اصلاح شیمیایی لیزوزیم از طریق واکنش میلارد با دکستران و بررسی خواص ضدمیکروبی آنزیم اصلاح شده

محمود امین لاری[a]، رقیه رمضانی[b]، صدیقه امیری[c*]

[a] استاد دانشگاه شیراز، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه، شیراز، ایران
[b] مربی دانشگاه شیراز، دانشکده کشاورزی، بخش علوم و صنایع غذایی، شیراز، ایران
[c] عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یاسوج، گروه صنایع غذایی، باشگاه پژوهشگران جوان، یاسوج، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۲/۱۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۶/۲۱

چکیده

مقدمه: لیزوزیم یک آنزیم طبیعی است که دارای اثر ضدمیکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت است، اما بر باکتری‌های گرم منفی بی‌تاثیر است، همین عامل استفاده صنعتی آن را محدود کرده است. هدف از این تحقیق اتصال دکستران به لیزوزیم به منظور بهبود خواص ضدمیکروبی آنزیم است.

مواد و روش‌ها: گلیکوزیله کردن لیزوزیم با دکستران با نسبت وزنی ۱:۵، در دمای $60^{\circ}C$ به مدت یک هفته و در رطوبت نسبی ۷۹٪ انجام شد. برای بررسی اتصال لیزوزیم به دکستران، الکتروفورز به‌روش SDS-PAGE انجام گرفت و از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با سفادکس G-100 برای خالص‌سازی لیزوزیم کنژوگه شده استفاده گردید. در نهایت، فعالیت آنزیمی، گروههای آمینی آزاد و فعالیت ضدمیکروبی آنزیم اصلاح شده بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصل از SDS-PAGE الکتروفورز، اتصال لیزوزیم به دکستران را تایید کرد و اندازه گیری گروه‌های آمینی آزاد نشان داد که ۳/۷ مول دکستران به یک مول لیزوزیم متصل شده است، در حالی‌که فعالیت آنزیم کنژوگه در اثر گلیکوزیله شدن به میزان ۳۷/۶۳ ٪ کاهش یافت. نتایج حاصل از بررسی اثر ضدمیکروبی نشان داد که گلیکوزیله کردن لیزوزیم با دکستران، آنزیم را علیه باکتری گرم منفی *E. coli* موثر کرد و با افزایش غلظت لیزوزیم کنژوگه شده اثر ضدمیکروبی آن نیز افزایش یافت. اثر ضدباکتریایی کنژوگه لیزوزیم-دکستران در برابر باکتری گرم مثبت *Staph. aureus* تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با آنزیم اصلاح نشده نشان نداد.

نتیجه‌گیری: بنابر نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، کنژوگه کردن لیزوزیم به دکستران مصرف بالقوه آنزیم را در فرمولاسیون مواد غذایی به‌عنوان یک عامل ضدباکتریایی مناسب افزایش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: *اثر ضدمیکروبی، اصلاح شیمیایی، دکستران، لیزوزیم.*

[*] نویسنده مسئول مکاتبات email: sedighehamiri@gmail.com

jftn.srbiau.ac.ir

مقدمه

در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی جهت بهبود روش‌های نگهداری مواد غذایی صورت گرفته است که تنها شمار معدودی از آن‌ها تاکنون در صنعت مواد غذایی کاربرد داشته است. تلاش برای بهبود کیفیت مواد غذایی باعث شده که توجه بسیاری از محققان به روش‌های نگهداری غیرحرارتی معطوف گردد (Devlieghere *et al.*, 2004). استفاده از نگهدارنده‌ها یکی از این روش‌ها است که درسال‌های گذشته نیز کاربرد داشته است. آنزیم لیزوزیم یکی از مهم‌ترین ترکیبات نگهدارنده و ضدمیکروبی طبیعی است که بطور فراوان در طبیعت یافت می‌شود و به‌وسیله گیاهان، قارچ‌ها، باکتری‌ها، پرندگان و پستانداران تولید می‌گردد (Gill & Holley, 2003). مشاهده شده است که بین میزان ترشح لیزوزیم در بسیاری از بافت‌ها و عفونت‌های باکتریایی ارتباطی معنی‌دار وجود دارد (Ibrahim *et al.*, 1996). این آنزیم در سال ۱۹۲۲ توسط الکساندر فلمینگ کشف گردید (Gill & Holley, 2000). انعطاف پذیری زنجیره اصلی لیزوزیم بدلیل وجود ۴ پیوند دی سولفید در ساختار آن، حتی در محلول‌ها، بسیار محدود شده است (Takahashi *et al.*, 2000). در کنار فعالیت ضدمیکروبی، لیزوزیم می‌تواند برخی از ویروس‌ها را از طریق تشکیل کمپلکس‌های نامحلول غیرفعال کند، فعالیت فاگسیتوزی لوکوسیت‌های چند هسته‌ای را بهبود بخشد، و فعالیت ضدموتوری مونوسیت‌ها را تحریک کند (Ibrahim *et al.*, 1996). لیزوزیم، محصولی با ارزش افزوده محسوب می‌گردد (Naidu, 2000) که در مقیاس صنعتی، از سفیده تخم مرغ استخراج می شود. اثرات ضدمیکروبی لیزوزیم از یک سمت و نداشتن اثرات سمی بر انسان از سویی دیگر، کاربرد این آنزیم را در غذاهایی که حداقل میزان فرآورش را دیده‌اند مناسب کرده است. لیزوزیم آنزیمی مؤثر بر باکتری‌های گرم مثبت است، اما باکتری‌های گرم منفی توسط لایه لیپوپروتئین/لیپوپلی ساکاریدی (LPS) خود در برابر آنزیم محافظت می‌شوند (Gill & Holley, 2003). خاصیت ضدباکتریایی لیزوزیم را از سه طریق می توان بهبود بخشید: ۱) شکستن دیواره خارجی باکتری برای تسهیل نفوذ آنزیم و عمل بر دیواره داخلی باکتری که با استفاده از روش‌های شیمیایی و یا فیزیکی امکان‌پذیر است. ۲) تغییر شیمیایی، فیزیکی، آنزیمی و یا ژنتیکی خود آنزیم ۳) استفاده از ترکیب لیزوزیم و دیگر عوامل ضد میکروبی که اثر تشدیدکنندگی در کنار همدیگر داشته باشند و یا آنکه بتوانند بطور همزمان به اهداف مختلف باکتریایی هجوم آورند (Touch *et al.*, 2004). هدف از این تحقیق اصلاح آنزیم لیزوزیم با استفاده از دکستران از طریق انجام واکنش میلارد برای بهبود خاصیت ضدمیکروبی آن است.

