختلف می تواند برای کار برد مد نظر بسیار مهم باشد . تحقیق حاضر به بررسی میزان رهایش لاکتو فرین خالص شده ازشیر شتر تک کوهانه از نانوکپسولهای آلژینات در pH و زمان مختلف پرداخته است.

مواد و روش ها

مواد مورد استفاده : لاکتو فرین شیر شتر(از لاکتوفرینی که با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی بوسیله رزین CM sephadex C-50 از شیر شتر تک کوهانه بوم شناخت ترکمن، در موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی شعبه شمال شرق استخراج وخالص شده بود ، استفاده گردید)، آلژینات کلسیم (از شرکت Fluka)، کلرید سدیم ، کلرید کلسیم دو آب ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ، سولفات آمونیوم، پراکسید هیدروژن ۳٪، گلیسرین، دی متیل سولفوکساید، اسید کلریدریک، تؤیین ۸۰، تریس، استات سدیم، گلیسین، آمونیوم پرسولفات، سدیم دودسیل سولفات، نیترات نقره، کربنات سدیم، متانول و از شرکت مرک آلمان(Merck) تهیه شدند. آلبومین سرم گاو BSA، CM Sephadex C-50، آکریل آمید، بیس آکریل آمید از شرکت سیگما آلدریچ(Sigma) تهیه شدند.

روش انکپسوله کردن لاکتوفرین

با تجربیات موجود و بر اساس منابع (Peinado et al., 2010 ، Tatyana et al., 2013 و Costa et al., 2009) از لاکتوفرین درغلظت نهایی ۰/۱ درصد و نیز آلژینات کلسیم با غلظت ۰/۵درصد وزنی/حجمی استفاده گردید . همچنین از ۲۷درصد (V/V)گلیسرول، و ۴ درصد(W/v) توئین ۸۰ (بعنوان سورفاکتانت) استفاده شد. برای تهیه ، محلول لاکتو فرین– آلژینات تهیه شده با استفاده از همزن مغناطیسی هم زده شده (۷۰۰آر پی ام ، درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی گراد) محلول آبی حاوی گلیسیرین به تدریج به فاز آبی اول حاوی آلژینات افزوده گردید و در شرایط(

www.SID.ir

Archive of SID

۷۰۰آر پی ام ، درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی گراد ، ۶۰ دقیقه) هم زده شد. کلرید کلسیم با ایجاد پل های عرضی به ذرات تولید شده استحکام می دهد(Jankowski et al., 1997). محلول کلسیم کلرید(CaCl2.6H2O) با غلظت ۰/۵ درصد وزنی–حجمی تهیه و امولسیون حاصل با استفاده از سرنگ با سرسوزن شماره ۱۸ ، به آرامی قطره قطره (۱۵قطره در دقیقه) درون ۵۰ میلی لیتر محلول چکانده شد.

بررسی کارآئی ریز پوشانی

مقدار پروتئین با استفاده از روش برادفورد و استفاده از سرم آلبومین گاوی BSA به عنوان استاندارد، اندازه گیری شد. جذب تمام نمونه ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه گیری گردید.

برای محاسبه بازده مقادیر پروتئین موجود در محلول اولیه (قبل از تشکیل امولسیون) و میزان پروتئین باقی مانده در محلول ناشی از شتشوی نهایی در نمونه وشاهد اندازه گیری گردید.

جهت افزایش صحت و دقت نمونه ها ی مورد آزمایش و شاهد هر آزمایش سه بار تکرار گردید.

تعیین اندازه ذرات ونحوه پراکنش آنها و اندازه گیری پتانسیل زتای ذرات

اندازه قطر کپسول ها ودرصد فراوانی کپسول ها با قطر های کوچک، متوسط و بزرگ و نیز اندازه پتانسیل زتای ذرات به کمک دستگاه انکسار نورلیزر مجهز به سل غیر مداوم مدل (DTS\MAL1033451-Ver.5.02) شرکت Malvern Instruments تعیین گردید. جهت تعیین مرفولوژی ذرات و مشاهده شکل ظاهری نانوکپسوله ای ایجاد شده از میکروسکوپ الکترونی SEM مدل (LEO 1450 VP Germany) آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد استفاده گردید.

