



بررسی فعالیت بازدارندگی آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی متابولیت‌های

## حاصل از کشت سویه لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس PTCC1900

فائزه شیرخان<sup>۱</sup>، سعید میردامادی<sup>۲\*</sup>، مهتا میرزایی<sup>۳</sup>، بهروز اکبری آدرگانی<sup>۴</sup>، نیکو نصوحی<sup>۵</sup>

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استاد پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۴- استاد مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران.

۵- استادیار دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، دانشکده علوم نوین، گروه بیوشیمی-بیوفیزیک، تهران، ایران.

### چکیده

### اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۳۰

امروزه استفاده از سویه‌های لاکتوباسیل و متابولیت آن‌ها از استراتژی‌های نوین در کنترل دیابت و استرس اکسیداتیو است. از اینرو مطالعه حاضر با هدف بررسی ویژگی‌های ضد دیابتی و آنتی‌اکسیدانی متابولیت‌های حاصل از کشت باکتری لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس انجام شد. نمونه‌ها شامل رومانند محیط کشت تخمیری (CFS)، اجزای شکسته سلولی (CFE)، سرم شیر تخمیری (CFS-FM) و پپتیدهای زیست فعال جداسازی شده از اولترافیلتراسیون (kDa10,5,3) مورد ارزیابی قرار گرفتند. توانایی باکتری در پروتئولیز پروتئین شیر تخمیری (FM) در مقایسه با نمونه غیرتخمیری (NFM) با روش اورتوفتالدئید (OPA) ارزیابی شد. فعالیت ضد دیابتی بر اساس مهار آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز اندازه‌گیری شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش مهار ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) و ۲،۲-آزینوبیس-۴-بنزوتیازولیناتیل-۶-سولفونیک اسید (ABTS) ارزیابی شد. نتایج نشان دادند که نمونه سرم شیر تخمیری، آنزیم‌های آلفا آمیلاز (۲۵٪) و آلفا گلوکوزیداز (۲۶/۶٪) را مهار کرد. در بین اجزای پپتیدی، جزء بالاتر از ۱۰ کیلودالتون با محتوای پروتئینی بالاتر (۱۳/۸۱۶ میلی‌گرم) بیشترین میزان مهار آنزیم آلفا آمیلاز (۸۰٪/۶۴) و آلفا گلوکوزیداز (۵۴٪) را داشت (p<۰/۰۵). نسبت کارایی مهار (IER) نشان داد جزء ۳-۵ کیلودالتون مهارکنندگی بیشتری نسبت به سایر اجزای پپتیدی داشت (p<۰/۰۵). همچنین رومانند محیط کشت تخمیری و اجزای شکسته سلولی آنزیم آلفا گلوکوزیداز را به ترتیب به میزان ۵۰٪ و ۲۵٪ مهار کردند. در زمینه خاصیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد مهار رادیکال‌های آزاد سرم تخمیری نسبت به سرم غیرتخمیری افزایش دارد (p<۰/۰۵). اجزای پپتیدی ۳-۵ کیلودالتون (۸۰/۸۵٪) و بالاتر از ۱۰ کیلودالتون (۴۳/۶۳٪) بیشترین میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS را داشتند. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اجزای پپتیدی معادل ترولوکس (میکرومول ترولوکس / میلی‌گرم پروتئین) نشان داد جزء کمتر از ۳ کیلودالتون بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشت (p<۰/۰۵). توانایی مهار رادیکال‌های آزاد در اجزای شکسته سلول و رومانند محیط کشت تخمیری مشاهده شد. این نتایج نشان‌دهنده اهمیت کاربرد لاکتوباسیلوس دلبروکی بعنوان کشت آغازگر و نقش عملکردی آن است.

کلمات کلیدی:

دیابت، آلفا آمیلاز،

آلفا گلوکوزیداز،

آنتی اکسیدانی،

متابولیت،

لاکتوباسیلوس دلبروکی.

DOI: 10.22034/FSCT.19.125.47

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.7.6

\* مسئول مکاتبات:

Mirdamadi@irost.ir

## ۱- مقدمه

دیابت یک اختلال متابولیک است که به یک مشکل بزرگ در سراسر جهان تبدیل شده است و ترکیب و عملکرد میکروبیوتای روده را تغییر می‌دهد [۲۰]. با توجه به اینکه پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و غذاهای تخمیری می‌توانند عملکرد میکروبیوتای روده را بهبود بخشند، اخیراً به عنوان یک استراتژی جدید در کنترل دیابت نوع دوم مورد توجه قرار گرفته‌اند [۳]. محققین محصولات تخمیری متعدد بویژه شیر تخمیری را بدلیل وجود پپتیدهای زیست فعال بی‌خطر و حتی نمونه‌های رومانند محیط کشت از جمله محیط کشت ام آر اس<sup>۱</sup> را جهت سنجش پتانسیل ضد دیابتی سویه‌های لاکتیکی مورد استفاده قرار داده‌اند [۴-۵]. پپتیدهای زیست فعال در توالی پروتئین‌های شیر غیرفعال هستند و با روش‌های متفاوت از جمله فرایند تخمیر و بواسطه فعالیت پروتئولیتیک میکروارگانیسم‌ها آزاد می‌شوند [۶]. بنابراین نه تنها کازئین و پروتئین‌های آب پنیر، بلکه پپتیدهای مشتق شده از آن‌ها نیز می‌توانند باعث بهبود عملکردهای فیزیولوژیکی در بدن شوند [۷]. توانایی باکتری‌های اسید لاکتیک در تولید پپتیدهای زیست فعال با مهارکنندگی آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز در تحقیقات متفاوتی گزارش شده است [۸-۱۰]. گروهی از تحقیقات نقش قوی پپتیدهای مشتق شده از فرآورده‌های غذایی را در جلوگیری از آسیب‌های اکسیداتیو تأیید کرده‌اند [۱۱]. از سوی دیگر نقش مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو در کنترل پیامدها و عوارض دیابت به اثبات رسیده است [۱۲]. پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی موجود در مواد غذایی با مهار رادیکال‌های آزاد، نقشی حیاتی در حفظ سیستم‌های دفاعی ارگانیسم‌ها دارند [۵]. از اینرو پپتیدهای زیستی مشتق شده از پروتئین شیر به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های نوین غذایی در نظر گرفته می‌شوند [۶]. از آنجا که تخمیر شیر با باکتری‌های آغازگر در تولید محصولات لبنی، باعث تغییرات مطلوب در خصوصیات حسی و کیفی شیر شده [۱۳] و سویه‌های لاکتوباسیل مورد استفاده و چگونگی اثر آن‌ها بر تولید پپتیدهای زیست فعال در خواص محصول نقش کلیدی دارند، این مطالعه با هدف ارزیابی خصوصیات ضد دیابتی بر اساس مهار دو آنزیم متابولیزه کننده

کربوهیدرات‌ها و نقش آنتی‌اکسیدانی ترکیبات حاصل از کشت سویه لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس در شیر و به طور مشخص پپتیدهای زیست فعال مورد بررسی قرار گرفت. اجزای شکسته سلولی و رومانند محیط کشت تخمیری نیز جهت بررسی منشاء و نقش سویسترا در ایجاد این خواص مورد ملاحظه قرار گرفته است.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد اولیه

شیر استریلیزه (فرادما) ۱/۵ درصد چربی از شرکت کاله تهران، آنزیم آلفا آمیلاز (EC 3.2.1.1)، آنزیم آلفاگلوکوزیداز (EC 3.2.1.20)، پارانیتروفیل آلفا دی گلوکوپیرانوزید، ۲۰۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدازیل، ۲۰۱-آزینویس-۴-بنزوتیازولین اتیل-۶-سولفونیک اسید، اورتوفتالدئید از شرکت سیگما (USA, Sigma) و سایر مواد با درجه آزمایشگاهی از شرکت مرک (Germany, Merck) تهیه شدند.

