

بررسی فعالیت ضد باکتریایی و سمیت پپتید نو ترکیب LasioglossinIII بر پاتوژن های شاخص مواد غذایی

محمد باقر حبیبی نجفی*^۱، عباس تنهاییان^۲، پریا رهنما^۳، مرجان ازغندی^۴

^۱استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

^۲دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

^۳دانشجوی دکتری میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

^۴دانشجوی دکتری علوم دامی، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۲۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۲۴

چکیده

افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها به آنتی بیوتیک‌های رایج منجر به یافتن ترکیبات ضد میکروبی جدید شده است. پپتیدهای ضد میکروبی یکی از گزینه‌های مناسب برای جایگزینی آنتی بیوتیک‌های موجود می‌باشند. لازیوگلو سین‌ها گروهی از پپتیدهای زیست فعال می‌باشند که در مطالعه حاضر، عملکرد ضد میکروبی پپتید نو ترکیب لازیوگلو سین III بر پنج عامل بیماری‌زای باکتریایی غذایی (باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی موریوم، انتروکوکوس فکالیس، لیستریا مونوسییتوزنز و اشرشیا کلی) و همچنین بررسی دوز سمیت آن بر یک رده سلول انسانی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حکایت از عملکرد ضد میکروبی مناسب پپتید نو ترکیب دارد به صورتی که حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کمترین غلظت کشندگی (MBC) پپتید لازیوگلو سین III بر باکتری های مورد آزمون به ترتیب در محدوده ۸-۶۲۵ $\mu\text{g/ml}$ و ۳/۸۵۱ و ۷/۱۵-۷۰۳/۴۰۶ $\mu\text{g/ml}$ بود. نتایج حاکی از آن بود که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین حساسیت را به این پپتید دارد به طوری که مقادیر MIC و MBC آن به ترتیب ۳/۸۵۱ و ۷/۷۰۳ بود. غلظتی از پپتید که اثر سمی بر روی سلول‌های کلیه جنین انسان نشان داد (۱۶۵۲ $\mu\text{g/ml}$) به مراتب بیشتر از مقادیر MIC و MBC بدست آمده بود. نتایج این مطالعه نشان داد خاصیت باکتری کشی این پپتید با آنتی بیوتیک‌های رایج قابل رقابت می‌باشد.

کلمات کلیدی: پپتید لازیوگلو سین III، پپتید ضد میکروبی، سمیت سلولی، پاتوژن غذایی.

مقدمه

ایمنی مواد غذایی یک نگرانی رو به رشد در سراسر جهان است. بیماری‌های ایجاد شده بوسیله مواد غذایی از مهمترین مشکلات سلامت عمومی به شمار می‌روند و همه ساله موجب ابتلا و مرگ و میر تعداد قابل توجهی از مردم می‌شوند. علل شایع بیماری‌های منتقله از غذا شامل باکتری‌ها، سموم باکتریایی، ویروس‌ها و انگل‌ها هستند. شایعترین این عوامل باکتری‌ها هستند، چراکه اقدامات نامناسب برای تهیه و جابه جایی غذا باعث آلودگی، بقا و رشد باکتری‌های بیماری‌زا می‌گردد (Chopra et al., 2015; Koek et al., 2006). صنعت غذا برای حفظ کیفیت و افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی به طور گسترده از نگهدارنده‌های شیمیایی استفاده می‌کند. از طرفی مصرف غذاهای فرآوری شده با مواد نگهدارنده شیمیایی منجر به افزایش نگرانی مصرف‌کنندگان و تقاضا برای مصرف غذاهای طبیعی و با حداقل مواد نگهدارنده شیمیایی شده است. لذا نیاز مبرم به یافتن نگهدارنده‌های طبیعی برای مواد غذایی احساس می‌شود (Espitia et al., 2012). مشکل اصلی در صنایع غذایی آلودگی مواد غذایی با پاتوژن‌هایی مثل سالمونلا، شیگلا، میکروکوکوس، انترکوکوس، فکالینس، باسیلوس لیچنیفرمیس، اشرشیاکلی، لیستریا مونوسیتوژنز و ... می‌باشد لذا باید به فکر یافتن ترکیبات ضد باکتریایی طبیعی بر علیه آن‌ها بود. تحقیقات نشان می‌دهد پپتیدهای ضد میکروبی می‌توانند بر علیه پاتوژن‌های غذایی