اندازه گیری رهایش لاکتوفرین از کپسول های تشکیل شده در pH و زمانهای مختلف در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد

www.SID.ir

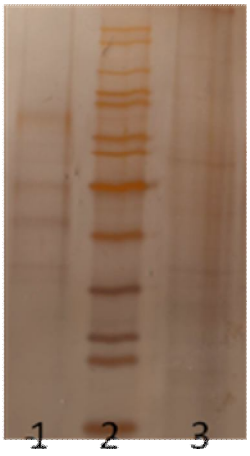
Archive of SID

بدین منظور میزان پروتئین رها شده از کپسول های تشکیل شده پس از شتشوی نهایی و نیز قبل از شتشوی نهایی پس از تنظیم نمونه ها مورد آزمایش و شاهد به pH ۲/۵ و ۷ توسط HCL 100mM و NaOH 0.1 N نمونه ها در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شده و میزان پروتئین آنها در زمانهای ۳۰ دقیقه، ۶۰ دقیقه ، ۱۲۰ دقیقه ، ۱۲ ساعت و ۲۴ ساعت پس از تنظیم pH انداه گیری شد. بدین منظور پس از سانتریفوژ ۵۰۰۰ rpm بمدت ۱۰ دقیقه نمونه ، میزان پروتئین مایع رویی اندازه گیری شد.

نتیجه گیری و بحث

نتایج حاصل از اندازه گیری میزان لاکتوفرین در نانوکپسول های تشکیل شده در نمونه های مورد آزمایش و شاهد نشان داد که کارآئی ریز پوشانی در نمونه های مورد آزمایش ۷۰/۰۸ درصد می باشد.

نتایج حاصل از بررسی لاکتوفرین رها شده در محلول رویی پس از انکپسوله کردن با استفاده از SDS-PAGE نیز تایید کننده این موضوع می باشد.



تصویر-۱نتایج حاصل ازتایید کارآئی ریز پوشانی با بررسی وجود لاکتوفرین رها شده در محلول رویی پس از انکپسوله کردن با استفاده از SDS-PAGE ، شماره ۱ لاکتوفرین رها شده در محلول رویی پس از انکپسوله کردن؛ شماره ۲ ، مارکر پروتئنی؛ شماره ۳، نمونه های رها شده در محلول رویی پس از انکپسوله کردن

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج حاصل از تعیین اندازه ذرات ونحوه پراکنش آنها

نتایج نشان می دهد که در نمونه مورد آزمایش به میزان (۱۵/۳درصد) ذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر(۲۵/۱ نانومتر) تشکیل داده است .

جدول ۱- نتایج حاصل از تهیه نانوکپسول های آلژینات حاوی لاکتوفرین با غلظت های مختلف آلژینات کلسیم

غلظت آلژینات	میانگین نمونه های	کارآئی (درصد)	شاخص بس پاشیدگی	متوسط پتانسیل زتا
۰/۵ درصد	مورد آزمایش	۷۰/۸۳	۰/۷۰۵	-۵/۱۱
	شاهد	۰	۰/۵۶	-۱/۹۳

جدول ۲- نتایج حاصل از درصد و متوسط اندازه های قطرذرات(کوچک ، متوسط و بزرگ)

غلظت آلژینات	شماره نمونه	میانگین درصد و اندازه قطر ذرات کوچک	میانگین درصد و اندازه قطر ذرات متوسط	میانگین درصد و اندازه قطر ذرات بزرگ	میانگین قطر ذرات
۰/۵ درصد	مورد آزمایش	٪۱۵/۳ ۲۵/۱	٪۶۳/۹ ۷۵۳	٪۳۲ ۴۳۵۱/۳۳	۶۷۳/۹۵
	شاهد	۰ ۰	٪۶۳/۹ ۷۵۳	٪۳۲ ۴۳۵۱/۳	۱۰۳۳/۸

نتایج حاصل از تعیین مرفولوژی ذرات و مشاهده ریز ساختار تشکیل شده با استفاده از (SEM)

www.SID.ir

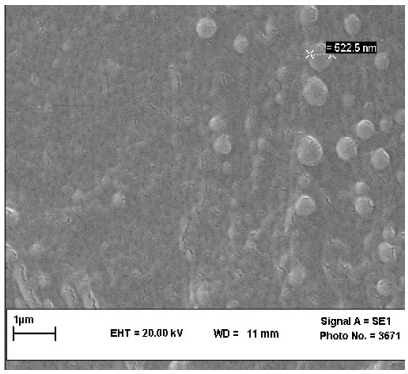
Archive of SID

نتایج حاصل از مشاهده نانوکپسول های تشکیل شده با استفاده از میکروسکوپ (SEM) نشان داد نانوذرات تشکیل شده اند .

