بررسی قدرت ضدباکتری پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین کنجاله دانه کدو (*Cucurbita pepo*)

الهام نورمحمدی[1*]، علیرضا صادقی ماهونک[2]، دینا شهرام‌پور[3]، مرتضی خمیری[2]

۱. دانش آموخته دکترای علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۲. دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۳. دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

*** نویسنده مسئول:** *elham_2191@yahoo.com*

تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۰۱/۳۱ تاریخ پذیرش : ۱۳۹۶/۰۴/۰۱

چکیده

در این پژوهش اثر پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین کنجاله دانه کدو به عنوان ترکیبات ضدمیکروب طبیعی مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور پروتئین کنجاله دانه کدو[1] توسط سه آنزیم پپسین، تریپسین و آلکالاز هیدرولیز شد. تیمارهای بهینه از نظر قدرت مهار رادیکال DPPH انتخاب و قدرت ضدمیکروبی عصاره تام و رقیق شده (۱/۲، ۱/۴، ۱/۸ و ۱/۱۶) تیمارها بر علیه *اشرشیا، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و لیستریا مونوسایتوژنز* با روش میکرودایلوشن ارزیابی گردید. سپس پپتیدهای تهیه شده توسط ۱٪ پپسین، ۳۰ درجه سانتیگراد و ۲ ساعت هیدرولیز (P_{3012})، ۱٪ پپسین، ۳۵ درجه سانتیگراد و ۳/۵ ساعت هیدرولیز (P_{35135})، ۱٪ آلکالاز، ۵۰ درجه سانتیگراد و ۳/۵ ساعت هیدرولیز (A_{50135})، ۲٪ آلکالاز، ۵۰ درجه سانتیگراد و ۳/۵ ساعت هیدرولیز (A_{50235})، ۱٪ تریپسین، ۳۵ درجه سانتیگراد و ۵ ساعت هیدرولیز (T_{3551}) و ۱٪ تریپسین، ۴۵ درجه سانتیگراد و ۵ ساعت هیدرولیز (T_{4551}) به عنوان نمونه‌های ضداکسایش بهینه انتخاب شدند. عصاره تام نمونه‌های P_{3012}، T_{4551} و A_{50135} دارای قدرت بازدارندگی مناسبی بر علیه باکتری‌های مورد بررسی بودند و عصاره تام نمونه T_{3551} اثر بازدارندگی بر هیچکدام از باکتری‌ها نشان نداد. حداقل غلظت مهارکنندگی P_{35135} بر علیه *باسیلوس* ۱/۲، *اشرشیا* ۱/۸ و *لیستریا* ۱/۱۶و همین ویژگی در A_{50235} بر علیه *استافیلوکوکوس* و *باسیلوس* ۱/۴ و برای *لیستریا* ۱/۸ بود. با توجه به نتایج از تکنیک هیدرولیز آنزیمی می‌توان به عنوان روشی مؤثر در تولید ترکیبات ضداکسایش و ضدمیکروب طبیعی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: هیدرولیز آنزیمی، ضداکسایش، ضدباکتری، کنجاله دانه کدو.

1 . *Cucurbita pepo*

مقدمه

در حال حاضر استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک‌ها منجر به افزایش مقاومت در بسیاری از گونه‌های باکتریائی شده است و انواع گرم مثبت و گرم منفی مقاوم به آنتی بیوتیک به یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد عفونت-های باکتریایی تبدیل شده‌اند. افزایش بیماری و مرگ و میر ناشی از عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک بسیاری از محققان را بر آن داشته است تا تلاش‌های خود را پیرامون یافتن انواعی از آنتی بیوتیک‌های طبیعی متمرکز نمایند (Cheng et al., 2013). یکی از ویژگی‌های پپتیدهای زیست فعال تولید شده در جریان هیدرولیز، تخمیر یا فرایند هضم اثرات ضد باکتری آنها می‌باشد (Haney and Hancock, 2013). پپتیدهای ضد میکروبی اثر گسترده‌ای را بر میکروارگانیزم‌های مختلف شامل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، قارچ‌ها و ویروس‌ها دارند. یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد این پپتیدها اثر ضدمیکروبی آنها بر باکتری‌های مقاوم در برابر انواع داروها و گرایش اندک این ترکیبات برای افزایش مقاومت باکتری‌ها می‌باشد. مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌ها ممکن است به طرق مختلف مانند ممانعت از تشکیل برهم کنش میان دارو و سلول هدف، تغییر در نقاط دریافت کننده دارو در سلول هدف و جدا شدن دارو از سلول هدف اتفاق بیفتد. علاوه بر این میکروارگانیزم‌ها قادرند الگوی ژنتیکی خود را در پاسخ به شرایط محیطی تغییر دهند (Seo et al., 2012). فعالیت ضدمیکروبی پپتیدهای زیست فعال به علت نحوه عملکرد برجسته این ترکیبات است. بیشتر این ترکیبات دارای ساختار آمفی‌پاتیک بوده و مستقیما بر روی غشاء سلولی اثر میگذارند (Taha et al., 2013). تاکنون بیشتر پپتیدهای ضدمیکروب از شیر و مشتقات آن جداسازی و مورد مطالعه قرار گرفته اند. محققان نشان دادند پپتیدهای زیست فعال تولید شده از هیدرولیز آنزیمی کازئین واجد خاصیت ضد میکروبی بر علیه *استافیلوکوکوس*[1]، *باسیلوس*[2]، *دیپلوکوکوس*[3]، *استرپتوکوکوس*[4] و *اشرشیا*[5] می‌باشند (Silva and Malcata, 2005). همین طور پپتیدهای زیست فعال تولید شده از هیدرولیز آنزیمی لاکتوفرین توسط پپسین همزمان دارای اثر ضد میکروبی بر علیه باکتری‌های مضر و اثر تقویت کننده بر میکروفلور طبیعی روده به جز *بایفیدوباکتریوم*[6] بودند (Haney and Hancock, 2013). در مطالعه‌ای پیرامون هیدرولیز کازئین شیر بوفالو توسط پپسین، پپتیدهایی با قدرت ممانعت کنندگی از فعالیت *میکروکوکوس لوتئوس*[7]، *اشریشیا* و *باسیلوس سرئوس*[8] جداسازی شدند. در یک آزمون حیوانی اثر ضد میکروبی اس-تاناتین[9] (یک پپتید سنتزی با توالی آمینواسیدی آلانین-متیونین-پرولاین) مورد بررسی قرار گرفت. پس از آلوده سازی حیوان با ۲×۱۰^{۱۰} CFU[10] از *اشریشیا*، اس-تاناتین به مقدار ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تزریق شد. نتایج نشان داد که اس-تاناتین قادر به اتصال موفق به لیپوپلی-ساکاریدها و کاهش تعداد میکروارگانیزم‌ها بوده است (Wu et al., 2010). پروتئین هیدرولیز شده کلزا (Agyei and Danquah, 2012)، ایزوله پروتئین آفتابگردان، آلفالاکتالبومین، بتالاکتوگلوبولین و هیدرولیز شده پروتئین آب پنیر (Taha et al., 2013)، لیزوزیم