موثر باشند و بنابراین بدون داشتن اثرات جانبی نقش مهمی در نگهداری مواد غذایی ایفا کنند (Hintz et al., 2012; Kraszewska et al., 2016). پپتیدهای ضد میکروبی به خانواده جدیدی از آنتی بیوتیک‌ها تعلق دارند. مزیت عمده پپتیدهای ضد میکروبی به مکانیسم عمل آن‌ها مربوط می‌شود که تفاوت عمده‌ای با آنتی بیوتیک‌های متداول دارند. پپتیدهای ضد میکروبی بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی مثل بار خالص به دو گروه پپتیدهای کاتیونی و پپتیدهای آنیونی تقسیم می‌شوند. اغلب پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی هستند (Marshall, 2003). هر چند مکانیسم دقیق عملکرد آن‌ها هنوز به طور دقیق مشخص نشده است ولی تصور بر آنست که این پپتیدهای باردار مثبت پوشش سلولی باکتریایی که بار منفی دارد را هدف قرار می‌دهند. سپس با نفوذ به درون غشای سلول ساختار سلول را تخریب کرده و منجر به تراوش اجزای سیتوپلاسم به بیرون و نهایتاً مرگ سلولی می‌شوند (Bagley, 2014). در حالی که پپتیدهای ضد میکروبی آنیونی گیرنده‌های ویژه-ای را هدف قرار داده و به عنوان بازدارنده‌های اصلی مسیرهای متابولیکی رفتار می‌کنند (Cotter et al., 2013). از میان بیش از ۹۰۰ پپتید ضد میکروبی ایزوله شده از تعداد زیادی از میکروارگانیزم‌ها، پپتیدهای ماریچ آلفا کاتیونی خطی بیشترین گروه مورد مطالعه بوده‌اند. اینها پپتیدهای کوچکی هستند که از ۱۰ تا ۴۵ اسید آمینه بلند زنجیره، هیدروفوب و بازی تشکیل

پاتوزن‌های شاخص غذایی بررسی نشده است. از این رو در این تحقیق، با توجه به در دسترس بودن نوع نوترکیب این پپتید از مطالعه دیگر (نتایج گزارش نشده است)، ابتدا اثر ضد میکروبی این پپتید نوترکیب بر علیه پاتوزن‌های *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *انتروکوکوس فکالیس* و *لیستریا مونوسی‌توزنز* مورد بررسی قرار گرفت و سپس عدم سمیت این پپتید ارزیابی شد تا چشم انداز روشنی در معرفی این پپتید به عنوان نگهدارنده مواد غذایی فراهم گردد.

مواد و روش‌ها

باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC25923)، *سالمونلا تیفی موریوم* (ATCC 14028)، *انتروکوکوس فکالیس* (ATCC 29212)، *لیستریا مونوسی‌توزنز* (ATCC 19111) و *اشرشیا کلی* (ATCC 25922) از کلکسیون میکروبی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردیدند.

پپتید نوترکیب Lasioglossin III از آزمایشگاه گروه صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید. این پپتید به صورت نوترکیب و با تجمع در فضای پری پلاسمی در باکتری *E. Coli* سویه BL21 ترانسفورم شده با وکتور pET22b نوترکیب، دارنده توالی کدکننده لازیوگلو سین III، سنتز شد و پس از استخراج

شده اند. این گروه از پپتیدها اغلب در زهر حشرات گزنده مثل زنبورها یافت می شوند. چنین پپتیدهایی به عنوان الگویی برای توسعه پپتیدهای آنتی بیوتیکی جدید و موثر می توانند به کار گرفته شوند (Cerovsky et al., 2009). Lasioglossin ها گروهی از پپتیدهای ضد میکروبی طبیعی هستند که به تازگی شناسایی شده اند و در زهر زنبور عسل وحشی (*Lasioglossum laticeps*) وجود دارند. سه نوع Lasioglossin از نظر ساختاری شناسایی شده‌اند و با اسامی Lasioglossin I, II, III نامگذاری شده‌اند (Vrablikova et al., 2017). این پپتیدها عملکرد ضد میکروبی بر برخی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان دادند. پپتیدهای Lasioglossin فعالیت همولیتیک کمی در برابر اریتروسیت‌های موش آزمایشگاهی نشان دادند که یک ویژگی مهم برای آن‌ها می باشد زیرا مشکل اصلی در کاربرد بسیاری از پپتیدهای ضد میکروبی توانایی آن‌ها برای لیز کردن سلول‌های یوکاریوتی می باشد که به عنوان فعالیت همولیتیکی مطرح می شود و در این پپتیدها این ویژگی در حداقل می باشد. از بین سه نوع، Lasioglossin نوع III بهترین پتانسیل ضد میکروبی، ضد توموری و ضد مخمر کاندیدا را نشان داده است (Vrablikova et al., 2017). در مطالعات پیشین انجام شده اثر ضد میکروبی پپتید Lasioglossin III که به شکل نوترکیب در فضای پری پلاسمی سنتز شده باشد بر علیه