در تحقیق حاضر بررسی نتایج حاصل از تشکیل نانو کپسول ها و نتایج حاصل از کارآئی ریز پوشانی نشان داد که روش مورد استفاده برای انکپسوله کردن لاکتوفرین روشی مناسب بوده و توانسته است در غلظت ۰/۵ درصد آلژینات نانوکپسول هایی با اندازه ذرات ۲۵/۱ نانومتر ایجاد نماید. نتایج حاصل از مشاهده نانوکپسول های تشکیل شده با استفاده از میکروسکوپ (SEM) تشکیل ذرات نانو را تایید می نماید. ذرات در برخی از موارد سطحی صاف با شکلی منظم(کروی)و در برخی موارد سطوح ناصاف با اشکال متفاوت نشان دادند. اندازه ذرات و بررسی پتانسیل زتا بدست آمده است حکایت از این دارد که پایداری مناسب می باشد. روش های متنوعی برای تشکیل ذرات پروتئین–پلی ساکاریدی بکاررفته است. بطور کلی این ذرات از طریق تشکیل پیوند کووالانسی(نظیر واکنش میلارد) با هم واکنش نشان می دهند و یا از طریق مهار (تحت کنترل در آوردن) خاصیت الکترواستاتیکی بیوپلی مرها برای تشکیل کمپلکس بیوپلی مری ذرات نانوپلی مری بوجود خواهد آمد که دارای هسته و دیواره باشند(Matalanis et al., 2011).

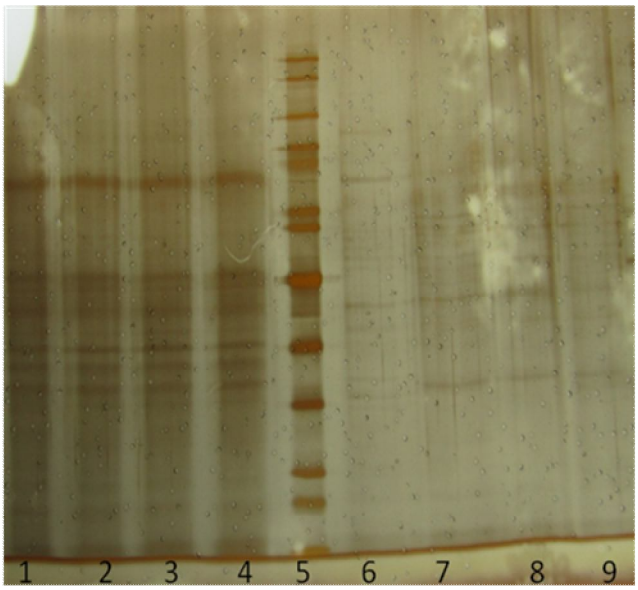
نتایج حاصل از اندازه گیری رهایش لاکتوفرین از کپسول های تشکیل شده در pH و زمانهای مختلف در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد

تصویر ۲– نتایج حاصل از مشاهده نانوکپسول های تشکیل شده با استفاده از (SEM)



