Applied Biology, Volume 10, Issue 40, 2021

Research Article

Identification of a new lactoferrin-derived peptide isolated from camel milk with potential antimicrobial activity[1]

Elnaz Khajeh | Graduate of Master of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Department of Biology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran. elnaz.khajeh68@gmail.com
Majid Jamshidian-Mojaver | Assistant Professor,Mashhad Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran **(Corresponding Author).** m.jamshidian@rvsri.ac.ir
Mohsen Naeemipour | Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran. naeemiourm@medsab.ac.ir
Hamidreza Farzin | Assistant Professor, Mashhad Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran. hrfarzin@yahoo.com

Abstract

Introduction: 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.Milk contains a lot of proteins, some of which have received a lot of attention, such as lactoferrin, which has antibacterial activity. The aim of this study was to investigate the antibacterial activity of a lactoferrin-derived peptide isolated from camel milk against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and, *Acinetobacter baumannii*.

Materials and methods: In the present study, antibacterial peptides in milk lactoferrin were identified using bioinformatics tools. Trypsin I peptide was synthesized. Then, the toxicity of the peptide on the cell line was investigated by the MTT method. The antibacterial properties of trypsin I was evaluated on four pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and, *Streptococcus pyogenes*.

Results: The results showed that the peptides had no lethal effect on the cell line tested. The MIC results of trypsin peptide for *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and, *Streptococcus pyogenes* were 7.81, 15.62, 125 and 250, respectively.

Conclusion: Antimicrobial peptides have received much attention in recent decades due to their appropriate properties and characteristics such as rapid lethality, a wide range of activity and, also the rare development of cases of drug resistance. According to the observed results of this study, the antibacterial properties of the compounds isolated from this study can be a good alternative to replacement with common antibiotics.

Keywords: Lactoferrin, Trypsin, Antibacterial peptide, Camel Milk.

1. **Received:** 2020/09/05 ; **Accepted:** 2020/11/30 **Copyright © the authors

بیولوژی کاربردی، دوره ۱۰، شماره ۴۰، زمستان ۱۳۹۹

مقاله پژوهشی

شناسایی یک پپتید جدید مشتق از لاکتوفرین جدا شده از شیر شتر با فعالیت ضد میکروبی بالقوه[۱]

الناز خواجه | کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران. elnaz.khajeh68@gmail.com

مجید جمشیدیان مجاور | استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران (**نویسنده مسئول**). mjmojaver@yahoo.com

محسن نعیمی‌پور | استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران.Naeemiourm@medsab.ac.ir

حمیدرضا فرزین | استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شعبه مشهد، مشهد ایران. hrfarzin@yahoo.com

چکیده

هدف: 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. شیر حاوی تعداد زیادی پروتئین می‌باشد که برخی از آنها مانند لاکتوفرین، دارای فعالیت ضد باکتری است. هدف پژوهش حاضر بررسی فعالیت ضد باکتریایی یک پپتید مشتق شده از لاکتوفرین جدا شده از شیر شتر در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *آسینتوباکتربومانی* می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی به شناسایی پپتیدهای ضد باکتری در لاکتوفرین شیر پرداخته شد. پپتید تریپسین سنتز گردید. سپس با روش MTT خاصیت سمی پپتید بر رده سلولی بررسی شد. همچنین خاصیت ضد باکتری تریپسین بر چهار باکتری بیماری‌زای *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *آسینتوباکتربومانی* و *استرپتوکوکوس پیوژنز* بررسی گردید.

نتایج: نتایج نشان داد که پپتیدها بر رده سلولی مورد آزمایش اثر کشندگی نداشتند. نتایج MIC پپتید تریپسین برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *آسینتوباکتربومانی* و *استرپتوکوکوس پیوژنز* به ترتیب ۷/۸۱، ۱۵/۶۲، ۱۲۵ و ۲۵۰ بود.

نتیجه‌گیری: پپتیدهای ضد میکروبی به علت برخورداری از خصوصیات و ویژگی‌های مناسب مانند کشندگی سریع، طیف وسیع فعالیت و همچنین پیشرفت نادر موارد ابتلاء به مقاومت دارویی، در دهه‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. با توجه نتایج مشاهده شده در این پژوهش، خاصیت آنتی‌باکتریال ترکیبات جدا شده از این تحقیق می‌توانند گزینه مناسبی برای جایگزینی با آنتی‌بیوتیک‌های متداول باشند.

کلیدواژه‌ها: لاکتوفرین، تریپسین، پپتید ضد میکروب، شیر شتر.

