



بررسی اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی مکمل غذایی تهیه شده با پروتئین‌های هیدرولیز شده شیر و وانیلین

مهدی عموحیدری^۱، محمدرضا احسانی^{۲*}، ایرج جوادی^۳

۱- دکتری علوم و صنایع غذایی-دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران.

۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران.

۳- دانشیار گروه سم شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرضا، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۱/۰۸

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۰۲

کلمات کلیدی:

لاکتوفرین،

کنستانتره آب پنیر،

آنتی‌اکسیدانی،

ضد میکروبی.

امروزه به دلیل گسترش بیماریها و عوارض ناشی از آنها و همچنین هزینه های بالای درمان، استفاده از غذاهای عملگر و سلامتی بخش مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. در این زمینه توجه به عوارضی مانند عفونت و توسعه بیماری ها در اثر گسترش رادیکال های آزاد بیشتر است. یکی از گزینه هایی که امروزه در پیشگیری، درمان و کاهش عوارض بیماری مورد توجه است پپتیدهای فعال بیولوژیکی است که از منابع گیاهی و جانوری استخراج می شود. در تحقیق حاضر پپتیدهای حاصل از هیدرولیز شیر شامل پپتیدهای بدست آمده از آب پنیر و لاکتوفرین همراه با طعم دهنده وانیلین در جهت کاهش عفونت و افزایش قدرت سیستم آنتی اکسیدانی در آزمایشگاه بررسی شدند. پس از آماده سازی پروتئینهای هیدرولیز شده از شیر و تهیه مکمل غذایی از آن همراه با طعم دهنده وانیلین آزمونهای ضد میکروبی علیه باکتری های استافیلوکوکس اورئوس و اشرشیا کلی انجام شد. همچنین اثرات آنتی اکسیدانی این پپتیدها همراه با مخلوط مکمل تهیه شده از آن مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که پپتیدهای حاصل از لاکتوفرین و کنستانتره پروتئین آب پنیر به تنهایی و به صورت مخلوط دارای اثرات ضد میکروبی به ترتیب در غلظت های ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلیلیتر هستند. همچنین نتایج آزمونهای آنتی اکسیدانی در سیستم ABTS.DPPH و قدرت احیاکنندگی، توانایی مناسب آنتی اکسیدانی این اجزا را در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نشان داد و در بین اجزا شرکت کننده در مکمل بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی به پروتئینهای هیدرولیز شده آب پنیر اختصاص داشت. با توجه به نتایج بدست آمده مشخص میشود که پپتیدهای حاصل از شیر و وانیلین به عنوان یک مکمل موثر در جهت کاهش عوارض بیماری ها و قابل استفاده در محصولات فراسودمند است که مطالعات حیوانی و بالینی تکمیل کننده این تحقیق خواهد بود.

DOI: 10.52547/fsct.18.03.28

* مسئول مکاتبات:

mehsani@srbiau.ac.ir

۱- مقدمه

ضدمیکروبی به یک عرصه فعال بدل شده است و این مواد نقش مؤثری در مقابله با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا دارند. براساس متداول‌ترین مدل، مکانیسم فعالیت ضد میکروبی اکثر پپتیدهای ضدمیکروبی بر اساس میان‌کنش بار مثبت پپتید با فسفولیپیدهای غشائی میکروب‌ها می‌باشد که سبب برهم خوردن تمامیت غشای میکروب و تخریب و در نهایت از بین رفتن آن می‌شود [۵].

در سال‌های اخیر مشخص شده است که پروتئین‌های رژیمی به‌عنوان تأمین‌کننده منبع غنی از پپتیدهای فعال بیولوژیکی یا بیوپپتیدها یا پپتیدهای فعال زیستی هستند. این پپتیدها می‌توانند فعالیتی شبیه هورمون داشته باشند و بر عملکرد بدن مانند سیستم‌های قلب-عروق، گوارشی، ایمنی و اعصاب تأثیرگذار باشند. انواع پپتیدهای ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی از منابع گیاهی و حیوانی استخراج شده است که یکی از این منابع شیر و فراورده‌های آن می‌باشد [۶].

باتوجه به اینکه شیر منبع غنی از ترکیبات فعال فیزیولوژیکی مانند لاکتوفرین و پپتیدهای بدست آمده از آب‌پنیر است. برخی اثرات فیزیولوژیکی ترکیبات زیست‌فعال شامل پیشگیری از بیماری‌های مزمن، تحریک سیستم ایمنی بدن، کنترل شرایط استرس‌زا، کنترل وزن بدن، تنظیم سطح قند خون، بهبود عملکرد شناختی و به تاخیر انداختن روند پیری است [۷]. در این زمینه شیر منبع غنی از ترکیبات فعال فیزیولوژیکی مانند لاکتوفرین و پروتئین‌های آب‌پنیر است. لاکتوفرین^۳ یک گلیکوپروتئین باند شونده به آهن و از خانواده پروتئین‌های ترانسفرین است. همچنین این گلیکوپروتئین علاوه بر انتقال ذخایر آهنی به گویچه‌های قرمز دارای خاصیت ضدباکتریایی، خاصیت ضدسرطانی، دفاع علیه عفونت‌های معده‌ای و روده‌ای، محرک رشد سلول‌های بدن، خاصیت ضدالتهابی و ایمنی به‌وسیله همکاری با بعضی از ایمونوگلوبولین‌ها و پروتئین‌های سیستم دفاعی و خاصیت ضد ویروسی می‌باشد. فراگمنت لاکتوفریسین از هضم لاکتوفرین با پپسین یک باند دی‌سولفیدی ایجاد می‌کند که این ترکیب خواص ضدمیکروبی بهتری علیه باکتری‌ها دارد. ساختار کاتیونیک و آمفی‌پاتیک بیوپپتید، منجر به دپلاریزه شدن غشاء باکتری و آسیب‌پذیری آن می‌شود [۸].

امروزه به منظور بهبود وضعیت سلامتی بیماران و افزایش کیفیت زندگی آنان استفاده از درمان‌های کمکی در جهت کاهش عوارض بیماری‌ها رو به افزایش است. یکی از گزینه‌های مطرح در این زمینه استفاده از ترکیبات طبیعی و غذاهای عمل‌گرا در جهت کاهش عوارض ناشی از بیماری‌هاست [۱]. مطالعات نشان داده است که دو عارضه مهم در بسیاری از بیماری‌ها عفونت‌ها و استرس اکسیداتیو^۱ هستند. استرس اکسیداتیو به وضعیتی اشاره دارد که توانایی سیستم بیولوژیک برای سم‌زدایی و یا ترمیم آثار مخرب انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن به قدر کافی نباشد، لذا آسیب‌های اکسیداتیو به سلول و بافت را به دنبال خواهد داشت. بسیاری از انواع سلول‌های سرطانی می‌توانند تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر^۲ را افزایش دهند که افزایش تولید آن‌ها نیز می‌تواند سطوح استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدها را افزایش دهد. آسیب اکسیداتیو در سطوح سلولی و بافتی به‌وسیله رادیکال‌های آزاد و متابولیت‌های فعال اکسیژن در زمان ابتلاء به بیماری‌های التهابی و نیز در طی روند درمان آن ایجاد می‌شود [۳ و ۲].