1. *Staphylococcus*
2. *Bacillus*
3. *Diplococcus*
4. *Streptococcus*
5. *Escherichia*
6. *Bifidobacterium*
7. *Micrococcus luteus*
8. *Bacillus cereus*
9. S-thanatin
10. Colony Forming Unit

(Agyei and Danquah, 2012) و صدف اقیانوس آرام (Salampessy et al., 2010) سایر منابعی هستند که اثر ضد میکروبی آنها به اثبات رسیده است. کدو یکی از گیاهانی است که به شکل گسترده‌ای در سرتاسر جهان کشت شده و به عنوان غذا و دارو مورد استفاده قرار می-گیرد. آسیا و اروپا به ترتیب ۶۵ و ۱۳ درصد کدوی جهان را تولید می‌کنند و چین از نظر میزان تولید و عملکرد در واحد سطح مقام اول را داراست. سطح زیرکشت کدو در ایران ۴۵ هزار هکتار، تولید ۶۹۶ هزار تن و متوسط عملکرد ۴۰/۱۵ تن در هکتار است و استان‌های گلستان و آذربایجان غربی بیشترین سطح زیرکشت و تولید را به خود اختصاص داده‌اند. سطح زیرکشت کدوی آجیلی در استان گلستان ۴۳۰ هکتار و در استان آذربایجان غربی ۱۸۰۰۰ هکتار می‌باشد (مردان زاده و همکاران، ۱۳۹۴). آرد چربی‌گیری شده دانه کدو حاوی ۵۵/۴٪ پروتئین، ۲۸/۱٪ فیبر خام و ۷/۲۳٪ خاکستر و ۳٪ چربی است. اسیدهای چرب اصلی دانه کدو لینولئیک (۴۳/۱٪) و اولئیک اسید (۳۷/۸٪) می‌باشند و از هر ۱۰۰ گرم از این ماده ۲/۸۳ مگاژول انرژی تولید می‌شود (Lazos 1986). با توجه به اینکه در حال حاضر تحقیقی پیرامون اثر ضد میکروبی پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز پروتئین دانه کدو انجام نگرفته، این پژوهش به هیدرولیز پروتئین کنجاله دانه کدو با استفاده از سه آنزیم پپسین، تریپسین و آلکالاز و اثر فرایند هیدرولیز بر خواص ضد میکروبی پپتیدهای حاصل پرداخته است.

مواد و روش کار

مواد مورد استفاده در این پژوهش کنجاله دانه کدو (شرکت سویابین گرگان)، آنزیم‌های آلکالاز، پپسین و تریپسین (شرکت مرک آلمان)، محیط کشت مولر هینتون براث (شرکت مرک آلمان) و چهار باکتری *اشریشیا کلی*ATCC:25922، *استافیلوکوکوس اورئوس*[1] ATCC:653، *لیستریا مونوسیتوژنز*[2] ATCC:13932 و *باسیلوس سرئوس* PTCC:1665 (کلکسیون کشت میکروبی انستیتو پاستور) بودند.

تهیه کنسانتره پروتئین دانه کدو

کنجاله دانه کدو چربی‌گیری شده به نسبت ۱:۱۰ در آب پراکنده شد. سپس pH محلول توسط سود ۱ نرمال به ۱۰ رسانده شده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق مخلوط گردید. مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با دور g۵۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در سانتریفوژ یخچال دار (مدل Combi514R، کره جنوبی) قرار گرفت. سپس pH مایع روئی به منظور رسوب پروتئین‌های دانه کدو توسط اسید کلریدریک ۱ نرمال به ۵ رسیده و تحت شرایط مشابه سانتریفوژ شد. رسوب بدست آمده (کنسانتره پروتئین) برای هیدرولیز مورد استفاده قرار گرفت (Živanović et al., 2011).

