فعالیت ضد باکتریایی هیدرولیز شده‌های پروتئینی به‌دست‌آمده از هضم آنزیمی ایزوله پروتئینی سویا بر برخی باکتری‌های شاخص مواد غذایی

علی مؤیدی[*۱]، مهناز نیک پیام [۲]، مرتضی خمیری [۱]، سید سهیل امیری عقدایی [۲]

[۱] گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، گلستان

[۲] گروه علوم و صنایع غذایی، موسسه آموزش عالی بهاران، گرگان، گلستان

چکیده

در این پژوهش، به‌منظور تولید ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی، ایزوله پروتئین سویا با استفاده از آنزیم آلکالاز تحت تأثیر فاکتور-های مختلف هیدرولیز گردید و فعالیت ضد باکتریایی هیدرولیز شده‌های پپتیدی به‌دست‌آمده علیه نژادهای شاخص باکتریایی ازجمله *اشرشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی گردید. نسبت آنزیم به سوبسترا و مدت‌زمان هیدرولیز به‌عنوان فاکتورها و متغیرهای فرایند انتخاب گردید. همچنین درجه هیدرولیز پروتئین و تأثیر آن بر فعالیت هیدرولیز شده‌ها ارزیابی گردید. حداکثر درجه هیدرولیز پس از min ۹۰ هیدرولیز با نسبت آنزیم به سوبسترای ۱/۵ درصد به دست آمد که تفاوت معنی‌داری با min ۶۰ هیدرولیز با نسبت آنزیم به سوبسترای ۲/۵ درصد نداشت. بر اساس نتایج، هیدرولیز آنزیمی به نحو مؤثری فعالیت ضد باکتریایی پروتئین سویا را افزایش داد. هیدرولیز شده‌های پپتیدی به‌دست‌آمده بیشترین اثر مهارکنندگی را بر *اشرشیا کلی* و کمترین تأثیر را بر *باسیلوس سرئوس* داشتند. استفاده از غلظت‌های بالاتر آنزیم اثر معنی‌داری بر پیشرفت هیدرولیز و همچنین فعالیت مهارکنندگی پپتیدهای حاصله در برابر *اشرشیا کلی* داشته است. بااین‌وجود، چنین تأثیر معنی‌داری در مورد فعالیت پپتیدها در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* مشاهده نشد. تأثیر افزایش زمان هیدرولیز بر فعالیت مهارکنندگی پپتیدها در برابر باکتری‌های مختلف بسیار متفاوت بود. به‌طورکلی، نتایج این مطالعه نشان داد می‌توان با هیدورلیز آنزیمی کنترل‌شده ایزوله پروتئینی سویا به پپتیدهایی دست‌یافت که فعالیت مهارکنندگی قابل‌توجهی در برابر *اشرشیا کلی* داشته و می‌توان از آن‌ها در فرمولاسیون غذاها استفاده کرد.

کلمات کلیدی: پپتید ضدمیکروبی، پپتیدهای زیست‌فعال، هیدرولیز آنزیمی

[*]amoayedi@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

پروتئین‌های موجود در رژیم غذایی به‌طورمعمول به‌عنوان منبع انرژی و آمینواسیدهای ضروری در نظر گرفته می‌شوند که جهت رشد و حفظ عملکردهای فیزیولوژیکی موردنیاز هستند (۱) اما در سال‌های اخیر نقش پروتئین‌های غذایی به‌عنوان ترکیباتی که ازنظر فیزیولوژیکی فعال هستند بسیار مورد استقبال قرارگرفته است (۲). به‌این‌ترتیب تحقیقات زیادی به تولید و بررسی ویژگی‌های پپتیدهای موسوم به پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از منابع گیاهی و حیوانی پرداخته‌اند. پپتیدهای زیست‌فعال معمولاً دارای ۲۰-۲ باقی‌مانده آمینواسیدی بوده و عمدتاً وزن مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ Da دارند. این توالی‌ها تا زمانی که درون پروتئین‌های بزرگ قرار دارند غیرفعال هستند اما پس از هیدرولیز پروتئین‌ها توسط آنزیم‌های گوارشی، آنزیم‌های میکروبی و گیاهی یا طی فراوری مواد غذایی آزاد می‌شوند و قادر خواهند بود اثرات فیزیولوژیک، بیولوژیک و کاربردی خود را اعمال کنند (۳).

