دراسة الفعالية المضادة للأحياء المجهرية والأكسدة لبروتين اللاكتوفيرين المنقى من لبأ الأبقار والأغنام

علي خضير جابر
قسم علوم الأغذية /كلية الزراعة/
جامعة البصرة

رغد أكرم عزيز
قسم العلوم/ كلية التربية الأساسية/
الجامعة المستنصرية

رغد رحيم علي الحاتم
قسم علوم الأغذية /كلية الزراعة/
جامعة البصرة

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لمعرفة كفاءة بروتين اللاكتوفيرين المنقى من شرش لبأ الأبقار والأغنام ضد بعض الأحياء المجهرية ومقدار تأثيره كمواد مضادة للأكسدة، اذ أظهر بروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام الكامل وبروتين لاكتوفيرين الأبقار المتحلل فعالية تثبيطية ضد عزلات من البكتريا الاختبارية المستعملة *مثل* ***Escherichia coli*** و ***Salmonella typhimurium*** و ***Staphylococcus aureus*** و ***Pseudomonas aeruginosa*** و ***Bacillus subtilis*** و ***Bacillus cereus***، كما بينت نتائج دراسة خواص بروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام كمواد مضادة للأكسدة، اذ ازدادت قوة الإختزال لبروتين اللاكتوفيرين بزيادة التركيز وأتضح بأن السعة الاختزالية للاكتوفيرين الأغنام كانت مقاربة لمضاد الأكسدة الطبيعي Ascorbic acid، اذ بلغت 130.08% وكانت أعلى من لاكتوفيرين الأبقار الذي بلغ 92.58% ، وقد اختلفت الفعالية المضادة للأكسدة باختلاف مصدر وتركيب البروتين، أذ تفوق لاكتوفيرين الأغنام في منع أكسدة الحامض الدهني اللينوليك بنسبة 89.24% وبفعالية مقاربة لمضاد الأكسدة الصناعي BHT وبالمقارنة مع لاكتوفيرين الأبقار، اذ بلغت فعاليته المضادة للأكسدة 73.64%، كما ازدادت قابلية الربط مع زيادة التركيز لكل من لاكتوفيرين الأبقار والأغنام، أذ أبدى لاكتوفيرين الأغنام قابلية ربط مقاربة لأنموذج المقارنة EDTA والتي بلغت 88.89%، في حين كانت 76.34% للاكتوفيرين الأبقار، وأظهرت نتائج إضافة لاكتوفيرين الأبقار والأغنام الى زيت الزيتون وزيت سمك الصبور المخزن عند درجة حرارة 45م لمدة 120 يوم وان التركيز 0.08 % أعطى أعلى فعالية مضادة للأكسدة كما وانخفضت قيمة البيروكسيد بزيادة التركيز

المقدمة

شهد العالم تطوراً كبيراً نحو استعمال مواد ذات طبيعة بروتينية لها القدرة على العمل كمضادات أكسدة وعوامل طبيعية مضادة لنمو الأحياء المجهرية لأجل ألاستغناء عن المواد الكيميائية التي أثارت الشكوك حول مدى سلامتها من الناحية الصحية لكون البعض منها مواد مسرطنة أو ذات تأثيرات سمية عند استعمالها على المستوى البعيد الأمد (1)، لذا

فقد أنصب الاهتمام في الآونة الأخيرة على المصادر الطبيعية لفائدتها الحيوية ومن هذه المواد الطبيعية بروتين اللاكتوفيرين Lactoferrin الذي يعد من البروتينات المناعية غير المتخصصة والمتميز بفعالية حيوية عالية من خلال قدرته على ربط الحديد، كما انه يعد من البروتينات السكرية القاعدية Basic glycoproteins وأحد إفراد عائلة البروتينات من نوع الترانسفيرين Transferrin (2)، اذ يمتلك اللاكتوفيرين تأثيراً مضاداً تجاه أنواع عدة من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة الكرام كما وله دوراً هاماً في تقليل أكسدة الزيوت والدهون (3)، وقد استقطب هذا البروتين اهتمام العديد من الباحثين لدراسته ومحاولة زيادة فعاليته الحيوية من خلال عملية هضمه Digestion، اذ تبين حصول زيادة في فعالية اللاكتوفيرين المتحلل سواء بفعل إنزيمي أو فيزيائي بمقدار 8–10 مرات أكثر بالمقارنة مع اللاكتوفيرين الطبيعي (4، 5، 6)، وكان معروف سابقا ان عمل اللاكتوفيرين تجاه الإحياء المجهرية هو سحب وربط ايون الحديد، الا انه وجد ان اللاكتوفيرين يؤثر حتى في الإحياء المجهرية المعروفة بعدم حاجتها الماسة للحديد أذ أنه يقوم بتحطيم الغشاء الخارجي للبكتريا السالبة لصبغة گرام مما يسبب تغيراً في نفاذية الغشاء ومن ثم موت الكائن المجهري (7)، وقد استعمال اللاكتوفيرين بوصفه مضاداً حيوياً طبيعياً Natural antibiotic في معالجة الأشخاص الذين يعانون من القرحة المعدية نتيجة لتأثيره المضاد لبكتريا *Helicobacter pylori* والمعروفة باستيطانها لمعدة الإنسان مسببة بذلك القرحة المعدية (8)، ويكون لبروتين اللاكتوفيرين دورا مشابها للهيبارين كونه مضادا لتكون الخثرة الدموية Anti-thrombotic اذ تظهر وظيفته مباشرة بعد تحرره من خلايا العدلة Neutrophil في الجسم وبذلك يكون ذا أهمية في معالجة بعض الامراض مثل الجلطة القلبية (9)، وان اللاكتوفيرين الموجود في اللعاب يؤدي دورا مهما في القضاء على بكتريا *Streptococcus mutans* الموجودة في الفم والمسؤولة عن تسوس الأسنان Dental caries (10)، كما وأن قابلية اللاكتوفيرين على ربط أيون الحديد في الأنظمة الغذائية له تأثير قوي كمضاد للاكسدة ولقد تم أختبار فعاليتهه للأكسدة في وسط مستحلب زيت في الماء Oil–in–Water أذ أظهرت النتائج وجود علاقة موجبة بين الفعالية المضادة للاكسدة وتركيز اللاكتوفيرين في النظام الدهني Lipid system (11)، بينما تمكن (12) من تقدير فعالية اللاكتوفيرين كمضاد للاكسدة من خلال تدعيم الحليب الصناعي Infant formula أذ وجد ان هناك علاقة موجبة بين زيادة تركيز اللاكتوفيرين والفعالية المضادة الاكسدة وتعود هذه الفعالية الى قابليته لربط أيون الحديد، **وعليه هدفت الدراسة إلى اختبار فعالية اللاكتوفيرين الكامل والمتحلل تجاه أنواع عدة من البكتريا وكذلك دراسة آلية عمله كمضاد أكسدة ومعرفة كفاءته في تقليل الأكسدة الذاتية في بعض أنواع الزيوت النباتية والحيوانية.**