بر اساس پژوهش‌های جدید عفونت‌ها بزرگترین مشکل درمان بسیاری از بیماری‌ها هستند و به طور معمول آنتی‌بیوتیک‌ها برای پیشگیری و درمان تجویز می‌شوند. تقریباً بیش از یک چهارم عفونت‌ها پس از بیماری توسط میکروب‌هایی ایجاد می‌شوند که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و استاندارد مورد استفاده در بیمارستان‌ها مقاوم هستند و افزایش مقاومت میکروبی می‌تواند تأثیرات منفی و مخربی را در آینده برای بیماران در آینده‌ای نه چندان دور به وجود آورد [۴]. بیماری‌های باکتریایی و قارچی سالانه باعث مرگ و میر بسیار زیادی می‌گردد. ظهور باکتری‌ها و قارچ‌های مقاوم به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، ضرورت تحقیق و معرفی انواع جدیدی از ترکیبات ضدمیکروبی را افزایش داده است. در بین انواع ترکیبات معرفی شده در این زمینه پپتیدهای ضدمیکروبی جایگزین‌های بسیار مناسبی برای داروهای آنتی‌بیوتیکی سنتی هستند. این پپتیدها ساختاری کوچک و طیف گسترده و وسیعی از فعالیت ضدمیکروبی را دارا هستند. امروزه تحقیق در زمینه پپتیدهای

1. (OS) Oxidative stress

2. (ROS) Reactive oxygen species

برای فرایند هیدرولیز آنزیمی از آنزیم آلکالاز اندوپروتیناز گرفته شده از باکتریاسیلوس لیکنی فورمیس و از شرکت نوزیم (دانمارک) تهیه شد. کنسانتره پروتئین آب پنیر ۸۰ درصد (WPC 80) آلمانی (German Prot) تهیه گردید. وانیلین از شرکت مرک آلمان آماده شد. لاکتوفرین، پپسین، DPPH و ABTS از شرکت سیگما آمریکا تهیه گردید. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند. باکتری‌های مورد استفاده در تحقیق از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شدند که شامل باکتری اشرشیاکلی (*Escherichia coli* O157:H7 ATCC 25922) و استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213) بودند.

۲-۲- دستگاه‌ها و تجهیزات

دستگاه‌ها و تجهیزات به کار رفته شامل مواردی مانند pH متر متروم، دستگاه اسپکتروفوتومتر UV Visible، دستگاه الیزا ریدر و سانتریفیوژ با دور بالا بود.

۲-۳- تولید بیوپپتیدهای فعال از لاکتوفرین و

کنسانتره پروتئین آب پنیر

۲-۳-۱- تولید هیدرولیزات لاکتوفرین

پودر لیوفیلیزه لاکتوفرین در ظرف مخصوص درب‌دار در فریزر °C ۲۰- برای کلیه آزمایش‌ها نگهداری شد. برای تهیه غلظت‌ها از آب مقطر فوق‌خالص استریل استفاده شد. ابتدا لاکتوفرین در آب مقطر استریل با غلظت ۵ درصد حل شد. pH محلول با استفاده از محلول ۱ نرمال اسید کلریدریک بر روی ۳ تنظیم شد. آنزیم پپسین به محلول سوبسترا تا رسیدن به غلظت ۳ درصد وزنی-وزنی سوبسترا به آنزیم اضافه شد. مخلوط به مدت ۴ ساعت در دمای °C ۳۷ همراه با هم زدن انکوبه شد. برای پایان دادن به واکنش هیدرولیز، مخلوط تا رسیدن به دمای °C ۸۰ در حمام آب به مدت ۱۵ دقیقه دما داده شد و سپس در حمام آب یخ و دمای اتاق ۱۵ تا ۲۵ درجه سلسیوس سرد شد. سپس pH مخلوط با استفاده از محلول ۱ نرمال هیدروکسید سدیم بر روی ۷ تنظیم شد. به کمک سانتریفیوژ ۱۵۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای °C ۵ مواد جامد جدا شد. برای اطمینان از حذف آنزیم احتمالی در مخلوط محلول رویی از فیلتر عبور داده شد و محلول به دست آمده با خشک‌کن

اثرات ضد میکروبی لاکتوفرین هیدرولیز شده بر علیه باکتری‌های گرم مثبت مانند استرپتوکوکوس، لیستریا، باسیلوس و همچنین باکتری‌های گرم منفی مانند سالمونلا، سودوموناس، اشرشیا کلی و کلبسیلا مشاهده شده است. لاکتوفرین گسترش و رشد باکتری‌های لاکتیک‌اسید مانند بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس را افزایش می‌دهد و از رشد باکتری‌های مهمان جلوگیری می‌کند. اثرات مختلف درمانی غذا داروهای حاوی لاکتوفرین در مطالعات مختلف اثبات شده است [۹ و ۱۰]. با پیشرفت تکنولوژی‌های فرآوری، ثابت شده است که ترکیبات پروتئینی ویژه آب پنیر همانند پروتئین آب پنیر و پپتیدهای فعال جدا شده آب پنیر از نقطه نظر جنبه‌های تغذیه‌ای پروتئینی کامل و باکیفیت بالا بوده و اسیدهای آمینه سولفورنی فراوانی که در آن وجود دارند قادر به کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو می‌باشند [۱۱].

وانیلین^۱ با نام متداول ۴-هیدروکسی متوکسی بنزالدهید یکی از مهمترین ترکیبات طعم‌دهنده در صنایع غذایی می‌باشد که بسته به نوع غذا می‌تواند در غلظت‌های مختلف و به عنوان یک ترکیب با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی و نگهدارنده استفاده شود [۱۲].

با توجه به حضور آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات ضد میکروبی در منابع غذایی، برخورداری از یک رژیم غذایی مناسب و کم‌هزینه در کنار سایر درمان‌های دارویی منجر به تقویت سیستم ایمنی و بهبود وضعیت بیماران و افزایش کیفیت زندگی آنان با درمان‌های کمکی می‌شود. تحقیق حاضر در جهت تولید یک محصول غذایی عملگرا است که می‌تواند خصوصیت کاهش عوارض عفونت و استرس اکسیداتیو را داشته باشد. در این تحقیق مکمل غذایی تهیه شده از کنسانتره پروتئین آب پنیر و لاکتوفرین هیدرولیز شده همراه با طعم‌دهنده وانیلین از نظر خواص ضد میکروبی بر علیه پاتوژن‌های رایج در آزمایشگاه و همچنین اثرات آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات در سیستم مدل مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه و مواد شیمیایی

به‌گونه‌ای که غلظت باکتری 10^6 کلنی در هر میلی لیتر باشد اضافه شد. بررسی نمونه‌های کنترل در چاهک‌ها بر اساس افزودن محیط کشت و باکتری بدون افزودن نمونه انجام شد و پلیت‌ها در پلیت ریدر قرار گرفت و ۲۴ ساعت در دمای 37°C اینکوبه شد. پس از ۲۴ ساعت بررسی دانسیته نوری در طول موج 630 نانومتر در دستگاه الیزا با مقایسه میزان دانسیته نوری نمونه‌ها و کنترل جهت تعیین کمترین غلظت مهارکننده رشد (MIC) انجام شد. نتایج با نمونه کنترل مقایسه گردید و پایین‌ترین غلظتی که در آن هیچ‌گونه کدورتی مشاهده نشد به عنوان (MIC) تعیین گردید. از دو باکتری گرم منفی اشرشیاکلی و گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد [۱۵].