بر اساس خصوصیات ساختاری و ترکیب و توالی آمینواسیدی، این‌گونه پپتیدها و هیدرولیز شده‌ها می‌توانند نقش‌های مختلفی ازجمله شبه افیونی، متصل شونده به مواد معدنی، تنظیم‌کننده فعالیت ایمنی، ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، پایین آورنده کلسترول و ضد فشارخون ایفا کنند. علاوه بر این پپتیدهای متعددی یافت شده‌اند که خصوصیات چندگانه داشته‌اند (۱). پروتئین‌ها را می‌توان به روش‌های شیمیایی، تخمیری و یا استفاده از آنزیم‌های تجاری هیدرولیز نمود. هیدرولیز کاتالیز شده توسط آنزیم‌ها در مقایسه با هیدرولیزهای شیمیایی در شرایط ملایم‌تری انجام می‌شوند و صدمه کمتری به سوبسترای پروتئینی وارد می‌کنند بنابراین هیدرولیز آنزیمی استراتژی ایده آلی جهت تولید پپتیدها و هیدرولیز شده‌های پروتئینی با درجه غذایی می‌باشد. ترکیب و فعالیت ماده هیدرولیز شده تولیدی بستگی به سوبسترای پروتئینی، نوع آنزیم پروتئولیتیک، نسبت آنزیم به سوبسترا، شرایط فیزیکوشیمیایی (pH، تیمار حرارتی اولیه، مدت‌زمان هیدرولیز، درجه حرارت واکنش) و اثرات متقابل بین این پارامترها دارد (۳). در طول دهه‌های گذشته مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و نگرانی مصرف‌کنندگان از اثرات جانبی آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی و همچنین تمایل مصرف‌کنندگان به مصرف ترکیبات طبیعی، علاقه‌ها را به سمت پپتیدها و هیدرولیز شده‌های ضدمیکروبی که باعث تحریک مقاومت آنتی‌بیوتیکی نمی‌گردند سوق داده است. این پپتیدها در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها و نگهدارنده‌های شیمیایی و سنتزی علیه طیف وسیع‌تری از عوامل بیماری‌زا و فسادزا مؤثر می‌باشند درحالی‌که سمیت سلولی کمتری برای سلول‌های یوکاریوت دارند (۴). پپتیدهای ضدمیکروبی کاربرد بالقوه‌ای در نگهداری مواد غذایی دارند و در اهداف درمانی و بهداشتی نیز موردتوجه هستند (۵). در سال‌های اخیر پژوهش‌هایی در مورد چگونگی تولید و آزادسازی پپتیدهای ضدمیکروبی از پروتئین‌های گیاهی و جانوری صورت گرفته‌اند. اگرچه اغلب هیدرولیز شده‌ها و پپتیدهای ضدمیکروبی از پروتئین‌های شیر و ماهی آزادشده‌اند (۹-۶) اما مطالعاتی نیز بر تولید این‌گونه ترکیبات از پروتئین‌های گیاهی صورت گرفته است. گروهی از پژوهشگران با استفاده از آنزیم آلکالاز پروتئین‌های جو را هیدرولیز نموده و پس از کاتیونی کردن پپتیدهای حاصله فعالیت ضد میکروبی آن‌ها را بررسی نمودند (۴). همچنین تفاله حاصل از روغن‌کشی هسته پالم با استفاده از آنزیم آلکالاز هیدرولیز شده و فعالیت ضد باکتریایی هیدرولیز شده‌های تولیدی موردبررسی قرار گرفت و گزارش داده‌شده که پپتیدهای حاصله فعالیت ضدمیکروبی قابل‌توجهی در برابر گونه‌های مختلف باسیلوس دارند (۱۰).

در مقایسه با حجم مطالعاتی که روی تولید و بررسی خصوصیات پپتیدهای آنتی‌اکسیدان و ضد فشارخون صورت گرفته است، مطالعات به‌مراتب کمتری روی تولید و ارزیابی پپتیدهای ضدمیکروبی انجام‌گرفته است. یکی از منابع پروتئینی ارزان‌قیمت که در مطالعات متعددی به‌عنوان سوبسترای تولید پپتیدهای زیست فعال مورداستفاده

Archive of SID

www.SID.ir

قرارگرفته است، پروتئین سویا است. علیرغم مطالعات نسبتاً زیادی که روی هیدرولیز پروتئین سویا و تولید هیدرولیز شده‌ها و پپتیدهای با خاصیت آنتی‌اکسیدانی، پایدارکنندگی کف و امولسیون کنندگی صورت گرفته است (۱۳-۱۱)، گزارش‌های بسیار محدودی در ارتباط با تولید پپتیدهای ضدمیکروبی از سویا مشاهده می‌شود. ازاین‌رو، مطالعه حاضر باهدف هیدرولیز آنزیمی ایزوله پروتئینی سویا با استفاده از آنزیم آلکالاز به‌منظور تولید هیدرولیز شده‌های حاوی پپتیدهایی با خاصیت ضدمیکروبی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد

مواد مورداستفاده در این مطالعه شامل آنزیم آلکالاز (شرکت سیگما، آلمان با فعالیت ۲/۴ واحد آنسون بر گرم[1])، محیط کشت آگار مغذی[2] و آبگوشت مغذی[3] (هر دو از شرکت بیولب هندوستان)، تری‌کلرواستیک اسید (از شرکت مرک، آلمان)، ایزوله پروتئینی سویا (وانگ جیابینگ[4]، چین)، دی‌سدیم‌هیدروژن‌فسفات و دی هیدروژن سدیم فسفات (مرک، آلمان) بود. کشت‌های ذخیره باکتری‌ها شامل *اشریشیا کلی*[5]، *باسیلوس سرئوس*[6] و *استافیلوکوکوس اورئوس*[7] مورداستفاده در این مطالعه از بانک میکروبی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تأمین گردید.