---

۱. **تاریخ دریافت:** ۱۳۹۹/۰۶/۱۵ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۰۹/۱۰

۱. مقدمه

شیر به عنوان یك ماده غذایی مهم و بسیار ارزشمند در تأمین مواد مغذی مانند کلسیم، فسفر، پروتئین و ریبوفلاوین شناخته شده است (۱). شیر حاوی تعداد زیادی پروتئین است که برخی از آنها بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند، مانند لاکتوفرین، که دارای فعالیت ضد باکتری است (۲). لاکتوفرین یک گلیکو پروتئین دارای وزن مولکولی ۸۰ کیلو دالتون می‌باشد. این گلیکو پروتئین به علت تشابه در توالی ترانسفرین‌ها با لاکتوفرین به عنوان عضوی از خانواده ترانسفرین‌ها شناخته می‌شود. لاکتوفرین در ساختار خود دارای آهن بوده و میل ترکیبی زیادی نیز با آهن دارد (۳). این پروتئین از یک زنجیره پلی‌پپتیدی حاوی بیش از ده اسید آمینه تاخورده به صورت دو لوب کروی تشکیل شده است. قوانین سنتز لاکتوفرین وابسته به نوع سلول‌های تولیدکننده این پروتئین می‌باشد (۴). این پروتئین جزو خانواده ترانسفرین‌ها بوده و شامل یک رشته پلی‌پپتید با تاخوردگی ساده و دو لوب هموژنوس C و N است. این دو لوب توسط یک پپتید کوتاه به یکدیگر متصل شده‌اند و هر کدام یک جایگاه اتصال به آهن دارند. توالی پروتئینی لاکتوفرین شتری با لاکتوفرین گاوی ۷۵ درصد تشابه دارد. لاکتوفرین دارای دولوب C و N است که هر یک از آن‌ها دو دامین (C1, C2 و N1, N2) را ایجاد می‌کنند (۵و۶). این پروتئین در اکثر ترشحات شیر، اشک و بزاق دیده می‌شود. از خواص بیولوژیکی لاکتوفرین می‌توان به تنظیم جذب آهن در روده، تحریک رشد سلول‌ها، فعالیت التهابی، تعدیل‌کننده فعالیت سیستم ایمنی بدن، فعالیت‌های ضد میکروبی و ویروسی و انگلی و آنتی اکسیدانی و ممانعت از رشد تومور اشاره نمود (۷). نقش اصلی لاکتوفرین دفاع در مقابل عفونت‌های میکروبی است که عمدتاً این توانایی را با اتصال به یون‌های آهن مورد نیاز جهت رشد باکتری، اثر متقابل مستقیم با سطح باکتری‌ها و فعالیت مستقیم ضد باکتریایی آن به خاطر لاکتو فریسین، اعمال می‌کند (۸). لاکتوفرین یک پروتئین چند عملکردی است که یکی از نقش‌های آن فعالیت ضد باکتریایی بوده و بر روی طیف گسترده‌ای از گونه‌های گرم مثبت و منفی تاثیرگذار می‌باشد (۹). تفاوت در اثر این پروتئین نسبت به نتایج گذشته در میزان غلظت مهارکنندگی آن بوده است (۱۰). لاکتوفرین با جذب آهن آزاد، محیط را عاری از این عنصر کرده و در نتیجه پاتوژن‌هایی که برای ادامه حیات به این عنصر حیاتی نیاز دارند را از آن محروم کرده و بدین ترتیب با مهار رشد باکتری‌های مضر، به صورت غیرمستقیم گسترش عفونت را مهار می‌کند (۱۱). پروتئین‌ها و پپتیدهای ضد میکروبی شیر به دلیل خاصیت ضد باکتریایی آنها می‌توانند

جایگزین‌های طبیعی آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده باشند. پپتیدهای آنتی باکتریال به طور معمول دارای ۱۲ تا ۵۰ اسید آمینه می‌باشد. مکانیسم عمل این پپتیدهای آنتی باکتریال‌ها (AMP)، وابسته به برخی از ویژگی‌ها مانند توالی اسید آمینه، ساختارهای گوناگون آنها، میزان غلظت و خاصیت آمفی پاتیک آنها بستگی دارد (۱۲).

هدف پژوهش حاضر استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی در شناسایی پپتید ضد باکتری در لاکتوفرین شیر می‌باشد. پپتید تریپسین I سنتز شد. سپس با روش MTT خاصیت سمّی پپتید بر رده سلولی بررسی گردید.