۲-۴-۲- بررسی اثر مهارکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده با روش انتشار دیسک

دیسک‌های حاوی $0/5$ میلی لیتر پپتیدهای تهیه شده به غلظت‌های ۱، ۲، ۵، $0/250$ میلی گرم بر میلی لیتر اشیاع گردیدند. برای مخلوط مکمل غلظت ۲ میلی گرم وانیلین، $0/5$ میلی گرم لاکتوفرین و $0/5$ میلی گرم کنستانتره آب پنی هیدرولیز شده بر میلی لیتر استفاده شد. سپس محیط کشت نوترینت آگار پس از آماده‌سازی و استریل کردن در ظرف پتری ریخته شده و فرصت داده شده تا به صورت جامد درآید، بعد از فرو بردن سوآپ استریل در سوسپانسیون میکروبی، اضافه محلول با فشار دادن سوآپ به جدار لوله گرفته شد و در تمام سطح پلیت کشت داده شد. در مرحله بعد با استفاده از پنس استریل دیسک‌های خیس‌شده در غلظت‌های مختلف در سطح محیط کشت قرار گرفتند و با کمی فشار بر روی محیط کشت ثابت گردیدند. پتری‌ها را در حرارت 37°C به مدت ۲۴ ساعت قرار داده، پس از آن قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر اندازه‌گیری شد. جهت مقایسه قدرت ضد میکروبی ترکیبات، از دیسک‌های کنترل مثبت جنتامایسین استفاده شد [۱۶].

۲-۵- بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های

هیدرولیز شده و مکمل تهیه شده از آن

به منظور بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی پپتیدها و مکمل تهیه شده از آن به صورت مخلوط با توجه به حداکثر مجاز خوراکی این ترکیبات و همچنین طعم آنها در مواد غذایی از غلظت ۲۰۰

انجمادی به صورت لیوفیلیزه درآمد و در فریزر 20°C - برای آزمون‌ها نگهداری شد [۱۳].

۲-۳-۲- تولید هیدرولیزات کنستانتره آب پنی

به منظور تولید بیوپپتیدها از روش آنزیمی استفاده شد. با استفاده از آنزیم آلکالاز تجاری پپتیدهای فعال تولید شد. ابتدا نمونه کنستانتره آب پنی با آب به نسبت ۱ به ۲۰ به حالت سوسپانسیون یکنواخت در آمد، نسبت سوپسترا به آنزیم ۱ به ۱۰۰ وزنی وزنی تهیه و به کمک محلول بافر هیدروکسید سدیم 2 مولار و pH متر متروم مدل 701 ساخت سویس بر روی $\text{pH}=8$ تنظیم شد. تمامی واکنش‌ها در فلاسک‌های 100 میلی لیتری در انکوباتور شیکردار فاطر الکترونیک ایرانی 50°C و با دور ثابت 200 دور در دقیقه به مدت 180 دقیقه انجام شدند. در انتهای هر تیمار به منظور غیرفعال شدن آنزیم با حرارت دادن سوسپانسیون در دمای 90°C به مدت 10 دقیقه واکنش آنزیمی به اتمام رسید و ترکیب هیدرولیز شده در حمام یخ به سرعت سرد شد. سپس سوسپانسیون برای جمع‌آوری سوپرناتانت در سانتریفیوژ سیگما آلمانی به مدت 20 دقیقه قرار گرفت و نهایتاً بصورت لیوفیلیزه برای آزمون‌های بعدی در آمد [۱۴].

۲-۴-۲- بررسی اثرات ضد میکروبی پپتیدهای

جداشده در سیستم آزمایشگاهی

۲-۴-۱- بررسی حداقل غلظت مهار کننده رشد

$1(\text{MIC})$ به روش میکروبراث دایلوژن

برای بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی با استفاده از روش رقت‌سازی میکروبراث دایلوژن از پلیت 96 خانه‌ای الیزا بیوتک آمریکایی و دانسیته نوری 630 نانومتر استفاده شد. تمام بررسی‌ها در پلیت‌های استریل پلی‌استایرن 96 خانه‌ای الیزا انجام گرفت. پپتید وزن شد و در محلول بافر فسفات^۲ حل شد. محیط کشت مولر هیتون براث استریل شده مرک به میزان 100 میکرولیتر در چاهک‌ها ریخته شد و غلظت اولین چاهک در پلیت بر اساس 200 میکرولیتر محیط کشت و برابر $10\mu\text{g/mL}$ تعیین شد.

با استفاده از میکروپیت سریال رقت از اولین چاهک تا انتها با انتقال 100 میکرولیتر از هر چاهک تهیه شد. به کلیه چاهک‌ها مقدار 10 میکرولیتر باکتری تلقیح شده در مولر هیتون براث

1. Minimum Inhibitory concentration

2. PBS(Phosphate Buffer Solution)

۲-۵-۳-آزمون قدرت احیاء کنندگی

اندازه‌گیری قدرت پروتئین‌های هیدرولیز شده در احیای آهن III به روش Bougategf و همکاران (۲۰۰۹) صورت پذیرفت. برای این منظور ۱ میلی‌لیتر از نمونه محلول هر کدام از نمونه‌ها با ۲/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH=۶/۶) و ۲/۵ میلی‌لیتر فری سیانید پتاسیم ۱ درصد مخلوط شد. مخلوط در ۵۰ °C به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شده و سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد (وزنی - حجمی) به آن اضافه گردید. مخلوط در ۱۶۵۰×g برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و در نهایت ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول سوپرناتانت با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ درصد (وزنی-حجمی) کلرید آهن مخلوط شد. بعد از ۱۰ دقیقه واکنش جذب محلول حاصل در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش بیانگر افزایش قدرت احیاء کنندگی آن می‌باشد [۱۹].