www.SID.ir

Archive of SID



تصویر۳- نتایج حاصل از بررسی ساختمان لاکتوفرین رها شده در محلول رویی پس از انکپسوله کردن پس از نگهداری در دو pH (۲ و ۷) و زمانهای(۳۰ ،۶۰ و۱۲۰ دقیقه) با استفاده از SDS-PAGE ؛ نمونه شماره ۱- لاکتوفرین شاهد؛ شماره ۲ – نمونه نگهداری شده در pH=2 و زمان۱۲۰ دقیقه؛ شماره ۳، نمونه نگهداری شده در pH=7 و زمان۱۲۰ دقیقه؛ شماره۴، نمونه نگهداری شده در pH=2 و زمان۶۰ دقیقه؛ شماره ۵ ، مارکر؛ شماره ۶، نمونه نگهداری شده در pH=7 و زمان۶۰ دقیقه؛ شماره ۷، نمونه نگهداری شده در pH=2 و زمان۳۰ دقیقه؛ شماره ۸ ، نمونه نگهداری شده در pH=7 و زمان۳۰ دقیقه؛ شماره ۹، نمونه نگهداری شده در pH=2 و زمان۱۲۰ دقیقه

Peinado et al., 2010 جهت تشکیل نانو ذرات پروتئینی از لاکتوفرین گاوی استفاده نموده است و ثبات ذرات لاکتوفرین را در pH های متفاوت و قدرت یونی متفاوت برای تشکیل ذرات ارزیابی نموده است در این تحقیق از غلظت های مختلف پلی ساکارید همراه با غلظت ۰/۲درصد لاکتوفرین استفاده نموده است. جهت طراحی میزان لاکتوفرین مناسب با تکیه بر نتایج Peinado et al., 2010 و Tatyana et al., 2013 و Costa et al., 2009 از غلظت ۰/۱ درصد لاکتوفرین استفاده گردید. بررسی نتایج بدست آمده نشان داد که استفاده از این غلظت همراه با غلظت ۰/۵ در صد آلژینات کلسیم نتایج مطلوبی جهت تولید نانو کپسول به همراه داشت. Tatyana et al., 2013 از روش تشکیل نانوذرات لاکتوفرین-پلی ساکارید بدون بکارگیری روغن استفاده نموده است در این تحقیق از غلظت های ۰/۰۱

www.SID.ir

Archive of SID

تا ۰/۵درصد پلی ساکارید همراه با غلظت ۰/۲ درصد لاکتوفرین استفاده شده است روش استفاده شده در مطالعه این محققین نشان داد که از پلی ساکارید هایی نظیر آلژینات و کاراگینان می توان جهت حفاظت لاکتوفرین برای عبور مناسب از معده استفاده نمود. در مطالعه ما، از ۰/۵ درصد آلژینات کلسیم استفاده شده است. نتایج حاصل نشان می دهد لاکتوفرین در نمونه های نگهداری شده در pH=2 و ۱۲۰ دقیقه و نیز در این pH در زمانهای ۶۰ آزاد شده است ، که این نشان دهنده این موضوع می باشد که تا ۳۰ دقیقه در این pH که pH معده می باشد نانوکپسول ها توانسته اندکه از رهایش لاکتو فرین از کپسول جلوگیری نمایند . این موضوع توسط Tatyana و همکاران (۲۰۱۳) نیزمورد بررسی قرار گرفته است. این محققین به این نتیجه رسیده اند که در باز سازی شرایط معده تشکیل نانوکپسول حاوی آلژینات سدیم توانسته بمدت ۴۰ دقیقه تجزیه نشود ، در این تحقیق این عدم تجزیه در pH دو تا ۱۲۰ دقیقه نیز دوام یافته است . یعنی اینکه در این pH لاکتوفرین پس از ۳۰ دقیقه (کمتر از ۶۰ دقیقه) از نانوکپسول ها رها می شود و تا دقیقه ۱۲۰ پس از قرار گرفتن در این شرایط تجزیه نمی گردد. شاید استفاده از آلژینات کلسیم سبب مقاومت بیشتر شده و یا لاکتوفرین شیر شتر نسبت به لاکتوفرین شیر گاو از مقاومت بیشتری نسبت به pH برخوردار می باشد.