### ۲-۲- فعالسازی سویه باکتریایی و آماده‌سازی

#### نمونه‌ها

برای پژوهش حاضر از سویه لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس (PTCC1900) جدا شده از محصول ماست محلی روستای دودانگه استان خوزستان استفاده شد. این سویه ابتدا در محیط کشت ام آر اس جهت ارزیابی خواص سویه و سپس در شیر تخمیری مورد سنجش قرار گرفت. نمونه‌های مورد آزمون برای سنجش فعالیت مهار آنزیم آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز و خاصیت آنتی‌اکسیدانی شامل رومانند محیط کشت تخمیری (مایع رویی کشت ام آر اس جدا شده پس از رسوب باکتری)، اجزای شکسته سلولی (عصاره سلولی بدست آمده از باکتری پس از سونیکاسیون)، سرم شیر تخمیری و اجزای پپتیدی بدست آمده از آن می‌باشند. برای آماده‌سازی نمونه‌ها، پس از خروج باکتری لاکتوباسیلوس دلبروکی از فریزر ۸۰- درجه سلسیوس، ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ذخیره به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت ام آر اس مایع تلقیح گردید و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط میکروآئروفیل گرمخانه‌گذاری گردید تا باکتری فعال

فعالیت پروتئولیتیک با روش اورتوفتالید (OPA) اندازه‌گیری شد. برای انجام آزمون ۲۰ میکرولیتر از نمونه به لوله حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول OPA اضافه گردید. جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و پس از قرار دادن در معادله استاندارد لوسین (۴-۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) میزان آمین آزاد در مقایسه با لوسین محاسبه شد و میزان هیدرولیز اندازه گرفته شد [۱۶].

## ۲-۵- اندازه‌گیری فعالیت ضد دیابتی به روش

### مهار آنزیمی

#### ۲-۵-۱- روش مهار آنزیم آلفا آمیلاز

در این روش ۴۰۰ میکرولیتر از آنزیم آلفا آمیلاز ( $\geq 5$  units/mg) در بافر فسفات (pH=۶/۹) با ۲۰۰ میکرولیتر نمونه مخلوط شد سپس ۴۰۰ میکرولیتر سوبسترای نشاسته (۱/۱) به مخلوط اضافه گردید. واکنش در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت و با افزودن ۱ میلی‌لیتر از معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید و قرار دادن مخلوط واکنش تحت گرما در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه واکنش متوقف شد سپس نمونه با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد. قند آزاد شده در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط میکروپلیت ریدر (BioTek, USA) اندازه‌گیری شد و درصد مهارکنندگی طبق فرمول (۱) محاسبه گردید [۸].

فرمول (۱)

$$\text{درصد مهارکنندگی} = \frac{(100 \times \text{جذب نوری نمونه} - \text{جذب نوری کنترل})}{(\text{جذب نوری کنترل})}$$

#### ۲-۵-۲- روش مهار آنزیم آلفا گلوکوزیداز

در این روش ۱۰۰ میکرولیتر از آنزیم آلفا گلوکوزیداز ( $\geq 10$  units/mg) محلول در بافر فسفات پتاسیم (pH=۶/۸) با ۵۰ میکرولیتر پارا نیتروفنیل دی گلیکوپیرانوزید (۵ میلی‌مولار) بعنوان سوبسترا اضافه و با ۵۰ میلی‌لیتر نمونه مخلوط شد. واکنش آنزیمی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انجام گرفت. برای هر دو آنزیم یک لوله حاوی تمام عناصر واکنش فاقد نمونه و یک نمونه فاقد آنزیم فعال به عنوان کنترل مثبت و شاهد در نظر گرفته شد. برای بدست آوردن نتایج، منحنی تغییرات در شرایط استاندارد همراه با نمونه و بدون مهارکننده در طول موج ۴۰۵ نانومتر رسم شد و پس از بدست آوردن شیب منحنی، میزان مهار طبق فرمول (۲) محاسبه گردید [۸].

( $10^7$  CFU/ml) شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت  $g \times 2010$  در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفوژ (Universal, Germany) شد. پس از آن، pH مایع رویی حاصل (روماند) بر روی ۷/۴ تنظیم گردید [۵]. برای تهیه اجزای شکسته سلولی، رسوب زیرین با بافر فسفات (pH=۷/۴) شسته و پس از سانتریفوژ، دیواره سلولی توسط دستگاه اولتراسونیک (فراز طب تجهیز، ایران) با توان ۱۰۰ کیلووات (۵-۸ پالس) شکسته و سپس در  $g \times 12000$  به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سلسیوس سانتریفوژ شد و عصاره سلولی شکسته شده جهت آزمایش مورد استفاده قرار گرفت [۵]. برای تهیه نمونه سرم شیرتخمیری، توده زیستی بدست آمده از پیش کشت (۱٪ حجمی/حجمی) پس از سانتریفوژ به ۱۰۰ میلی‌لیتر شیر اضافه و بعد از آن در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شد و سپس pH نمونه توسط اسیدکلریدریک/سود ۱ مولار بر روی ۴/۶ تنظیم و محلول حاصل در  $g \times 20000$  به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سلسیوس سانتریفوژ گردید. پس از جداسازی پروتئین‌های رسوب داده شده جهت عدم تداخل pH در نتایج آزمایش، pH نمونه‌ها با کربنات کلسیم به ۶ رسید. مایع حاصل (سرم تخمیری) جهت ارزیابی‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت [۸]. اجزای پپتیدی حاصل از سرم شیرتخمیری توسط غشاهای اولترافیلتراسیون (USA, Sartorius) با دامنه عبوری ۳، ۵ و ۱۰ کیلودالتون جداسازی شدند [۱۴].

## ۲-۳- اندازه‌گیری محتوای پروتئین محلول

برای اندازه‌گیری میزان پروتئین به روش لوری، ابتدا محلول شیمیایی از ترکیب ۰/۵ میلی‌لیتر سولفات مس (۱٪)، ۰/۵ میلی‌لیتر سدیم پتاسیم تارتارات (۲٪)، ۲۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم (۲٪) و ۲۵ میلی‌لیتر سود ۰/۱ نرمال حاصل شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول شیمیایی مخلوط گردید و بمدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط و مکان تاریک قرار داده شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر محلول فولین رقیق شده با آب به نمونه اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه جذب نوری در طول موج ۷۵۰ منحنی استاندارد سرم آلبومین گاوی (۱۰۰-۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) محاسبه گردید [۱۵].