۳-نتایج و بحث

۳-۱-بررسی حداقل غلظت مهارکننده رشد

(MIC) به روش میکروبراث دایلوژن

به منظور اندازه‌گیری کم‌ترین غلظت مهارکنندگی اجزا تشکیل‌دهنده مکمل به صورت جداگانه و مخلوط بر علیه باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس از دستگاه الایزایدرد و خواندن مقدار جذب در میکروپلیت‌های ۹۶ خانهای با کنترل منفی که فاقد باکتری بود استفاده شد و غلظت‌هایی که در آن میزان کدورت در محدوده کنترل منفی بود به عنوان کم‌ترین غلظت مهار کنندگی (MIC) در نظر گرفته شد. همان‌گونه که از جدول ۱ مشخص است برای باکتری اشرشیا کلی لاکتوفرین در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کنسانتره آب‌پنیر هیدرولیز شده در غلظت بالاتر و برای وانیلین غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثرات ضد میکروبی داشت و کم‌ترین غلظتی بودند که مهار رشد باکتری را از خود نشان داد و مخلوط این سه ترکیب لاکتوفرین، وانیلین و کنسانتره هیدرولیز شده آب‌پنیر که به عنوان مکمل مورد استفاده قرار گرفته در غلظت‌های کم‌تر و در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثرات ضد میکروبی داشت که نشان دهنده اثر سینرژیستی این ترکیبات بر

میلی گرم براساس هر کیلوگرم وزن بدن استفاده شده است. با توجه به این موضوع از غلظت ۲۰۰ppm برای هر ماده و مخلوط این ترکیبات در سه غلظت مجموع ۴۰۰، ۲۰۰ و ۱۰۰ استفاده شد. اندازه‌گیری خصوصیات آنتی‌اکسیدانی در سه سیستم مدل بررسی شد.

۲-۵-۱-اندازه گیری فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

برای این منظور ۱۰۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ی پروتئین هیدرولیز شده با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول DPPH ۰/۱ میلی‌مولار در اتانول ۹۶٪ مخلوط شد، مخلوط به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگاه داشته شد. در نهایت جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نمونه کنترل به جای محلول پروتئین هیدرولیز شده از ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول استفاده شد. درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال از رابطه زیر محاسبه گردید [۱۷].

= (درصد مهارکنندگی فعالیت رادیکال)

جذب شاهد / (جذب نمونه - جذب شاهد) × ۱۰۰

۲-۵-۲-بررسی قابلیت حذف رادیکال ABTS

این آزمون با استفاده از روش روبرتا و همکاران با اندکی تغییرات انجام شد. ابتدا محلول‌های پایه، شامل ABTS (۷ میلی‌مولار) و پتاسیم پرسولفات (۲/۴۵ میلی‌مولار) تهیه شد. در ادامه، محلول اصلی ABTS به وسیله مخلوط کردن دو محلول پایه به مقدار مساوی با یکدیگر تهیه شد. این مخلوط در دمای اتاق و محیط تاریک به مدت ۱۶ ساعت به منظور تکمیل واکنش نگهداری شد. سپس محلول تهیه شده با اتانول تا رسیدن جذب به $0.7 \pm (0.2)$ در طول موج ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. ۰/۲ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف مکمل‌ها به ۲ میلی‌لیتر از محلول تازه تهیه شده‌ی ABTS اضافه شد و بعد از ۶ دقیقه نگهداری در تاریکی، جذب نمونه‌ها در ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد بازدارندگی نمونه از طریق رابطه زیر محاسبه و در نهایت به صورت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گزارش گردید [۱۸].

درصد جذب رادیکال =

جذب شاهد / (جذب نمونه - جذب شاهد) × ۱۰۰

بالای ۴۰۰۰ و برای مخلوط هر سه ماده غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کم‌ترین غلظت‌های مهارکننده بودند (جدول ۲).

روی یکدیگر و نهایتاً تاثیر بالای ضد میکروبی علیه باکتری اشرشیاکلی داشته است. در مورد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس لاکتوفرین و کنسانتره آب پنیر هیدرولیز شده غلظت ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای وانیلین با غلظت

Table 1 Optical density of different samples in the presence of E. coli in the ELISA reader

4000	2000	1000	500	Contol-	
0.126±0.003 ^b	0.166±0.07 ^b	0.293±0.09 ^a	0.310±0.04 ^a	0.112±0.03 ^b	Lactoferrin Hydrolysate
0.427±0.022 ^d	0.531±0.04 ^c	0.748±0.05 ^b	0.886±0.04 ^a	0.311±0.02 ^c	Whey Protein Hydrolysate
0.193±0.003 ^c	0.235±0.07 ^c	0.393±0.08 ^b	0.647±0.09 ^a	0.201±0.03 ^c	Vanillin
0.189±0.005 ^b	0.190±0.06 ^{ab}	0.194±0.02 ^{ab}	0.202±0.06 ^a	0.183±0.07 ^b	Mixture

*values with different letter indicate significant difference (P<0.05)

Table 2 Optical density of different samples in the presence of Staphylococcus aureus in Eliza Reader

4000	2000	1000	500	Contol-	
0.134±0.02 ^b	0.231±0.04 ^a	0.248±0.04 ^a	0.286±0.04 ^a	0.12±0.02 ^b	Lactoferrin Hydrolysate
0.317±0.07 ^c	0.579±0.08 ^b	0.638±0.03 ^b	0.721±0.02 ^a	0.295±0.06 ^c	Whey Protein Hydrolysate
0.225±0.05 ^b	0.293±0.03 ^{ab}	0.302±0.05 ^{ab}	0.364±0.03 ^a	0.199±0.01 ^c	Vanillin
0.184±0.03 ^b	0.188±0.02 ^{ab}	0.195±0.02 ^{ab}	0.198±0.02 ^a	0.188±0.06 ^b	Mixture

*values with different letter indicate significant difference (P<0.05)

هیدرولیز شده و وانیلین قرار داشتند که این دو اختلاف معنی داری در سطح اطمینان ۰/۰۵ درصد نداشتند (شکل ۱).

۲-۳- بررسی اثرات ضد باکتریایی مواد بر اساس قطر هاله عدم رشد

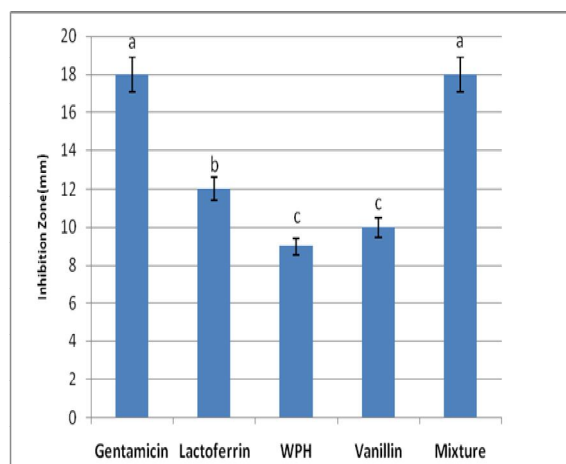


Fig 1 Diameter of Inhibition zone of E- coli in presence of different compounds (mm) values with different letter indicate (P<0.05) *significant difference

