مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بررسی اثرات ضدمیکروبی 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.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۹۸ /۱۱/۰۸

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۰۲

کلمات کلیدی:

لاکتوفرین،

کنستانتره آب پنیر،

آنتی اکسیدانی،

ضد میکروبی.

DOI: 10.52547/fsct.18.03.28

* مسئول مکاتبات:

mehsani@srbiau.ac.ir

چکیده

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 ضدمیکروبی به ترتیب در غلظت های۲۰۰۰، 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 هیدرولیزشده 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.

۱-مقدمه

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 بیماری ها عفونت‌ها و استرس اکسیداتیو[1] هستند. استرس اکسیداتیو به وضعیتی اشاره دارد کـه توانایی سیستم بیولوژیک برای سم‌زدایی و یا ترمیم آثار مخـرب انـواع رادیکال‌های آزاد اکسـیژن به قدر کـافی نباشد، لذا آسیب‌های اکسـیداتیو بـه سـلول و بافـت را به دنبال خواهد داشت. بسیاری از انواع سلول‌های سرطانی می‌توانند تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر[2]را افزایش دهند که افزایش تولید آن‌ها نیز می‌تواند سطوح استرس اکسیداتیوو پراکسیداسیون لیپیدیرا افزایش دهد.آسیب اکسیداتیو در سطوح سلولی و بافتی به‌وسیله رادیکال‌های آزاد و متابولیت‌های فعال اکسیژن در زمان ابتلاء به بیماری های التهابی و نیز در طی روند درمان آن ایجاد می‌شود[۲و۳].

بر اساس پژوهش‌های جدید عفونت‌ها بزرگترین مشکل درمان بسیاری از بیماری‌ها هستند و به طور معمول آنتی‌بیوتیک‌ها برای پیشگیری و درمان تجویز می‌شوند. تقریبا بیش از یک چهارم عفونت‌ها پس از بیماری توسط میکروب‌هایی ایجاد می‌شوند که نسبت به آنتی بیوتیک‌های رایج و استاندارد مورد استفاده در بیمارستان‌ها مقاوم هستند و افزایش مقاومت میکروبی می تواند تاثیرات منفی و مخربی را در آینده برای بیماران در آینده‌ای نه چندان دور به وجود آورد[٤]

.بیماری‌های باکتریایی و قارچی سالانه باعث مرگ‌ومیر بسیار زیادی می‌گردد. ظهور باکتری‌ها و قارچ‌های مقاوم به انواع آنتی بیوتیک‌ها، 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 آنتی بیوتیکی سنتی هستند. این پپتیدها ساختاری کوچک و طیف گسترده و وسیعی از فعالیت ضدمیکروبی را دارا هستند. امروزه تحقیق در زمینه پپتیدهای ضدمیکروبی به یک عرصه فعال بدل شده است و این مواد نقش مؤثری در مقابله با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا دارند. براساس متداول‌ترین مدل، مکانیسم فعالیت ضدمیکروبی اکثر پپتیدهای ضدمیکروبی بر اساس میان‌کنش بار مثبت پپتید با فسفولیپیدهای غشائی میکروب‌ها می‌باشد که سبب برهم‌خوردن تمامیت غشای میکروب و تخریب و درنهایت ازبین‌رفتن 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 برعملکرد بدن مانند سیستم‌های قلب-عروق، گوارشی، ایمنی و اعصاب تاثیرگذار باشند. انواع پپتیدهای ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی از منابع گیاهی و حیوانی استخراج شده است که یکی از این منابع شیر و فراورده‌های آن می باشد [٦].

باتوجه به اینکه شیر منبع غنی از ترکیبات فعال فیزیولوژیکی مانند لاکتوفرین و پپتیدهای بدست آمده از آب‌پنیر است. برخی اثرات فیزیولوژیک 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[3] یک گلیکوپروتئین باند شونده به آهن و از خانواده پروتئین‌های ترانسفرین است. همچنین این گلیکوپروتئین علاوه‌بر 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 ایمنوگلوبولین‌ها و پروتئین‌های سیستم دفاعی و خاصیت ضدویروسی 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].