## ۲-۴- اندازه‌گیری فعالیت پروتئولیتیک

فرمول (۲)

= درصد مهار کنندگی

$$\left( \frac{100 \times (\text{تغییرات شیب نمونه} - \text{تغییرات شیب نمونه کنترل})}{\text{تغییرات شیب نمونه کنترل}} \right)$$

## ۲-۶- اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی

## ۲-۶-۱- مهار رادیکال آزاد به روش DPPH

برای سنجش خاصیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه (یا اتانول بعنوان کنترل) به ۲۵۰ میکرولیتر محلول ۰/۰۰۲ درصد DPPH در اتانول ۹۶ درصد اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی نگهداری شد. میزان جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد و درصد مهار رادیکال آزاد با استفاده از فرمول (۱) محاسبه گردید [۱۷].

## ۲-۶-۲- مهار رادیکال آزاد به روش ABTS

برای سنجش خاصیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS، ابتدا محلول حاوی ABTS (۷ میلی‌مولار) و پرسولفات پتاسیم (۲/۴۵ میلی‌مولار) تهیه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۶-۱۲ ساعت در دمای اتاق و تاریکی قرار گرفت. سپس محلول ABTS با بافر فسفات ۵ میلی‌مولار با pH ۷/۴ مخلوط شد. میزان جذب این محلول در طول موج ۷۳۴ نانومتر معادل  $0.007 \pm 0.002$  بود. در ادامه ۲۰ میکرولیتر از نمونه (بافر فسفات بعنوان نمونه کنترل) با ۹۸۰ میکرولیتر از محلول ABTS مخلوط و پس از ۶ دقیقه، جذب آن در طول موج ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد مهار رادیکال آزاد ABTS مطابق فرمول (۱) محاسبه شد [۱۸].

## ۲-۷- آزمون آماری

محاسبات با نرم افزار اکسل تحت آفیس (۲۰۱۰) انجام شد و

نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شد. برای بررسی اختلاف بین میانگین داده‌ها از جدول تجزیه و تحلیل آنالیز واریانس و رسم نمودارها از نرم افزار گراف پد ورژن ۸ استفاده شد.

## ۳- نتایج و بحث

## ۳-۱- قدرت هیدرولیز میکروبی

فعالیت پروتئولیتیک باکتری لاکتوباسیلوس دلبروکی در نمونه‌های شیر تخمیری با بررسی میزان پروتئین محلول و گروه‌های آمین آزاد نمونه سرم شیر تخمیری و مقایسه آن با نمونه قبل از تخمیر ارزیابی شد. علاوه بر آن از آنجا که فعالیت زیستی نمونه‌های تخمیری و اجزای پپتیدی حاصل از آن وابسته به محتوا و سایز پپتیدهای تولیدی است، لذا محتوای گروه‌های آمین آزاد در اجزای پپتیدی مختلف مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. به منظور مقایسه دقیق‌تر بین نمونه‌های مختلف، محتوای گروه‌های آمین آزاد بر اساس وزن یکسان از پروتئین نیز محاسبه شد که نتایج در جدول ۱ ارائه شده است. همانطور که مشاهده می‌شود محتوای پروتئین کل اندازه‌گیری شده در نمونه سرم شیر تخمیری بالاتر از نمونه سرم شیر غیرتخمیری است که نشان‌دهنده هیدرولیز پروتئین‌های شیر در جریان تخمیر و فعالیت پروتئولیتیک باکتری لاکتوباسیلوس دلبروکی است. به طوری که هیدرولیز پروتئین باعث ایجاد پپتیدهایی با سایز کوچک شده است که در جریان رسوب دادن کازئین با فرایند تغییر pH، به دلیل سایز کوچک‌شان به صورت محلول در فاز رویی باقی‌مانده و بعد از جداسازی پروتئین‌های با سایز درشت، در سرم اندازه‌گیری شده اند [۱۹].

**Table 1** Microbial hydrolysis of FM by *Lactobacillus delbrueckii* and peptide fractions from FM in protein content, proteolysis, inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes compared with NFM

Sample	<3 kDa	3-5 kDa	5-10 kDa	>10 kDa	CFS-FM	NFM
Sample volum (ml)	4	8	8	8	30	30
Protein (mg/ml)	0.077 $\pm$ 0.008 <sup>e</sup>	0.287 $\pm$ 0.003 <sup>d</sup>	0.446 $\pm$ 0.003 <sup>c</sup>	1.727 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.942 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>	0.086 $\pm$ 0.004 <sup>d</sup>
Total Protein (mg sample)	0.308 $\pm$ 0.03 <sup>f</sup>	2.296 $\pm$ 0.02 <sup>e</sup>	3.568 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	13.816 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>	28.260 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	2.580 $\pm$ 0.12 <sup>d</sup>
Protein recovery* (%)	1.08	8.12	12.62	48.88	100	---
Free amine ( $\mu$ M Leucine/ml)	1.654 $\pm$ 0.03 <sup>f</sup>	5.220 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>	6.220 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	8.660 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	7.318 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	3.040 $\pm$ 0.03 <sup>e</sup>
Total free amine ( $\mu$ M Leucine/ sample)	6.616 $\pm$ 0.12 <sup>f</sup>	41.760 $\pm$ 0.40 <sup>e</sup>	49.760 $\pm$ 0.40 <sup>d</sup>	69.280 $\pm$ 0.50 <sup>c</sup>	219.30 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	91.20 $\pm$ 0.90 <sup>b</sup>
$\mu$ M Leucine/mg protein	21.48 <sup>b</sup>	18.18 <sup>c</sup>	13.94 <sup>d</sup>	5.01 <sup>f</sup>	7.76 <sup>e</sup>	35.34 <sup>a</sup>
Inhibition of $\alpha$ -amylase (%)	ND	46.96 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	39.17 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	80.64 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	25.00 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	20.00 $\pm$ 0.03 <sup>e</sup>
Inhibition of $\alpha$ -glucosidase (%)	ND	21.65 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	15.850 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>	54 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	26.6 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	14.54 $\pm$ 0.02 <sup>e</sup>

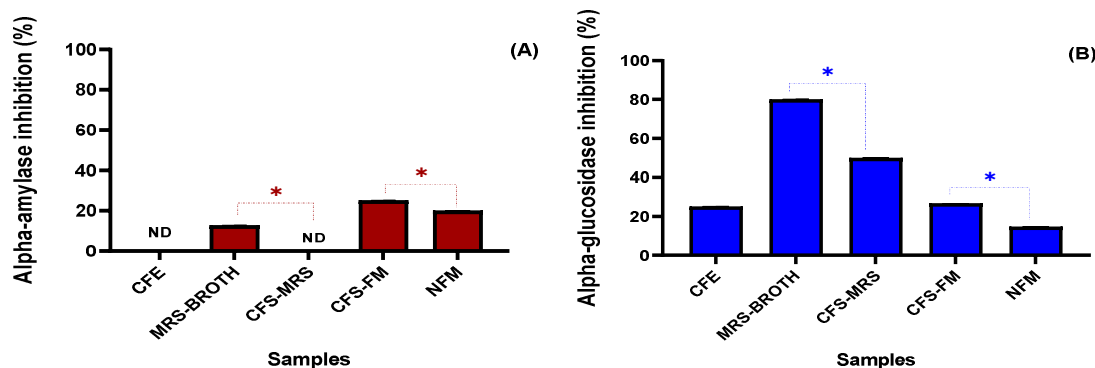
\*ND: Not Detected, Different letters, show a statistical significant different between treatments ( $P < 0.05$ )