روش‌ها

هیدرولیز پروتئین و تولید پپتیدها با استفاده از آنزیم آلکالاز

میزان ۵ g پودر ایزوله پروتئینی سویا به ۱۰۰ ml بافر فسفات سدیم ۱۰۰ mM (pH =۷/۵) درون یک ارلن افزوده شد و به مدت ۱۰ min در دمای ۵۰C° تحت شرایط همزنی قرار گرفت. سپس محلول آنزیمی آلکالاز به نسبت‌های مختلف (۱/۵ و ۲/۵ درصد) به آن افزوده شد و هیدرولیز سوبسترای پروتئینی انجام گرفت. مدت‌زمان انجام هیدرولیز به‌عنوان یک متغیر در ۴ سطح ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ min تنظیم شد. پس از انجام هیدرولیز به‌منظور توقف واکنش آنزیمی، محتویات درون ارلن در دمای ۸۰ °C حرارت داده شد. پس از سرد شدن، هیدرولیز شده‌ها در ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ min سانتریفیوژ شد (۱۴ و ۱۵)، فاز روماند جمع‌آوری و تا زمان انجام آزمایش‌ها در فریزر (۲۰ °C-) نگهداری شد.

تعیین درجه هیدرولیز

شدت هیدرولیز در تیمارهای مختلف با اندازه‌گیری میزان نیتروژن محلول در تری‌کلرواستیک‌اسید[8] (۱۰ درصد) و نسبت آن به میزان کل نیتروژن نمونه تعیین گردید (۱۶). برای این کار، ۵ml نمونه هیدرولیزشده با ۵ ml از محلول تری‌کلرواستیک‌اسید (۲۰ درصد) مخلوط شد. پس از ۱۰ min نگهداری در دمای محیط، مخلوط حاصله در ۶۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ min سانتریفیوژ شد. سپس میزان نیتروژن در فاز روماند با استفاده از دستگاه کلدال اندازه‌گیری شد. در آزمایش دیگر، میزان نیتروژن در نمونه فاقد تری‌کلرواستیک‌اسید اندازه‌گیری شد. درجه هیدرولیز با استفاده از رابطه زیر تعیین گردید:

$$\text{درجه هیدرولیز} = \left(\frac{TCA\ souble\ nitrogen}{total\ nitrogen}\right) \times 100$$

آماده‌سازی کشت‌های میکروبی

با انتقال سلول‌های *اشریشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* از کشت ذخیره به پلیت حاوی آگار مغذی و گرمخانه گذاری به مدت حداقل ۲۴ h (در

[1] 2.4 Anson units/g

[2] Nutrient agar

[3] Nutrient broth

[4] Wang jia Bing

[5] *Escherichia coli*

[6] *Bacillus cereus*

[7] *Staphylococcus aureus*

[8] TCA (*Trichloroacetic acid)*

www.SID.ir
Archive of SID

°C ۳۷) سلول‌ها فعال شدند. سپس، سلول‌ها از محیط آگار به درون محیط آبگوشت مغذی منتقل و در شرایط بهینه رشد (°C ۳۷) گرمخانه گذاری شد تا وارد فاز رشد لگاریتمی شوند (۱۶ تا ۲۰h پس از کشت). از این کشت تازه در آزمایش‌های تعیین فعالیت ضدمیکروبی استفاده شد (۱۷).

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی

ظرفیت ضد باکتریایی هیدرولیز شده‌های پروتئینی حاوی پپتیدها به‌روش ریزرقت[1] تعیین گردید (۱۷). سلول‌های باکتریایی هدف، از شب قبل از آزمایش در محیط آبگوشت مغذی کشت داده شدند. در هر لوله آزمایش ۶۰۰µl کشت باکتریایی تازه (در مرحله رشد لگاریتمی)، ۱۲۰۰µl محیط کشت مغذی استریل و ۱۲۰۰µl محلول هیدرولیز شده‌ی استریل (فیلترشده با فیلتر سرنگی ۰/۲ µm) قرار داده شد. سپس لوله‌های آزمایش تحت شرایط استریل در °C ۳۷ گرمخانه گذاری شدند و کدورت چاهک‌ها پس از ۲۰h در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

اثر ضد میکروبی هیدرولیز شده‌های حاوی پپتید با اندازه‌گیری نسبت جذب محلول ویال‌های تیمار به ویال نمونه کنترل (فاقد ترکیب مهارکننده) و با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید. در نمونه کنترل به‌جای هیدرولیز شده‌ی پروتئینی از ۱۲۰۰ µm آب مقطر استریل استفاده شد.

$$\text{فعالیت مهارکنندگی} = (1 - \frac{As}{Ac}) \times 100$$

که در آن As، جذب نمونه تیمار با حضور مهارکننده و Ac جذب نمونه کنترل است.

طراحی آزمایش و تجزیه‌وتحلیل آماری

در این پژوهش در طراحی آزمایش‌ها از آزمایشات فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. متغیرهای مستقل عبارت بودند از نسبت آنزیم به سوبسترای پروتئینی (در دو سطح ۱/۵ و ۲/۵ درصد) و مدت‌زمان هیدرولیز (در چهار سطح ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ min). آنالیز آماری داده‌ها با نرم‌افزار SAS و مقایسات میانگین با استفاده از روش حداقل تفاوت معنی‌دار[2] در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام گرفت.