که در آن‌ها رشد باکتری صورت نگرفته بود یعنی همان رقت MIC و رقت‌های بالاتر از آن به محیط مولر هیتون آگار (مرک، آلمان) منتقل شد و پس از پخش بوسیله سواب استریل به مدت ۲۴ ساعت در 37°C گرمخانه گذاری شدند. پلیت‌هایی که حاوی کمترین غلظت از پیتید بودند و همچنین در آن رشدی مشاهده نشد به عنوان MBC در نظر گرفته شدند.

سمیت پیتید روی سلول‌های کلیه جنین انسان بررسی شد. تقریباً 3×10^3 سلول در $100 \mu\text{l}$ محیط DMEM^۳ (۱۰٪ حجمی-حجمی FBS^۴) (سیگما، انگلستان) در هر چاهک یک پلیت دارای ۹۶ چاهک کشت داده شدند. سلول‌ها به مدت ۱ شب در دمای 37°C در یک اینکوباتور مرطوب با ۵٪ دی اکسید کربن گرمخانه‌گذاری شدند. سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای 37°C تحت شرایط یکسان گرمخانه‌گذاری شدند. تست MTT برای دیدن اثر بازدارندگی پیتید در سلول‌های نرمال انجام شد. طی این ارزیابی $10 \mu\text{l}$ از رنگ MTT تهیه شده (5 PBS mg/ml) در هر یک از خانه‌ها اضافه شد و به منظور متابولیزه شدن ماده MTT توسط سلول‌های زنده و ایجاد بلورهای فورمازان، پلیت ۹۶ خانه ای به مدت ۴ ساعت در دمای 37°C گرمخانه گذاری شد. سپس محتویات خانه‌ها

پیتید از فضای پری پلاسمی و تخلیص آن، غلظت آن تعیین گردید. سپس پیتید جهت ارزیابی ضد میکروبی به کار برده شد.

برای تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC^1) و حداقل غلظت کشندگی (MBC^2) از روش میکرو دایلوشن استفاده گردید (Wikler et al., 2009; Wiegand et al., 2008). برای این منظور ابتدا از باکتری‌ها کشت ۲۴ ساعته تهیه شد. پس از تهیه ۰/۵ مک فارلند از باکتری‌ها در محیط مولر هیتون براث (مرک، آلمان)، مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون تهیه شده به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. سپس به چاهک اول ۱۰۰ میکرو لیتر پیتید اضافه شد و کاملاً مخلوط گردید و از آن ۱۰۰ میکرو لیتر برداشته به چاهک بعدی اضافه شد و این رویه را در چاهک‌های بعدی ادامه داده به صورتی که سریالی از رقت‌های پیتید حاصل شد. کنترل منفی (بدون افزودن باکتری) و کنترل مثبت (بدون افزودن پیتید) نیز در هر ردیف در نظر گرفته شد. بعد از ۱۶ تا ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری میکرو پلیت در دمای 37°C جذب تمامی چاهک‌ها بوسیله الیزا خوان (مدل ELX800 بیوتک، امریکا) در ۶۲۰ نانومتر اندازه گیری شد. اولین چاهک‌هایی که حاوی پیتید بود و جذبی در ۶۲۰ نانومتر نداشتند و شفاف بوده به عنوان MIC در نظر گرفته شد. به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی نیز ۵۰ میکرو لیتر از چاهک‌هایی