افزایش غلظت آمین‌های آزاد می‌شود [۲۲]. همانطور که در مقایسه بین محتوای پروتئین اجزای پپتیدی مختلف گفته شد، نتایج مقایسه محتوای گروه‌های آمین آزاد بین اجزای مختلف نیز نشان داد که بیشترین محتوای آمین آزاد مربوط به اجزای پپتیدی بالاتر از ۱۰ کیلودالتون می‌باشد که تأیید می‌کند عمده پپتیدهای تولید شده در محدوده وزن مولکولی بالاتر از ۱۰ کیلودالتون هستند و بعد از آن به ترتیب اجزای ۵-۱۰، ۳-۵ و کوچک‌تر از ۳ کیلودالتون قرار گرفته‌اند. سلیمانزاده و همکاران (۲۰۱۹) نیز میزان بالای گروه‌های آمین آزاد در اجزای پپتیدی با وزن مولکولی بالای ۱۰-۵ کیلودالتون سرم شیر تخمیر شده توسط سویه لاکتوباسیلوس لاکتیس را گزارش کرده‌اند [۲۳]. همچنین به منظور حذف اثر غلظت‌های مختلف پروتئین در اجزای پپتیدی، میزان آمین آزاد بر اساس وزن یکسان پروتئین در هر نمونه محاسبه شد که نتایج نشان‌دهنده فعالیت پروتئولیز بیشتر در اجزای پپتیدی با وزن مولکولی پایین‌تر بدلیل قطعات پپتیدی تولید شده در حین تخمیر می‌باشد.

### ۲-۳- فعالیت ضد دیابتی

نتایج فعالیت ضد دیابتی نمونه‌ها شامل سرم شیر تخمیری سویه لاکتوباسیلوس دلبروکی، سرم شیر غیرتخمیری، رومانند محیط کشت تخمیری و اجزای شکسته سلولی در شکل ۱ ارائه شده است.

مطابق جدول ۱ مشاهده می‌شود میزان پروتئین کل در جزء پپتیدی با وزن مولکولی بالاتر از ۱۰ کیلودالتون نسبت به سایر اجزای پپتیدی بیشتر است و نشان‌دهنده این است که عمده پپتیدهای تولید شده در شرایط تخمیری، دارای وزن مولکولی بالاتر از ۱۰ کیلودالتون هستند. با توجه به اینکه جداسازی مناسب پپتیدها توسط غشاهای اولترافیلتراسیون مزایایی چون عملکرد مناسب، نیاز به انرژی کمتر، حفظ پایداری پروتئین در حین جداسازی، شفافیت نمونه و عدم نیاز به استفاده از حلال‌ها و سایر مواد شیمیایی دارد اما اعمال فشار صحیح جهت عبور کامل هر جزء و گرفتگی منافذ در صورت بالا بودن غلظت نمونه از محدودیت‌های این روش می‌باشد [۲۰]. از اینرو میزان بازیابی پروتئین بر اساس درصد هر جزء پپتیدی به کل پروتئین نمونه (۷۰/۷٪) محاسبه شد. علاوه بر این بررسی مقایسه نتایج محتوای گروه‌های آمین آزاد در نمونه‌های قبل و بعد از تخمیر نیز تأیید کننده نقش باکتری در هیدرولیز پروتئین شیر و افزایش محتوای گروه‌های آمین آزاد در نمونه سرم شیر تخمیری می‌باشد. Rubak و همکاران (۲۰۲۰)، بالا بودن فعالیت پروتئولیز سویه لاکتوباسیلوس دلبروکی را در شیر تخمیری گزارش کرده‌اند [۲۱] به طوری که توان پروتئولیتیک به فعالیت پروتئینازهای خارج سلول و وابسته به غشای باکتری‌های اسید لاکتیک در طی فرایند تخمیر شیر نسبت داده می‌شود که منجر به تجزیه پروتئین‌های پیچیده و بزرگ به پپتیدهای ساده و کوچک‌تر و



**Fig 1** Anti-diabetic activity of CFE, CFS-MRS, CFS-FM, MRS-broth and NFM by  $\alpha$ -amylase (A) and  $\alpha$ -glucosidase (B) inhibition

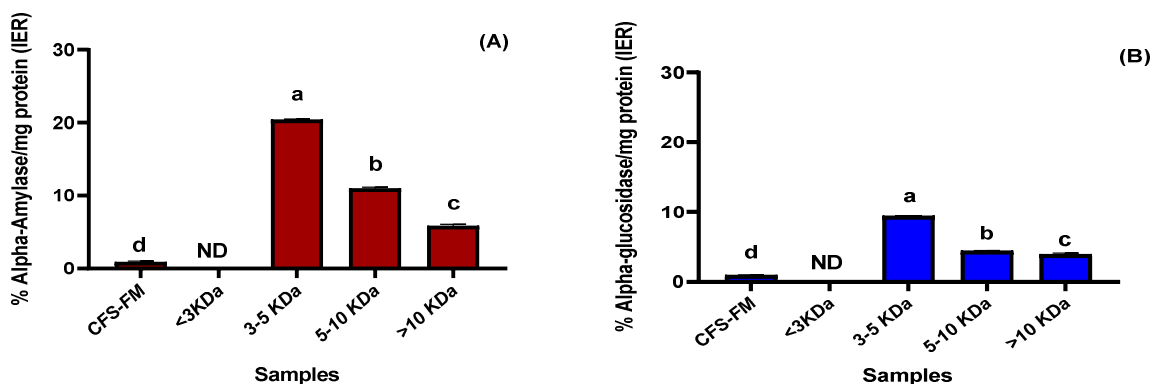
The data marked with an asterisk are significantly different ( $P < 0.05$ ), ND: Not Detected

تفاوت معنی‌داری وجود دارد ( $p < 0.05$ ). از اینرو سرم شیر تخمیری محیط مناسبی برای تولید پپتیدهای فعال زیستی با قابلیت مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز می‌باشد که از

مطابق شکل ۱ مشاهده می‌شود که میان میزان مهار آنزیم آلفا آمیلاز (۲۵٪) و آلفا گلوکوزیداز (۲۶٪) در سرم شیرهای تخمیری سویه لاکتوباسیلوس دلبروکی با سرم شیر تخمیر نشده

پپتیدی، به منظور استاندارد کردن فعالیت مهارکنندگی بر اساس وزن یکسان پروتئین نتایج بر مبنای نسبت میزان فعالیت به وزن پروتئین محاسبه و با عنوان کارایی بازدارندگی (IER) در شکل ۲ ارائه شده است [۲۱].