مواد و روش‌ها

- مواد

لیزوزیم از شرکت آنواتک (Anovatech) کانادا با وزن مولکولی ۱۴۶۰۰ دالتون تهیه گردید، دکستران با وزن مولکولی ۱۰۵۰۰دالتون، دیوارهٔ سلولی *lysodeikticus Micrococcus* ، تری نیترو بنزن سولفونیک اسید (Trinitrobenzenesulfonate) و سفادکس G-100 (Sephadex) از شرکت سیگما (Sigma) آمریکا خریداری شدند. سایر مواد از نوع آنالیتیکال بوده و از منابع تجاری تهیه گردیدند.

- گلیکوزیله کردن لیزوزیم با دکستران در حالت پودر لیوفیلیزه شده

۴۰۰ میلی‌گرم لیزوزیم و ۲ گرم دکستران در ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار با pH=۷ حل شده و سپس مخلوط حاصل لیوفیلیزه گردید. پودر حاصل به مدت ۱ هفته در دمای ۶۰°C درحضور بروماید پتاسیم اشباع به منظور تامین رطوبت نسبی ۷۹٪ قرار داده شد. یک نمونه لیزوزیم بدون دکستران نیز به عنوان شاهد تحت شرایط مذکور قرار داده شد.

- انجام کروماتوگرافی به روش ژل فیلتراسیون (صافی مولکولی)

از رزین سفادکس G-100 برای بررسی میزان گلیکوزیله شدن و همچنین جداسازی لیزوزیم گلیکوزیله شده از لیزوزیم اصلاح نشده استفاده گردید (Delaney, 1980). میزان ۵۰ میلی گرم پروتئین، از لیزوزیم اصلاح نشده، لیزوزیم اصلاح شده با دکستران و لیزوزیم حرارت دیده، هر یک بطور جداگانه، برداشته شد و در ۰/۵ میلی لیتر از بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با pH =۷/۴ حل گردید و

jftn.srbiau.ac.ir

سپس با دور rpm ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی از رسوب جدا شده و برای گذاشتن بر روی ستون استفاده شد. ستون به منبع بافر متصل گردید و خروجی ستون به میزان ۳ میلی لیتر محلول در هر لوله جمع‌آوری شد. جذب نوری لوله‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و کروماتوگرام مربوطه رسم گردید.

- اندازه‌گیری پروتئین محلول در مایع فوقانی به روش لوری

برای اندازه گیری میزان پروتئین محلول در مایع فوقانی محلول کنژوگه لیزوزیم - دکستران از روش لوری استفاده گردید (Lowry, 1951). رنگ آبی تولیدی در این روش ناشی از واکنش یون مس دو ظرفیتی با باندهای پپتیدی پروتئین و احیاء فسفومولیبدات – فسفو تنگستیک اسید توسط گروه‌های تیروزین و تریپتوفان موجود در پروتئین است. شدت رنگ تولیدی رابطه ای مستقیم با غلظت پروتئین موجود در نمونه دارد.

- الکتروفورز

برای بررسی میزان دکستران متصل شده به پروتئین لیزوزیم الکتروفورز به روش SDS-PAGE و بر روی ژل جداکننده آکریل آمید با غلظت ۱۰٪ انجام گرفت (Laemmli, 1970). غلظت پروتئین در نمونه‌ها به‌گونه‌ای تنظیم شد که بعد از رقیق سازی با آب مقطر و بافر نمونه، ۲ میکروگرم در میکرولیتر باشد. ژل جداکننده با ابعاد ۱×۱۴۰×۱۴۰ میلی‌متر با غلظت ثابت ۱۰٪ آکریل آمید در ۱/۲ mol/liter محلول تریس-HCl (pH= ۸/۸) و g/liter ۳ سدیم دو دسیل سولفات تهیه گردید. ژل رویی حاوی g/liter ۳۰ آکریل آمید در ۰/۲۵ mol/liter تریس- کلریدریک اسید (pH=۶/۸) و g/liter ۲ سدیم دودسیل سولفات بود. بافر الکترود حاوی mol/liter ۰/۰۲۵ تریس-کلریدریک اسید، mol/liter ۰/۱۹۲ گلایسین و g/liter ۱/۵ سدیم دودسیل سولفات با pH= ۸/۱۶ بود. میزان جریان الکتریسیته (آمپرسنج) روی ۱۵ میلی‌آمپر برای یک ژل تنظیم گردید. ژل در محلول g/liter ۲/۵ کوماسی بریلینت بلو در g/liter ۵۰۰ استیک اسید- g/liter ۲۵۰ متانول رنگ‌آمیزی شد و در g/liter ۱۰۰ استیک اسید-g/liter ۷۰ متانول رنگ‌بری گردید.