^۳ Dulbecco's modified eagle medium

^۴ Foetal bovine serum

^۱ Minimum inhibitory concentration

^۲ Minimum bactericidal concentration

طرفی تعداد پاتوژن‌های مقاوم به آنتی بیوتیک روز به روز در حال افزایش است و ترکیبات ضد میکروبی موجود برای کنترل عفونت‌های باکتریایی جوابگو نمی‌باشند (Okuda *et al.*, 2015). پپتیدهای ضد میکروبی می‌توانند جایگزین آنتی بیوتیک‌های موجود برای کنترل و مبارزه با عفونت‌های باکتریایی باشند. این پپتیدهای ضد میکروبی نه تنها عملکرد ضد باکتریایی دارند بلکه در بسیاری موارد اثر کشندگی بر روی ویروس‌ها و حتی سلول‌های سرطانی نشان داده‌اند. عملکرد پپتیدهای ضد میکروبی به طور عمده به سطح سلول‌های باکتریایی و ترکیب آمینو اسیدی پپتید بستگی دارد. پپتیدهای ضد میکروبی ابتدا به سطح سلول باکتریایی که به احتمال زیاد توسط پیوند الکترواستاتیک بین پپتید کاتیونی و سطح باکتریایی ایجاد می‌شود متصل می‌شوند. احتمال آن می‌رود که پپتیدهای کاتیونی ابتدا توسط مولکول‌های لیپولی ساکارید دارای بار منفی موجود در باکتری‌های گرم منفی جذب می‌شوند (Brogden, 2005). هر چند یافته‌های Ebbensgaard *et al.* (2015) نشان داد که لیپولی ساکارید در باکتری/شرشیا کلی نه فقط در جذب و اتصال پپتیدهای ضد میکروبی به غشای خارجی نقش دارد بلکه به عنوان مانع حفاظتی بر

تخلیه و $150 \mu\text{l}$ DMSO^۱ (سیگما، انگلستان) به هر یک از خانه‌ها افزوده شد. DMSO حلال بلورهای فورمازان است. افزودن DMSO باعث ایجاد درجه‌ی متفاوتی از شدت رنگ بنفش تا سفید می‌شود. شدت رنگ این محلول‌ها، معیاری از تعداد سلول‌های زنده در محیط می‌باشد. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند رابطه مستقیم دارد. سپس میزان جذب خانه‌ها در طول موج 570 nm توسط دستگاه الیزا اندازه‌گیری شد (Ghandehari *et al.*, 2015).

در این مطالعه برای تجزیه داده‌ها از نرم افزار SPSS.22 استفاده شد. بررسی خواص ضد باکتریایی در ۴ تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون تحلیل واریانس و آزمون چند دامنه-ای دانکن در سطح اطمینان ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج و بحث

هر روز اثرات زیان‌آور نگهدارنده‌های شیمیایی از جمله عوارض سرطان‌زایی و نیز باقی مانده‌های سمی بر سلامت انسان به اثبات می‌رسد و تقاضا برای مصرف مواد غذایی که عمر ماندگاری آن‌ها به صورت طبیعی افزایش می‌یابد، بیشتر می‌شود. لذا محققین مواد غذایی درصدد جایگزینی آن‌ها با نمونه‌های طبیعی شده‌اند. از

^۱ Dimethyl sulfoxide

بیوتیک‌های ونکومایسین، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین خیلی بیشتر بود ولی آنتی بیوتیک آمپی سیلین اثر مهار کنندگی بیشتری نسبت به پپتید لازيوگلويسين III بر روی رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* داشت. اثر مهار کنندگی این پپتید بر رشد *سالمونلا تیفی* موربوم تقریباً مشابه اثر آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین بود ولی در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین، کافتازیدیم، پپراسیلین و جنتامایسین اثر مهار کنندگی بیشتری بر رشد *سالمونلا تیفی* موربوم نشان داد. اثر بازدارندگی پپتید مذکور بر رشد باکتری *انتروکوکوس فکالیس* از آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین، ونکومایسین، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین کمتر بود. هر چند اثر کشندگی این پپتید بر *انتروکوکوس فکالیس* از آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین ($16 \mu\text{g/ml}$)، ونکومایسین ($256 \mu\text{g/ml}$)، جنتامایسین ($128 \mu\text{g/ml}$) و سیپروفلوکساسین ($16 \mu\text{g/ml}$) خیلی بیشتر بود. نتایج MIC بر باکتری لیستریا مونوسیژنر نشان داد اثر مهار کنندگی پپتید لازيوگلويسين III بر رشد لیستریا خیلی بیشتر از اثر مهار کنندگی آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین، پپراسیلین و جنتامایسین بود. از بین باکتری‌های مورد بررسی مقاوم‌ترین باکتری به پپتید لازيوگلويسين III باکتری *اشرشیا کلی* بود که هرچند در برابر دو آنتی بیوتیک آمپی سیلین و سیپروفلوکساسین حساستر بود ولی مقاومت بیشتری در برابر آنتی بیوتیک‌های کافتازیدیم، پپراسیلین و جنتامایسین نشان داد. بررسی نتایج

علیه پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی عمل می‌کند. زیرا سوبه‌های باکتریایی *اشرشیا کلی* جهش یافته‌ی دارای نقص در لیپوپلی ساکارید، حساسیت بیشتری به پپتیدهای ضد میکروبی بکار رفته نشان دادند. که این امر دلالت بر این دارد که لیپوپلی ساکارید به عنوان جزء ضروری در فعالیت ضد میکروبی پپتیدهای کاتیونی نقش ندارد همچنان‌که بسیاری از پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی فعالیت ضد میکروبی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت که فاقد لیپوپلی ساکارید هستند نشان دادند (Ebbensgaard et al., 2015).