فعالیت پروتئولیتیک باکتری‌های اسید لاکتیک تولید می‌شوند [۱۰]. [برخی از محققان نیز پتانسیل مهارکنندگی آنزیم آلفا گلوکزیداز در محصولات تخمیر شده با باکتری‌های اسید لاکتیک را به آگزوپولی‌ساکاریدهای تولید شده توسط باکتری‌ها نسبت داده اند [۲۴]. جهت مقایسه فعالیت ضد دیابتی اجزای



**Fig 2** Inhibitory efficiency ratio (IER) in CFS-FM and peptide fractions from fermented milk by *Lactobacillus delbrueckii* by  $\alpha$ -amylase/mg protein (A) and  $\alpha$ -glucosidase/mg protein (B)

Different letters show a statistically significant different between treatments ( $P < 0.05$ ), ND: Not Detected

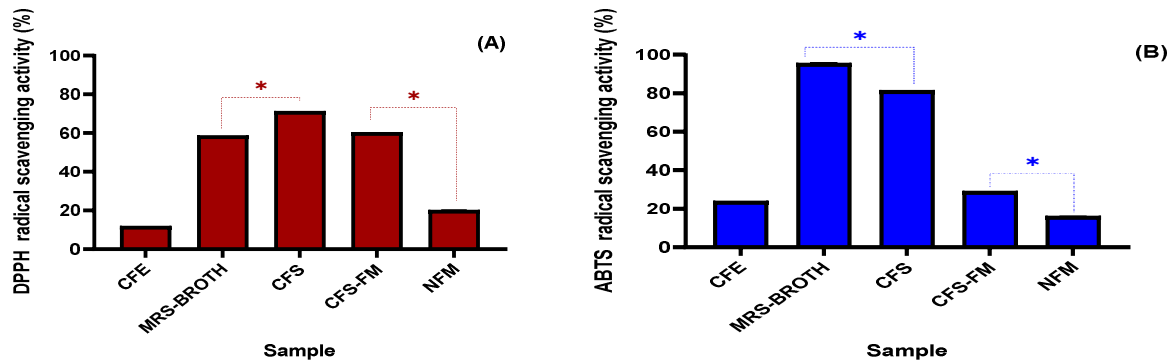
میزان ۱۲/۷ درصد قابلیت مهار آنزیم آلفا آمیلاز را دارد ( $p < 0.05$ ). همچنین مشاهده گردید که نمونه‌های رومانند محیط کشت تخمیری و اجزای شکسته سلولی توانستند آنزیم آلفا گلوکزیداز را به ترتیب ۵۰ و ۲۵ درصد مهار کنند. نتایج تحقیق Frediansyah و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد که رومانند محیط کشت تخمیری و عصاره سلولی سویه لاکتوباسیلوس پتوزوس پتانسیل مهارکنندگی خوبی در مهار دو آنزیم آلفا آمیلاز و آنزیم آلفاگلوکزیداز دارد [۲۷]. نتایج پژوهش Son و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد که فعالیت مهارکنندگی آنزیم آلفاگلوکزیداز در رومانند محیط کشت تخمیری سویه‌های لاکتوباسیلوس مورد مطالعه ۱۰/۱ تا ۲۴/۱ درصد و اجزای شکسته سلولی بین ۰ تا ۱۰/۵ درصد می‌باشد [۲۸]. لذا دلیل این تفاوت‌ها را به نوع سویه، جنس گونه، نوع محیط کشت، فرایند شکست سلول، تعداد باکتری و نوع آنزیم سلولی مرتبط دانست.

### ۳-۳- فعالیت آنتی اکسیدانی

نتایج فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها شامل سرم شیر تخمیری سویه لاکتوباسیلوس دلبروکی، سرم شیر غیر تخمیری، رومانند محیط کشت تخمیری و اجزای شکسته سلولی در شکل ۳ ارائه شده است.

مطابق شکل ۲، بیشترین مقدار IER در مهار آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکزیداز مربوط به جزء پپتیدی ۳-۵ کیلوالتون است ( $p < 0.05$ ). در بررسی میزان کارایی بازدارندگی با سایر پپتیدها، تأثیر مثبت پپتیدهای با اندازه کوچک در مهار آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفاگلوکزیداز بخوبی قابل مشاهده است. بصورتیکه جزء پپتیدی ۳-۵ کیلوالتون در مقایسه با سایر اجزای پپتیدی بیشترین توانایی را در مهار آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکزیداز دارد که دلیل این یافته را می‌توان به اثربخشی بیشتر پپتیدهای کوتاه زنجیره در آزادسازی الکترون‌ها نسبت داد که منجر به افزایش تعامل با آنزیم آلفا آمیلاز و آلفاگلوکزیداز و ممانعت از کاتالیز سوپرکسید می‌شود. برخی از محققین معتقدند که پپتیدهای کوچکتر قابلیت نفوذ بهتری در محل فعال آنزیم یا تعاملات قوی‌تر با سایت‌های غیرفعال دارند [۲۵]. از سوی دیگر این احتمال وجود دارد که پپتیدهای با وزن مولکولی پایین به آسانی به محل کاتالیزوری آنزیم می‌رسند سپس به آنزیم متصل می‌شوند و با تغییر شکل آن و جلوگیری از اتصال بین آنزیم و سوپرکسید باعث مهار می‌شوند [۲۶]. در بررسی فعالیت ضد دیابتی نمونه‌های رومانند محیط کشت تخمیری و اجزای شکسته سلولی مطابق شکل ۱ مشاهده می‌شود که این نمونه‌ها قابلیت مهار آنزیم آلفا آمیلاز را ندارند ولی نمونه کنترل (محیط کشت ام آر اس) به



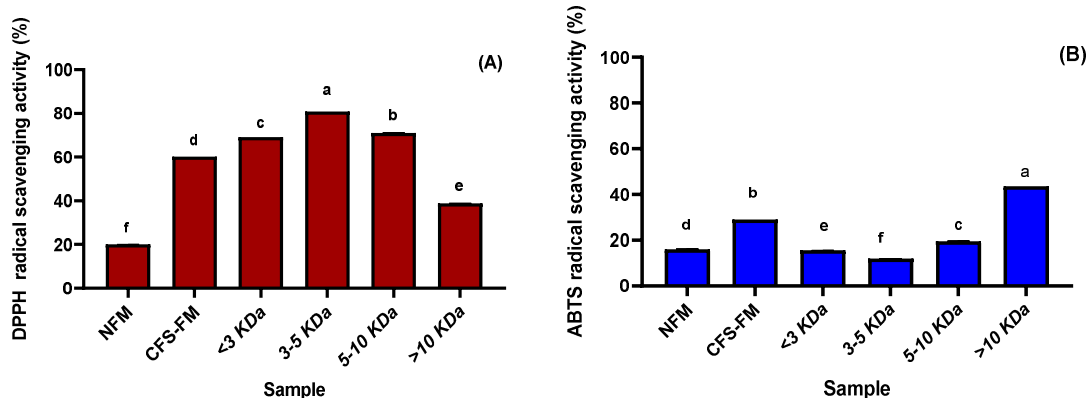


**Fig 3** Anti-oxidant activity of CFE, CFS, CFS-FM, MRS-broth and NFM by DPPH (A) and ABTS free radical scavenging (B)

The data marked with an asterisk are significantly different ( $P < 0.05$ )

می‌شود که نمونه رومانند محیط کشت تخمیری نسبت به نمونه کنترل (محیط کشت ام آر اس مایع) دارای قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH بیشتری است به طوری که سویه لاکتوباسیلوس دلبروکی در افزایش سطح آنتی‌اکسیدان موثر است و محیط کشت ام آر اس که حاوی منبع نیتروژن عصاره مخمر، پپتون و عصاره گوشت گاو است [۲۹]. در رشد و فعالیت باکتری در محیط کشت و تولید متابولیت‌هایی با فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH موثر بوده است. این در حالی است که میزان مهار رادیکال آزاد ABTS در نمونه رومانند محیط کشت تخمیری نسبت به نمونه کنترل (محیط کشت ام آر اس) کاهش داشته است که دلیل آن ممکن است واکنش پذیری کمتر متابولیت‌های تولیدی در مهار رادیکال آزاد ABTS باشد. در مرحله بعد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اجزای پپتیدی سرم شیر تخمیر شده توسط سویه لاکتوباسیلوس دلبروکی با دو روش DPPH و ABTS مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در شکل ۴ نشان داده شده است.