المواد وطرائق العمل

1- بروتين اللاكتوفيرين: استعمل في الدراسة بروتين اللاكتوفيرين المنقى من شرش لبا الأبقار والأغنام والمستحصل عليه من مختبرات قسم علوم الأغذية/كلية الزراعة/جامعة البصرة.

2- تقدير البروتين: استعملت الطريقة التي وصفها (13) لتقدير البروتين في محاليل النماذج.

3- تحضير بروتين اللاكتوفيرين المتحلل: اجري هضم بروتين اللاكتوفيرين المنقى من شرش لبأ الأبقار وفقا لما ذكره (4).

4- عزلات بكتريا الاختبار: جرى الحصول على عزلات البكتريا المستعملة في قياس الفعالية المضادة لبروتين اللاكتوفيرين الكامل والمتحلل من مختبرات كلية العلوم/ جامعة بغداد، وشملت كل من بكتريا *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* و *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus subtilis* و *Bacillus cereus* .

5- اختبار فعالية بروتين اللاكتوفيرين الكامل والمتحلل ضد البكتريا: استعملت طريقة الانتشار في الحفر Well diffusion التي ذكرها (14) لاختبار فعالية بروتين اللاكتوفيرين الكامل والمتحلل ضد بعض من أنواع البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام.

6- اختبار الفعل المضاد للأكسدة لبروتين اللاكتوفيرين: أ- **قياس قوة الاختزال:** تم اختبار القوة الاختزالية لبروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام استنادا لما ذكره (15) و للمقارنة قدرت القوه الأختزالية لمضاد الأكسدة الطبيعي α-Tocopherol و Ascorbic acid ، وحسبت اعتماداً على المعادلة الآتية:

$$\text{القوة الاختزالية (\%)} = 100 - \left[\frac{\text{امتصاص الأنموذج البروتيني}}{\text{امتصاص الأنموذج الكفأ}} \times 100 \right]$$

ب- قياس الفعالية المضادة للأكسدة: اتبعت الطريقة التي اشار اليها (16) لقياس الفعالية المضادة للأكسدة لبروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام باستعمال نظام الحامض الدهني اللينوليك Linoleic acid System ، اذ حضرت تراكيز من لاكتوفيرين الأبقار والأغنام و مضاد الأكسدة الصناعيBHT و α-Tocopherol تراوحت بين0.5-3.5 ملغم/مل، وقد حسبت النسبة المئوية لتثبيط بيروكسيدات الحامض الدهني اللينوليك تبعاً للمعادلة الآتية:

$$\text{الفعالية المضادة للأكسدة (\%)} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{امتصاص الأنموذج البروتيني}}{\text{امتصاص النموذج الكفأ}} \right]$$

ج- قابلية ربط أيون الحديد: أتبعت الطريقة التي ذكرها (17) لقياس قابلية بروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام لربط ايون الحديدوز، وللمقارنة قدرت قابلية ربط أيون الحديدوز لمركب الأثلين ثنائي أمين رباعي حامض

الخليك ثنائي الصوديوم (EDTA-2Na) Ethylene diamine tetra aceticacid disodium بالطريقة نفسها، وحسبت قابلية البروتين على ربط أيون الحديدوز وفقاً للمعادلة الآتية:

$$\text{قابلية الربط}(\%) = \left[1 - \frac{\text{امتصاص الأنموذج البروتيني}}{\text{امتصاص الأنموذج الكفأ}} \right] \times 100$$

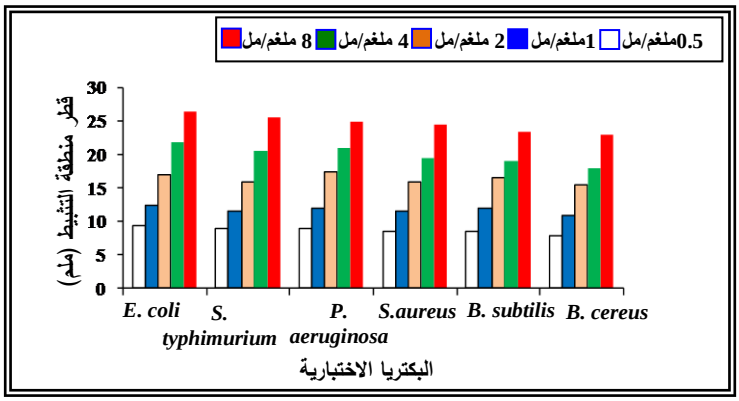
7- استخلاص زيت الصبور: استخلص الزيت من عينات سمك الصبور *ilisha* *Tenualosa* باستعمال طريقة الاستخلاص بالمذيبات العضوية وفقا الى ما ذكره (18).

8- تقيم أداء بروتين اللاكتوفيرين في الأنظمة الغذائية كمضادات أكسدة في الزيوت النباتية والحيوانية: اتبعت الطريقة التي ذكرها (19) اذ أذيب مضاد الأكسدة الصناعيBHT بالكحول الاثيلي وα-Tocopherol بالهكسان اما الأنموذج لبروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام فقد أذيب في الماء المقطر، كما وأضيفت المحاليل أعلاه الى زيت الزيتون وزيت سمك الصبور كل على انفراد وعلى درجة حرارة 45م وبتركيز نهائي لمضاد الأكسدة الصناعيBHT 0.02% في الزيت، اما المستخلص البروتيني فكان بتراكيز 0.02% و0.04% و0.08% وكذلك كانت تراكيز α –Tocopherol هي 0.02% و0.04% و0.08% وتمت متابعة كفاءة مضادات الأكسدة من خلال تقدير قيمة البيروكسيد Peroxide value في الزيت ولمدة 120 يوم وبواقع قرأه كل 15 يوم، وحسبت قيمة رقم البيروكسيد وفقا للطريقة المذكورة في (20).