تعیین فعالیت ضد میکروبی به روش تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده (MIC) یکی از پرکاربردترین روش‌ها است و توسط اکثر محققین به عنوان معیاری برای تعیین فعالیت ضد میکروبی پذیرفته شده است. فاکتورهای متعددی بر روی میزان MIC تاثیر می‌گذارند از جمله دما، میزان تلقیح و نوع میکروارگانیسم (Lambert, 2000). نتایج مربوط به حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی پپتید لازيوگلويسين III بر روی ۵ باکتری پاتوژن در جدول ۱ نشان داده شده و با آنتی بیوتیک‌های استاندارد مقایسه شده است. نتایج نشان داد کمترین MIC و MBC به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مربوط بود، یعنی این باکتری بیشترین حساسیت به این پپتید را نشان داد. اثر مهار کنندگی این پپتید بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با آنتی

آنالیزهای بعدی آنها نشان داد که این پتید می-تواند باعث تخریب غشای خارجی شود (Mishra et al., 2013). با توجه به این که مطالعه بر روی اثرات ضد میکروبی این پتید در ایران و جهان محدود بوده لذا به بررسی موارد مشابه بر روی پتیدهای دیگر پرداختیم. در مطالعه حاضر نتایج حاکی از آن بود که مقادیر MBC پتید لازيوگلويسين III بر علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی، موریوم، انتروکوکوس فکالیس و لیستریا مونوسیترنوز تقریباً دو برابر مقادیر MIC بود که این یافته‌ها در تطابق با نتایج Ilić et al. (2013) بود که بر روی فعالیت ضد میکروبی طیف وسیعی از پتیدهای ضد میکروبی آزمایشاتی انجام دادند. در پژوهشی Slaninová et al. (2012) اثر ضد میکروبی پتید لازيوگلويسين ایزوله شده از زهر زنبور عسل در برابر باکتری-های گرم مثبت و گرم منفی و همچنین سمیت آنها را بر علیه سلول‌های نرمال و سرطانی انسان بررسی کردند. نتایج نشان داد لازيوگلويسين III و یکی از آنالوگ‌های آن می‌توانند به عنوان داروهای ضد میکروبی بکار روند. بطوری که سمیت ۳ تا ۵ برابر بیشتر بر علیه سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال داشتند. آزمایشات in vivo در موش نیز نشان داد لازيوگلويسين III ترکیبی فعال و غیر سمی می-باشد. (Slaninová et al., 2012). در مطالعه انجام شده توسط Ebbensgaard et al. (2015)

MBC نشان داد پتید لازيوگلويسين III در مقایسه با آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۱/۶ μg/ml) اثر کشندگی کمتری بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد. از بین باکتری‌های مورد آزمون حداقل غلظت مهار کنندگی رشد با حداقل غلظت کشندگی رشد پتید بر علیه باکتری اشرشیا کلی یکسان بود (CLSI, 2017). پتید لازيوگلويسين III همچنین بر روی یوکاریوت‌های ابتدایی نیز تاثیر بازدارندگی نشان داد به طوری که مخمر کاندیدا/آلیکانس در حضور لازيوگلويسين III LL و لازيوگلويسين III-D LL به ترتیب در غلظت‌های ۱۱/۵ μM و ۲۱ μM به مدت ۳ روز قادر به رشد بود (Vrablikova et al., 2017).

در پژوهش انجام شده توسط Mishra et al. (2013) اثر ضد میکروبی پتید لازيوگلويسين III که بصورت شیمیایی سنتز شده بود بر باکتری اشرشیا کلی ATCC8739 و استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 6538 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج MIC برای هر دو پاتوژن ۱/۷۵ میکروگرم بر لیتر بود که از نتایج حاصل از پژوهش ما که نوع نوترکیب این پتید بکار رفته بود خیلی کمتر بود. همچنین آنالیز انجام شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی توسط آنها نشان داد که سلول-های باکتریایی تیمار شده با پتید لازيوگلويسين III در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده تفاوت-های آشکاری در مورفولوژی غشایی داشتند.