نتایج

نتایج مربوط به اثر مهارکنندگی تمام هیدرولیز شده‌های به‌دست‌آمده از پروتئین سویا تحت تیمارهای مختلف در برابر رشد برخی باکتری‌های شاخص بیماری‌زا و فساد مواد غذایی در جدول ۱ آورده شده است. هیدرولیز در تیمارهایی که در آن‌ها نسبت آنزیم به سوبسترا صفر است، مبین گروه‌های کنترل است. ازآنجاکه درجه هیدرولیز بیانگر میزان پیشرفت هیدرولیز آنزیمی است و همچنین به دلیل نقش غیرمستقیم شدت هیدرولیز پروتئین بر فعالیت مهارکنندگی پپتیدها و هیدرولیز شده‌های به‌دست‌آمده، درجه هیدرولیز نیز به‌عنوان یک پاسخ مهم اندازه‌گیری و نتایج آن در جدول ۱ آورده شد. همان‌طور که قابل‌انتظار بود، با افزایش زمان هیدرولیز درجه هیدرولیز نیز افزایش‌یافته تا نهایتاً به ۴۶/۵ درصد رسیده است. این میزان درجه هیدرولیز با به‌کارگیری نسبت آنزیم به سوبسترای ۱/۵ درصد پس از ۹۰ min به‌دست‌آمده است که تفاوت معنی‌داری با به‌کارگیری نسبت آنزیم به سوبسترای ۲/۵ درصد به مدت ۶۰ min نداشت. ضریب همبستگی بین درجه هیدرولیز و فعالیت ضد باکتریایی هیدرولیز شده‌ها در برابر باکتری‌های مورد آزمون در جدول ۲ آورده شده است. فعالیت مهارکنندگی هیدرولیز شده‌ها در برابر *اشرشیا کلی* با درجه هیدرولیز، همبستگی مثبت با ضریب ۰/۴۸ نشان می‌داد. همچنین فعالیت مهارکنندگی هیدرولیز شده‌ها در برابر *باسیلوس سرئوس* با درجه هیدرولیز، همبستگی مثبت با

[1] - Microdilution

[2] - Least Significant Difference (LSD)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. فعالیت مهارکنندگی هیدرولیزشده های پپتیدی به‌دست‌آمده تحت شرایط مختلف در برابر باکتری‌های شاخص موردمطالعه

نسبت آنزیم/سوبسترا (درصد)	زمان (min)	*E. coli*	*B. cereus*	*S. aureus*	DH
۰	۱۵	۰ d	۵ bcd	۵ ef	۰ d
	۳۰	۶ d	۰ d	۴/۵ ef	۱/۵ d
	۶۰	۳ d	۲ cd	۱/۵ f	۰/۵ d
	۹۰	۳/۵ d	۰ d	۳/۵ f	۲ d
۱/۵	۱۵	۶ d	۱۴ b	۵ ef	۵ cd
	۳۰	۴۶ b	۹ bc	۴۵/۴ a	۱۱/۶ bc
	۶۰	۵۳ ab	۱۱ bc	۱۲ ef	۱۷/۷ b
	۹۰	۲۴ c	۲۴ a	۳۵/۵ abc	۴۶/۵ a
۲/۵	۱۵	۴۲ b	۲۵a	۴۲ ab	۱۲/۳ bc
	۳۰	۵۸ a	۷ bcd	۳۰ bcd	۱۶/۱ b
	۶۰	۴۷ ab	۱۰ bc	۱۷/۵ de	۴۳ a
	۹۰	۳۰ c	۰ d	۲۶/۵ cd	۴۴/۹ a

در هر ستون، اعداد دارای حروف غیرمشابه دارای تفاوت معنی‌دار ($p\leq ۰/۰۵$) هستند.

جدول ۲. ضرایب همبستگی بین میزان فعالیت مهارکنندگی در برابر باکتری‌های مختلف و درجه هیدرولیز

مهار *E. coli*	مهار *B. cereus*	مهار *S. aureus*
۰/۴۸	۰/۳۳	۰/۴۸

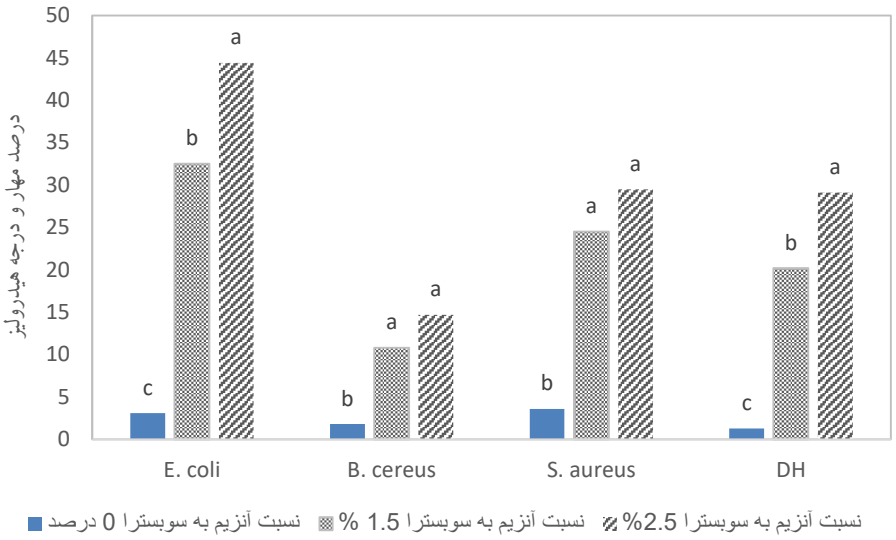
ضریب ۰/۳۳ و فعالیت مهارکنندگی هیدرولیزشده ها در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* با درجه هیدرولیز همبستگی مثبت با ضریب ۰/۴۸ نشان داد. البته تمام ضرایب همبستگی غیر معنی‌دار بودند.