1. (OS) Oxidative stress
2. (ROS) Reactive oxygen species
3. Lactoferrin

اثرات ضدمیکروبی لاکتوفرین هیدرولیز شده بر علیه باکتری‌های گرم مثبت مانند استرپتوکوکوس، لیستریا، باسیلوس و همچنین باکتری های 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 [۹و۱۰]. با پیشرفت تکنولوژی‌های فرآوری، ثابت شده است که ترکیبات پروتئینی ویژه آب پنیر همانند پروتئین آب‌پنیر و پپتیدهای فعال جدا شده آب‌پنیر از نقطه نظر جنبه‌های تغذیه‌ای پروتئینی کامل و باکیفیت بالا بوده و اسیدهای آمینه سولفوری فراوانی که درآن وجود دارند قادر به کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو می‌باشند[۱۱].

وانیلین[1] با نام متداول ٤-هیدروکسی‌متوکسی‌بنزآلدهید 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 ضدمیکروبی و نگهدارنده استفاده شود[۱۲].

با توجه به حضور آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات ضدمیکروبی 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 وافزایش کیفیت زندگی آنان با درمان‌های کمکی می شود. تحقیق حاضر در جهت تولید یک محصول غذایی عملگرا است که می‌تواند خصوصیت کاهش عوارض عفونت و استرس‌اکسیداتیو را داشته باشد. در این تحقیق مکمل غذایی تهیه شده از کنستانتره پروتئین آب‌پنیر و لاکتوفرین هیدرولیزشده همراه با طعم‌دهنده وانیلین از نظر خواص ضدمیکروبی 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

برای فرایند هیدرولیز آنزیمی از آنزیم آلکالاز اندوپروتئیناز گرفته شده از باکتریباسیلوس لیکنی فورمیس و از شرکت نووزیم (دانمارک) تهیه شد. کنسانتره پروتئین آب پنیر۸۰ 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 اسپکتروفوتومترUV Visible، دستگاه الایزا ریدر و سانتریفیوژ با دور بالا بود.

۲-۳-تولید بیوپپتیدهای فعال از لاکتوفرین و کنستانتره پروتئین‌آب‌پنیر

۲-۳-۱-تولید هیدرولیزات لاکتوفرین

پودر لیوفیلیزه لاکتوفرین در ظرف مخصوص درب‌دار در فریزر ۲۰- °C 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 ٤ ساعت در دمای ۳۷ °C همراه باهم زدن انکوبه شد. برای پایان دادن به واکنش هیدرولیز، مخلوط تا رسیدن به دمای ۸۰ °C 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 ۵ °C مواد جامد جدا شد. برای اطمینان از حذف آنزیم احتمالی در مخلوط محلول رویی از فیلتر عبور داده شد و محلول به‌دست آمده با خشک‌کن

1. Vanillin

انجمادی به‌صورت لیوفیلیزه درآمد و در فریزر ۲۰- °C برای آزمون‌ها نگهداری شد [۱۳].

۲-۳-۲-تولید هیدرولیزات کنستانتره آب‌پنیر

به منظور تولید بیوپپتیدها از روش آنزیمی استفاده شد. با استفاده از آنزیم آلکالاز تجاری پپتیدهای فعال تولید شد. ابتدا نمونه کنسانتره آب‌پنیر با آب به نسبت ۱ به ۲۰ به حالت سوسپانسیون یکنواخت در آمد، نسبت سوبسترا به آنزیم ۱ به ۱۰۰ وزنی وزنی تهیه و به کمک محلول بافر هیدروکسیدسدیم ۲ مولار و pH متر متروم مدل ۷۰۱ ساخت سویس بر روی pH=۸ تنظیم شد. تمامی واکنش‌ها در فلاسک‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری در انکوباتور شیکردار فاطر الکترونیک ایرانی۵۰ °C و با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۸۰ دقیقه انجام شدند. در انتهای هر تیمار به منظور غیرفعال شدن آنزیم با حرارت دادن سوسپانسیون در دمای ۹۰ °C به مدت۱۰ 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 مدت۲۰ دقیقه قرار گرفت و نهایتا بصورت لیوفیلیزه برای آزمون‌های بعدی در آمد[۱٤].