- تعیین میزان گروه‌های آمینی بلاک شده لیزوزیم توسط دکستران با روش تری نیترو بنزن سولفونیک اسید

برای تعیین میزان گروه‌های آمینی بلاک شده از واکنش تری نیترو بنزن سولفونیک اسید با گروه‌های آمینی پروتئین در pH=۷ استفاده گردید (Habeeb, 1966). یک میلی گرم از نمونه‌های شاهد و اصلاح شده در یک میلی لیتر آب مقطر حل شده و در g ×۲۷۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. سپس از محلول رویی به میزان ۰/۳ میلی گرم پروتئین برداشته شد و حجم هر یک از نمونه‌ها با آب مقطر به یک میلی لیتر رسانده شد. سپس یک میلی لیتر محلول ۴٪ بیکربنات سدیم ($NaHCO_3$) و محلول ۰/۱٪ تری نیترو بنزن سولفونیک اسید اضافه گردید. محلول‌های آماده شده در دمای $40^{\circ}C$ برای مدت زمان ۲ ساعت در تاریکی قرار گرفتند. بعد از آن یک میلی لیتر از محلول سدیم دو دسیل سولفات ۱۰٪ (جهت افزایش حلالیت پروتئین در محلول) و نیم میلی لیتر اسید کلریدریک یک مولار اضافه شد. سپس جذب محلول‌های حاصله در طول موج ۳۳۵ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد نیز به همین ترتیب بر اساس میزان جذب نوری و غلظت لایسین رسم گردید.

- بررسی فعالیت آنزیمی لیزوزیم

سرعت تجزیه دیواره سلولی سوبسترای لیزوزیم، میکروکوکوس لیزودیکتیکوس، توسط لیزوزیم بیانگر فعالیت آنزیمی می‌باشد. ۳ میلی‌گرم از دیواره سلول‌های خشک شده میکروکوکوس لیزودیکتیکوس در ۲۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH=۷ حل شد و حجم نهایی با بافر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. ۲/۹ میلی‌لیتر از سوسپانسیون محلول سوبسترا داخل کووت، در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار گرفت. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول آنزیم تهیه شده با غلظت ۱ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر (از نمونه‌های شاهد و اصلاح شده)، در آب مقطر سرد حل شد. به کووت اضافه شد. تغییرات جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر به ازای هر دقیقه ثبت گردید (Imoto *et al.*, 1972).

- بررسی فعالیت میکروبی

باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* هر یک بطور

jftn.srbiau.ac.ir

جداگانه، در محیط کشت Plate count agar کشت داده شدند و از کلونی‌های آن برای کشت در محیط Nutrient broth برای مدت زمان ۱۵ ساعت در دمای ۳۷°C استفاده شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر از این محیط کشت به ۱۰ میلی لیتر محیط کشت Nutrient broth انتقال داده شد و مجددا در دمای ۳۷°C گرمخانه گذاری گردید تا جذب نوری ۰/۶ در طول موج ۶۷۵ نانومتر حاصل گردید. در این زمان با استفاده از روش شمارش کلونی، تعداد باکتری‌ها در این جذب نوری برآورد گردید. چون جمعیت باکتریایی بیشتر از حد مورد نظر بود، با استفاده از رقیق سازی دسیمال جمعیت باکتری‌ها به 10^6 رسید.

۱) ۴/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت Nutrient broth (حاوی جمعیت 10^6) به نیم میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۱۰ میلی مولارسترون با pH=۷ که حاوی:

الف) رقت‌های ۱۰۰ ، ۲۵۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از آنزیم لیزوزیم اصلاح نشده باشد.

ب) رقت‌های ۱۰۰ ، ۲۵۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از آنزیم لیزوزیم کنژوگه شده با دکستران باشد.

ج) رقت‌های ۱۰۰ ، ۲۵۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از آنزیم اصلاح شده با حرارت باشد.

د) نمونه کنترل که فاقد هر گونه آنزیم، اعم از اصلاح شده و نشده بود.

اضافه گردید و در حمام آب گرم در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در زمان‌های ۰ ، ۲۰ ، ۴۰ و ۶۰ دقیقه شمارش کلی باکتری‌ها انجام گرفت.

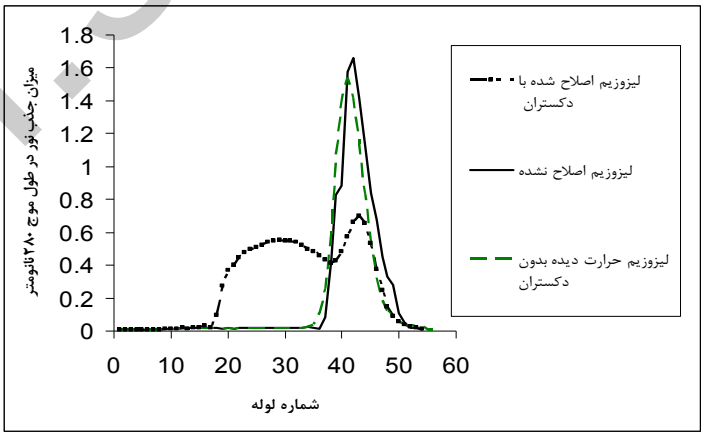
۲) ۴/۵ میلی لیتر از محیط کشت Nutrient broth (حاوی جمعیت 10^6) به نیم میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۱۰ میلی مولارسترون با pH=۷ حاوی آنزیم با غلظت‌های ذکر شده در قسمت (۱)، اضافه گردید و در گرمخانه ۳۷°C قرار داده شدند و جذب نوری آن‌ها به ازای هر یک ساعت در طول موج ۶۷۵ نانومتر خوانده شد.

- تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق از طرح آماری کاملا تصادفی استفاده شد و کلیه آزمایشات سه بار، هر بار در دو تکرار انجام شد و مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد به روش دانکن و با نرم افزار CO-STAT صورت گرفت.

یافته‌ها

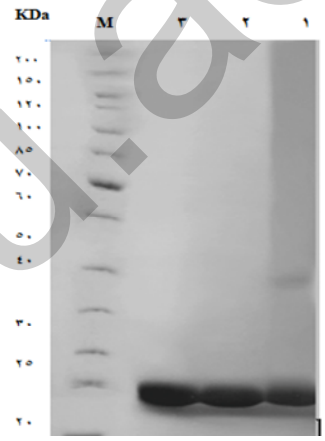
نتایج حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، گلیکوزیله شدن ملکول لیزوزیم توسط دکستران را به‌خوبی نشان داد. همانطوری‌که که در نمودار ۱ دیده می شود، لیزوزیم خالص واصلاح نشده، همچنین لیزوزیم حرارت دیده بدون دکستران یک منحنی مشخص را در محدوده‌ای یکسان نشان می دهند، این درحالی است که کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی نمونه اصلاح شده با دکستران دو منحنی را نشان می دهد که منحنی اول حکایت از خروج لیزوزیم گلیکوزیله شده دارد و منحنی دوم خروج لیزوزیم گلیکوزیله نشده را نشان می دهد.



نمودار ۱- کروماتوگرام حاصل از ژل فیلتراسیون G-100 نمونه های لیزوزیم گلیکوزیله نشده و گلیکوزیله شده (لیزوزیم اصلاح شده با دکستران با نسبت وزنی ۱ به ۵ و در دمای ۶۰ °C به مدت یک هفته در رطوبت نسبی ۷۹٪ تهیه گردید). اندازه ستون: (۱/۵×۹۰ سانتی‌متر)، بافر مورد استفاده: بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با pH = ۷/٤ ، سرعت جریان بافر: ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه، غلظت پروتئین: ۵۰ میلی‌گرم از لیزوزیم اصلاح نشده، لیزوزیم اصلاح شده با دکستران و لیزوزیم حرارت دیده در ۰/۵ میلی‌لیتر بافر

jftn.srbiau.ac.ir

نمودار ۲ الگوی الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰٪ نمونه‌های لیزوزیم گلیکوزیله نشده و گلیکوزیله شده را نشان می دهد. نمونه‌ها حاوی ۲-مرکاپتو اتانل هستند و در هر چاهک از ژل ۱۰٪، ۱۵ میکرولیتر نمونه آماده شده که حاوی ۳۷ میکروگرم نمونه می‌باشد، ریخته شد. همانطوری‌که در شکل ۲ مشاهده می گردد، در ستون شماره ۱ (لیزوزیم گلیکوزیله شده) در مقایسه با ستون‌های شماره ۲ و ۳ (لیزوزیم اصلاح نشده و لیزوزیم حرارت دیده بدون دکستران) باند پروتئینی گسترده‌تر شده است. در این ژل نیز کنژوگه کردن دکستران به لیزوزیم، باعث ظاهر شدن تدریجی یک باند کشیده و وسیع در ژل متراکم کننده شده در مقایسه با نمونه‌های گلیکوزیله نشده، شده است.



نمودار ۲- الگوی الکتروفورز لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران بر روی ژل پلی آکریل آمید با غلظت ۱۰٪.
ستون شماره ۱ : لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران به نسبت ۱ به ۵، ستون شماره ۲: لیزوزیم حرارت دیده بدون دکستران، ستون شماره ۳: لیزوزیم اصلاح نشده، ستون M : استاندارد پروتئین با وزن ملکولی ۲۰۰-۱۰ کیلودالتون

لیزوزیم با وزن ملکولی ۱۴۶۰۰ دارای ۷ گروه آمینی آزاد می باشد (Haynes *et al.*, 1967). بر اساس نتایج حاصل از آزمایش تعیین گروه‌های آمینی بلاک شده (جدول ۱)، در لیزوزیم گلیکوزیله شده ۳/۳ گروه از ۷ گروه آمینی لیزوزیم آزاد بود که نشان دهنده واکنش ۳/۷ مول دکستران با ۱ مول لیزوزیم است. تعداد گروه‌های آمینی آزاد لیزوزیم حرارت دیده (بدون دکستران) نیز قابل مقایسه با نوع لیزوزیم شاهد بود.

نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیمی (جدول ۱) حکایت از فعالیت آنزیمی معادل ۵۳۹/۵ U/mg protein برای لیزوزیم، ۳۳۶/۳۷ U/mg protein برای لیزوزیم گلیکوزیله شده و ۴۳۲/۴۱ U/mg protein برای لیزوزیم تیمار شده با حرارت (بدون دکستران) دارد. در لیزوزیم گلیکوزیله شده و تیمار شده با حرارت (بدون دکستران) فعالیت آنزیمی به ترتیب به میزان ۳۷/۶۳ ٪ و ۱۹/۸۵ ٪ در مقایسه با لیزوزیم اصلاح نشده کاهش یافت، نمونه‌ها اختلاف آماری معنی‌داری ($\rho < ۰/۰۵$) را با هم نشان دادند.