چنانچه در جدول ۱ دیده می‌شود، تفاوت معنی‌داری بین فعالیت هیدرولیز شده‌های حاصله تحت تیمارهای مختلف وجود دارد. آنچه مشخص است این است که هیدرولیز آنزیمی پروتئین موجب افزایش معنی‌دار فعالیت ضد باکتریایی پروتئین سویا گردید. استفاده از آنزیم در غلظت ۲/۵ درصد (نسبت به سوبسترای پروتئینی هیدرولیز نشده) پس از ۳۰ min هیدرولیز منجر به تولید پپتیدها و هیدرولیز شده‌هایی شد که حداکثر فعالیت مهارکنندگی معادل ۵۸ درصد را در برابر *اشرشیا کلی* نشان می‌دادند. این میزان فعالیت مهارکنندگی باقدرت مهارکنندگی پپتیدهای به‌دست‌آمده پس از ۶۰ min هیدرولیز پروتئین سویا در محلول حاوی ۱/۵ درصد آنزیم آلکالاز تفاوت معنی‌داری نداشت. در مورد اثر ضد باکتریایی هیدرولیز شده‌ها در برابر *باسیلوس سرئوس* اگرچه به‌طورکلی فعالیت مهارکنندگی چندان رضایت‌بخش نبود، اما بالاترین فعالیت مربوط به پپتید-هایی بود که با استفاده از ۲/۵ درصد آنزیم آلکالاز به مدت ۱۵ min یا ۱/۵ درصد آنزیم به مدت ۹۰ min به‌دست‌آمده بودند. همچنین پس از ۳۰ min هیدرولیز پروتئین سویا در محلول حاوی ۱/۵ درصد آنزیم آلکالاز پپتیدها و هیدرولیز شده‌هایی به دست آمد که قادر بودند ۴۵/۴ درصد فعالیت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را مهار کنند.

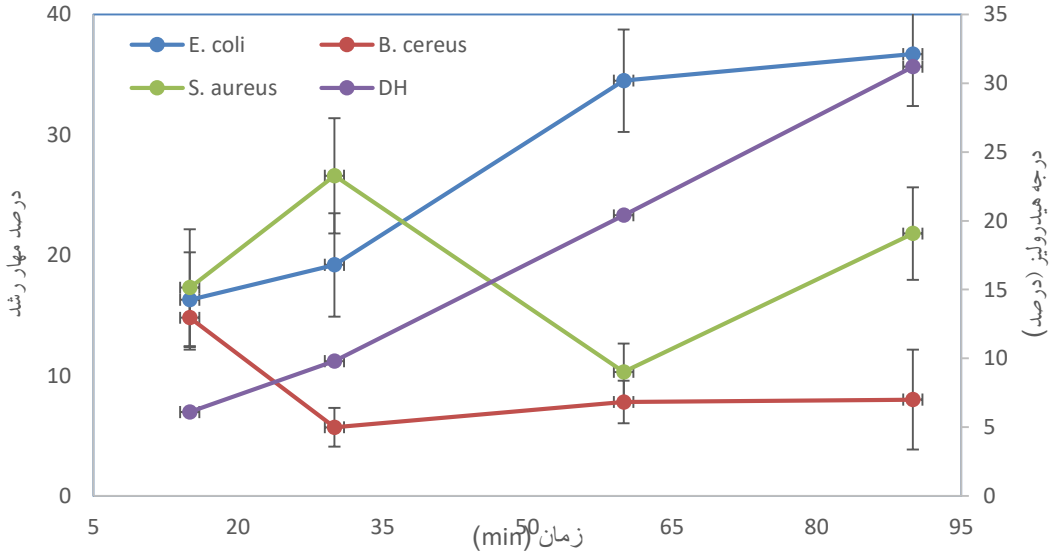
شکل‌های ۱ و ۲ نشان‌دهنده اثر کلی متغیرهای فرایند آنزیمی یعنی نسبت آنزیم به سوبسترا و مدت‌زمان هیدرولیز را بر فعالیت ضد باکتریایی پپتیدهای حاصله و همچنین پیشرفت هیدرولیز نشان می‌دهد. بر اساس آنالیز آماری انجام‌شده، استفاده از غلظت‌های بالاتر آنزیم اثر معنی‌داری بر پیشرفت هیدرولیز و همچنین فعالیت مهارکنندگی پپتیدهای حاصله در برابر *اشرشیا کلی* داشته است. بااین‌وجود، به‌کارگیری غلظت آنزیمی بالاتر، تأثیر معنی‌داری بر فعالیت ضد باکتریایی پپتیدهای حاصله در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* نشان نداد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. اثر کلی نسبت‌های مختلف آنزیم به سوبسترا بر فعالیت ضد باکتریایی هیدرولیزشده های پپتیدی حاصله و پیشرفت هیدرولیز