۲-٤-بررسی اثرات ضدمیکروبی پپتیدهای جداشده در سیستم آزمایشگاهی

۲-٤-۱- بررسی حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC)[1] به روش میکروبراث دایلوشن

برای بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی با استفاده از روش رقت‌سازی میکروبراث دایلوشن از پلیت ۹٦ خانه‌ایی الیزا بیوتک آمریکایی و دانسیته نوری ٦۳۰ نانومتر استفاده شد. تمام بررسی‌ها در پلیت‌های استریل پلی‌استایرن ۹٦ خانه‌ای الیزا انجام گرفت. پپتید وزن شد و در محلول بافرفسفات[2]حل شد. محیط کشت مولرهینتون براث استریل‌شده مرک به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در چاهک‌ها ریخته شد و غلظت اولین چاهک در پلیت بر اساس ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت و برابر ۱۰µg/mL تعیین شد.

با استفاده از میکروپیپت سریال رقت از اولین چاهک تا انتها با انتقال ۱۰۰ میکرولیتر از هر چاهک تهیه شد. به کلیه چاهک‌ها مقدار ۱۰ میکرولیتر باکتری تلقیح شده در مولرهینتون براث 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 ۲٤ ساعت در دمای۳۷° C اینکوبه شد. پس از ۲٤ ساعت بررسی دانسیته نوری در طول موج ٦۳۰ 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].

۲-٤-۲-بررسی اثر مهارکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده با روش انتشار دیسک

دیسک‌های حاوی ۰/۵ میلی لیتر پپتیدهای تهیه شده به غلظت های ۲ ، ۱، ۰/۵ و۰/۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اشباع گردیدند. برای مخلوط مکمل غلظت ۲ میلی گرم وانیلین، ۰/۵ میلی گرم لاکتوفرین و ۰/۵ میلی گرم کنستانتره آب پنیر 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 سواپ 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 ۳۷ °C به مدت ۲٤ ساعت قرار داده، پس از آن قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. جهت مقایسه قدرت ضدمیکروبی ترکیبات، از دیسک‌های کنترل مثبت جنتامایسین استفاده شد[۱٦].

۲-۵-بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده و مکمل تهیه شده از آن

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

1. Minimum Inhibitory concentration
2. PBS(Phosphate Buffer Solution)

میلی گرم براساس هر کیلوگرم وزن بدن استفاده شده است. با توجه به این موضوع از غلظت ppm۲۰۰ 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 با۱۰۰۰ 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 رادیکالABTS

این آزمون با استفاده از روش روبرتا و همکاران با اندکی تغییرات انجام شد. ابتدا محلولهای پایه، شامل ABTS (۷میلی مولار) و پتاسیم پرسولفات (۲/۴۵ میلی‌مولار) تهیه شد. در ادامه، محلول اصلیABTS 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 (۰/۲)±۰/۷ در طول موج ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. ۰/۲ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف مکمل ها به ۲ میلی لیتر از محلول تازه تهیه شده‌یABTS 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