مقایسه اثرات ضد میکروبی مکمل‌های غذایی مورد استفاده در تحقیق در مهار رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در شکل ۲ آمده است. قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شده نشان می‌دهد که بالاترین قطر بر اساس میلی‌متر به جنتامایسین با ۲۱ میلی‌متر بوده است. پس از آن مخلوط مکمل‌ها بالاترین

به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی اجزا استفاده شده در مکمل به صورت مجزا و مخلوط از غلظت مناسب این ترکیبات که سمیت خوراکی برای مصرف در سیستم حیوانی و انسانی نداشتند استفاده شد. به همین منظور از غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اجزا به صورت جداگانه و هم‌چنین مخلوط این ترکیبات به نسبت مساوی استفاده شد. نتایج مقایسه‌ای اثر مکمل‌های مورد استفاده در بررسی خاصیت میکروبی با آزمون دیسک و اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر در جدول آمده است. نتایج نشان می‌دهد که اختلاف معنی داری بین اثرات ضد میکروبی ترکیبات مکمل غذایی وجود دارد. از مقایسه‌ی قطر هاله عدم رشد دیسک آنتی‌بیوتیکی جنتامایسین با مکمل‌ها مشخص می‌شود که بیشترین هاله عدم رشد از نظر میلی‌متر مربوط به جنتامایسین و پس از آن مخلوط مکمل‌ها است که نشان‌دهنده اثر بالای ضد میکروبی مخلوط مکمل در مهار رشد باکتری اشرشیاکلی می‌باشد. لاکتوفرین هیدرولیز شده در بین ترکیبات اثر ضد میکروبی بالاتری داشت و پس از آن کنسانتره آب پنیر

به تخریب دیواره سلولی می‌شود. گزارش شده است که تایکونیک اسید مسئول بار منفی سطح باکتری های گرم مثبت می باشد [۲۴].

فعالیت زیستی وانیلین در سال‌های اخیر مورد مطالعه قرار گرفته است که این فعالیت بستگی به محل شلاته کردن یون‌های فلزی دارد. این ویژگی‌ها شامل باندهای هیدروژنی درون مولکولی می‌باشد، بنابراین وانیلین می‌تواند به طور بالقوه نقش بیولوژیکی در تشکیل کمپلکس، مانند لیگاندها با یون‌های فلزی را داشته باشد. بر اساس مطالعه سومیتا و همکاران بر روی اثرات ضد میکروبی وانیلین در محیط آزمایشگاهی علیه باکتری اشرشیاکلی و باسیلوس سابتلیس با روش انتشار دیسک مشخص شد که در مقایسه با وانیلین به صورت کمپلکس با نمک سدیم اثرات آنتی‌باکتریالی قوی علیه این دو باکتری خصوصاً در غلظت‌های بالا را دارد [۲۵]. مطالعات زیادی نشان از فعالیت قوی ضد میکروبی وانیلین علیه تعدادی زیادی از باکتری‌ها و قارچ‌ها را در محیط آزمایشگاهی نشان می‌دهد. اثرات آنتی‌باکتریالی وانیلین علیه باکتری‌های اشرشیاکلی و لاکتوباسیلوس پلانتاریوم توسط فیتس جرارد و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داد که این ترکیب اثر باکتریواستاتیک بیش‌تر نسبت به اثر کشندگی دارد [۲۶].

۳-۳- بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی مکمل‌های

غذایی مورد استفاده در سیستم DPPH

یکی از ویژگی‌های آنتی‌اکسیدان‌ها قابلیت آن‌ها در واکنش با رادیکال‌های آزاد و ایجاد گونه پایدار است که این عملکرد موجب کاهش اکسیداسیون میشود. از این رو DPPH به طور گسترده در مطالعات مختلف رادیکال آزاد برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مختلف احیا کننده به کار می‌رود. نتایج بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی پیتیدها و مخلوط مکمل‌ها در مقایسه با اثر آنتی‌اکسیدانی اسید آسکوربیک با غلظت بالای مکمل اختلاف معنی‌داری نشان نداد. این دو ترکیب بالاترین اثرات آنتی‌اکسیدانی را دارد از بین دو پیتید حاصل و وانیلین مورد استفاده، پیتیدهای حاصل از آب‌پنیر هیدولیز شده بیش‌ترین اثرات آنتی‌اکسیدانی را داشت و نتایج مخلوط کردن این پیتیدها نشان داد که اثرات آنتی‌اکسیدانی با مخلوط شدن این مواد افزایش پیدا کرده است و اثرات

اثر ضد میکروبی را داشت. اختلاف معنی‌داری بین مکمل‌ها و دیسک آنتی‌بیوتیکی از نظر خصوصیات ضد میکروبی دیده می‌شود، اما بین لاکتوفرین، کنسانتره آب‌پنیر و وانیلین اختلاف معنی‌داری وجود نداشت که نشان دهنده اثرات یکسان این ترکیبات بر علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از نظر آزمون انتشار دیسک می‌باشد.

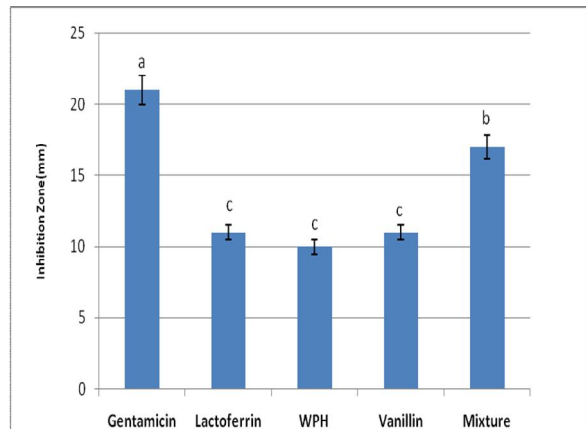


Fig 2 Diameter of Inhibition zone of *Staphylococcus aureus* in presence of different compounds (mm) values with different letter indicate ($P < 0.05$) *significant difference

در بین ترکیبات مورد استفاده در مکمل غذایی لاکتوفرین اثرات ضد میکروبی بالاتری از خود نشان داد. لاکتوفرین پلی‌پیتیدی است که دارای یون آهن است و به همین دلیل اثرات باکتریواستاتیک و کشندگی بر علیه گروه وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را داراست. همچنین اثرات ضد ویروسی و ضد قارچی برای این ترکیب گزارش شده است [۱۳].