همانطوری‌که در نمودار ۳ مشاهده می گردد در خصوص باکتری *E. coli* نمونه‌های حاوی لیزوزیم کنژوگه شده با دکستران جذب کمتری را در مقایسه با نمونه کنترل نشان می دهند. جذب پایین‌تر، نشان دهنده اثر ضدمیکروبی بیشتر است. با افزایش غلظت لیزوزیم کنژوگه شده با دکستران از ۱۰۰ µg/ml به ۴۰۰ µg/ml ، اثر ضدمیکروبی افزایش یافته و نمونه‌ها جذب کمتری را نشان می دهند. لیزوزیم و لیزوزیم حرارت دیده بدون دکستران در غلظت‌های ۱۰۰ µg/ml و ۲۵۰ در مقایسه با نمونه کنترل، تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهند ($\rho < ۰/۰۵$) اما در غلظت ۴۰۰ µg/ml دارای تفاوت معنی‌داری با نمونه کنترل هستند.

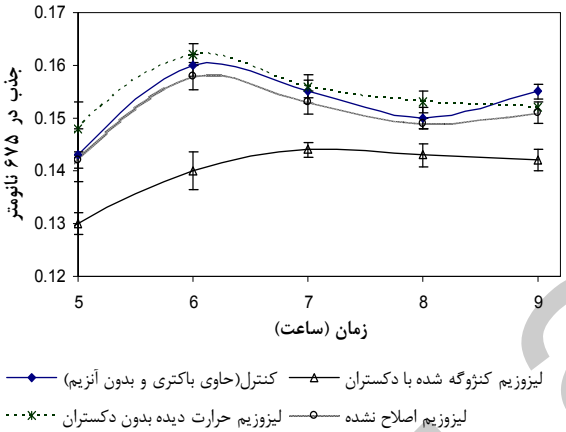
جدول ۱- تعداد گروه‌های آمینی آزاد و فعالیت آنزیمی لیزوزیم اصلاح نشده ، آنزیم اصلاح شده با دکستران و آنزیم حرارت دیده بدون دکستران

نمونه†	گروه NH_2 آزاد (مول در مول لیزوزیم)	فعالیت آنزیمی (واحد در میلی گرم پروتئین)
لیزوزیم	۷/۰ [a]	۵۳۹/۵۰ [a]
لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران	۳/۳ [b]	۳۳۶/۳۷ [b]
لیزوزیم حرارت دیده بدون دکستران	۷/۰ [a]	۴۳۲/۴۱ [c]

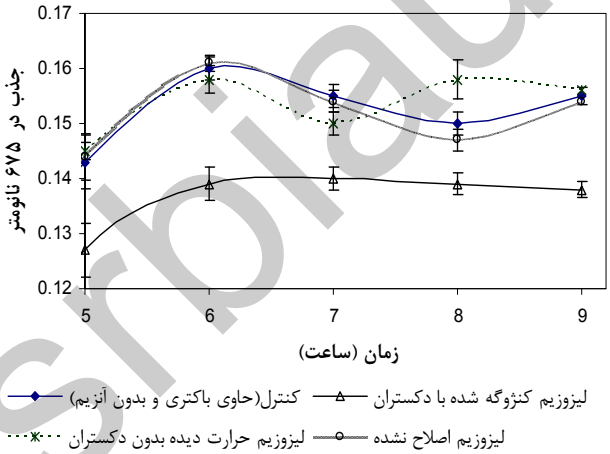
† اعداد نشان داده شده میانگین سه تکرار می باشند. [a,b] حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار($\rho < ۰/۰۵$) می باشند.

jftn.srbiau.ac.ir

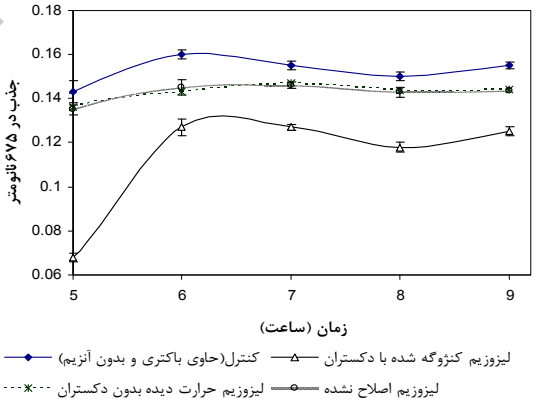
در بررسی اثر ضدمیکروبی لیزوزیم کنژوگه شده با دکستران بر باکتری گرم مثبت *Staph. aureus* مشاهده گردید که با افزایش غلظت آنزیم، جذب نمونه‌ها در مقایسه با نمو نه کنترل کاهش پیدا کرد، بدان معنی‌که با افزایش غلظت آنزیم، اثر ضدمیکروبی آن علیه باکتری گرم مثبت *Staph. aureus* افزایش یافت. تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های لیزوزیم اصلاح نشده، لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران و لیزوزیم حرارت دیده بدون دکستران دیده نشد، اما این نمونه‌ها با نمونه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان دادند (نمودار ۴).