هیدروفوب به لایه لیپوپلی ساکارید را محدود می کند (Ebbensgaard *et al.*, 2015). در پژوهش دیگری که توسط Ilić *et al.* (2013) صورت گرفت میزان MIC پپتیدهای ADP1، ADP2 و ADP3 در برابر باکتری *اشرشیا کلی* ATCC25922 به ترتیب ۴-۲، ۱ و ۴ میکروگرم بر میلی لیتر بود که از MIC پپتید بکار رفته در پژوهش ما کمتر بود. ولی میزان کشندگی پپتید ADP3 بر روی باکتری *اشرشیا کلی* با میزان کشندگی پپتید بکار رفته در این پژوهش تقریباً برابر بود. که تاثیر این پپتیدها در مهار رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC25923 خیلی کمتر از پپتید لازيوگلويسين III بود. همچنين میزان مهار پپتید ADP2 بر روی *سالمونلا تیفی موریوم* خیلی کمتر از پپتید لازيوگلويسين III بود (Ilić *et al.*, 2013).

آنچه کاربرد پپتیدهای ضد میکروبی را به عنوان یک عامل ضد باکتری در مواد غذایی و استفاده دارویی با مشکل مواجه می سازد سمیت آن‌ها در برابر سلول‌های یوکاریوت می باشد. لذا پپتیدهای ضد میکروبی در کنار خاصیت ضد میکروبی قوی، برای کاربردهای غذایی و دارویی باید از نظر عدم سمیت مورد بررسی قرار بگیرند (Lee *et al.*, 2013). در این پژوهش نیز در کنار بررسی ویژگی بازدارندگی رشد و کشندگی پپتید لازيوگلويسين III بر روی باکتری‌های پاتوژن، ویژگی عدم سمیت آن روی سلول‌های کلیه جنین انسان نیز مورد بررسی قرار گرفت. غلظت

تاثیر ضد میکروبی پپتیدهای Cap11 و Cap18 (که همچون پپتید لازيوگلويسين دارای ساختمان ماریچج آلفا بودند) بر روی سویه های *E.coli* در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت بیشتر بود در حالی که در این مطالعه تاثیر بازدارندگی پپتید لازيوگلويسين III بر باکتری *E.coli* در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت کمتر بود هر چند اثر کشندگی پپتید لازيوگلويسين III بر باکتری *E.coli* نسبت به لیستریا و انتروکوکوس بیشتر بود. پپتید ملیتین^۱ که از زنبور عسل ایزوله شده بود نیز همچون پپتید لازيوگلويسين III فعالیت ضد میکروبی خوبی بر علیه باکتری‌های پاتوژن گرم مثبت بویژه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروکوکوس فکاليس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* داشت. به طوری که MIC ملیتین بر علیه هر سه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC29213، *انتروکوکوس فکاليس* ATCC29212 و *لیستریا مونوسیتوژنز* N22-2 ۲-۴ میکروگرم بر میلی لیتر بود. MIC ملیتین بر علیه باکتری *اشرشیا کلی* ATCC25922 ۱۶ میکروگرم بر میلی لیتر بود که تقریباً دو برابر MIC پپتید لازيوگلويسين III بر علیه این باکتری بود. به این معنی که قدرت بازدارندگی پپتید لازيوگلويسين III بر علیه *اشرشیا کلی* دو برابر قدرت پپتید ملیتین بود. علت قدرت بازدارندگی کمتر پپتید ملیتین بر علیه باکتری *اشرشیا کلی* وجود غشای خارجی در باکتری‌های گرم منفی می باشد که در نتیجه میزان نفوذ اجزای

^۱ Melittin

از نظر خاصیت ضد باکتریایی و کشندگی باکتریایی دارد. با توجه به غلظت چندین برابر بیشتر از MIC و MBC اعمال شده در تست عدم سمیت پپتید لازيوگلوسين III بر روی یک رده سلول انسانی، عدم سمیت پپتید مذکور به اثبات رسید. با ارزیابی‌های تکمیلی و انجام تست‌های عدم سمیت بر روی رده‌های سلولی انسانی دیگر و غلظت‌های مطلوب قابل رقابت با ترکیبات ضد میکروبی متداول می‌توان چشم انداز روشنی را برای این پپتید به عنوان نگهدارنده مواد غذایی در نظر داشت.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد (معاونت پژوهشی) در قالب طرح شماره ۲/۴۵۸۰۴ انجام گرفت. بدین وسیله مجری طرح از حمایت مالی سپاسگزاری می‌نماید.