لاکتوفرین از طریق مهار آهن توانایی اختلال در متابولیسم میکروب‌ها را با عمل بر روی کربوهیدرات‌های دیواره سلولی دارد [۲۱]. بسیاری از پیتیدهای جدا شده از لاکتوفرین نیز که دارای خواص آنتی‌باکتریالی قوی‌تری نسبت به لاکتوفرین هستند جدا شده‌اند. یکی از این پیتیدها لاکتوفرین است که دارای جایگاه اتصال آهن ندارد و بنابراین اثرات آنتی‌باکتریالی آن به جذب آهن بستگی ندارد [۲۲]. در بین لاکتوفرین‌های تولید شده توسط منابع مختلف مانند انسانی، شیر گاو و سایر حیوانات مشخص شده است که لاکتوفرین به دست آمده از شیر گاو بیش‌ترین اثرات ضد میکروبی را دارد [۲۳]. مکانیسم عمل پیتیدهای کاتیونیک به عمل مداخله‌گرانه‌ی لایه‌ی بیرونی دارای بار منفی باکتری‌ها مرتبط است که منجر

سلول‌ها و جلوگیری از مرگ سلول‌ها را دارد [۳۰]. مشاهدات نشان داده است که تنفس وابسته به گلوکز با افزایش سطح وانیلین مهار می‌شود. این مطالعات نشان می‌دهد که وانیلین تمامیت غشا را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد و آنزیم‌های تنفسی را مهار می‌کند [۳۱].

۳-۴- بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی مکمل‌های

غذایی مورد استفاده در سیستم ABTS

نتایج اثر آنتی‌اکسیدانی و مکمل‌های مختلف در سیستم مدل ABTS در شکل ۴ آمده است، نتایج نشان می‌دهد که در مقایسه با اسید اسکوربیک به عنوان کنترل و سایر ترکیبات، بالاترین اثر آنتی‌اکسیدانی مربوط به اسید اسکوربیک و سپس مخلوط غلظت مکمل‌ها می‌باشد. بین این غلظت و اسید اسکوربیک از نظر توانایی قدرت آنتی‌اکسیدانی در سیستم ABTS اختلاف معنی داری وجود ندارد. همچنین از نظر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، وانیلین و پیتیدهای حاصل از آب پنیر همانند سیستم DPPH بالاترین اثر آنتی‌اکسیدانی را داشتند.

نتایج حاصل از ABTS تحقیقات مختلف نشان دهنده اثر واکنش‌های متعدد بر فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ممانعت از اکسیداسیون لیپیدها از جمله دادن اتم هیدروژن، پایدارسازی یا محدود نمودن رادیکال‌های آزاد و یا شلاته کردن یونهای فلزی پروکسیدان بود. تفاوت در قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها به تفاوت در ترکیب آمینواسیدها و پیتیدها مرتبط است [۳۲].

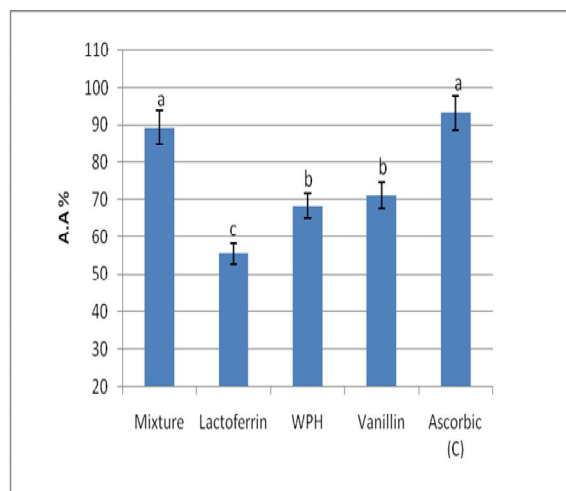


Fig 4 Antioxidant activity of different samples in ABTS model(%) values with different letter indicate ($P < 0.05$) *significant difference

سینرژیستی ایجاد می‌کند. پس از هیدولیزات آب پنیر، وانیلین اثرات آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به لاکتوفرین نشان داد.

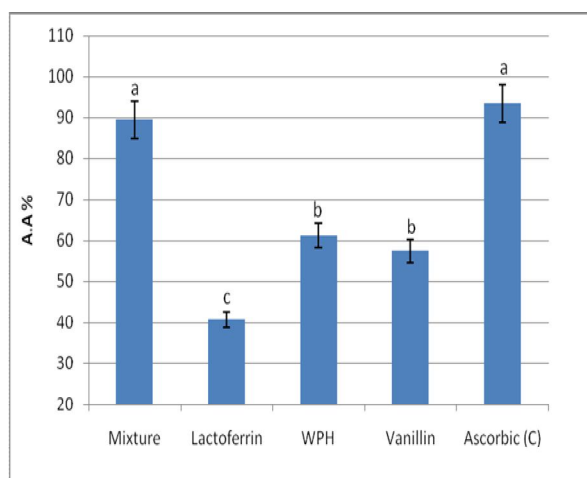


Fig 3 Antioxidant activity of different samples in DPPH model(%) values with different letter indicate ($P < 0.05$) *significant difference

به طور کل، پیتیدهای آنتی‌اکسیدان قادر به عمل به عنوان جاذب رادیکالی، دهنده پروتون و شلاته کننده یون هستند. توانایی پیتیدهای زیستی، فاکتور تعیین کننده در فعالیت آنتی‌اکسیدانهاست. حضور ریشه‌های اسید آمینه‌ای مشخص، به خصوص هیستیدین، تیروزین، تریپتوفان، میتونین، سیستئینوپرویلین، به طور معناداری با فعالیت خاموش کنندگی پیتیدها همبستگی دارند. همچنین افزایش گروه‌های با زنجیره‌های جانبی حاوی آمینواسیدهای هیدروفوب موجب سهولت دسترسی بیشتر این پیتیدها در واکنش با رادیکالهای آزاد DPPH میشوند [۲۶].

لاکتوفرین به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان با توانایی افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس اکسیداتیو شناخته شده است که مطالعات مختلفی در تایید هیدرولیزات‌های به دست آمده از آن در موش‌ها تایید شده است [۲۷]. گزارش شده است که لاکتوفرین در واکنش‌های اکسایش و کاهش در غشا سلول‌ها مشارکت می‌کند. لاکتوفرین یک ترکیب مهارکننده آهن است و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن مرتبط با توانایی آن در باندر کردن آهن ۲ و ۳ ظرفیتی است، بنابراین لاکتوفرین کاتالیز شکل‌گیری آهن و رادیکالهای هیدروکسیل که منبع مهم ROS است را مهار می‌کند [۲۹]. مطالعات نشان داده است که لاکتوفرین شیر گاو با سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدان اثر سینرژیستی آنتی‌اکسیدانی، متابولیسم آنزیم‌ها و مهار ازدیاد

۳-۵- بررسی قدرت احیاء کنندگی

توانایی قدرت احیا که یکی از مدل‌های اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی است در شکل ۵ آمده است، که بر اساس میزان جذب اندازه‌گیری شده است. از مقایسه کنترل اسید آسکوربیک به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان و سایر مکمل‌ها با غلظت‌های متفاوت مشخص می‌شود که همانند دو سیستم مدل قبلی بین غلظت بالای مکمل‌ها و کنترل اسید آسکوربیک اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. در بین مواد اولیه تشکیل‌دهنده مکمل، پپتیدهای آب پنیر و وانیلین نسبت به لاکتوفیرین از نظر قدرت احیا قوی‌تر هستند.