الف



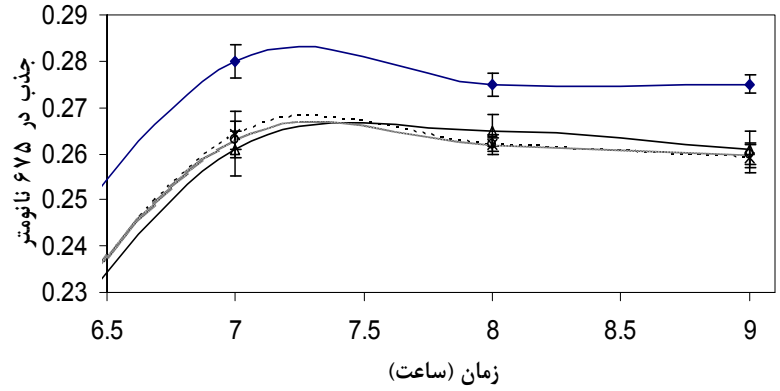
ب

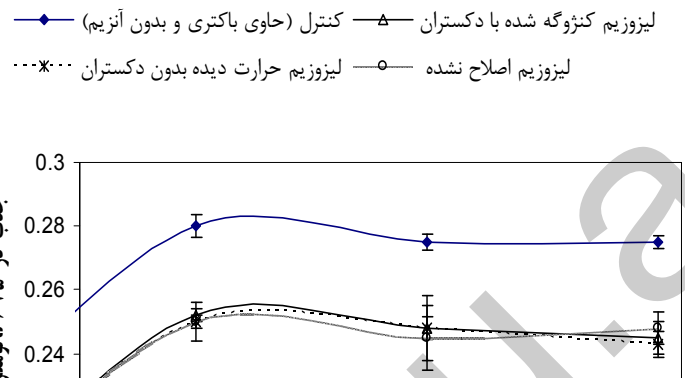


ج

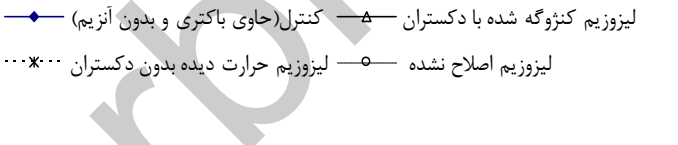
نمودار ۳- اثر ضدمیکروبی لیزوزیم اصلاح نشده، لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران و لیزوزیم حرارت دیده بدون دکستران در غلظت الف) ۱۰۰ µg/ml ب) ۲۵۰ µg/ml و ج) ۴۰۰ µg/ml بر باکتری گرم منفی *E . coli* در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد. اعداد نشان داده شده میانگین سه تکرار می باشند.

jftn.srbiau.ac.ir

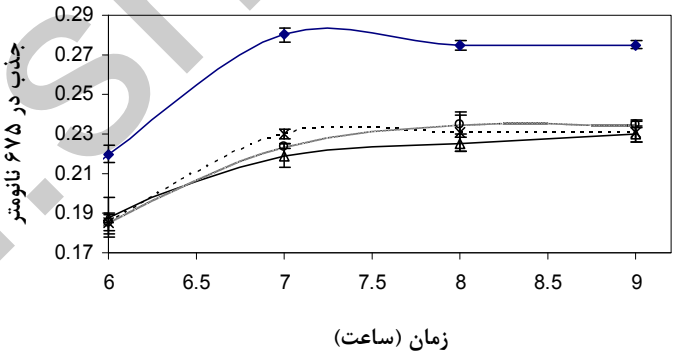


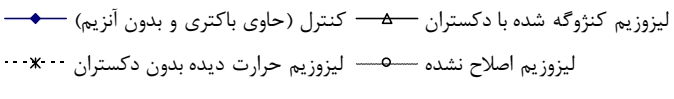


الف



ب





ج

نمودار ٤- اثر ضدمیکروبی لیزوزیم اصلاح نشده، لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران و لیزوزیم حرارت دیده بدون دکستران در الف) ۱۰۰ µg/ml ب) ۲۵۰ µg/ml و ج) ٤۰۰ µg/ml بر باکتری گرم مثبت *Staph. aureus* در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد. اعداد نشان داده شده میانگین سه تکرار می‌باشند.

jftn.srbiau.ac.ir

بحث

نتایج حاصل از الکتروفورز با ژل ۱۰٪، نشان می‌دهد که دکستران تحت واکنش کنترل شده میلارد، با پیوند کووالانسی به لیزوزیم متصل شده است که بدلیل اتصال تعداد مول‌های متفاوت دکستران به لیزوزیم، مشتقاتی با وزن ملکولی متنوع تولید می‌گردند. این توزیع وسیع وزن ملکولی برای ترکیبات مختلف پروتئینی لیزوزیم، منجر به گسترده شدن باندهای پروتئینی شده که حرکت الکتروفورتیکی آن‌ها بسته به وزن ملکولی این ترکیبات می‌باشد. این امر منجر به ظاهر شدن یک طیف وسیع در باندهای پروتئینی شکل گرفته در مسیر حرکت پروتئین می‌گردد. بنابراین در مخلوط واکنش، گروه وسیعی از مشتقات لیزوزیم که حاوی صفر تا هفت ملکول دکستران هستند، وجود دارد و عدد ذکر شده در جدول ۱ (۳/۷ مول دکستران) یک عدد میانگین بوده که نشان دهنده متوسط تعداد مول دکستران‌های متصل شده به لیزوزیم است. طبیعتا با افزایش تعداد مول دکستران متصل شده به لیزوزیم، وزن ملکولی افزایش یافته و حرکت الکتروفورتیکی کاهش می‌یابد. نتایج مشابهی توسط Nakamura و همکاران (۱۹۹۱و۱۹۹۲) در ترکیب لیزوزیم-گالاکتومنان و لیزوزیم –دکستران، Song و همکاران (۲۰۰۲) در ترکیب لیزوزیم-کیتوزان، Ibrahim و همکاران (۱۹۹۴) در ترکیب لیزوزیم-پریل آلدهید و Scaman و همکاران (۲۰۰۶) در ترکیب لیزوزیم-دکستران و لیزوزیم-گالاکتومنان نیز گزارش شده است. در ژل ۱۰٪، باند مونومر لیزوزیم حرکت سریع‌تری نسبت به سایر مشتقات پروتئین داشته و جلوتر از آن‌ها حرکت می‌کند.