هیدرولیز کنسانتره پروتئین دانه کدو

به این منظور کنسانتره به نسبت ۵٪ (وزنی/حجمی) در بافر فسفات با pH برابر با ۲ و ۸ برای آنزیم‌های پپسین و تریپسین و بافر تریس-اسیدکلریدریک با pH برابر با ۹ برای آنزیم آلکالاز پراکنده و آنزیم‌ها در غلظت ۱٪ تا ۲٪ افزوده شدند. سپس هیدرولیز در محدوده دمائی ۴۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد برای پپسین، ۵۵-۴۵ درجه سانتی‌گراد برای آلکالاز و ۴۵-۳۵ درجه سانتی‌گراد برای تریپسین و به مدت ۵-۲ ساعت در انکوباتور شیکردار (مدل 8480-VS، کره جنوبی) با دور ۲۰۰ rpm به انجام رسید. در انتها واکنش آنزیمی در ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه متوقف و سانتریفوژ کردن برای حذف ترکیبات

1 .*Staphylococcus aureus*
2 .*Listeria monocytogenes*

اضافه در ۵۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت (Villanueva et al., 1999).

اندازه‌گیری قدرت مهار رادیکال DPPH

نمونه‌های هیدرولیز شده توسط سه آنزیم آلکالاز، پپسین و تریپسین از نظر قدرت مهار رادیکال DPPH مورد بررسی قرار گرفتند. به این منظور ۱۰۰۰ میکرولیتر از پروتئین هیدرولیز شده با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول DPPH (۰/۱ میلی مولار) تهیه شده در اتانول ۹۶٪ مخلوط شد، مخلوط حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری و در نهایت جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد (Bougatef et al., 2009). در نمونه کنترل به جای پروتئین هیدرولیز شده از۱۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد. فعالیت مهارکنندگی رادیکال از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{فعالیت مهارکنندگی رادیکال ٪} = \frac{\text{جذب شاهد} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب شاهد}}$$

بررسی فعالیت ضدباکتریایی پپتیدهای زیست فعال به روش میکرودایلوشن

جهت تعیین خواص ضدباکتریایی پپتیدهای زیست فعال حاصل از کنجاله دانه کدو از روش میکرودایلوشن استفاده شد. بدین منظور پس از تلقیح و فعالسازی هریک از باکتری‌های بیماری‌زای مورد مطالعه در محیط کشت مولر هینتون براث به مدت ۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، سوسپانسیون میکروبی با غلظت CFU/ml 10^4 آماده شد. سپس رقت‌های مختلفی از ماده ضد باکتری (پپتید زیست فعال) با ضریب یک دوم تهیه و با غلظت ثابتی (10^4 CFU /ml) از هر یک از باکتری‌های مورد مطالعه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت در داخل میکرو پلیت ۹۶ خانه‌ای انکوبه گردید. اولین ردیف پلیت به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و تنها حاوی محیط کشت و ترکیب ضدمیکروبی با غلظت مشخص بود. ردیف آخر به عنوان کنترل مثبت تنها حاوی محیط کشت و سوسپانسیون باکتری با غلظت ثابت (10^4 cfu/ml) بود. حجم نهایی هر خانه میکروپلیت ۲۰۰ ماکرولیتر در نظر گرفته شد. پس از گذشت مدت زمان انکوباسیون جذب نوری هریک از خانه‌های میکروپلیت با دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۶۰۰ نانومترتعیین گردید و اولین غلظت از ماده آنتی باکتریال (پپتید زیست فعال) که مانع رشد هریک از باکتری‌ها شده بود و کدورتی کمتر از کدورت کنترل مثبت داشت به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)[1] در نظر گرفته شد. بهینه‌سازی داده‌ها به منظور دستیابی به تیمارهای بهینه از نظر خواص ضداکسایش به روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD[2]) با استفاده از نرم افزارDesign Expert[3] انجام گرفت.

نتایج

قدرت مهار رادیکال DPPH

تیمارهای آزمایشی و قدرت مهار رادیکال DPPH در نمونه‌های تولید شده توسط آنزیم‌های پپسین، تریپسین و آلکالاز به ترتیب در جداول ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است.

1 .Minimum Inhibitory Concentration
2. Central Composite Design
3 .Design Expert, 8.0.7.1 Trial, Stat-Ease Inc.