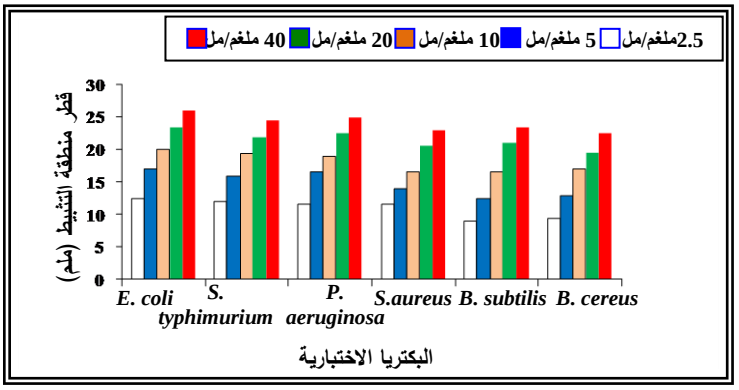
النتائج والمناقشة

فعالية بروتين اللاكتوفيرين الكامل والمتحلل تجاه بعض العزلات البكترية: توضح الإشكال (1و2 و3) نتائج فعالية بروتين لاكتوفيرين الأبقار المتحلل وبروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام الكامل على التوالي تجاه بعض العزلات البكترية، اذ تبين الإشكال أقطار هالات التثبيط التي أحدثها اللاكتوفيرين الكامل والمتحلل وبتراكيز مختلفة تجاه البكتريا، اذ اظهر لاكتوفيرين الأبقار المتحلل تأثيراً مثبطاً ضد جميع العزلات البكترية اذ سجل أعلى قيم لهالة التثبيط وكان ضد بكتريا *E. coli* وبلغ 26.5 ملم عند تركيز 8 ملغم/مل، في حين بلغ قطر هالة التثبيط 8 ملم ضد بكتريا *B. cereus* وكان ذلك عند تركيز 0.5 ملغم/مل وعدت اقل هالة تثبيط ضد البكتريا الاختبارية ، اما بالنسبة لبروتين لاكتوفيرين الأبقار الكامل فقد بلغت أعلى قيمة لقطر هالة التثبيط 26 ملم وكان ضد بكتريا *E. coli* عند تركيز 40 ملغم/مل، اما اقل قيمة لقطر هالة التثبيط فسجلت ضد بكتريا *B. subtilis* وكانت 9 ملم عند تركيز 2.5ملغم/مل، كما بينت النتائج ان بروتين لاكتوفيرين الأغنام قد امتلك

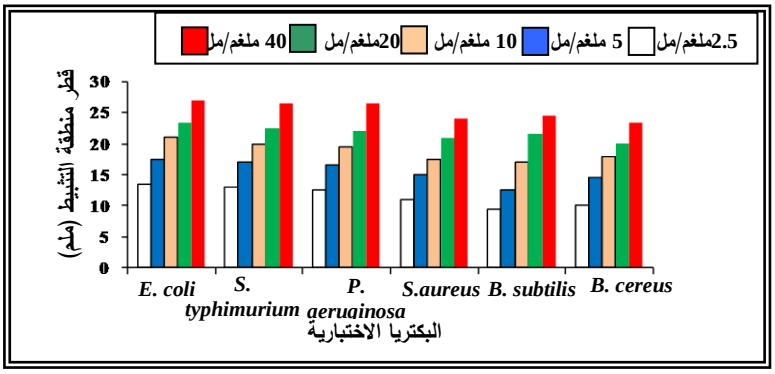
فعالية تثبيطية ضد البكتريا المستخدمة في الدراسة اذ أظهر اكبر قيمة لقطر هالة التثبيط ضد بكتريا *E.coli* أيضا اذ بلغ 27 ملم عند تركيز 40 ملغم/مل، أما أقل قطر لهالة التثبيط أظهره هذا البروتين فبلغ 9.5 ملم وكان ضد بكتريا *B.subtilis* عند تركيز 2.5 ملغم/مل، وقد يعود السبب في ارتفاع الفعالية لبروتين لاكتوفيرين الأبقار المتحلل تجاه العزلات البكترية في الحفر التي وضع فيها هذا البروتين إلى ارتباط الببتيد القاتل اللاكتوفيرسين بالغشاء السايتوبلازمي بالنسبة للبكتريا الموجبة لصبغة گرام إما فعاليته تجاه البكتريا السالبة لصبغة گرام تعود إلى ان هذا الببتيد الناتج من التحلل يحوي على نسبة عالية من الأحماض الامينية القاعدية وهذا يجعله يحمل شحنة موجبة عالية والتي لها ألفة عالية للفوسفولبيدات ومتعدد السكريات الدهنية (LPS) Lipopolysaccharide الموجود في جدار الخلية البكترية والتي قد تؤدي الى زيادة نفاذية الغشاء وبالتالي تثبيط نمو البكتريا (10، 21)، كما ويلاحظ من النتائج المذكورة ان لاكتوفيرين الأغنام يمتلك قدرة تثبيطية أعلى من لاكتوفيرين الأبقار وقد يعود هذا إلى ان لاكتوفيرين الأغنام يحتوي على نسبة تشبع من الحديد اقل من لاكتوفيرين الأبقار، مما يكسب لاكتوفيرين الأغنام قدرة أعلى في تثبيطه لعزلات البكتريا المستخدمة في الدراسة بسبب سحب كمية اكبر من الحديد المتوافر في البيئة والضروري في نموها، وهذا يتفق مع (22) اذ ان دور بروتين اللاكتوفيرين في سحب ايونات الحديد ومنع الإحياء المجهرية من الاستفادة من الحديد وبالتالي تثبيطها ومنع نموها، كما ان لبروتين اللاكتوفيرين دور أخر في قدرته التثبيطية تجاه البكتريا وتعود الى ارتباط اللاكتوفيرين مع سطح الخلية البكتيرية كما انه يعمل على تحطيم الغشاء الخارجي للبكتريا (23)، وكانت النتائج متفقة مع (24) اذ بين ان اللاكتوفيرين المتحلل ذو فعالية تثبيطية أعلى بكثير من فعالية بروتين اللاكتوفيرين الكامل ضد البكتريا، كما واشار الى ان بروتين اللاكتوفيرين الكامل والمتحلل لهما قدرة على تدمير الغشاء الخارجي للبكتريا السالبة لصبغة گرام ولكن ببتيدة اللاكتوفيرسين الناتجة اثر تحلل بروتين اللاكتوفيرين ذو فعالية تثبيطية أعلى من اللاكتوفيرين الكامل، وذلك لان هذه الببتيدة يمكن ان تتخلل الغشاء الخارجي للبكتريا وتصل الى الغشاء الداخلي وتحطمه وبالتالي تقتل الخلية البكتيرية وذلك لصغر وزنه الجزيئي، في حين ان بروتين اللاكتوفيرين الكامل تكون قدرته على تحطيم الغشاء الخارجي فقط للبكتريا لكون وزنه الجزيئي عالي مقارنة مع ببتيدة اللاكتوفيرسين (23، 25).