بنا بر نتایج حاصل از آزمایش تعیین گروه‌های آمینی بلاک شده (جدول ۱)، زمانی که لیزوزیم با نسبت وزنی ۱ به ۵ در حضور دکستران در دمای ۶۰ °C به مدت یک هفته در رطوبت نسبی ۷۹٪ قرار می‌گیرد، ۳/۷ مول دکستران به یک ملکول لیزوزیم متصل می‌شود. از آنجا که واکنش میلارد بین گروه‌های ε- آمینوی اسیدهای آمینه لایسین پروتئین و انتهای احیاکننده گروه کربونیل پلی ساکارید در کنژوگه پروتئین-پلی ساکارید رخ می‌دهد، تعداد گروه‌های آمینی آزاد لیزوزیم کاهش می‌یابد، بطوریکه در کنژوگه لیزوزیم-دکستران ۳/۴ گروه از ۷ گروه آزاد لیزوزیم تنها قابل شناسایی بود. نتایج حاصل از تعیین گروه‌های آمینی بلاک شده، نتایج حاصل از الکتروفورز را تایید می‌کند. نتایج مشابهی توسط Nakamura و همکاران (۱۹۹۱و۱۹۹۲) در ترکیب لیزوزیم-گالاکتومنان و لیزوزیم – دکستران، Song و همکاران (۲۰۰۲) در ترکیب لیزوزیم-کیتوزان، Hattori و همکاران (۱۹۹۴) در ترکیب لیزوزیم-کربوکسی متیل دکستران، Ibrahim و همکاران (۱۹۹۱و۱۹۹۴) در ترکیب لیزوزیم- پالمتیک اسید و لیزوزیم- پریل آلدهید، Aminlari و همکاران (۲۰۰۵) در ترکیب لیززویم-دکستران و Scaman و همکاران (۲۰۰۶) در ترکیب لیزوزیم –گالاکتومنان نیز گزارش شده است.

فعالیت آنزیمی لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران به ۶۳/۳۷ ٪ در مقایسه با نوع گلیکوزیله شده کاهش یافت. بنظر می‌رسد که اتصال کربوهیدرات به لیزوزیم، در اطراف جایگاه فعال آنزیم (آسپارتیک اسید و گلوتامیک اسید)، ممانعت فضایی ایجاد می‌کند و این امر مانع از اتصال سوبسترای آنزیم (دیواره سلولی میکروکوکوس لیزودیکیتکوس) به جایگاه فعال می‌گردد (Arita *et al.*, 2001). مسدود شدن گروه‌های آمینی آزاد لایسین در لیزویم بوسیله دکستران باعث کاهش بار مثبت آنزیم شده که این امر خود از تمایل آنزیم به دیواره سلولی میکروکوکوس لیزودیکیتکوس، که دارای بار الکتریکی منفی است می‌کاهد. نتایج مشابهی توسط Takahashi و همکاران (۲۰۰۰)، Aminlari و همکاران (۲۰۰۵)، Ibrahim و همکاران (۱۹۹۱)، Nakamura و همکاران (۱۹۹۱) و Scaman و همکاران (۲۰۰۶) نیز گزارش شده است.

کنژوگه کردن لیزوزیم به دکستران، علیه باکتری گرم منفی *E. coli* موثر کرد. با افزایش غلظت آنزیم، اثر ضدباکتریایی آن نیز افزایش یافت. چنین اثر ضدمیکروبی در لیزوزیم اصلاح نشده و لیزوزیم حرارت دیده (بدون دکستران) در دو غلظت ۱۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده نگردید، اما آنزیم‌های مذکور توانستند در غلظت ۴۰۰ µg/ml بر باکتری *E. coli* موثر واقع شوند. این کاهش در مقایسه با آنزیم کنژوگه شده با دکستران قابل ملاحظه نبود. چنانکه انتظار می‌رفت لیزوزیم بر باکتری *Staph. aureus* موثر بود و این اثر با افزایش غلظت آنزیم از ۱۰۰ به ۴۰۰ µg/ml افزایش یافت. نتایج حاصل از بررسی اثر ضدباکتریایی کنژوگه لیزوزیم-دکستران نشان

jftn.srbiau.ac.ir

داد کـه کنژوگـه کـردن لیـزوزیم بـا دکسـتران، قـدرت ضدباکتریایی آنزیم را علیه بـاکتری گـرم مثبـت *Staph. aureus* افزایش نمی‌دهد. مـی‌تـوان گفـت کـه کنژوگـه لیـزوزیم- دکسـتران اثـر ضـدباکتریایی بیشـتری را علیـه باکتری گرم منفـی *E. coli* در مقایسـه بـا بـاکتری گـرم مثبت *Staph. aureus* از خود نشان داد. لیزوزیم، آنزیمی فعال علیه باکتری‌های گرم مثبت است که اثر ضدباکتریایی خود را از طریق هیدرولیز پیونـد گلیکوزیـدی(۱،۴) β بـین ان- استیل مورامیک اسـید و ان- اسـتیل گلـوکز آمـین در لایه پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری‌ها ایفا مـی کنـد. از آنجا که این دیواره در باکتری‌های گرم منفی توسـط لایـه لیپـوپروتئین/ لیپـوپلی سـاکارید احاطـه شـده اسـت، ایـن باکتری‌ها در برابر آنزیم از خود مقاومـت نشـان مـی‌دهنـد (Gill & Holley, 2000). بررسی‌ها نشان می دهند که هیبریدهای مختلف پـروتئین بـا پلـی سـاکاریدهایی چـون دکستران و یا گالاکتومنان خواص عملکردی قابل تـوجهی را از خود نشان می دهنـد (Nakamura *et al.*, 1991). بنابراین، برای بهبود خواص سطحی پروتئین‌هـا، مـی‌تـوان آن‌ها را به پلی ساکاریدها متصـل کـرد (Nakamura *et al.*, 1994). از آنجا که کنژوگه پـروتئین- پلـی سـاکارید بدلیل خواص سطحی که از خود نشان می‌دهـد، مـی‌توانـد دیواره بیرونی باکتری‌های گرم منفی را در خـود حـل کنـد، جـایگزینی مناسـب بـرای اسـتفاده در مـواد غـذایی بنظـر می‌رسد. بنابراین کنژوگه لیزوزیم-دکستران می تواند دیواره خارجی باکتری‌های گرم منفـی را پـاره کنـد و بـدنبال آن، ملکول‌های لیزوزیم که دارای بار الکتریکی مثبت هستند در تماس با دیواره داخلی باکتری که دارای فسفولیپیدهای بـار منفی است، قرار می‌گیرند و بر جایگاه‌های عملکردی خـود در دیواره داخلی باکتری اثر می گذارند و باعث پـاره شـدن این دیواره و نهایتا از بین رفتن باکتری می شوند.