اولیه برای تست عدم سمیت با ارزیابی سمیت پپتید لازيوگلوسين III تخلیص شده برابر با ۱۶۵۲ میکروگرم بر میلی لیتر بود که در این غلظت که بالاترین مقدار ممکن از پپتید بود هیچ گونه سمیت معناداری مشاهده نشد ($P > 0.05$). این غلظت از پپتید به ترتیب ۴۲۹، ۳۸۳، ۲۹۲، ۲۱۴/۵ و ۱۹۱/۵ برابر بیشتر از MIC باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی*، *موریوم*، *انتروکوکوس فکاليس*، *لیستریا مونوسیٹوژنز* و *اشرشیا کلی* و همچنین به ترتیب ۲۱۴/۵، ۱۹۱/۵، ۱۴۶، ۱۰۷ و ۱۹۱/۵ برابر بیشتر از MBC این باکتری‌ها بود. پپتیدهای لازيوگلوسين در مطالعه Cerovsky *et al.* (2009) اثر سمیت بر روی سلول‌های سرطانی در شرایط *in vitro* نشان دادند. کمترین غلظت سمیت این پپتید بر روی سلول‌های مخاطی نرمال موش آزمایشگاهی بود که غلظت آن ۱۹ μM بود.

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان از قابلیت رقابت پپتید لازيوگلوسين III با آنتی بیوتیک‌های رایج

جدول ۱- میانگین حداقل غلظت مهار کننده رشد و کشندگی پپتید نو ترکیب لازيوگلو سين III در مقایسه با آنتی بیوتیک های متداول بر روی ۵ باکتری پاتوژن (CLSI).

Table 1- The average values of MIC and MBC for lasioglossin LL III recombinant peptide in comparison with commercial antibiotics against five pathogenic bacteria (CLSI).

سیپروفلوکس اسین Ciprofloxacin	جنتامایسین Gentamicin	پپراسیلین Piperacillin	ونکومایسین Vancomycin	کافتازیدیم Caftazidime	آمپیسیلین Ampicillin	Lasioglossin III		باکتری Bacteria
						حداقل غلظت بازدارندگی MIC (µg/ml)	حداقل غلظت کشندگی MBC (µg/ml)	
≥16	≥16	-	≥16	-	0.5-2	3.851±0.31	7.703±0.57	استافیلوکوکوس اورئوس <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923)
≥4	≥16	≥128	-	≥16	≥32	4.312±0.22	8.625±0.15	سالمونلا تیفی موریوم <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)
1	4	-	4	-	4	5.655±0.24	11.31±0.22	انتروکوکوس فکالیس <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)
-	≥16	≥128	-	-	≥32	7.703±0.43	15.406±0.33	لیستریا مونوسیتوژنز <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 19111)
≥4	≥16	≥128	-	≥16	2-8	8.625±0.41	8.625±0.09	اشرشیا کلی <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)

منابع

- Bagley C (2014). Potential role of synthetic AMPs in animal health to combat growing concerns of antibiotic resistance - A review. *Wyno Academic Journal of Agricultural Sciences* 2: 19-28
- Brogden KA (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 3: 238-250
- Chopra L, Singh G, Kumar Jena K, Sahoo DK (2015). Senorensin: a new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative. *Scientific Reports* 5: 13412
- Cerovsky V, Budesnsky M, Hovorka O, Cvacka J, Voburka Z, Slaninov J, Borovic'kov L, Fuck V, Bednrov L, Votruba I, Straka J (2009). Lasioglossins: Three Novel Antimicrobial