شكل (1): العلاقة بين تركيزبروتين لاكتوفيرين الأبقار المتحلل وقطر منطقة التثبيط للعزلات البكترية.



شكل (2): العلاقة بين تركيز لاكتوفيرين الأبقار الكامل وقطر منطقة التثبيط للعزلات البكترية.

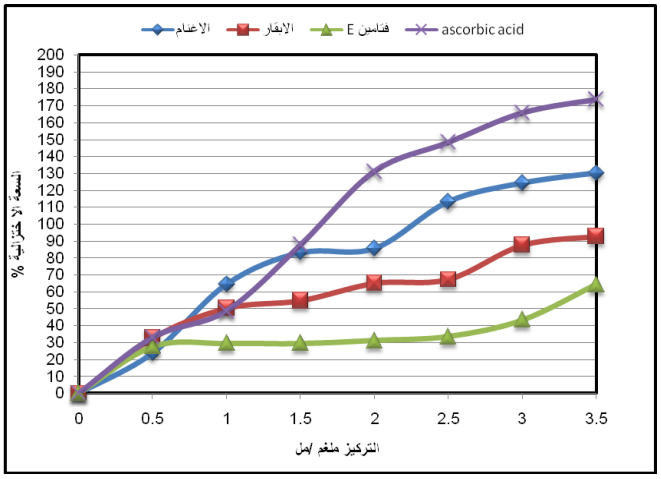


شكل (3): العلاقة بين تركيز بروتين لاكتوفيرين الأغنام الكامل وقطر منطقة التثبيط للعزلات البكترية.

اختبار الفعل المضاد للأكسدة لبروتين اللاكتوفيرين:

أ- **قياس قوة الاختزال:** يوضح الشكل (4) سعة القوة الاختزالية معبرا عنها بالمعادلة الرياضية للمحلول البروتيني لكل من لاكتوفيرين الأبقار والأغنام المحضر بتراكيز 0.5-3.5 ملغم/مل مقارنة مع مضاد الأكسدة الطبيعي α-Tocopherol و Ascorbic acid والتي قيست الامتصاصية على طول موجي 700 نانوميتر، إذ يلاحظ من الشكل أن القوة الاختزالية لمحلول لاكتوفيرين الأغنام كان أعلى من القوة الاختزالية لمحلول لاكتوفيرين الأبقار ومضاد الأكسدة الطبيعي α-Tocopherol إذ بلغت 130.08% و92.58% و62.28%

عند تركيز 3.5 ملغم/مل على التوالي، في حين أمتلك مضاد الأكسدة الطبيعي Ascorbic acid أعلى سعة اختزالية اذ بلغت 173.74% عند تركيز 3.5 ملغم/مل أيضا، كما وبينت النتائج حصول زيادة في السعة الاختزالية مع زيادة التركيز ولجميع المعاملات، وتقاربت النتائج مع (26) عند أجراءهم مقارنة بين بروتينات الشرش والكازين ومقارنته مع قوة الاختزال لمضاد الأكسدة الطبيعي Ascorbic acid و α-Tocopherol وبتراكيز تراوحت بين 2–20 ملغم/مل، اذ ذكروا أن القوة الاختزالية لبروتينات الشرش كانت أعلى من الكازين كما وان القوة الاختزالية تزداد بزيادة التركيز (27).



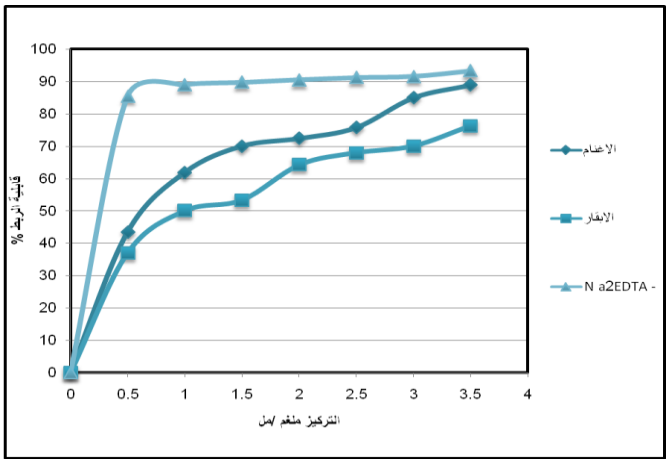
شكل (4): السعة الاختزالية لمحلول بروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام

ب- قياس الفعالية المضادة للأكسدة: يوضح الجدول (1) الفعالية المضادة للأكسدة للاكتوفيرين الأبقار والأغنام في تثبيط أكسدة الحامض ألدهني اللينوليك، اذ قدرت الفعالية المضادة للأكسدة في كلا النموذجين اعتمادا على العلاقة البيانية بين الامتصاصية والتركيز بتطبيق المعادلة الرياضية ومقارنتها مع مضاد الأكسدة الصناعي BHT ومضاد الأكسدة الطبيعي α–Tocopherol وباستعمال تراكيز مختلفة، اذ أظهرت النتائج امتلاك لاكتوفيرين الأغنام فعالية مضاد للأكسدة أعلى من لاكتوفيرين الأبقار ومضاد الأكسدة الطبيعي α–Tocopherol عند تركيز 3.5 ملغم/مل أذ بلغت 89.24%، 73.64% و81.10% على التوالي. كما يلاحظ من جدول الفعالية المضادة للأكسدة لكلا النموذجين أقل من فعالية مضاد الأكسدة الصناعي BHTوالذي بلغت فعاليته95.54% عند التركيز نفسه، وقد تعزى هذه الزيادة الى قابلية البروتين على منح الهيدروجين وقابليته على اقتناص الجذور الحرة وربط ايون الحديد هذا وكما تعتمد الفعالية المضادة على عدد وموقع مجاميع الهيدروكسيل في جزيئة البروتين (28).

جدول (1): الفعالية المضادة للأكسدة لبروتين اللاكتوفيرين في نظام إعاقة أكسدة الحامض ألدهني اللينوليك

العينة	نسبة التثبيط IP
لاكتوفيرين الأغنام	89.24
لاكتوفيرين الأبقار	73.64
α-Tocopherol	81.10
BHT	95.54

ج- قابليـة ربـط أيـون الحديـد: يبـين الشـكل (5) النسـبة المئويـة لـربط ايـون الحديـدوز للاكتـوفيرين الأبقـار والأغنـام ومقارنتهمـا مـع EDTA-2Na، اذ تفـوق لاكتـوفيرين الأغنـام علـى لاكتـوفيرين الأبقـار بقابليتـه علـى ربـط ايـون الحديـدوز أذ بلغـت نسـبة الـربط 88.89%، بينمـا كـان لاكتـوفيرين الأبقـار 76.34% عنـد التركيـز 3.5 ملغـم/مـل، كمـا ويتضـح مـن النتـائج أن نسـبة الـربط لايـون الحديـد فـي لاكتـوفيرين الأغنـام كانـت مقاربـة لمركـب المقارنـة EDTA-2Na الـذي أمتلـك نسـبة ربـط عاليـة بلغـت 93.28% عنـد التركيـز نفسـه، كمـا وشـهدت قابليـة الـربط زيـادة واضـحة مـع زيـادة التراكيـز ولجميـع المعـاملات، وأن تبـاين قابليـة الـربط فـي لاكتـوفيرين الأبقـار والأغنـام قـد يعـزى إلـى درجـة تشـبع الحديـد وكـذلك إلـى تركيـز بـروتين اللاكتـوفيرين (28)، وجـاءت هـذه النتـائج متفقـه مـع (26) عنـد إجـراءهم مقارنـة بـين بروتينـات الشـرش والكـازين للبـأ ومقارنتـه مـع EDTA-2Na، اذ وجـدوا أن بروتينـات الشـرش تمتلـك قابليـة ربـط لأيـون الحديـدوز أعلـى مـن الكـازين وهـذا قـد يعـزى الـى أن بروتينـات الشـرش ولاسـيما بـروتين اللاكتـوفيرين لـه القابليـة علـى ربـط المعـادن لاسـيما Zn^{2+},Cr^{3+},Cu^{2+},Co^{3+} أذ يمتلـك نسبة ربط مقدارها حوالي 90%.

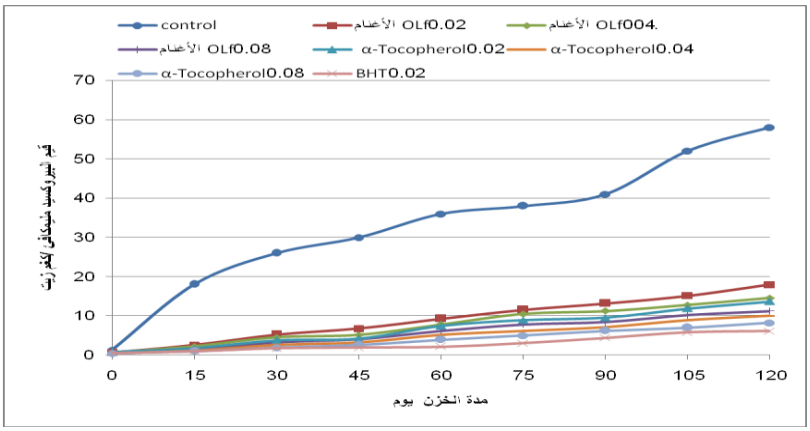


شكل (5) قابلية محلول بروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام لربط ايون الحديدوز ومقارنه مع EDTA-2Na.

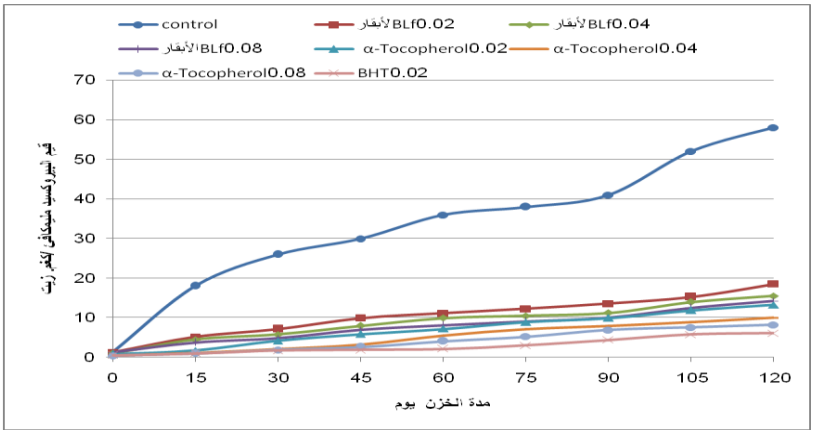
تأثير اللاكتوفيرين التثبيطي لإعاقة أكسدة الزيوت:

1-تـــأثير اللاكتـــوفيرين التثبيطـــي لإعاقـــة أكســـدة زيـــت الزيتـــون: أستعمل زيت الزيتون المكرر والخالي من إي إضافة لمعرفة الفعالية التثبيطية لأكسدة بروتين لاكتوفيرين الأبقار والأغنام والمضاف له بتراكيز 0.02–0.08 ملغم/غم زيت الزيتون والخزن بدرجة حرارة 45م، اذ توضح الاشكال (6 و7) أن كلا النموذجين أظهر فعالية تثبيطية واضحة لإعاقة أكسدة زيت الزيتون بالمقارنة مع العينة الضابطة، أذ دلت النتائج أن لاكتوفيرين الأغنام عند تركيز 0.08ملغم/غم أبدى فعالية تثبيطية عالية لإخماد أكسدة الزيت إذ بلغت قيمة رقم البيروكسيد له 10.10 مليمكافئ/كغم زيت بعد مرور 120 يوما من الخزن وهي مقاربة لمضاد الأكسدة الطبيعي α– Tocopherol والذي بلغت قيمة البيروكسيد له 9.95 مليمكافئ/كغم زيت في ظروف الخزن نفسها، في حين أمتلك لاكتوفيرين الأبقار فعالية تثبيطية منخفضة إذ بلغت قيمة رقم البيروكسيد له 14.25عند تركيز 0.08 ملغم/غم بعد مرور 120 يوما من الخزن، وكما هو متوقع فقد تفوق مضاد الأكسدة الصناعي على بقية النماذج بفعاليته التثبيطية لإعاقة أكسدة الزيت إذ بلغت قيمة رقم البيروكسيد له 6.10مليمكافئ/كغم زيت بعد نهاية مدة الخزن، اذ يلاحظ زيادة الفعالية التثبيطية مع زيادة التراكيز ولجميع المعاملات، كما وتشير النتائج الى الزيادة في قيم رقم البيروكسيد بتقدم مدة الخزن اذ ازدادت قيمة رقم البيروكسيد من 1.25 لبروتين لاكتوفيرين الأغنام عند تركيز 0.04مليمكافئ/كغم زيت في بداية الخزن الى 9.84مليمكافئ/كغم زيت بعد مرور 90 يوما واستمرت بالارتفاع تدريجيا لتصل الى 11.75مليمكافئ/كغم زيت بعد مرور120 يوما، وأن عدم حصول تطور كبير في قيم رقم البيروكسيد يدل على الفعالية التثبيطية العالية لهذا البروتين بالمقارنة مع العينة الضابطة التي شهدت ارتفاعا واضحا في قيم البيروكسيد إذ بلغت 34.55مليمكافئ/كغم زيت بعد مرور30 يوما من مدة الخزن، وجاءت هذه النتائج متفقه مع (29) عند دراستهم للفعالية المضادة للأكسدة لبروتين اللاكتوفيرين مع زيت فول الصويا soy oil وبالمقارنة مع مضاد الأكسدة الطبيعي α–Tocopherol اذ وجدوا أن اللاكتوفيرين ومن مصادر مختلفة أمتلك قدرة على إعاقة أكسدة زيت فول الصويا ولكن بنسب مختلفة إذ كان تأثيره

مماثل الى مضاد الأكسدة الطبيعي α–Tocopherol وقد يعود تباين فعالية اللاكتوفيرين إلى مصدره و نسبة تشبعه وتركيزه اذ ان ذلك يؤثر على ربط الحديد وكلما كانت نسبة التشبع قليلة كانت الفعالية التثبيطية للأكسدة أعلى وينتج عنه خفض قيمة رقم البيروكسيد بوساطة تحويل H_2O_2 الى OH عن طريق ربط الحديد (30).



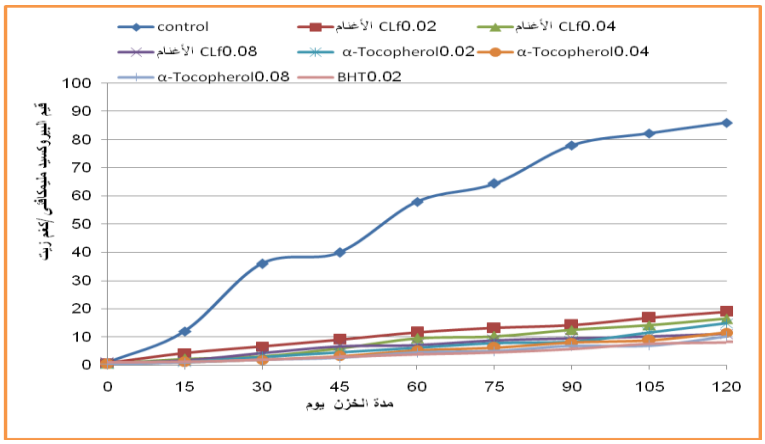
شكل (6): التأثير التثبيطي لبروتين لاكتوفيرين الأغنام لإعاقة أكسدة زيت الزيتون ولمدد خزنية مختلفة على درجة حرارة الحضن 45م.



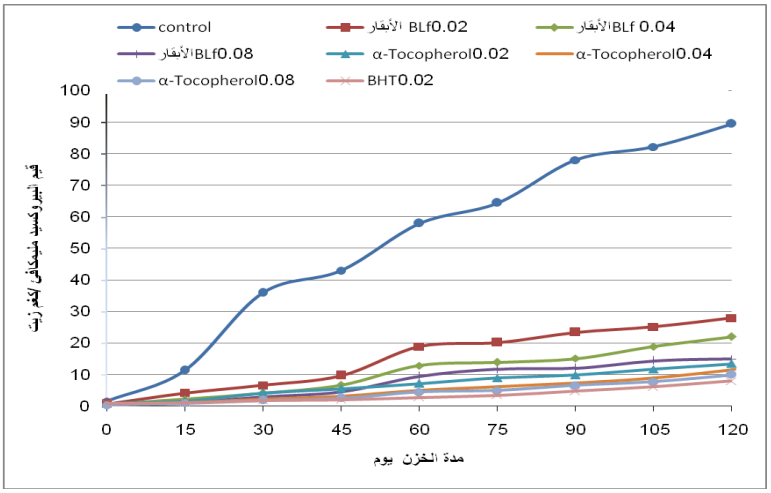
شكل (7): التأثير التثبيطي لبروتين لاكتوفيرين الأبقار لإعاقة أكسدة زيت الزيتون ولمدد خزنية مختلفة على درجة حرارة الحضن45م.