نتیجه‌گیری

بنابر نتایج حاصل این تحقیق، گلیکوزیله کردن لیزوزیم با دکستران هرچند از فعالیت آنزیمـی آن بـه میـزان قابـل توجهی می‌کاهد اما تاثیر منفیی بر فعالیت ضـدمیکروبی آن نمی‌گذارد. به این ترتیب می توان نتیجه گرفت که فعالیـت ضدمیکروبی آنزیم از طریق فعالیت آنزیمی انجام نمی شود. گلیکوزیلـه کـردن آنـزیم لیـزوزیم بـا دکسـتران از تـوان ضدمیکروبی آنزیم علیه باکتری‌های گرم مثبت نکاست، اما توانست فعالیت ضدمیکروبی آن را علیه باکتری‌هـای گـرم منفی افزایش دهد.

منابع

Aminlari, M., Ramezani, R. & Jadidi, F. (2005). Effect of Maillard-based conjugation with dextran on the functional properties oflysozyme and casein. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85, 2617-2624.

Arita, K., Babiker, E., Azakami, H. & Kato, A. (2001). Effect of chemical and genetic attachment of polysaccharide to proteins on the production of IgG and IgE. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 2030-2036.

Devlieghere, F., Vermeiren, L. & Debevere, J. (2004). New preservation technologies: possibilities and limitations. International Dairy Journal, 14, 273-285.

Delaney, R. (1980). Applied protein chemistry. Applied Science Publishers, London, pp. 233-280.

Gill, A. O. & Holley, R. A. (2003). Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24˚C. International Journal of Food Microbiology, 80, 251-259.

Gill, A. O. & Holley, R. A. (2000). Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. Food Research International, 33, 83-91.

Habeeb, A. F. S. A. (1966). Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. Analytical Biochemistry, 14, 328-336.

Hattori, M., Imamura, S. & Nagasawa, K. (1994). Functional changes of lysozyme-carboxymethyl dextran conjugate. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 58, 174-177.

Haynes, R., Osuga, D. T. & Feeney, R. E. (1967). Modification of amino groups in inhibitors of proteolytic enzymes. Journal of Biochemistry, 6, 541-546.

Ibrahim, H. R., Higashiguchi, S., Juneja, L. R., Kim, M. & Yamamoto, T. (1996). A structural phase of heat-denatured lysozyme with novel antimicrobial action. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 1416-1423.

ifrl.srbiau.ac.ir

Ibrahim, H. R., Higashiguchi, S., Koketsu, M., Juneja, L. R., Kim, M. & Yamamoto, T. (1996). Partially unfolded lysozyme at neutral PH agglutinates and kills Gram-negative and Gram-positive bacteria through membrane damage mechanism. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 3799-3806.

Ibrahim, H. R., Hatta, H., Fujiki, M., Kim, M. & Yamamoto, T. (1994). Enhanced antimicrobial action of lysozyme against Gram-negative and Gram-positive bacteria due to modification with perillaldehyde. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42, 1813-1817.

Imoto, T., Johnson, L. N., North, A. C. T., Philips, D. C. & Rupley, J. A. (1972). Vertebrate Lysozyme. Academic Press, New York, pp. 665-664.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. Nature, 227, 680-685.

Lowry, P. H., Rosebrough, N. J. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193, 265-275.

Naidu, A. S. (2000). Natural Food Antimicrobial Systems. CRC Press, Culinary and Hospitality Industry Publications Services, Washington, pp. 1– 4.

Nakamura, S., Kato, A. & Kobayashi, K. (1991). New antimicrobial characteristics of Lysozyme–dextran conjujate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39, 647–650.

Nakamura, S., Kobayashi, K. & Kato, A. (1994). Role of positive charge of lysozyme in the excellent emulsifying properties of Maillard-type lysozyme-polysaccharide conjugate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42, 2688-2691.

Song, Y., Babiker, E. E., Usui, M., Saito, A. & Kato, A. (2002). Emulsifying properties and bactericidal action of chitosan-lysozyme conjugates. Food Research International, 35, 459-466.

Scaman, C., Nakai, S. & Aminlari, M. (2006). Effect of pH, temperature and sodium bisulfite or cyctein on the level of Maillard–based conjugation of lysozyme with dextran, galactomannan. Food Chemistry, 99, 368 – 380.

Takahashi, K., Lou, X., Ishii, Y. & Hattori, M. (2000). Lysozyme–glucose stearic acid monoester conjugate formed through the Maillard reaction as an antibacterial emulsifier. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 2044-2049.

Touch, V., Hayakawa, S. & Saitoh, K. (2004). Relationship between conformational changes and antimicrobial activity of lysozyme upon reduction of its disulfide bonds. Food Chemistry, 84, 421-428.

jftn.srbiau.ac.ir