جدول ۱- قدرت مهار رادیکال DPPH در تیمارهای تهیه شده توسط آنزیم پپسین

تیمار	غلظت آنزیم (٪)	دمای هیدرولیز (درجه سانتی‌گراد)	زمان هیدرولیز (ساعت)	فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (٪)
۱	۲	۳۰	۲	۶۸/۱۱
۲	۱	۳۰	۲	۸۲/۰۷
۳	۲	۳۰	۵	۷۲
۴	۱	۳۰	۵	۷۰/۳۱
۵	۱/۵	۳۰	۳/۵	۵۰/۱۸
۶	۱/۵	۳۵	۳/۵	۶۵/۹
۷	۱/۵	۳۵	۲	۷۰/۳۴
۸	۱/۵	۳۵	۳/۵	۶۵/۱۳
۹	۱/۵	۳۵	۳/۵	۶۸
۱۰	۱	۳۵	۳/۵	۷۹/۲۴
۱۱	۱/۵	۳۵	۳/۵	۶۸/۴۴
۱۲	۱/۵	۳۵	۳/۵	۶۲/۳۹
۱۳	۱/۵	۳۵	۳/۵	۶۷/۸۴
۱۴	۱/۵	۳۵	۵	۶۸/۹۳
۱۵	۲	۳۵	۳/۵	۷۹
۱۶	۱	۴۰	۵	۶۲/۶۷
۱۷	۱/۵	۴۰	۳/۵	۴۳/۵۲
۱۸	۲	۴۰	۲	۶۸/۷۲
۱۹	۱	۴۰	۲	۷۶/۸۳
۲۰	۲	۴۰	۵	۶۵/۳۱

بر اساس نتایج بدست آمده پپتیدهای تهیه شده توسط پپسین در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، غلظت آنزیم ۱٪ و ۲ ساعت هیدرولیز (P_{3012}) و دمای ۳۵ درجه سانتیگراد، غلظت آنزیم ۱٪ و زمان ۳/۵ ساعت (P_{35135}) نسبت به سایر تیمارهای تهیه شده با پپسین دارای قدرت مهار رادیکال بیشتری بودند (نورمحمدی و همکاران، ۱۳۹۴ الف). در میان تیمارهای تهیه شده توسط آلکالاز نمونه-های تولید شده با غلظت ۱٪ آنزیم در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد و ۳/۵ ساعت هیدرولیز (A_{50135}) و تیمار تهیه شده با ۲٪ آنزیم در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد و ۳/۵ ساعت هیدرولیز (A_{50235}) نسبت به سایر نمونه‌ها دارای قدرت مهار رادیکال بیشتری بودند (نورمحمدی و همکاران، ۱۳۹۴ ب). در نهایت نمونه تهیه شده با غلظت ۱٪ آنزیم، دمای ۳۵ درجه سانتیگراد و زمان هیدرولیز ۵ ساعت (T_{3551}) و نمونه تولید شده توسط ۱٪ آنزیم، دمای ۴۵ درجه سانتیگراد و زمان ۵ ساعت (T_{4551}) به عنوان نمونه‌های ضداکسایش بهینه تهیه شده با آنزیم تریپسین انتخاب شده (نورمحمدی و همکاران، ۱۳۹۴ ج) و از لحاظ خواص ضد میکروبی مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی قدرت ضد میکروبی پپتیدهای تهیه شده با آنزیم‌های پپسین، تریپسین و آلکالاز

حداقل غلظت مهارکنندگی پپتیدهای زیست فعال تولید شده توسط آنزیم‌های پپسین، تریپسین و آلکالاز علیه باکتری‌های بیماریزای *اشریشیا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسایتوژنز* و *باسیلوس سرئوس* در جدول ۴ نشان داده شده است. بر اساس نتایج، پروتئین دست نخورده کدو اثر بازدارندگی بر هیچ‌کدام از باکتری‌ها نداشت، در حالی‌که عصاره تام نمونه P_{3012} دارای قدرت

بازدارندگی بر تمامی باکتری‌های مورد بررسی بود. عصاره تام نمونه T_{4551} دارای اثر بازدارندگی بر *اشریشیا* ، *لیستریا مونوسایتوژنز* و *باسیلوس سرئوس* بود. عصاره تام نمونه A_{50135} تنها اثر بازدارندگی بر *اشریشیا* و *لیستریا مونوسایتوژنز* داشت و عصاره تام نمونه T_{3551} اثر بازدارندگی بر هیچ باکتری نشان نداد. حداقل غلظت مهارکنندگی در نمونه P_{35135} بر علیه *باسیلوس سرئوس* ۱/۲، *اشریشیا* ۱/۸ و *لیستریا مونوسایتوژنز* ۱/۱۶ بود و این نمونه اثر بازدارنده بر *استافیلوکوکوس اورئوس* نداشت. در مورد نمونه A_{50235} حداقل غلظت مهارکنندگی برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* ۱/۴ و برای *لیستریا مونوسایتوژنز* ۱/۸ بود. این تیمار اثر بازدارندگی بر *اشریشیا* نشان نداد. از لحاظ کمی پپتیدها فعالیت متفاوتی را نشان دادند به طوریکه کمترین غلظت مهارکنندگی برای باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* توسط پپتیدهای نمونه P_{35135} به دست آمد و باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* بیشترین مقاومت را در برابر پپتیدهای زیست فعال استخراجی کدو نشان داد.