به طور کلی، تفاوت در قدرت احیا کنندگی نمونه‌ها را میتوان به تفاوت در ترکیب آمینواسیدها و پپتیدها مرتبط دانست. افزایش رهایش آمینواسیدهایی مانند تریپتوفان، متیونین، لیزین، هیستیدین و تیروزین که عموماً از فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی برخوردارند، موجب بهبود قدرت احیاء کنندگی پروتئینهای هیدرولیز شده می‌شود [۳۳].

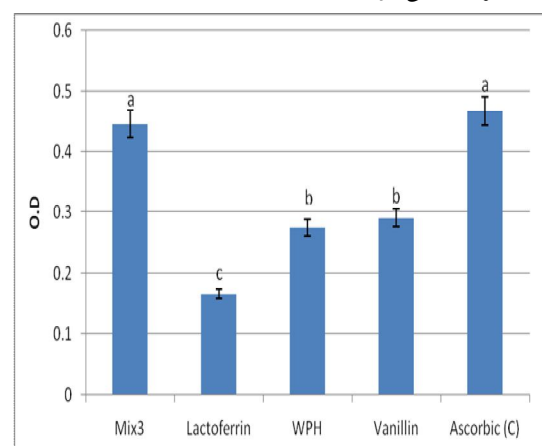


Fig 5 Reducing power of different samples based on absorbance

بر اساس مطالعات تای و همکاران در سال ۲۰۱۱ مشخص شد که وانیلین فعالیت قوی آنتی‌اکسیدانی در روش ORAC و Trolox از خود نشان داده است اما در سیستم DPPH اثرات آنتی‌اکسیدانی ضعیفی تری نشان داد [۳۴]. به طور کلی، پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی قادر به عمل به عنوان جاذب رادیکالی، دهنده‌ی پروتون و شلاته‌کننده‌ی یون هستند. توالی پپتیدهای زیستی، فاکتور تعیین‌کننده در فعالیت آنتی‌اکسیدانهاست. حضور ریشه‌های اسید آمینه‌ای مشخص، به خصوص هیستیدین، تیروزین، تریپتوفان، متیونین، سیستئینوپرولین، به طور معناداری با فعالیت خاموش کنندگی پپتیدها همبستگی دارند.

پروتئین‌های هیدرولیز شده بسته به نوع و ترکیب پروتئین اولیه، آنزیم مورد استفاده، درجه هیدرولیز و شرایط فرآیند متفاوتند. ترکیبات اسید آمینه هیدرولیزات، مستقیماً با فعالیتهای زیستی آنها در ارتباط است. هیستیدین یا پپتیدهای حاوی هیستیدین، دارای توانایی به دام انداختن رادیکال لیپید به دلیل حلقه‌ی ایمیدازول می‌باشند. اسیدهای آمینه‌ی آروماتیک مانند تریپتوفان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بروز می‌دهند، زیرا می‌توانند به آسانی به رادیکال‌های فاقد الکترون پروتون اهدا نمایند. چندین اسید آمینه مانند لوسین، آرژنین، پرولین، والینو هیستیدین به طور کلی به صورت آنتی‌اکسیدان لحاظ می‌شوند. بر اساس مطالعه D. Elia و همکاران روی موش‌ها، مکمل یاری با پروتئین آب پنیر اثرات آنتی‌اکسیدانی داشته و مصرف منظم مکمل آب پنیر از استرس اکسیداتیو جلوگیری می‌کند. از آنجا که پروتئین آب پنیر پروتئینی با جذب سریع می‌باشد و اسیدهای آمینه آن اثرات فیزیولوژیک زیادی دارند، زمان به اوج رسیدن غلظت پلاسمایی اسیدهای آمینه بعد از دریافت پروتئین آب پنیر بسیار اهمیت دارد [۳۵].

۴- نتیجه گیری

استفاده از مواد غذایی سلامتی‌بخش و عمل‌گرا بخشی از درمان بیماری‌های مختلف خصوصاً بیماری‌هایی که عوارض درمانی زیادی دارند می‌باشد. از این رو بهره‌گیری از ترکیبات فعال بیولوژیکی که علاوه بر نقش تغذیه‌ای نقش دارویی و درمانی ویژه‌ای دارند به عنوان گزینه مناسبی در روند بهبودی و افزایش کیفیت زندگی بیماران مطرح است. در این پژوهش اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده شیر شامل کنستانت‌تره پروتئین آب پنیر و لاکتوفیرین همراه با طعم‌دهنده وانیلین بررسی شد که اثر بالای ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی این مواد و اثر سینرژیستی بصورت مخلوط آنها در کنترل باکتری‌های مولد عفونت و کنترل اکسیداسیون و مهار رادیکال‌های آزاد را نشان داد. در نتیجه این مکمل غذایی می‌تواند به عنوان یک غذا دارو مورد استفاده بیماران درگیر عفونت و التهاب قرار گیرد. گام بعدی تحقیقات، مطالعات حیوانی و بالینی بر روی انسان است که اثر بخشی این مکمل در انسان را تایید کند.

۵- منابع

- [11] Patel, S. (2015). Functional food relevance of whey protein: A review of recent findings and scopes ahead. *Journal of Functional Foods*, 19, 308-319.
- [12] Aarabi, A., Mizani, M., & Honarvar, M. (2017). The use of sugar beet pulp lignin for the production of vanillin. *International journal of biological macromolecules*, 94, 345-354.
- [13] Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., & Kawase, K. (1991). Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *Journal of dairy science*, 74(12), 4137-4142.
- [14] Dryáková, A., Pihlanto, A., Marnila, P., Čurda, L., & Korhonen, H. J. (2010). Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. *European Food Research and Technology*, 230(6), 865-874.
- [15] Expósito, I. L., & Recio, I. (2006). Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16(11), 1294-1305.
- [16] Hickey, R. M., Twomey, D. P., Ross, R. P., & Hill, C. (2003). Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. *Microbiology*, 149(3), 655-664.
- [17] Power-Grant, O., Bruen, C., Brennan, L., Giblin, L., Jakeman, P., & FitzGerald, R. J. (2015). In vitro bioactive properties of intact and enzymatically hydrolysed whey protein: targeting the enteroinular axis. *Food & Function*, 6(3), 972-980.
- [18] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- [19] Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food chemistry*, 114(4), 1198-1205.
- [20] Harouna, S., Carraminana, J. J., Navarro, F., Pérez, M. D., Calvo, M., & Sánchez, L. (2015). Antibacterial activity of bovine milk lactoferrin on the emerging foodborne pathogen *Cronobactersakazakii*: Effect of
- [1] Goetzke, B., Nitzko, S., & Spiller, A. (2014). Consumption of organic and functional food. A matter of well-being and health?. *Appetite*, 77, 96-105.
- [2] Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C., & Rahu, N. (2016). Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- [3] Gomes, B., Augusto, M. T., Felício, M. R., Hollmann, A., Franco, O. L., Gonçalves, S., & Santos, N. C. (2018). Designing improved active peptides for therapeutic approaches against infectious diseases. *Biotechnology advances*, 36(2), 415-429.
- [4] Schlesinger, A., Paul, M., Gafter-Gvili, A., Rubinovitch, B., & Leibovici, L. (2009). Infection-control interventions for cancer patients after chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 9(2), 97-107.
- [5] Konovalova, M. V., Zubareva, A. A., Lutsenko, G. V., & Svirshchevskaya, E. V. (2018). Antimicrobial peptides in health and disease. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 54(3), 238-244.
- [6] Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of functional foods*, 1(2), 177-187.
- [7] MuroUrista, C., Álvarez Fernández, R., Riera Rodríguez, F., Arana Cuenca, A., & Tellez Jurado, A. (2011). Production and functionality of active peptides from milk. *Food Science and Technology International*, 17(4), 293-317.
- [8] García-Montoya, I. A., Cendón, T. S., Arévalo-Gallegos, S., & Rascón-Cruz, Q. (2012). Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(3), 226-236.
- [9] Bruni, N., Capucchio, M. T., Biasibetti, E., Pessione, E., Cirrincione, S., Giraud, L., ... & Dosio, F. (2016). Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine. *Molecules*, 21(6), 752.
- [10] Giansanti, F., Panella, G., Arienzo, A., Leboffe, L., & Antonini, G. (2018). Nutraceutical peptides from lactoferrin. *J. Adv. Dairy Res*, 6(1), 199.