شکل ۲. اثر کلی مدت‌زمان هیدرولیز بر فعالیت ضد باکتریایی هیدرولیزشده های پپتیدی حاصله و پیشرفت هیدرولیز

در مورد اثر زمان‌بر درجه هیدرولیز، به‌طورکلی با افزایش مدت‌زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز نیز افزایش یافت که البته قابل‌انتظار بود. با افزایش زمان هیدرولیز تا ۶۰ min اثر مهارکنندگی پپتیدها و هیدرولیز شده‌ها بر *اشرشیا کلی* به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. این اثر مهارکنندگی با طولانی‌تر شدن هیدرولیز تا ۹۰ min نیز افزایش یافت که البته تفاوت معنی‌داری با ۶۰ min نشان نداد. طولانی‌تر شدن هیدرولیز پروتئین بر فعالیت مهارکنندگی پپتیدهای حاصله در برابر *باسیلوس سرئوس* اثر معنی‌دار کاهنده داشت به‌نحوی‌که پپتیدهای به‌دست‌آمده از ۱۵ min هیدرولیز به‌طور معنی‌داری فعالیت بالاتری نسبت به پپتیدهای به‌دست‌آمده پس از ۳۰، ۶۰ و ۹۰ min هیدرولیز نشان دادند. این در حالی است که روند مشخصی در ارتباط با اثر افزایش زمان

www.SID.ir

هیدرولیز بر فعالیت مهارکنندگی پپتیدهای حاصله در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده نشد.

بحث

درجه هیدرولیز، میزان باندهای پپتیدی شکسته شده در یک سوبسترای پروتئینی توسط عامل پروتئولیتیک را نشان می‌دهد. فعالیت بیولوژیکی پپتیدهای آزادشده از پروتئین‌ها به سوبسترای پروتئینی، ویژه‌گزینی آنزیم هیدرولیز کننده، ساختار مولکولی و اندازه پپتیدها و شرایط هیدرولیز بستگی دارد که اغلب این فاکتورها خود تابع درجه هیدرولیزاند (۱۸). چنگ[1] و همکاران (۱۹) و سیلا[2] و همکاران (۱۴) گزارش دادند که هیدرولیز شده‌های پروتئینی اثر خود را در درجه هیدرولیزهای خاصی نشان می‌دهند و شدت این اثر بسته به درجه هیدرولیز به‌طور قابل‌توجهی متغیر است. والد[3] و همکاران (۱۸) نیز گزارش دادند که درجه هیدرولیز تأثیر قابل‌توجهی بر فعالیت ضد باکتریایی هیدرولیز شده‌های پپتیدی ماهی سالمون داشته است و بیشترین اثر ضد باکتریایی در درجه هیدرولیز ۳۰ درصد حاصل‌شده است. در مطالعه حاضر، با افزایش درجه هیدرولیز از حدود ۲۰ به ۳۱ درصد، افزایش معنی‌داری در فعالیت مهارکنندگی پپتیدها در برابر *اشرشیا کلی* مشاهده نگردید که خود گواه و تأییدی بر یافته‌های مطالعات پیشین است که بیان می‌کنند لزوماً با افزایش شدت هیدرولیز، فعالیت ضدمیکروبی پپتیدها و هیدرولیز شده‌ها افزایش نمی‌یابد. همچنین سیلا و همکاران (۱۴) گزارش دادند که هیدرولیز شده‌های دارای درجه هیدرولیز پایین و هیدرولیز شده‌های دارای درجه هیدرولیز بالا فاقد فعالیت ضدمیکروبی اند برعکس در درجه هیدرولیزهای بینابینی فعالیت ضدمیکروبی بسیار مطلوب بوده است. بین درجه هیدرولیز و طول زنجیر پپتیدهای حاصله، نسبت عکس برقرار است (۲۰). برخلاف پپتیدهای ضد فشارخون و آنتی‌اکسیدان که اندازه‌های بسیار کوچک دارند و عمدتاً کمتر از ۶ باقیمانده آمینواسیدی در ساختار خوددارند (۱ و ۲)، پپتیدهای ضدمیکروبی ازنظر سایز چندان کوچک نیستند و گاها حاوی ۳۰ یا ۵۰ باقیمانده آمینواسیدی هستند؛ بنابراین شاید بتوان گفت جهت تولید پپتیدهای ضدمیکروبی نیاز به هیدرولیز شدید پروتئین و تولید پپتیدهای بسیار کوچک نیست.