۲-۵-۳-آزمون قدرت احیاءکنندگی

اندازه‌گیری قدرت پروتئین‌های هیدرولیز شده در احیای آهن III به روش Bougatef و همکاران (۲۰۰۹) صورت پذیرفت. برای این منظور۱ میلی‌لیتر از نمونه محلول هر کدام از نمونه ها با ۲/۵ میلی‌لیتراز بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH=۶/۶) و ۲/۵ میلی‌لیتر فری سیانید پتاسیم ۱ درصد مخلوط شد. مخلوط در ۵۰ ^{o}C به مدت۳۰ دقیقه انکوبه شده و سپس ۲/۵ میلی لیتر از محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰درصد (وزنی – حجمی) به آن اضافه گردید. مخلوط در ۱۶۵۰×g برای۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و در نهایت ۲/۵ میلی لیتر از محلول سوپرناتانت با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ درصد (وزنی–حجمی) کلریدآهن مخلوط شد. بعد از ۱۰ دقیقه واکنش جذب محلول حاصل در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش بیانگر افزایش قدرت احیاکنندگی آن می‌باشد [۱۹].

۳-نتایج و بحث

۳-۱-بررسی حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) به روش میکروبراث دایلوشن

به منظور اندازه‌گیری کم‌ترین غلظت مهارکنندگی اجزا تشکیل‌دهنده مکمل به صورت جداگانه و مخلوط بر علیه باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس از دستگاه الایزاریدر 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 کم ترین غلظت مهار کنندگی (MIC) در نظر گرفته شد. همان‌گونه که از جدول۱ 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 میلی لیتر اثرات ضدمیکروبی 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 قرارگرفته در غلظت‌های کم‌تر و در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر اثرات ضد میکروبی داشت که نشان دهنده اثر سینرژیستی این ترکیبات بر

روی یکدیگر و نهایتاً تاثیر بالای ضدمیکروبی علیه باکتری اشرشیاکلی داشته است. در مورد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس لاکتوفرین و کنسانتره آب پنیر هیدرولیز شده غلظت٤٠٠٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای وانیلین با غلظت بالای ٤٠٠٠ و برای مخلوط هر سه ماده غلظت‌های ١٠٠٠ و ٢٠٠٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر کم‌ترین غلظت‌های مهارکننده بودند(جدول٢) .

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^{e}	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}	Vanilin
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}	Vanilin
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)

٣-٢-بررسی اثرات ضد باکتریایی مواد براساس قطر هاله عدم رشد

به منظور بررسی اثرات ضدمیکروبی 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 ٠/٢ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اجزا به صورت جداگانه و هم‌چنین مخلوط این ترکیبات به نسبت مساوی استفاده شد. نتایج مقایسه‌ی 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 ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی مخلوط مکمل در مهار رشد باکتری اشرشیاکلی می‌باشد. لاکتوفرین هیدرولیزشده در بین ترکیبات اثر ضدمیکروبی بالاتری داشت و پس از آن کنسانتره آب‌پنیر هیدرولیز شده و وانیلین قرار داشتند که این دو اختلاف معنی داری در سطح اطمینان ٠/٠٥ درصد نداشتند(شکل١).

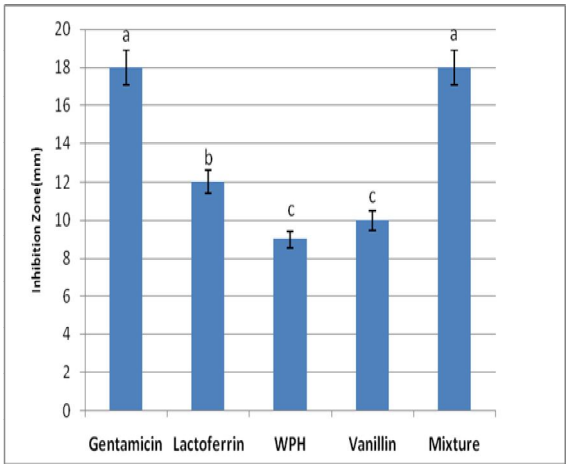

Fig 1 Diameter of Inhibition zone of E- coli in presence of different compounds(mm)
values with different letter indicate (P<0.05)
*significant difference