- Peptides from the Venom of the Eusocial Bee *Lasioglossum laticeps* (Hymenoptera: Halictidae). *ChemBioChem* 10: 2089 – 2099
- Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). M100-S27 (2017). performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-seventh informational supplement. Retrieved January 1, 2017, from <https://standards.globalspec.com/std/10066309/m100-s27>
- Cotter PD, Ross RP, Hill C (2013). Bacteriocins—A viable alternative to antibiotics. *Nature Reviews Microbiology* 11: 95–105
- Ebbensgaard A, Mordhorst H, Toft Overgaard M, Gyruup Nielsen C, Møller Aarestrup F, and Bech Hansen E (2015). Comparative Evaluation of the Antimicrobial Activity of Different Antimicrobial Peptides against a Range of Pathogenic Bacteria. *PLoS One* 10: e0144611
- Espitia P, Soares N, Coimbra J, Andrade N, Cruz R, Medeiros E (2012). Bioactive peptides: synthesis, properties, and applications in the packaging and preservation of food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11: 187–204
- Ghandehari F, Behbahani M, Pourazar A, Noormohammadi Z (2015). In silico and in vitro studies of cytotoxic activity of different peptides derived from vesicular stomatitis virus G protein. *The Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 18: 47–52
- Hintz T, Matthews KK, Di R (2015). The use of plant antimicrobial compounds for food preservation. *BioMed Research International* 2015: 1-12
- Ilić N, Novković M, Guida F, Xhindoli D, Benincasa M, Tossi A, Juretić D (2013). Selective antimicrobial activity and mode of action of adeptantins, glycine-rich peptide antibiotics based on anuran antimicrobial peptide sequences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1828: 1004-1012
- Koek AG, Bovée LP, van den Hoek JA, Bos AJ, Bruisten SM (2006). Additional value of typing Noroviruses in gastroenteritis outbreaks in Amsterdam, The Netherlands. *Journal of Clinical Virology* 35: 167-172
- Kraszewska J, Beckett MC, James TC, Bond U (2016). Comparative analysis of the antimicrobial activities of plant defensin-like and ultrashort peptides against food-spoiling bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* AEM-00558
- Lambert RJW (2000). Susceptibility testing: inoculum size dependency of inhibition using the Colworth MIC technique. *Applied and Environmental Microbiology* 89: 275-279
- Lee MT, Sun TL, Hung WC, Huang HW (2013). Process of inducing pores in membranes by melittin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 14243–14248
- Marshall SH (2003). Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology* 6: 271-284
- Mishra B, Basu A, Saravanan R, Xiang L, Kai Yang L, and Su Jan Leong S (2013). *Lasioglossin-III*: antimicrobial characterization and feasibility study for immobilization applications. *RSC Advances* 3: 9534-9543
- Okuda D, Yomogida S, Kuwahara-arai K (2015). Augmentation of the antimicrobial activities of guinea pig cathelicidin CAP11-derived peptides by amino acid substitutions. *International Journal of Molecular Medicine* 23: 501–508
- Slaninová J, Mlsová V, Kroupová H, Alán L, Tůmová T, Monincová L, Borovičková L, Fučík V, Čeřovský V (2012). Toxicity study of antimicrobial peptides from wild bee venom and their analogs toward mammalian normal and cancer cells. *Peptides* 33:18–26
- Vrablikova A, Czernekova L, Cahlikova R, Novy Z, Petrik M, Imran S, Novak Z, Krupka M, Cerovsky V, Turanek J, Raska M (2017). *Lasioglossins LLIII* affect the morphogenesis

- of *Candida albicans* and reduces the duration of experimental vaginal candidiasis in mice. *Microbiology and Immunology* 61: 474–481
- Wikler MA, Cockerill FR, Bush K, Dudley MN, Eliopoulos GM, Hardy DJ (2009). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. approved standard—eighth edition. Retrieved January, 11, 2018, Clinical and Laboratory Standards Institute, from <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07>
- Wiegand I, Hilpert K and Hancock REW (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* 3: 163–175

Study on antibacterial activity and cytotoxicity of recombinant peptide, Lasioglossin III, against foodborne pathogens

Habibi Najafi M.B.^{1*}, Tanhaian A.², Rahnama P.³, Azghandi M.⁴

¹Department of Food Science & Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

²Ph.D. Student of Agricultural Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

³Ph.D. Student of Food Microbiology, Department of Food Science & Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

⁴Ph.D. Student of Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Abstract

The increasing microbial resistance to existing antibiotics has increased the interest in novel antimicrobial compounds. Antimicrobial peptides (AMPs) represent an attractive alternative to classical antibiotics. Lasioglossins are a group of peptides with antimicrobial activity. The inhibitory effects of a recombinant synthetic Lasioglossin, Lasioglossin III, on five food pathogens (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*) and its cytotoxicity on the normal cell line was investigated in vitro. The findings showed great antimicrobial function of the peptide. Minimum inhibition concentration and minimum bactericidal concentration of Lasioglossin III on the pathogens were the range of 3.851-8.625 and 7.703-15.406, respectively. Results indicated *Staphylococcus aureus* showed the highest sensitivity to Lasioglossin III. The Lasioglossin demonstrated cytotoxic effect on human embryonic kidney cells in higher concentration (1652 µg/ml) in comparison to MIC and MBC values. The results indicate that this peptide can be competed with common antibiotics in terms of the bactericidal properties.

Keywords: *Lasioglossin III*, *Antimicrobial peptide*, *cytotoxicity*, *food pathogen*.

* Corresponding author: Habibi Najafi M.B.

Tel: 051 38805772

Email: habibi@um.ac.ir