2- التأثير التثبيطي لإعاقة أكسدة زيت السمك: توضح الإشكال (8 و9) التأثير التثبيطي للاكتوفيرين الأغنام والأبقار لإعاقة أكسدة زيت الصبور والمضافة بتراكيز 0.02- 0.08ملغم/غم زيت على التوالي والمخزن لفترات

15،0، 30، 45، 60، 75، 90، 105، 120 يوما وعلى درجة حرارة 5±45م وبالمقارنة مع مضاد الأكسدة الطبيعي α–Tocopherol المحضر بالتراكيز نفسها ومضاد الأكسدة الصناعي BHT المحضر بتركيز 0.02غم/غم والعينة الضابطة، اذ أن كلا النموذجين أظهرا فعالية تثبيطية واضحة لإعاقة أكسدة زيت الصبور بالمقارنة مع العينة الضابطة، أذ دلت النتائج أن لاكتوفيرين الأغنام عند تركيز 0.08ملغم/غم أبدى فعالية تثبيطية عالية لإخماد أكسدة الزيت إذ بلغت قيمة رقم البيروكسيد له 12.35 مليمكافئ/كغم زيت بعد مرور 120يوما من الخزن وهي مقاربة لمضاد الأكسدة الطبيعي α–Tocopherol والذي بلغت قيمة البيروكسيد له 10.75مليمكافئ/كغم زيت في نفس ظروف الخزن، في حين أمتلك لاكتوفيرين الأبقار فعالية تثبيطية منخفضة إذ بلغت قيمة رقم البيروكسيد له 17.55 عند تركيز 0.08 ملغم /غم بعد مرور 120 يوما من الخزن، وكما هو متوقع فقد تفوق مضاد الأكسدة الصناعي BHT على بقية النماذج إذ أعطى أعلى فعالية تثبيطية لخفض مستويات البيروكسيد المتكونة بتقدم مدة الخزن، إذ بلغت قيمة رقم البيروكسيد له 8.15 مليمكافئ/كغم زيت بعد نهاية مدة الخزن، كما يلاحظ زيادة الفعالية التثبيطية مع زيادة التراكيز ولجميع المعاملات اذ يتضح من خلال النتائج ارتفاع قيم رقم البيروكسيد لنماذج زيت السمك عن نماذج زيت الزيتون، مما يدل على حدوث عملية الأكسدة الذاتية في زيت السمك والذي يعزى سببه إلى احتواء زيت السمك على نسبة كبيرة من الأحماض الدهنية غير المشبعة بدرجة عالية وذات 3–6 أواصر مزدوجة اذ تتراوح نسبتها 79–83% ومن هذه الأحماض: Docosahexaenoic acid و Eicosapentaenoic acid و Docosapentaenoic acid (31) أما زيت الزيتون فأنه مصدر طبيعي لمضادات الأكسدة والذي يحتوي في تركيبه على مركبات فينولية وتوكوفيرول والأحماض الدهنية أحادية عدم التشبع والتي تكون نسبتها حوالي 55–83%، كما ويحتوي على الفوسفولبيدات Phospholipids التي يكون ضمن تركيبها مجموعة امينية تساعد هذه المجموعة على ربط المعادن أذ تعمل على زيادة الفعالية المضادة للأكسدة،(32، 33).



شكل (8): التأثير التثبيطي لبروتين لاكتوفيرين الأغنام لإعاقة أكسدة زيت الصبور ولمدد خزنية مختلفة على درجة حرارة الحضن 45م.



شكل (9): التأثير التثبيطي للاكتوفيرين الأبقار لإعاقة أكسدة زيت سمك الصبور ولمدد خزنية مختلفة على درجة حرارة الحضن 45م.

المصادر

1- **Namiki, M. (1990).** Antioxidants and ant mutagens in food. ***Crit. Rev Food Sci. Nutr.***, 29(4): 273-300.

2- **Jenssen, H. and Hancock, R. E. (2009).** Antimicrobial properties of lactoferrin. ***Biochimie,*** 91: 19-29.

3- **Kim, J.; Ko, Y.; Park, Y.; Kim, N.; Ha, W. and Cho, Y. (2010).** Dietary effect to lactoferrin-enriched fermented milk on skin surface lipid and clinical improvement of acne vulgarism. ***Nutrition,*** 26: 902-909.

4- Tomita, M.; Bellamy, W.; Takasem, M.; Yamauchi, Wakabayashi, H. and Kawase, K. (1991). Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. ***Journal of Dairy Science,*** 74:4137- 4142.

5- Gifford, J. L.; Hunter, H. N. and Vogel, H. J. (2005). Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. ***Cellular and Molecular Life Sciences,*** 62(22):2588-2589.

6- Flores-Villasenor, He.; Canizalez-Roman, A. and Reyes-Lopez, M. (2010). Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFcin, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. ***Biometals,*** 23:569–578.

7- Ellison, R. T.; Giehl, T. J. and LaForce. F. M. (1988). Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. ***Infection and Immunity,*** 56(11):2774-2781.

8- Tursi, A.; Elisei, W.; Brandimarte, G.; Giorgetti, G.M.; Modeo, M. E. and Aiello, F. (2007). Effect of lactoferrin supplementation on the effectiveness and tolerability of a 7-day quadruple therapy after failure of a first attempt to cure *Helicobacter pylori* infection***. Medicine of Sciences Monitor,***13: 187-190.

9- Wu, H. F.; Monroe, D. M. and Church, F.C. (1995). Characterization of the glycosamino glycan-binding region of lactoferrin***. Arch Biochem Biophys,*** 317:85–92.

10- Roseanu, A.; Florian, P.; Condei, M.; Cristea, D. and Damian,M. (2010). Antibacterial activity of lactoferrin and lactoferricin against oral *Streptococci,* ***Romanian Biotechnological Letters***, 15(6): 5788-5792.