مقایسه اثرات ضدمیکروبی مکمل‌های غذایی مورد استفاده در تحقیق در مهار رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در شکل٢ آمده است . قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شده نشان می‌دهد که بالاترین قطر بر اساس میلی‌متر به جنتامایسین با ٢١ میلی‌متر بوده است. پس از آن مخلوط مکمل‌ها بالاترین

اثرضدمیکروبی را داشت. اختلاف معنی‌داری بین مکمل‌ها و دیسک آنتی‌بیوتیکی از نظر خصوصیات ضدمیکروبی دیده می‌شود، اما بین لاکتوفرین، کنسانتره آب‌پنیر و وانیلین اختلاف معنی‌داری وجود نداشت که نشان دهنده‌ی اثرات یکسان این ترکیبات بر علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از نظر آزمون انتشار دیسک می باشد.

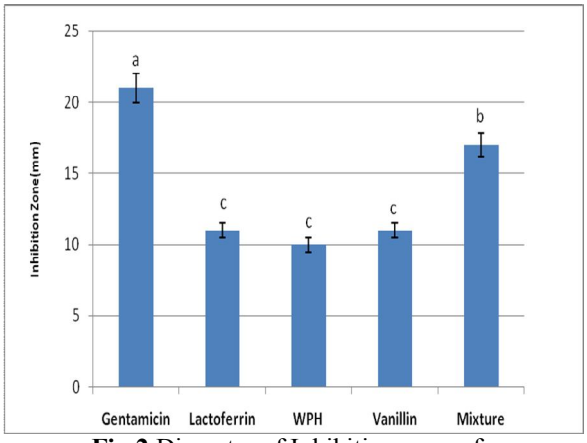

Fig 2 Diameter of Inhibition zone of Staphylococcus aureus in presence of different compounds(mm)
values with different letter indicate (P<0.05)
*significant difference

در بین ترکیبات مورد استفاده در مکمل‌غذایی لاکتوفرین اثرات ضدمیکروبی بالاتری از خود نشان داد. لاکتوفرین پلی‌پپتیدی 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 ضدویروسی و ضدقارچی برای این ترکیب گزارش شده است[۱۳].

لاکتوفرین از طریق مهار آهن توانایی اختلال در متابولیسم میکروب‌ها را با عمل بر روی کربوهیدرات‌های دیواره‌ی سلولی دارد[۲۱]. بسیاری از پپتیدهای جدا شده از لاکتوفرین نیز که دارای خواص آنتی‌باکتریالی قوی‌تری نسبت به لاکتوفرین هستند جدا شده‌اند. یکی از این پپتیدها لاکتوفرسین است که دارای جایگاه اتصال آهن ندارد و بنابراین اثرات آنتی‌باکتریالی آن به جذب آهن بستگی ندارد[۲۲]. در بین لاکتوفریسین‌های تولید شده توسط منابع مختلف مانند انسانی، شیر گاو و سایر حیوانات مشخص شده‌است که لاکتوفریسین به دست‌آمده از شیر گاو بیشترین اثرات ضدمیکروبی را دارد [۲۳]. مکانیسم عمل پپتیدهای کاتیونیک به عمل مداخله‌گرانه‌ی لایه‌ی بیرونی دارای بار منفی باکتری‌ها مرتبط است که منجر به تخریب دیواره سلولی می‌شود. گزارش شده است که تایکوئیک اسید مسئول بار منفی سطح باکتری های گرم مثبت می باشد [۲۴].