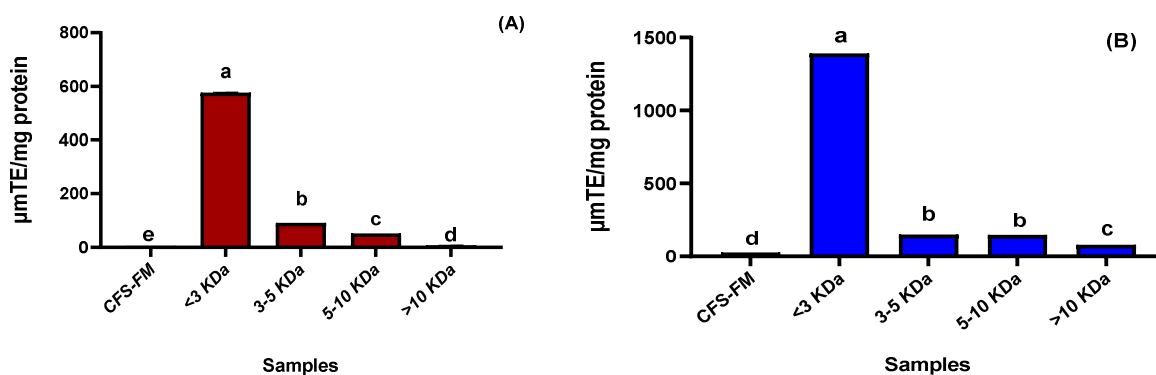
در بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه سرم شیر تخمیری به روش مهار رادیکال‌های آزاد با دو روش DPPH و ABTS، نتایج حاکی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطلوب نمونه سرم شیر تخمیری نسبت به نمونه سرم شیر غیرتخمیری است ( $P < 0.05$ ). که دلیل آن مربوط به تولید پپتیدهای زیست فعال با خاصیت آنتی‌اکسیدانی ناشی از هیدرولیز پروتئین در حین تخمیر باکتریایی می‌باشد. لذا شیر تخمیری بستر مناسبی برای تولید پپتیدها با فعالیت آنتی‌اکسیدانی است به طوری که این ترکیبات در شیر تخمیری از پراکسیداسیون آنزیمی و غیرآنزیمی اسیدهای چرب ضروری جلوگیری می‌کنند [۸]. در بررسی مهار رادیکال آزاد با دو روش مورد آزمون مشاهده می‌شود که نمونه عصاره سلولی کمتر از ۲۵ درصد و نمونه رومانند محیط کشت تخمیری در محدوده ۷۰ تا ۸۰ درصد قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS را دارند که دلیل این یافته را می‌توان به وجود ترکیبات پروتئینی در مایع رویی نسبت داد. همچنین مشاهده



**Fig 4** Anti-oxidant activity of NFM, CFS-FM and peptide fractions from fermented milk by *Lactobacillus delbrueckii* by DPPH (A) and ABTS (B) free radical scavenging

Different letters show a statistically significant different between treatments ( $P < 0.05$ )

کیلودالتون می‌باشد [۶]. در این زمینه Aguilar-Toalá و همکاران (۲۰۱۷) یک رابطه قوی بین پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون در پپتیدهای سرم شیر تخمیر شده سویه لاکتوباسیلوس پلانناروم، با فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده کردند [۳۰]. در بررسی مهار رادیکال آزاد به روش ABTS مشاهده می‌شود که میزان مهار رادیکال آزاد در جزء پپتیدی بالای ۱۰ کیلودالتون ۴۳/۶۳ درصد می‌باشد و میزان مهارکنندگی در این جزء از اجزای پپتیدی دیگر بالاتر است ( $p < 0.05$ ). جهت ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس نمونه، قابلیت مهار رادیکال آزاد اجزای پپتیدی بر اساس معادل ترولوکس ( $\mu\text{MTE}/\text{mg protein}$ ) محاسبه شد که نتایج آن در شکل ۵ ارائه شده است.



**Fig 5** Anti-oxidant capacity of CFS-FM and peptide fractions from fermented milk by *Lactobacillus delbrueckii*. The data of DPPH (A) and ABTS (B) free radical scavenging activities are expressed as trolox equivalent ( $\mu\text{M TE}/\text{mg protein}$ ). Different letters show a statistically significant different between treatments ( $P < 0.05$ )

تریپسین مشاهده کردند که جزء کمتر از ۳ کیلودالتون بالاترین میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS را دارد [۳۲]. علاوه بر اندازه پپتید، ماهیت و ترکیبات پپتیدها نیز در قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد موثر هستند [۷]. ترکیب و توالی آمینواسیدی پپتیدها در تعیین خاصیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها نقش دارد [۳۳]. با این حال با توجه به ارتباط عملکرد آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای مشتق شده از پروتئین‌های غذایی با ترکیب، ساختار و آبگریزی پپتیدها، توسعه مهار رادیکال‌های آزاد به آنزیم‌های پروتئولیتیک اختصاصی بدست آمده از سویه‌های میکروبی مرتبط است [۳۴]. بررسی نتایج فعالیت مهارکنندگی

مطابق شکل مشاهده می‌شود که مهار رادیکال DPPH در تمام اجزای پپتیدی به طور مطلوبی بیشتر از نمونه سرم شیر غیر تخمیری است ( $p < 0.05$ ) و نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول حاصل از تخمیر باکتری لاکتوباسیلوس دلبروکی است. همچنین با مشاهده میزان مهار رادیکال آزاد DPPH می‌توان بیان کرد که اجزای پپتیدی ۳ تا ۵ کیلودالتون توانایی خوبی در مهار رادیکال آزاد DPPH نسبت به سایر اجزای پپتیدی دارند ( $p < 0.05$ ) که این یافته با نتیجه پژوهش Qian و همکاران (۲۰۱۱) در زمینه بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی در اجزای پپتیدی مشتق شده از شیر خشک بدون چربی تخمیر شده با سویه لاکتوباسیلوس دلبروکی همخوانی دارد. بر اساس نتایج این مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی اجزای پپتیدی با وزن مولکولی کمتر از ۳، ۳-۵ و ۱-۳ کیلودالتون بیشتر از جزء پپتیدی بالاتر از ۱۰-۵