- Antihypertensive effect of a bovine lactoferrin pepsin hydrolysate: identification of novel active peptides. *Food Chemistry*, 131(1), 266-273.
- [29] Lawen, A., & Lane, D. J. (2013). Mammalian iron homeostasis in health and disease: uptake, storage, transport, and molecular mechanisms of action. *Antioxidants & redox signaling*, 18(18), 2473-2507.
- [30] Chandra Mohan, K. V. P., Letchoumy, P. V., Hara, Y., & Nagini, S. (2008). Combination chemoprevention of hamster buccal pouch carcinogenesis by bovine milk lactoferrin and black tea polyphenols. *Cancer investigation*, 26(2), 193-201.
- [31] Ramachandra Rao, S., & Ravishankar, G. A. (2000). Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(3), 289-304.
- [32] Tong, L. M., Sasaki, S., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1473-1478.
- [33] Peña - Ramos, E. A., Xiong, Y. L., & Arteaga, G. E. (2004). Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(14), 1908-1918.
- [34] Tai, A., Sawano, T., Yazama, F., & Ito, H. (2011). Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1810(2), 170-177.
- [35] Elia, D., Stadler, K., Horváth, V., & Jakus, J. (2006). Effect of soy-and whey protein-isolate supplemented diet on the redox parameters of trained mice. *European journal of nutrition*, 45(5), 259-266.
- media and heat treatment. *Food control*, 47, 520-525.
- [21] Bokkhim, H., Tran, T., Bansal, N., Grøndahl, L., & Bhandari, B. (2014). Evaluation of different methods for determination of the iron saturation level in bovine lactoferrin. *Food chemistry*, 152, 121-127.
- [22] Wada, Y., & Lönnnerdal, B. (2014). Bioactive peptides derived from human milk proteins—mechanisms of action. *The Journal of nutritional biochemistry*, 25(5), 503-514.
- [23] Sinha, M., Kaushik, S., Kaur, P., Sharma, S., & Singh, T. P. (2013). Antimicrobial lactoferrin peptides: the hidden players in the protective function of a multifunctional protein. *International journal of peptides*, 2013.
- [24] Stark, M., Liu, L. P., & Deber, C. M. (2002). Cationic hydrophobic peptides with antimicrobial activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(11), 3585-3590.
- [25] Purkayasthaa, S. P., Dasb, B., Bhattacharyyac, K. G., & Deb, B. (2014). A new polymeric sodium complex of vanillin: Synthesis, characterization and antibacterial activity. *J. Indian Chem. Soc*, 91, 1-6.
- [26] Fitzgerald, D. J., Stratford, M., Gasson, M. J., & Narbad, A. (2004). The potential application of vanillin in preventing yeast spoilage of soft drinks and fruit juices. *Journal of food protection*, 67(2), 391-395.
- [27] Salami, M., Yousefi, R., Ehsani, M. R., Razavi, S. H., Chobert, J. M., Haertlé, T., ... & Moosavi-Movahedi, A. A. (2009). Enzymatic digestion and antioxidant activity of the native and molten globule states of camel α -lactalbumin: Possible significance for use in infant formula. *International Dairy Journal*, 19(9), 518-523.
- [28] Ruiz-Giménez, P., Salom, J. B., Marcos, J. F., Vallés, S., Martínez-Maqueda, D., Recio, I., ... & Manzanares, P. (2012).



Evaluation of antimicrobial and antioxidant effects of dietary supplements prepared with hydrolyzed proteins of milk and vanillin

Amouheydari, M. ¹, Ehsani, M. R. ^{2*}, Javadi, I. ³

1. Ph.D. of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Professor of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Associate Professor of Toxicology, Shahrezah Branch, Islamic Azad University, Shahreza, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 28 January 2020
Accepted 22 December 2020

Keywords:

Lactoferrin,
Whey protein Concentrate,
Antioxidant,
Antimicrobial.

DOI: 10.52547/fsct.18.03.28

*Corresponding Author E-Mail:
mehsani@srbiau.ac.ir

ABSTRACT

Nowadays, due to the spread of diseases and their complications as well as the high cost of treatment, the use of functional and healthy foods has been considered by scientists. In this context, more attention is paid to complications such as infection and disease development due to the spread of free radicals. One of the options currently considered in the prevention, treatment and reduction of disease complications is biologically active peptides extracted from plant and animal sources. In the present study, peptides derived from milk hydrolysis, including peptides derived from whey and lactoferrin combined with vanillin flavors, were investigated in the laboratory to reduce infection and increase the potency of the antioxidant system. Antimicrobial tests against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were performed after preparing milk hydrolyzed proteins and food supplementation with vanillin flavoring. The antioxidant effects of these peptides individually and along with a mixture of supplements were also tested. The results showed that the peptides derived from lactoferrin and whey protein concentrate alone and in combination had antimicrobial effects at concentrations of 2000, 4000 and 1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$, respectively. Also, the results of antioxidant tests in DPPH, ABTS and reducing power system showed the appropriate ability of these components at 400 mg/ml concentration. The highest antioxidant activity was related to the hydrolyzed whey protein among the components participating in the supplement. Based on the results, it can be concluded that milk-derived peptides with vanillin can be used as an effective supplement to reduce the therapeutic effects in diseases, which will be complemented by animal and clinical studies.