هیدرولیز شده‌ها و پپتیدهای به‌دست‌آمده از پروتئین‌های غذایی به‌ویژه پروتئین‌های شیر علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های عامل فساد و بیماری‌زا مؤثر بوده‌اند. هیدرولیز شده‌های به‌دست‌آمده از هضم آلفا-کازئین گاوی در برابر *باسیلوس سرئوس* و *اشرشیا کلی* فعالیت مهارکننده داشته است (۲۰). همچنین هیدرولیز کازئین شیر بز نیز در برابر چندین باکتری گرم مثبت و گرم منفی فعالیت مهارکننده داشته است (۲۱). بااین‌وجود اغلب پپتیدها و هیدرولیز شده‌های به‌دست‌آمده از پروتئین‌های غذایی در برابر باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با گرم‌منفی‌ها فعالیت مهارکنندگی به‌مراتب قوی‌تری نشان داده‌اند. به‌طور مثال، در مطالعه کوریا[4] و همکاران روی تولید پپتید از کازئینات شیر بز، محصولات هیدرولیز تنها بر باکتری‌های گرم مثبت اثر داشتند (۲۲) و هیدرولیز شده‌های به‌دست‌آمده از هضم آلکالازی پروتئین‌های جگر مرغ علیرغم اثر قابل‌توجهی که بر رشد باکتری‌های گرم مثبت داشتند هیچ‌گونه اثر مهارکننده‌ای در برابر *اشرشیا کلی* نشان نداد (۲۳). همچنین در مطالعه لیو[5] و همکاران روی هیدرولیز آنزیمی صدف با آلکالاز، هیدرولیز شده‌های حاصله بر باکتری‌های گرم مثبت مؤثرتر بودند (۲۴). در مطالعه مویدی[6] و همکاران نیز، اثر مهارکنندگی فاز پپتیدی به‌دست‌آمده از هیدرولیز پروتئین دانه گوجه‌فرنگی بر *باسیلوس سرئوس* نسبت به *اشرشیا کلی* حدود دو برابر بیشتر بود (۱۷). مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی در برابر پپتیدهای ضدمیکروبی به پیچیدگی

[1] Cheng
[2] Sila
[3] Wald
[4] Corre
[5] Liu
[6] Moayedi

www.SID.ir
Archive of SID

ساختاری و عملکردی غشای سیتوپلاسمی و پوشش‌های محافظتی آن‌ها در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت نسبت داده می‌شود (۲۲)؛ اما همان‌گونه که دیده شد، هیدرولیز شده‌های پپتیدی به‌دست‌آمده از پروتئین سویا در مطالعه حاضر فعالیت مهارکنندگی بسیار قوی‌تری در برابر باکتری گرم‌منفی *اشرشیا کلی* در مقایسه با باکتری‌های گرم‌مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* داشته است. با توجه به نقش بسیار مهم *اشرشیا کلی* در بیماری‌زایی و همچنین ضعف بسیاری از پپتیدهای ضدمیکروبی جداسازی شده از منابع پروتئینی (بر اساس مقالات پیشین) در برابر این باکتری، یافته‌های این مطالعه می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد.

نتیجه‌گیری

با بررسی نتایج مطالعه حاضر، چنین استدلال می‌شود که با هیدرولیز ایزوله پروتئینی سویا به مدت ۶۰ تا ۹۰ min می‌توان به هیدرولیز شده‌هایی دست یافت که به نحو مؤثری از رشد *اشرشیا کلی* ممانعت می‌کنند. ازاین‌رو می‌توان از هیدرولیز شده‌های حاصله در فرمولاسیون برخی مواد غذایی استفاده کرد. عدم فعالیت مهارکنندگی مناسب هیدرولیز شده‌های پپتیدی به‌دست‌آمده در این مطالعه در برابر *باسیلوس سرئوس* بیانگر عدم موفقیت هیدرولیز آنزیمی ایزوله پروتئینی سویا در تولید ترکیبی طبیعی با چنین اثر مهارکنندگی حداقل در شرایط بکار گرفته‌شده در این مطالعه است. همچنین ازآنجاکه روند اثر مهارکنندگی هیدرولیز شده‌ها در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* چندان قابل پیش‌بینی نبود، مطالعه دقیق‌تر در این زمینه و انتخاب متغیر-های بیشتر پیشنهاد می‌گردد.

منابع

1. Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. Peptides. 2010; 31(10): 1949-1956.

2. Korhonen H, Pihlanto A. Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. Current pharmaceutical design. 2003; 9(16): 1297-1308.

3. Power O, Jakeman P, FitzGerald R. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. Amino Acids. 2013; 44(3): 797-820.

4. Bamdad F, Sun X, Guan LL, Chen L. Preparation and characterization of antimicrobial cationized peptides from barley (Hordeum vulgare L.) proteins. LWT- Food science and Technology. 2015; (63): 29-36.

5. Shahidi F, Zhong Y. Bioactive peptides. Journal of AOAC International. 2008; 91(4): 914-931.

6. Kent RM, Guinane CM, O'Connor CM, Fitzgerald GF, Hill C, Stanton C, Ross RP. Production of antimicrobial peptides caseicin A and B by Bacillus isolates growing on sodium caseinate. Letters in Applied Microbiology. 2012; 141-148.

7. Sedaghati M, Ezzatpanah H, Mashhadiakbar Boojar M, Tajabadi Ebrahimi M, Aminafshar M. Plasmin-digest of β-lactoglobulin with antibacterial properties. Food and Agricultural Immunology. 2014; 1-13.

8. Salami M, Moosavi-Movahedi AA, Ehsani MR, Yousefi R, Haertlé T, Chobert JM, et al. Improvement of the antimicrobial and antioxidant activities of camel and bovine whey proteins by limited proteolysis. Journal of agricultural and food chemistry, 2010; 58(6): 3297-3302. Jemil I, Jridi M, Nasri R, Ktari N, Salem RB S-B, Mehiri M,... Nasri M. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by Bacillus subtilis A26. Process Biochemistry. 2014; 49(6): 963-972.