جدول ۲- قدرت مهار رادیکال DPPH در تیمارهای تهیه شده توسط آنزیم تریپسین

تیمار	غلظت آنزیم (٪)	دمای هیدرولیز (درجه سانتی‌گراد)	زمان هیدرولیز (ساعت)	فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (٪)
۱	۱	۳۵	۵	۷۸
۲	۲	۳۵	۲	۳۸/۰۳
۳	۲	۳۵	۵	۶۱/۲۴
۴	۱/۵	۳۵	۳/۵	۶۲/۴۷
۵	۱	۳۵	۲	۵۶/۷۷
۶	۱/۵	۴۰	۳/۵	۴۸/۹۱
۷	۱/۵	۴۰	۳/۵	۵۰/۱۱
۸	۱/۵	۴۰	۳/۵	۵۴/۸۳
۹	۱/۵	۴۰	۳/۵	۵۰
۱۰	۱/۵	۴۰	۳/۵	۴۷/۹۳
۱۱	۱/۵	۴۰	۳/۵	۴۹/۴۷
۱۲	۱	۴۰	۳/۵	۶۵/۲۹
۱۳	۱/۵	۴۰	۵	۵۶/۳۳
۱۴	۱/۵	۴۰	۲	۴۴/۹۳
۱۵	۲	۴۰	۳/۵	۴۴/۳۷
۱۶	۱	۴۵	۲	۴۸/۳۴
۱۷	۲	۴۵	۲	۲۹/۶۴
۱۸	۱	۴۵	۵	۷۲/۵۱
۱۹	۲	۴۵	۵	۴۳/۲۹
۲۰	۱/۵	۴۵	۳/۵	۴۳/۱۹

جدول ۳- قدرت مهار رادیکال DPPH در تیمارهای تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز

تیمار	غلظت آنزیم (٪)	دمای هیدرولیز (درجه سانتی‌گراد)	زمان هیدرولیز (ساعت)	فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (٪)
۱	۱	۴۵	۵	۴۸/۰۵
۲	۲	۴۵	۲	۴۷/۴۳
۳	۱	۴۵	۲	۴۵/۸۷
۴	۱/۵	۴۵	۳/۵	۴۱/۸۶
۵	۲	۴۵	۵	۴۹/۲۷
۶	۲	۵۰	۳/۵	۹۰/۱۴
۷	۱/۵	۵۰	۳/۵	۶۸/۳۳
۸	۱/۵	۵۰	۳/۵	۷۳/۱۶
۹	۱/۵	۵۰	۳/۵	۷۱/۳۷
۱۰	۱/۵	۵۰	۳/۵	۷۷/۲۴
۱۱	۱/۵	۵۰	۳/۵	۷۷
۱۲	۱/۵	۵۰	۳/۵	۶۹/۴۲
۱۳	۱	۵۰	۳/۵	۸۱/۹۳
۱۴	۱/۵	۵۰	۵	۶۹/۵۸
۱۵	۱/۵	۵۰	۲	۶۱/۳۷
۱۶	۱	۵۵	۲	۳۸/۱۲
۱۷	۲	۵۵	۲	۵۰/۶۸
۱۸	۱	۵۵	۵	۳۳/۷۱
۱۹	۲	۵۵	۵	۴۶/۲
۲۰	۱/۵	۵۵	۳/۵	۵۰/۳۷

جدول ۴- حداقل غلظت مهارکنندگی پپتیدهای زیست فعال حاصل از کدو علیه چهار باکتری بیماریزای غذا زاد

	سویه‌های باکتریایی/ حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)			
	باسیلوس سرئوس	*لیستریا مونوسایتوژنز*	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*اشریشیا*
پروتئین کدو	–	–	–	–
P_{3012}	+۱	+۱	+۱	+۱
T_{4551}	+۱	+۱	–	+۱
P_{35135}	+(۱/۲)	+(۱/۱۶)	–	+(۱/۸)
T_{3551}	–	–	–	–
A_{50135}	–	+۱	–	+۱
A_{50235}	+(۱/۴)	+(۱/۸)	+(۱/۴)	–

+ اثر بازدارندگی بر رشد باکتری

– عدم بازدارندگی بر رشد باکتری

(۱): عصاره تام پپتید زیست فعال بدون رقیق سازی، (۱/۱،۴/۲، ۱/۸، ۱/۱۶) پپتید زیست فعال رقیق شده با آب مقطر استریل