11- Huang, S. W.; Satuė-Gracia, M. T.; Frankel, E. N. and German, D. (1999). Effect of lactoferrin on antioxidive stability of corn oil emulsions and liposomes. ***J. Agric. Food Chem.,*** 47(4):1356-1361.

12- Satue-Gracia, M. T.; Frankel, E. N.; Rangavajhyala, N. and German, J. B. (2000). Lactoferrin in infant formulas:effect onoxidation. ***J. Agric. Food Chem.,*** 48: 4984-4990.

13- Law, B.A. and Reiter, B. (1977). The isolation and bacteriostatic properties of lactoferrin from bovine milk whey***. J. Dairy Res.***, 44:595-599.

14- Czirok, E.; Milch, H.; Nemeth, K. and Gado, I. (1990). In vitro and in vivo (LD50) effects of human lactoferrin on bacteria. ***Acta. Microbiological Hungarian,***37(1):55-71.

15- Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. ***Japanese Journal of Nutrition,*** 44: 307–315.

16- Osawa, T. and Namiki, M. (1981). A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves***. Agric. Bio. Chem.,*** 45:735-739.

17- Decker, E. A. and Welch, B.(1990). Role of furring as lipid oxidation catalyst in muscle food***. J. Agric. Food Chem.,*** 38:674-677.

18- Bligh, E. G. and Dyer ,W. J. (1959).A rapid method of total lipid extraction and purification. ***Canadian Journal of Biochemistry and Physiology,*** 37(52):911-917.

19- Scott, G. (1965). Atmospheric oxidation and antioxidant. Elsevier publishing**.** New York**.**

20- A.O.A.C. (1980).(Association of Official Analytical Chemists) .official methods of analysis, 13thed., Washington, D. C.

21- Havard, J. and Hancock, R. E. W. (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. ***Biochimie,*** 91,19-29.

22- Farnaud, S. and Evans, R.W. (2003). Lactoferrin- a multifunctional protein with antimicrobial properties. ***Mol. Immunol.,*** 40:395-405.

23- Asfour, A. E.; Yassin, M. H.; and Gomaa, A.M. (2010). Anti-bacterial activity of bovine milk lactoferrin against causative pathogens with special regard to Mycoplasma. ***International Journal of Microbiological Research***, 1(3): 97-109.

24- Bellamy, W.; Wakabayashi, H.; Takase, M.; Kawase, K.; Shimamura, S. and Tomita, M. (1993). Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. ***Medical Microbiology and Immunology, (Berl.)***, 182(2):97-105.

25- Umuhumuza, L.C.; Wei-Min, W. and Sun, X. (2011). Effect of bovine lactoferrin and casein peptide powder on microbial growth and glucose utilization by microorganisms in pork meat during storage at 4℃ **.*Pakistan Journal of Nutrition,*** 10(3): 208-213.

26- Chiang, S. H. and Chang, C. Y. (2005). Antioxidant properties of caseins and whey proteins from colostrums. ***Journal of Food and Drug Analysis***, 13(1):57-63.

27- Perenlei, G, Tee1, T. W.; Yusof., N. A. and Kheng. J. G. (2011). Voltammetric detection of potassium ferricyanide mediated by multi-walled carbon nanotube/titanium dioxide composite modified glassy carbon electrode. ***International Journal of Electrochemical Science***, 6**:** 520 – 531.

28- Pihlanto, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. ***International Dairy Journal,*** 16:1306-1314.

29- Steijns, J. M. and Van Hooijdonk, A.C. (2000). Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. ***British Journal of Nutrition,*** 84(1):11-17.

30- Madureira, A. R.; Claudia, I.; Pereira, A.; Gomes, M.P.; Manuela E.; Pintado, F. and Malcata, X. (2007). Bovine whey proteins-overview on their main biological properties. ***Food Research International,*** 40:1197–1211.

31- Lesmes, U.; Sandra, S.; Decker, E.A. and Clements, D. J. (2010). Impact of surface deposition of lactoferrin on physical and chemical stability of omega-3 rich lipid droplets stabilized by caseinate. ***Food Chem.,*** 123: 99-106.

32- Velasco, J. and Dobarganes, C. (2002). Oxidative stability of virgin olive oil. ***European Journal of Lipid Science and Technology,*** 104:661–676.

33- Martinez-Gonzalez, M.G. and Sanchez-Villegas, A. (2004). Review: The emerging role of mediterranean diets in cardiovascular epidemiology monounsaturated fats, olive oil, red wine or the whole pattern. ***European Journal of Epidemiology,*** 19(1):9–13.

Antimicrobial and antioxidant study of purify lactoferrin from bovine and ovine colostrums

Ali khudhair AL-Rikabi
Department of Food Science / College of Agriculture - University of Basrah

Raghad Akram
Department of Science College of Education - University of Mustansiria

Raghad Raheem Ali Al-Hatim
Department of Food Science
College of Agriculture
University of Basrah

Abstract

In this study,purify lactoferrin from bovine and ovine colostrums was known its ability as antimicrobial agent against some microorganisms and how its effect as antioxidant agents. The results were referred to the complete lactoferrin form bovine and ovine, also hydrolysis lactoferrin form bovine were showed ability as antimicrobial agent against some microorganisms like: *Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. The specific study of lactoferrin effect as antioxidant agents were referred to the reducing force for lactoferrin was increase by upper concentration, the reducing capacity for ovine lactoferrin was 130.08% that it near to natural antioxidant (Ascorbic acid) and its upper from bovine lactoferrin that its 92.58%, the anti oxidant activity was different according to its sources and protein structure. So, ovine lactoferrin was give a good results to prevent linoleic acid oxidation 89.24% that it near to industrial antioxidant (BHT), but the percent of bovine lactoferrin as the antioxidant activity was 73.64%, the binding ability to ferrous ion for both of bovine and ovine lactoferrin were increased with the upper concentrate, ovine lactoferrin was give a good results 88.89% that it near to control EDTA, while the binding ability to bovine lactoferrin was 76.34%, the results of added bovine and ovine lactoferrin in 0.02, 0.04 and 0.08% to olive and fish (*Tenualosa ilisha*) oil that storage at 45^{o}C for 120 days refer to the concentration 0. 08% showed highest antioxidant activity than the other concentrations, the peroxide value was decreased with increase concentrations.