مطابق شکل ۵ مشاهده می‌شود بیشترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS بر اساس میکرومولار ترولوکس به میلی‌گرم پروتئین نمونه مربوط به جزء پپتیدی کمتر از ۳ کیلودالتون است ( $p < 0.05$ ). خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر پپتیدهای با جرم مولکولی کم تأیید شده است زیرا آن‌ها می‌توانند به راحتی با رادیکال‌های چربی واکنش دهند و از پراکسیداسیون لیپید با واسطه رادیکال آزاد بکاهدند [۳۱]. لذا پژوهش حاضر نشان می‌دهد که اندازه پپتید نقش مهمی در مهار رادیکال‌های آزاد دارد [۷]. میرزایی و همکاران (۲۰۱۵) نیز بر روی اجزای بدست آمده از هیدرولیز پروتئین مخمر ساکارومایسس سرویزیه با آنزیم



- [2] Rajoka, MS., Shi, J., Mehwish, HM., Zhu, J., Li, Q., Shao, D., Huang, Q. & Yang, H. 2017. Interaction between diet composition and gut microbiota and its impact on gastrointestinal tract health. *Food Science and Human Wellness*, 6(3), 121-130.
- [3] Cabello-Olmo, M., Oneca, M., Torre, P., Sainz, N., Moreno-Aliaga, MJ., Gुरुceaga, E., Díaz, JV., Encio, IJ., Barajas, M. & Araña, M. 2019. A fermented food product containing lactic acid bacteria protects ZDF rats from the development of type 2 diabetes. *Nutrients*, 11(10), 25-30.
- [4] Graham, K., Rea, R., Simpson, P. & Stack, H. 2019. *Enterococcus faecalis* milk fermentates display antioxidant properties and inhibitory activity towards key enzymes linked to hypertension and hyperglycaemia. *Journal of Functional Foods*, 58, 292-300.
- [5] Chen, P., Zhang, Q., Dang, H., Liu, X., Tian, F., Zhao, J., Chen, Y., Zhang, H. & Chen, W. 2014. Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. *Food Control*, 35(1), 65-72.
- [6] Qian, B., Xing, M., Cui, L., Deng, Y., Xu, Y., Huang, M. & Zhang, S. 2011. Antioxidant, antihypertensive and immunomodulatory activities of peptide fractions from fermented skim milk with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB340. *Journal of Dairy Research*, 78(1), 72-79.
- [7] Moslehishad, M., Ehsani, MR., Salami, M., Mirdamadi, S., Ezzatpanah, H., Naslaji, AN. & Moosavi-Movahedi, AA. 2013. The comparative assessment of ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions obtained from fermented camel and bovine milk by *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637. *International Dairy Journal*, 29(2), 82-87.
- [8] Ayyash, M., Al-Nuaimi, AK., Al-Mahadin, S. & Liu, SQ. 2018. In vitro investigation of anticancer and ACE-inhibiting activity,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibition, and antioxidant activity of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. *Food Chemistry*, 15(239), 588-597.
- [9] González-Montoya, M., Hernández-Ledesma, B., Mora-Escobedo, R. & Martínez-Villaluenga, C. 2018. Bioactive peptides from

رادیکال‌های DPPH و ABTS به صورت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترولوکس (شکل ۵) نشان می‌دهد که مقادیر بدست آمده با روش ABTS بیشتر از روش DPPH است که علت این یافته می‌تواند با واکنش‌پذیری بیشتر رادیکال‌های آزاد ABTS در مقایسه با رادیکال‌های DPPH، تفاوت در مکانیسم‌های مهار رادیکالی و حساسیت روش سنجش در سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آلدوست و چربی دوست مرتبط باشد [۳۲] زیرا DPPH در محیط‌های آلی و ABTS در محیط‌های آبی و آلی حل می‌شوند [۲۲].

#### ۴- نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج مطالعه مبنی بر توانایی بروز ویژگی‌های ضد دیابتی و آنتی‌اکسیدانی متابولیت‌های حاصل از سویه لاکتوباسیلوس دلبروکی در نمونه رومانند محیط کشت تخمیری، اجزای شکسته سلولی، سرم شیر تخمیری و پپتیدهای زیست فعال مشتق شده از نمونه سرم شیر تخمیری سویه لاکتوباسیلوس دلبروکی می‌توان بیان کرد که این سویه با ویژگی‌های عملکردی مفیدی که دارد می‌تواند به عنوان کشت آغازگر برای تولید شیرهای تخمیر شده با پتانسیل ضد دیابتی و آنتی‌اکسیدانی استفاده شود. همچنین این یافته بار دیگر نقش میکروارگانیسم‌ها را در تولید محصولات تخمیری فراسودمند جدید نشان می‌دهد به طوری که این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند ابزاری قدرتمند برای کنترل بیماری‌ها باشند از اینرو پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری در زمینه تأثیر این محصولات بر نشانگرهای متابولیکی انجام گردد. لازم بذکر است اگرچه ظرفیت بازدارندگی پپتیدهای شیر تخمیری ممکن است کمتر از داروهای موجود باشد اما تولید آن‌ها از منابع طبیعی، جایگزین سالمی برای پیشگیری از بیماری‌های مزمن بدون عوارض شیمیایی می‌باشد.

#### ۵- منابع

- [1] Zeng, Z., Luo, JY., Zuo, FL., Yu, R., Zhang, Y., Ma, HQ. & Chen, SW. 2016. Bifidobacteria possess inhibitory activity against dipeptidyl peptidase  $\square$ IV. *Letters in Applied Microbiology*, 62(3), 250-255.