9. Tan YN, Ayob MK, Wan Yaacob WA. Purification and characterisation of antibacterial peptide-containing compound derived from palm kernel cake. Food Chemistry. 2013; (136): 279-284.

10. Hrčková M, Rusňáková M, Zemanovič J. Enzymatic hydrolysis of defatted soy flour by three different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysate. Czhech Journal of Food Science. 2002; 7-14.

11. Tsumura K, Saitoa T, Tsuge K, Ashida H, Kugimiya W, Inouye K. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. LWT- Food science and Technology. 2005; (38): 255-261.

12. Chiang WD, Shih CJ, Chu YH. Functional properties of soy protein hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. Food Chemistry. 1999; 65: 189-194.

13. Sila A, Nedjar-Arroume N, Hedhili K, et al. Antibacterial peptides from barbel muscle protein

Archive of SID

www.SID.ir

LWT-Food Science and Technology. 2013; 50(2): 378-385.

20. Srinivas S, Prakash V. Bioactive peptides from bovine milk α-casein: isolation, characterization and multifunctional properties. International Journal of peptide Research and Therapeutics. 2010; 16: 7–15.

21. Lopez-Exposito I, Gomez-Ruiz JA, Amigo L, Recio I. Identification of antibacterial peptides from ovine αs2-casein. International Dairy Journal. 2006; 16: 1072–1080.

22. Corrêa APF, Daroit DJ, Coelho J, Meira SM, Lopes FC, Segalin J, Risso PH, Brandelli A. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2013; 91(12): 2247-2254.

23. Chakka AK, Elias M, Jini R, Sakhare PZ, Bhaskar N. *In-vitro* antioxidant and antibacterial properties of fermentatively and enzymatically prepared chicken liver protein hydrolysates. Journal of Food Science and Technology. 2015; 52(12): 8059-8067.

24. Liu Z, Dong S, Xu J, Zeng M, Song H, Zhao Y. Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (Crassostrea gigas) with alcalase and bromelin. Food Control. 2008; 19: 231-235.

hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria. LWT- Food science and Technology. 2014; 55 (1): 183-186.

14. Tang CH, Wang XS, Yang XQ. Enzymatic hydrolysis of hemp (Cannabis sativa L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. Food Chemistry. 2009; 114: 1484-1490.

15. Hoyle N, Merritt J. Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (Clupea harengus). Journal of food science.1994; 59 (1): 76-79.

16. Moayedi A, Hashemi M, Safari M. Valorization of tomato waste proteins through production of antioxidant and antimicrobial hydrolysates using proteolytic bacillus subtilis. Journal of food science and technology. 2016; (53): 391-400.

17. Wald M, Schwarz K, Rehbein H, Bubmann B, Beermann. Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. Food Chemistry. 2017; 1-38.

18. Cheng X, Tang X, Wang Q, Mao XY. Antibacterial effect and hydrophobicity of yak k-casein hydrolysate and its fractions. International Dairy Journal. 2013; 31(2): 111-116.

19. Kotlar C, Ponce A, Roura S. Improvement of functional and antimicrobial properties of brewery byproduct hydrolysed enzymatically.

Archive of SID

www.SID.ir

Antibacterial activity of protein hydrolysates obtained from enzymatic digestion of soy protein isolate on some food indicator bacteria

Ali Moayedi[1*], Mahnaz Nikpayam[2], Morteza Khomeiri[2], Seyed Soheil Amiri Aghdaei[1]

[1]Department of food science and technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

[2]Department of food science and technology, Baharan Institute of higher education, Gorgan, Iran

Abstract

In this study, soy protein isolate (SPI) was hydrolyzed using Alcalase with the aim of generating natural antibacterial components. Then, antibacterial activities of resulting protein hydrolysates were investigated against some indicator bacteria including *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, and *Staphylococcus aureus*. Enzyme to substrate ratio (E/S) and hydrolysis time were chosen as process variables. Degree of hydrolysis (DH) and its effects on hydrolysates activity were also evaluated. The maximum DH was observed after protein hydolysis for 90 min at E/S value of 1.5%, which was not significantly different from that observed after 60 min at E/S of 2.5%. According to the results, enzymatic hydrolysis effectively enhanced antibacterial activity of SPI. The obtained hydrolysates showed the highest activity against *E. coli* and the least effect on *B. cereus*. Applying higher enzyme concentration showed significant effect on hydrolysis progress and also on inhibitory activity of hydrolysates against *E. coli*, but not against *B. cereus* and *S. aureus.* The effect of increase in hydrolysis time on the inhibitory activity of resulting hydrolysates against different tested bacteria was highly varied. In overall, the results of this study showed that with controlled enzymatic hydrolysis of SPI, peptides with considerable antimicrobial activity against *E. coli* may be obtained that can be used in food formulation.

Key words: Antimicrobial peptides, Bioactive peptide, Enzymatic Hydrolysis

Archive of SID

[*] **amoayedi@ut.ac.ir**

www.SID.ir