بحث

این مطالعه به بررسی قدرت مهار رادیکال DPPH و قدرت ضدباکتری پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز پروتئین کنجاله دانه کدو توسط آلکالاز، پپسین و تریپسین پرداخته است. بر اساس نتایج، به دنبال هیدرولیز قدرت ضداکسایش و توان بازدارندگی از فعالیت باکتری‌ها افزایش چشمگیری نشان داد. تفاوت میان قدرت ضداکسایش پپتیدهای تولیدی توسط سه آنزیم آلکالاز، پپسین و تریپسین نشان داد که هیدرولیز پروتئین‌ها یا پپتیدها با آنزیم‌های مختلف می‌تواند منجر به تولید محصولاتی با پتانسیل ضداکسایش متفاوت شود. با توجه به نتایج بدست آمده، می‌توان گفت میزان تولید اسیدهای آمینه با خاصیت ضداکسایش به ویژه انواع آبگریز مانند والین، فنیل‌آلانین، ایزولوسین و لوسین در نمونه‌های P_{35135}، P_{3012}، A_{50135}، A_{50235}، T_{4551} و T_{3551} در مقایسه با سایر تیمارهای تولید شده بیشتر بوده است. قدرت ضداکسایش پروتئین‌های هیدرولیز شده در مطالعات مختلف مورد ارزیابی واقع شده است. هیدرولیز آنزیمی پروتئین آفتابگردان توسط آنزیم‌های آلکالاز و تریپسین در تحقیق انجام شده توسط Taha و همکاران (۲۰۱۳) بررسی شد. بنابر گزارش این محققین، برای دستیابی به پروتئین‌های هیدرولیز شده با حداکثر قدرت ضداکسایش، هیدرولیز ایزوله پروتئین آفتابگردان توسط آنزیم تریپسین در غلظت ۲٪ و زمان هیدرولیز ۱ ساعت و توسط آلکالاز در غلظت ۲٪ و زمان هیدرولیز ۳ ساعت لازم بود که به نتایج بدست آمده در این پژوهش نزدیک بود. در تحقیق انجام شده توسط Bougatef و همکاران (۲۰۰۹) تأثیر استفاده از پروتئاز قلیائی با وزن مولکولی پائین، تریپسین و پپسین بر قدرت ممانعت از پراکسیداسیون چربی در هیدرولیز شده‌های نوعی کوسه ماهی[1] مورد مطالعه قرار گرفت. تمامی هیدرولیز شده‌های تولیدی درجات متفاوتی از قدرت ضداکسایش را بروز دادند و این قدرت با افزایش در غلظت نمونه هیدرولیز شده افزایش یافت. بر اساس نتایج گزارش شده، هیدرولیز شده‌های تولیدی توسط تریپسین بیشترین قدرت ممانعت از پراکسیداسیون را در غلظت ۳ میلی گرم/ میلی لیتر به خود اختصاص دادند و هیدرولیز شده‌های تولیدی توسط پروتئاز قلیائی با وزن مولکولی پائین در ردیف بعدی قرار گرفتند، درحالی‌که نمونه تولید شده توسط پپسین دارای کمترین قدرت ضد پراکسیداسیون بود. آنتی اکسیدان سنتزی BHT به عنوان کنترل مثبت بیشترین قدرت ضد پراکسیداسیون را در مقایسه با نمونه‌های هیدرولیز شده در غلظت مشابه به خود اختصاص داد. در مورد قدرت ضدباکتری پروتئین‌های هیدرولیز شده، تصور می‌شود که پپتیدهای زیست فعال بیشتر بر روی غشاء سیتوپلاسمی باکتری‌ها مؤثر باشند. تجمع پپتیدها در غشاء سیتوپلاسمی منجر به نشت محتویات سیتوپلاسمی و در نهایت مرگ باکتری می‌شود. اکثر پپتیدها با ایجاد منافذی در غشا و تداخل در عبور و مرور یون‌ها و مواد غذایی می‌توانند مستقیما اثر ضد میکروبی خود را اعمال نمایند. مکانیسم‌های مولکولی و نفوذ در غشا در پپتیدهای مختلف ممکن است تحت تأثیر پارامترهایی چون توالی اسید آمینه، ترکیب چربی‌های غشا و غلظت پپتید قرار گیرد (Shai 2002). پپتیدهای ضدباکتری معمولا از کمتر از ۵۰ (۵۰-۱۲) اسید آمینه تشکیل شده اند، دارای وزن مولکولی ۱۰-۵ کیلودالتون بوده و واجد ویژگی های کاتیونی و آمفی پاتیک می-باشند. علیرغم ساختارهای گوناگون (آلفا هلیکس و بتا شیت، حلقوی و بلند زنجیره) وجود بار مثبت در بسیاری