فعالیت زیستی وانیلین در سال‌های اخیر مورد مطالعه قرارگرفته‌است که این فعالیت بستگی به محل شلاته‌کردن 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 یون های فلزی را داشته باشد. بر اساس مطالعه‌ی سومیتا و همکاران بر روی اثرات ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی 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 جرارلد 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 سیستمDPPH

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 طورگسترده در مطالعات مختلف رادیکال آزاد برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مختلف احیا کننده به کار می‌رود. نتایج بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی پپتیدها و مخلوط مکمل‌ها در مقایسه با اثر آنتی‌اکسیدانی اسیدآسکوربیک با غلظت بالای مکمل اختلاف معنی‌داری نشان نداد. این دو ترکیب بالاترین اثرات آنتی‌اکسیدانی را دارد از بین دو پپتید حاصل و وانیلین مورد استفاده، پپتید های حاصل از آب‌پنیر هیدولیز شده بیش‌ترین اثرات آنتی‌اکسیدانی را داشت و نتایج مخلوط کردن این پپتیدها نشان داد که اثرات آنتی‌اکسیدانی با مخلوط شدن این مواد افزایش پیدا کرده‌است و اثرات

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

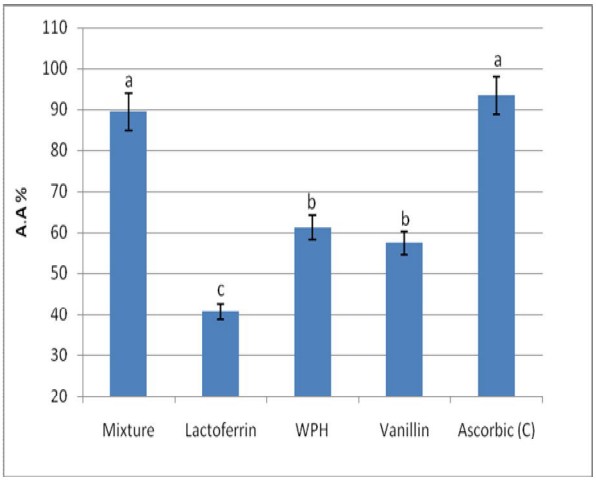

Fig 3 Antioxidant activity of different samples in DPPHmodel(%)
values with different letter indicate (P<0.05)
*significant difference

به طور کل، پپتیدهای آنتی‌اکسیدان قادر به عمل به عنوان جاذب رادیکالی، دهنده‌ی پروتون و شلاته کننده‌ی یون هستند. توالی پپتیدهای زیستی، فاکتور تعیین کننده در فعالیت آنتی‌اکسیدانهاست. حضور ریشه های اسید آمینه‌ای مشخص، به خصوص هیستیدین، تیروزین، تریپتوفان، میتونین، سیستئینوپرولین، به طور معناداری با فعالیت خاموش کنندگی پپتیدها همبستگی دارند. همچنین افزایش گروه‌های با زنجیره‌های جانبی حاوی آمینواسیدهای هیدروفوب موجب سهولت دسترسی بیشتر این پپتیدها 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 باندکردن آهن ۲ و ۳ ظرفیتی است، بنابراین لاکتوفرین کاتالیز شکل‌گیری آهن و رادیکالهای هیدروکسیل که منبع مهم ROS است را مهار می کند[۲۹]. مطالعات نشان داده است که لاکتوفرین شیر گاو با سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدان اثر سینرژیستی آنتی‌اکسیدانی، متابولیسم آنزیم‌ها و مهار ازدیاد 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].

۳-٤-بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی مکمل‌های غذایی مورد استفاده در سیستمABTS

نتایج اثر آنتی‌اکسیدانی و مکمل‌های مختلف در سیستم مدل ABTS در شکل٤ آمده‌است، نتایج نشان می‌دهد که در مقایسه با اسید اسکوربیک به عنوان کنترل و سایر ترکیبات، بالاترین اثر آنتی‌اکسیدانی مربوط به اسیدآسکوربیک و سپس مخلوط غلظت مکمل‌ها می‌باشد . بین این غلظت و اسید آسکوربیک از نظر توانایی قدرت آنتی‌اکسیدانی در سیستم ABTS اختلاف معنی داری وجود ندارد. همچنین از نظر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، وانیلین و پپتیدهای حاصل از آب‌پنیر همانند سیستم DPPH بالاترین اثر آنتی‌اکسیدانی را داشتند.