Ye Aiqian et al., 2012 بمنظور تولید نانوکپسول لاکتوفرین از امولسیون روغن در آب استفاده نموده است. دراین تحقیق ماده دیواره کازینات سدیم و یا پروتئین های آب پنیر بوده که در حضور کلسیم امولسیون تشکیل شده ، که توسط پیوند های الکترواستاتیک اتصال لاکتوفرین با پروتئین انجام گردید و بدین ترتیب ذرات نانو در داخل دیواره مورد نظر تشکیل شد. در تحقیقی که ما انجام داده ایم میزان پتانسیل زتای بدست آمده نشان از پایداری نسبتا مناسب امولسیون ها دارد.Costa et al., 2009 بمنظور تشکیل نانوکپسول لاکتوفرین جهت استفاده برای فورمولاسیون دهانشویه از روش تشکیل امولسیون مرکب آب در روغن در آب (W/O/W) استفاده نمود. در این تحقیق از غلظت های ۲۵ تا ۲۵۰ میلی گرم لاکتوفرین استفاده شده است .

www.SID.ir

Archive of SID

References:

1 -Adem , G., Gae.lle ,R., Odile ,C., Andre´e ,V., Re´mi ,S. 2007.Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients. An overview, Food Research International, 40:1107–1121 .

2-Al haj, O A., Hamad A. Al Kanhal. 2010. Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk. Department of Food Science & Nutrition, College of Food and Agricultural Sciences, King Saud University, P.O. Box 2460, Riyadh 11451, Saudi Arabia

3-Augustin, M .A., Sanguansri, L.,Margett,C.,and Young,B.(2001).Microencapsulation of food ingradiants.Food Australian,53:220-223

4-Bengoechea, C., Jones, O. G., 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), 1227e1232

5- Chen, X.G., Lee.,C.M. and Park., H.J. 2003. O/W emulsification for the self-aggregation

and nanoparticle formation of linolenic acid modified chitosan in the aqueous system. Journal of Agricultural and Food Chemistry,51: 3135–3139.

6- Costa, C.I., Morsy, T.A., Matos, C.M., Amorim, M., Pintado ,M.E.,. Gomes, A.P.,Teixeira J.A., and Balcão V.M. 2009. Nanoencapsulation of bovine lactoferrin for oral hygiene applications. XVIIth International Conference on Bioencapsulation, Groningen, Netherlands; September 24-26.

7-González,C., Susana ,A., Sigifredo, A.G., Quintín ,R,C. 2009. Lactoferrin: structure, function and applications. International Journal of Antimicrobial Agents , 33: 301–308

8-Isui, A.,García,M., Siqueiros,T. C., Arévalo,G.S., Rascón-Cruz ,Q. 2011. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview Biochimical et biophysica Acta

9-Jankowski, T., Zielinska, M., and Wysakowska, A 1997. Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. Biotechnol. Tech. 11: 31-34

10-Krasaekoopt, W., B. Bhandari., Deeth, H. 2006. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yogurt from UHT- and conventionally-treated milks during storage. Lebensm.-Wiss. U.-Technol. 39: 177-183

11-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

12-Lee,K,U,.Mooney,D,D.(2012) Alginate: Properties and biomedical applications. Progress in Polymer Science 37 (2012) 106– 126

www.SID.ir

Archive of SID

13-Luk,Y,Y., Simon,K, A., Ren, D.2009.On Amphiphile based water in water emulsion uses thereof . USPC Class: 424 943 .Patent application number: 20090269323

14-Matalanis, A., Jones, O. G., & McClements, D. J. (2011). Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. Food Hydrocolloids, 25(8), 1865e1880

15-Pasparakis,G., Bouropoulos,N.2006. Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads. International Journal of Pharmaceutics 323: 34–42

16-Simon, K. A; Sejwal, P ; Gerecht, R. B ; Luk, Y. Y., Water-in-Water Emulsions Stabilized by Non-Amphiphilic Interactions: Polymer-Dispersed Lyotropic Liquid Crystals. Langmuir 2007, 23, (3), 1453–1458

17-Walstra,P. 2003.Physical Chemistry of Foods,Marcel Dekker,New York,NY

18-Ye, Aiqian.,Lo, J., Singh, H. 2012.Formation of interfacial milk protein complexation to stabilize oil-in-water emulsions against calcium. Journal of Colloid and Interface Science. 378 : 15. 184–190

19-Zhang ,J . 2011. Novel Emulsion-Based Delivery Systems. A dissertation submitted to the faculty of the graduate school of the University of Minnesota. In partial fulfillment of the requirements for the degree of philosophy. Advisor: Reineccius. G. A.

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

www.SID.ir