1 .*Mustelus mustelus*

از پپتیدها آن‌ها را قادر به اتصال به غشاء باکتریایی می-نماید. این اتصال برای ایجاد خواص ضد میکروبی ضروری است و پس از آن، پپتیدها باید برای رسیدن به جایگاه-های هدف موجود در داخل سلول از سد غشایی عبور نمایند (Shai 2002). پپتیدهای ضدمیکروب از طریق قسمت‌های با بار مثبت خود با قسمت‌های باردار منفی موجود در غشاء سلول‌های باکتری بر هم کنش برقرار کرده و از این طریق در سطح غشاء سلول هدف تجمع می‌یابند. درجه آبگریزی سطحی پپتیدها نیز نقش مهمی در بروز ویژگی‌های ضدباکتری آنها ایفا می‌نماید، زیرا بخش‌های آبگریز مسئول برقراری ارتباط با اجزاء آبگریز در غشاء هستند. از طریق ایجاد این برهم‌کنش با غشاء سلولی بازآرائی‌های عمده ای در ساختار اتفاق می‌افتد که ممکن است نتیجه برقراری اتصال میان پپتید و چربی، تغییر مکان پپتید در طول ممبران سلولی و برقراری برهم‌کنش با اهداف داخل سلولی باشد (Taha et al., 2013). تصور بر این است که حداقل ۵۰٪ از اسیدهای آمینه موجود در پپتیدهای ضدباکتری از انواع آبگریز هستند. تریپتوفان، هیستیدین، لوسین، ایزولوسین، والین و فنیل آلانین از اسیدهای آمینه یافت شده در این دسته از پپتیدها هستند (Taha et al., 2013). اتصال به انتروتوکسین‌ها و ممانعت از اتصال سلول باکتری به سطوح نیز می‌تواند در بروز خواص ضد میکروبی مؤثر باشد. به علاوه پپتیدهای زیست فعال مواد مغذی مورد نیاز برای بقا و رشد باکتری را از دسترس خارج کرده و از این طریق نیز اثر ضد میکروبی خود را اعمال می‌نمایند (Théolier et al., 2014). بر طبق بررسی‌های انجام شده حساسیت باکتری‌ها به پپتیدهای زیست فعال به ماهیت پروتئینی مواد غذایی، نوع آنزیم پروتئاز هیدرولیز کننده و همچنین نوع باکتری بستگی دارد (Shai 2002). با در نظر گرفتن نتایج بدست آمده می‌توان قدرت ضد باکتری مشاهده شده به ویژه در نمونه‌های P_{3012}، P_{35135}، T_{4551}، A_{50235} و A_{50135} را به وزن مولکولی پائین، وجود اسیدهای آمینه بازی و آبگریز، درجه آبگریزی سطحی بالا، حضور پپتیدهای غنی از اسیدهای آمینه ضدباکتری مانند تریپتوفان، هیستیدین و والین و وجود پپتیدهای حاوی اسیدهای آمینه با بار مثبت در این نمونه‌ها نسبت داد. از سوئی، قدرت ضدباکتری پروتئین‌های هیدرولیز شده با افزایش درجه آبگریزی سطحی تا یک حد آستانه افزایش یافته و پس از آن افزایش بیشتر در درجه آبگریزی سطحی به علت دیمر شدن پروتئین‌ها در محلول آبی منجر به کاهش اثر ضدباکتری پروتئین هیدرولیز شده خواهد شد، چرا که دیمرهای پروتئینی قادر به عبور از دیواره سلولی برای واکنش دادن با غشاء هدف نخواهند بود (Cheng et al., 2013). بنابراین فقدان اثر ضدباکتری در نمونه T_{3551} در این تحقیق ممکن است به دلیل درجه آبگریزی بالا و دیمر شددن نمونه در محیط آبی بوده باشد. Cheng و همکاران (۲۰۱۳) فعالیت ضد میکروبی کاپا کازئین علیه باکتری *اشریشیا* را به محتوای بالای اسیدآمینه‌های هیدروفوب عمومی مثل لوسین، لایزین، فنیل آلانین و پرولین نسبت دادند. به اعتقاد این محققین پپتیدهای ضد باکتری می‌توانند پس از ورود به سیتوپلاسم با اتصال به مولکول‌های درون سلولی از سنتز دیواره سلولی و سنتز RNA ، DNA و پروتئین ممانعت نمایند. بررسی فعالیت ضد میکروبی پپتیدهای زیست فعال حاصل از نمونه‌های پنیر چدار با روش میکرودایلوشن بر سه باکتری بیماری زای غذازاد *(اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس ارئوس و باسیلوس سرئوس)* توسط Pritchard و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد که پپتیدهایی با اندازه تقریبی ۱۰ کیلودالتون بیشترین اثر ضدمیکروبی را بر باسیلوس سرئوس داشتند. همچنین کمترین اثر

مهارکنندگی بر باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* مشاهده شد که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. به علاوه Taha و همکاران (۲۰۱۳) فعالیت ضد میکروبی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی دانه آفتابگردان توسط آنزیم‌های گوارشی را علیه باکتری‌های *لیستریا مونوسایتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* به روش دیسک دیفیوژن گزارش کردند.

نتیجه گیری

با توجه به افزایش چشمگیر مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های سنتزی، این مقاله به بررسی امکان استفاده از پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز پروتئین کنجاله دانه کدو توسط سه آنزیم آلکالاز، پپسین و تریپسین به عنوان ترکیبات ضدمیکروب طبیعی پرداخته است. در این تحقیق به استثناء تیمار T_{3551} سایر نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده دارای قدرت بازدارندگی از فعالیت برخی یا تمامی باکتری‌های بیماریزای مورد بررسی بودند. بنابراین و با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان از پروتئین‌های هیدرولیز شده کنجاله دانه کدو به عنوان ترکیبات طبیعی با قابلیت بازدارندگی از فعالیت باکتری‌های بیماریزا نام برد.

منابع

۱. مردان زاده، د.، زاهدی، ب و درویش زاده، ر. (۱۳۹۴). بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی کدوی شمال غرب ایران از نظر صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی. به‌نژادی گیاهان زراعی و باغی، سال سوم، شماره ۱، صفحه ۱۲۳-۱۰۷.

۲. نورمحمدی، ا.، صادقی ماهونک، ع.ر.، صادقی، م.، اعلمی، م و قربانی، م. (۱۳۹۴ الف). تعیین شرایط بهینه تولید پپتیدهای ضداکسایش از هیدرولیز پروتئین کنجاله روغنی دانه کدو توسط پپسین. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، سال سیزدهم، شماره ۶۱، صفحه ۱۳۴-۱۲۷.

۳. نورمحمدی، ا.، صادقی ماهونک، ع.ر.، اعلمی، م.، قربانی، م و صادقی، م. (۱۳۹۴ ب). بهینه‌سازی هیدرولیز پروتئین کنجاله دانه کدو توسط آلکالاز جهت دستیابی به حداکثر خاصیت ضد اکسایش. نشریه فراوری و نگهداری مواد غذایی، در دست چاپ.

۴. نورمحمدی، ا.، صادقی ماهونک، ع.ر.، قربانی، م.، اعلمی، م و صادقی، م. (۱۳۹۴ ج). بهینه سازی شرایط تولید پپتیدهای ضد اکسایش از هیدرولیز کنسانتره پروتئینی دانه کدو توسط تریپسین به روش سطح پاسخ. پژوهش-های علوم و صنایع غذایی ایران، در دست چاپ.