نتایج حاصل از ABTS تحقیقات مختلف نشان دهنده‌ی 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 پپتیدها مرتبط است [۳۲].

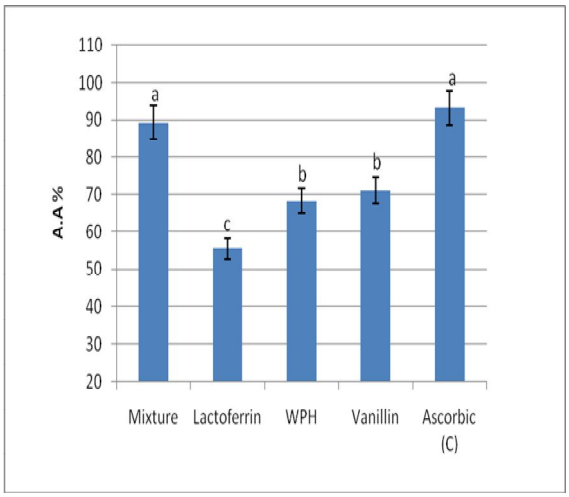

Fig 4 Antioxidant activity of different samples in ABTS model(%)
values with different letter indicate (P<0.05)
*significant difference

۳-۵-بررسی قدرت احیاءکنندگی

توانایی قدرت احیا که یکی از مدل‌های اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی است در شکل۵ آمده‌است، 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 لاکتوفرین 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 احیاءکنندگی پروتئینهای هیدرولیز شده می‌شود[۳۳].

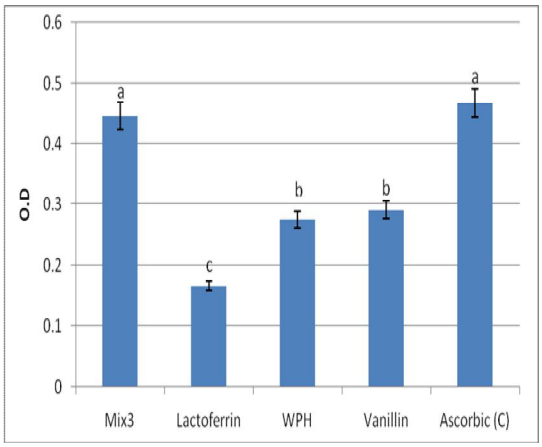

Fig 5 Reducing power of different samples based on absorbance

بر اساس مطالعت 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 ضعیفی‌تری نشان داد [۳٤]. به طورکلی، پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی قادر به عمل به عنوان جاذب رادیکالی، دهنده‌ی پروتون و شلاته کننده‌ی یون هستند. توالی پپتیدهای زیستی، فاکتورتعیین کننده در فعالیت آنتی‌اکسیدانهاست. حضور ریشه‌های اسید آمینه‌ای مشخص، به خصوص هیستیدین، تیروزین، تریپتوفان، میتونین، 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، والینوهیستیدین 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 ازدریافت پروتئین آب‌پنیر بسیار اهمیت دارد [۳۵].

٤-نتیجه گیری

استفاده از موادغذایی 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 ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیزشده شیر شامل کنستانتره پروتئین آب‌پنیر و لاکتوفرین همراه با طعم‌دهنده وانیلین بررسی شد که اثر بالای ضدمیکروبی 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. درنتیجه این مکمل‌غذایی می تواند 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

[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 Rodriguez, 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., Giraudo, 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.

[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 enteroinsular 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 (Mustelusmustelus) 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

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., &Lönnerdal, 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). 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.

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

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 ofFood Science and Technology, Science and Research Branch,Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Associate Professor of Toxicology, Shahrezah Branch,Islamic Azad University,Shahreza, Iran.

ARTICIE 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 µg / 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 studie.