- [18] Mukherjee, S., Pawar, N., Kulkarni, O., Nagarkar, B., Thopte, S., Bhujbal, A. & Pawar, P. (2011). Evaluation of free-radical quenching properties of standard Ayurvedic formulation Vayasthapana Rasayana. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11(1), 1-6.
- [19] Al Kanhal, H. A. 2010. Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk. *International Dairy Journal*, 20(12), 811-821.
- [20] Vollet Marson, G., Belleville, M. P., Lacour, S. & Dupas Hubinger, M. 2021. Membrane fractionation of protein hydrolysates from by-Products: recovery of valuable compounds from spent yeasts. *Membranes*, 11(23), 1-19.
- [21] Rubak, YT., Nuraida, L., Iswantini, D. & Prangdimurti, E. 2020. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in milk fermented by indigenous lactic acid bacteria. *Veterinary World*, 13(2), 345-353.
- [22] Aloglu, H. Ş., & Öner, Z. 2011. Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. *Journal of Dairy Science*, 94(11), 5305-5314.
- [23] Soleymanzadeh, N., Mirdamadi, S., Mirzaei, M. & Kianirad, M. 2019. Novel  $\beta$ -casein derived antioxidant and ACE-inhibitory active peptide from camel milk fermented by *Leuconostoc lactis* PTCC1899: Identification and molecular docking. *International Dairy Journal*, 97, 201-208.
- [24] Ramchandran, L., & Shah, N. P. 2008. Proteolytic profiles and angiotensin-I converting enzyme and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of selected lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*, 73(2), 75-81.
- [25] Famuwagun, A. A., Alashi, A. M., Gbadamosi, S. O., Taiwo, K. A., Oyedele, D., Adebooye, O. C., & Aluko, R. E. 2021. Effect of protease type and peptide size on the In vitro antioxidant, antihypertensive and anti-diabetic activities of eggplant leaf Protein hydrolysates. *Foods*, 10(5), 1-22.
- [26] Castañeda-Pérez, E., Jiménez-Morales, K., Quintal-Novelo, C., Moo-Puc, R., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. 2019. Enzymatic protein hydrolysates and germinated soybean with anti-diabetic potential by inhibition of dipeptidyl peptidase-IV,  $\alpha$ -amylase, and  $\alpha$ -glucosidase enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 1-14.
- [10] Muganga, L., Liu, X., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H. & Chen, W. 2015. Screening for lactic acid bacteria based on antihyperglycaemic and probiotic potential and application in synbiotic set yoghurt. *Journal of Functional Foods*, 1(16), 125-136.
- [11] Tagliazucchi, D., Martini, S. & Solieri, L. 2019. Bioprospecting for bioactive peptide production by lactic acid bacteria isolated from fermented dairy food. *Fermentation*, 5(4), 1-34.
- [12] Stratton, I. M., Adler, A. I., Neil, H. A. W., Matthews, D. R., Manley, S. E., Cull, C. A., ... & Holman, R. R. 2000. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *British Medical Journal*, 321(7258), 405-412.
- [13] Dan, T., Ren, W., Liu, Y., Tian, J., Chen, H., Li, T., & Liu, W. 2019. Volatile flavor compounds profile and fermentation characteristics of milk fermented by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-12.
- [14] Soleymanzadeh, N., Mirdamadi, S. & Kianirad M. 2016. Antioxidant activity of camel and bovine milk fermented by lactic acid bacteria isolated from traditional fermented camel milk (Chal). *Dairy Science & Technology*, 96(4), 443-457.
- [15] Hatree, EF. 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, 48, 422-427.
- [16] Church, FC, Swaisgood, HE., Porter, DH., Catignani, GL. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66(6), 1219-1227.
- [17] Son, S. & Lewis, BA. 2002. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure-activity relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 468-472.

- [30] Aguilar-Toalá, J. E., Santiago-López, L., Peres, C. M., Peres, C., Garcia, H. S., Vallejo-Cordoba, B., ... & Hernández-Mendoza, A. 2017. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 65-75.
- [31] Ngoh, YY., & Gan CY. 2016. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and  $\alpha$ -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). *Food Chemistry*, 190, 331-337.
- [32] Mirzaei, M., Mirdamadi, S., Ehsani, MR., Aminlari, M. & Hosseini, E. 2015. Purification and identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptide from *Saccharomyces cerevisiae* protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, 19, 259-68.
- [33] Wiriyaphan, C., Chitsomboon, B. & Yongsawadigul, J. 2012. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi by products. *Food Chemistry*, 132, 104-111
- [34] Sarmadi, B.H., & Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956.
- ultrafiltered peptide fractions from Cowpea *Vigna unguiculata* L bean with in vitro antidiabetic potential. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 16(8), 1773-1781.
- [27] Frediansyah, A., Nurhayati, R., & Sholihah, J. 2019. *Lactobacillus pentosus* isolated from *Muntingia calabura* shows inhibition activity toward alpha-glucosidase and alpha-amylase in intra and extracellular level. 2nd International Conference on Natural Products and Bioresource Sciences-2018. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 251(1), 1-6.
- [28] Son, SH., Jeon, HL., Yang, SJ., Lee, NK. & Paik HD. 2017. In vitro characterization of *Lactobacillus brevis* KU15006, an isolate from kimchi, reveals anti-adhesion activity against foodborne pathogens and antidiabetic properties. *Microbial Pathogenesis*, 112, 135-141.
- [29] Yusuf, D., Nuraida, L., Dewanti-Hariyadi, R. & Hunaefi, D. 2021. In vitro Antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of *Lactobacillus* spp. isolated from indonesian kefir grains. *Applied Food Biotechnology*, 8(1), 39-46.



## Evaluation of Inhibitory Activity of $\alpha$ -Amylase and $\alpha$ -Glucosidase Enzymes and Antioxidant Capacity of Metabolites Obtained from *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* PTCC1900 Culture Media

Shirkhan, F. <sup>1</sup>, Mirdamadi, S. <sup>2\*</sup>, Mirzaei, M. <sup>3</sup>, Akbari-adergani, B. <sup>4</sup>, Nasoohi, N. <sup>5</sup>

1. Department of Food Science and Technology, Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Science, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Tehran, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4. Professor of Food and Drug Laboratory Research Center, Food and Drug administration, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran.
5. Assistant Professor, Department of Biochemistry and Biophysics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

## ARTICLE INFO

## ABSTRACT

## Article History:

Received 2021/ 10/ 15  
Accepted 2022/ 04/ 19

## Keywords:

Diabetes,  
 $\alpha$ -Amylase,  
 $\alpha$ -Glucosidase,  
Antioxidant,  
Metabolite,  
*Lactobacillus delbrueckii*.

DOI: 10.22034/FSCT.19.125.47

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.7.6

\*Corresponding Author E-Mail:  
Mirdamadi@irost.ir

Today, the use of *Lactobacill* strains and their metabolites is the new strategies in control of diabetes and oxidative stress. Therefore, the present study aimed to investigate the antidiabetic and antioxidant properties of metabolites obtained from *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* culture media. The samples were evaluated including cell free supernatant (CFS), cell free extracts (CFE), cell free supernatant of fermented milk (CFS-FM) and bioactive peptides separated from ultrafiltration (3,5,10 kDa). The ability of bacteria in proteolysis of protein of fermented milk (FM) was evaluated by O-phthalaldehyde method compared with non-fermented milk (NFM). The antidiabetic activity was measured based on inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. The antioxidant activity was evaluated by inhibition of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS). The results showed that the sample of CFS-FM inhibited  $\alpha$ -amylase (25%) and  $\alpha$ -glucosidase (26.6%) enzymes. Among the peptide fractions, fraction of >10 kDa with higher protein content (13.816 mg) had the highest inhibition of  $\alpha$ -amylase (80.64%) and  $\alpha$ -glucosidase enzyme (54%) ( $p < 0.05$ ). The inhibitory efficiency ratio (IER) showed that the 3-5 kDa fraction had more inhibitory than other peptide fractions ( $p < 0.05$ ). Also, the CFS and CFE inhibited  $\alpha$ -glucosidase enzyme by 50% and 25%, respectively. In case of antioxidant properties, it was observed that the free radicals scavenging of CFS-FM increased compared with NFM ( $p < 0.05$ ). Also, the peptide fractions of 3-5 kDa (80.85%) and >10 kDa (43.63%) had the highest DPPH and ABTS free radicals scavenging. The antioxidant capacity of trolox equivalent from peptide fractions ( $\mu\text{mTE}/\text{mg}$  protein) showed that the <3 kDa fraction had the highest antioxidant activity ( $p < 0.05$ ). The ability to free radicals scavenging in CFS and CFE was observed. Results indicate the importance of *Lactobacillus delbrueckii* as a starter culture and its functional role.