5. Agyei, D., and Danquah, K.M. 2013. Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. Trends Food Sci Technol. 23(2): 62-69.

6. Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., and Nasri, M. 2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound *(Mustelus mustelus)* muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. Food Chem. 114(4): 1198-1205.

7. Cheng, X., Tang, X., Wang, Q., and Mao, X.Y. 2013. Antibacterial effect and hydrophobicity of yak κ-casein hydrolysate and its fractions. Int Dairy J. 31 (2): 111-16.

8. Haney, F.E., and Hancock, E.W.R. 2013. Peptide design for antimicrobial and immunomodulatory applications. Pept Sci. 100(6): 572-583.

9. Lazos, E.S. 1986. Nutritional, fatty acid, and oil characteristics of pumpkin and melon seeds. J Food Sci. 51(5): 1382-1383.

10. Pritchard, S.R., Phillips, M., and Kailasapathy, K. 2010. Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. Food res int. 43(5): 1545-1548.
11. Salampessy, J., Phillips, M., Seneweera, S., and Kailasapathy, k. 2010. Release of antimicrobial peptides through bromelain hydrolysis of leatherjacket *(Meuchenia sp.)* insoluble proteins. Food Chem. 120(2): 556-560.
12. Seo, M.D., Won, H.S., Kim, J.H., Mishig-Ochir, T., and Lee, B.J. 2012. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. Molecules. 17(10): 12276-12286.
13. Shai, Y. 2002. From innate immunity to de-novo designed antimicrobial peptides. Curr Pharm Des. 8(9): 715-725.
14. Silva, V.S., 2004. Malcata FX. Caseins as source of bioactive peptides. Int Dairy Sci. 15 (1): 1-15.
15. Taha, S.F., Mohamed, S.S., Wagdy, M.S., and Mohamed, F.G. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of enzymatic hydrolysis products from sunflower protein isolate. World Appl Sci J. 21(5): 651-658.
16. Théolier, J., Fliss, I., Jean, J., and Hammami, R. 2014. Antimicrobial peptides of dairy proteins: from fundamental to applications. Food Rev Int, 30(2): 134-154.
17. Villanueva, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J., and Millán, F. 1999. Peptide Characteristics of Sunflower Protein Hydrolysates. J Ameri Oil Chem Soc. 76(12): 1455-1460.
18. Wu, G., Fan, X., Li, L., Wang, H., Ding, J., Hongbin, W., Zhao, R., Gou, L., Shen, Z., and Xi, T. 2010. Interaction of antimicrobial peptide s-thanatin with lipopolysaccharide in vitro and in an experimental mouse model of septic shock caused by a multidrug-resistant clinical isolate of Escherichia coli. Int J Antimicrob Agents. 35(3): 250-254.
19. Živanović, I., Vaštag, Z., Popović, S., Popović, L., and Peričin, D. 2011. Hydrolysis of Hull-Less Pumpkin Oil Cake Protein Isolate by Pepsin. Int J Biol Life Sci. 5(3): 30-34.

The investigation on the anti-bacterial power of bioactive peptides obtained from enzymatic hydrolysis of pumpkin *(Cucurbita pepo)* oil cake protein

Nourmohammadi E[1*], Sadeghi Mahoonak AR[2], Shahrampour D[3], Khomeiry M[2]

1. PhD graduated of food science and technology, Department of food science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2. Department of food science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
3. PhD student of food science and technology, Department of food science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

***Corresponding Author**: *elham_2191@yahoo.com*

Received: 20 April 2017 Accepted: 22 June 2017

Abstract

Nowadays a large part of microorganisms are going to become resistant against common antibiotics. In this study the effect of bioactive peptides obtained from enzymatic hydrolysis of pumpkin oil cake protein as natural anti-microbial agents was examined. In this research pumpkin *(Cucurbita pepo)* oil cake protein was hydrolyzed by pepsin, trypsin and alcalase. Optimum treatments were selected based on DPPH radical scavenging activity and anti-microbial activity of total and diluted extracts (1/2, 1/4, 1/8 and 1/16) were evaluated against *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli.* peptides produced by 1% pepsin, 30 ˚C and 2h hydrolysis (P_{3012}), 1% pepsin, 35 ˚C, 3.5h hydrolysis (P_{35135}), 1% alcalase, 50 ˚C, 3.5h hydrolysis (A_{50135}), 2% alcalase 50 ˚C, 3.5h hydrolysis (A_{50235}), 1% trypsin, 35 ˚C, 5h hydrolysis (T_{3551}) and 1% trypsin, 45 ˚C and 5h hydrolysis (T_{4551}) were selected as optimum treatments. Total extracts of P_{3012}, T_{4551} and A_{50135} showed an appropriate inhibitory effect on tested bacteria while total extract of T_{3551} had no inhibitory activity against pathogens. The minimum inhibitory concentration of P_{35135} was 1/2 against *Bacillus*, 1/8 against *Escherichia* and 1/16 against *Listeria*. Minimum inhibitory concentration of A_{50235} was 1/4 on *Staphylococcus* and *Bacillus* and 1/8 against *Listeria.* Based on the results, enzymatic hydrolysis can be employed as an effective approach to produce natural anti-oxidative and anti-microbial agents.

Keywords: enzymatic hydrolysis, anti-oxidative, anti-bacterial, pumpkin oil cake protein.