۲. مواد و روش کار

۲-۱. بخش بیوانفورماتیک

چندین استراتژی برای شناسایی و تولید پپتیدهای فعال بیولوژیک از پروتئین شیر به کار گرفته می‌شود. ابتدا پپتیدهای موجود در توالی پروتئین باید توسط هیدرولیز آنزیمی، آنزیم‌های گوارشی، تخمیر شیر و کشت‌های پروتئولیتیک استارتر یا با عمل آنزیم‌های مشتق شده از میکروارگانیسم‌ها آزاد شوند. آنزیم‌های پروتئولیتیک مانند پپسین، تریپسین، آلکالاز، کیموتریپسین، پاپائین و الاستاز پانکراس، برای به دست آوردن پپتیدهای زیستی فعال به کار می‌روند. در مرحله بعد، قسمت‌های پپتیدی جدا شده و تمیز می‌شوند، خصوصیات ضد میکروبی آنها تعیین می‌گردد و معمولاً با تکنیک‌های مختلف MS شناسایی می‌شوند. با توجه به اینکه توالی پروتئین‌های شیر و محل‌های شکافت آنزیم شناخته شده و همچنین خصوصیات پپتیدهای ضد میکروبی به خوبی تعریف شده است، می‌توان از ابزارهای بیوانفورماتیک در جستجوی AMP های جدید استفاده کرد. این استراتژی مبتنی بر شبیه‌سازی کامپیوتری پروتئولیز و استفاده از روش‌های آماری چند متغیره برای تعیین انگیزه‌های بالقوه ضد میکروبی آزاد شده از پروتئین‌های مورد بررسی است. پروتئولیز در سیلیکا می‌تواند با استفاده از چندین برنامه مانند PMAP[1] و PeptideCutter[2] یا یک ابزار اختصاصی در پایگاه داده BIOPEP انجام شود.

1. www.proteolysis.org/proteases
2. www.expasy.org/tools/peptidecutter/

۲-۲. سوش‌های مورد مطالعه

در این مطالعه برای انجام آزمایش از سوش‌های میکروبی استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC: 6538)، آسینتوباکتربومانی (ATCC:BAA-747)، استرپتوکوکوس پیوژنز (ATCC: 19615) و سودوموناس آئروژینوزا (ATTCC: 27853) که تمامی آن‌ها از مرکز انستیتو پاستور ایران تهیه شد بود، استفاده گردید.

۲-۳. سنتز پپتید

پپتید انتخاب شده مورد مطالعه، تریپسین (Trypsin-Camel-Lac-1) نام داشت و توسط شرکت MIMOTOPES (استرالیا) سنتز شد. مقدار ۲ میلی‌گرم از پپتید ضد میکروبی با ۱cc آب استریل حل گردید. سپس داخل فریزر ۲۰- قرار داده شد تا برای انجام بقیه مراحل از آن استفاده شود.

۲-٤. سنجش سمّیت

جهت بررسی اثر پپتید آنتی باکتریال بر روی رشد و تکثیر سلول‌ها در این پژوهش، از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. این روش براساس شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده انجام شد (۱۳و۱۴).

جهت انجام این تست، حجم ۱۰۰ ماکرولیتر از سوسپانسیون سلولی در هر خانه پلیت ۹۶ خانه‌ای، به گونه‌ای که هر میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی ۱۰۰۰۰ سلول باشد، ریخته شد. پلیت به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. پس از طی مدت زمان انکوباسیون، سلول‌های هر خانه با پپتید آنتی‌باکتریال در غلظت مشخص تیمار شدند. در این مطالعه از ۴ رقت سریالی استفاده گردید. ۳۰۰ ماکرولیترآب مقطر استریل به همه میکروتیوپ‌ها اضافه شد، به میکروتیوپ اول ۳۰۰ ماکرولیتر پپتید آنتی‌باکتریال اضافه گردید و تا شماره ۴ پاساژ داده شد. ۱۰۰ ماکرولیتر از میکروتیوپ اول نیز به چاهک اضافه گردید، این کار را برای همه میکروتیوپ‌ها انجام شد. این کار برای هر رقت سه بار تکرار گردید. ۲۴ ساعت در تیمار سلول‌ها با پپتیدهای آنتی‌باکتریال، به هر خانه پلیت، ۲۰ ماکرولیتر رنگ MTT، با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و در شرایط تاریک انکوبه گردیدند.

پس از این زمان، محیط کشت حاوی MTT به طور مداوم تخلیه شد و برای حل کریستال‌های بنفش به هر چاه حجم ۵۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکسید اضافه شد. نتایج به صورت بقایای

سلولی و غلظت بیانگر رشد سلول تا ۵۰٪ به دست آمد که از آن به عنوان غلظت بازدارنده (IC50) یاد می‌شود. تمام تجزیه و تحلیل MTT در ۳ تکرار انجام شد تا دقت نتایج بدست آمده بالا باشد (۱۵).

۲-۵. روش تهیه محلول سوسپانسیون میکروبی

آمپول‌های لیوفیلیزه باکتری‌های مورد مطالعه ابتدا در شرایط استریل باز و به محیط کشت مایع مولر هینتون براث (مرک-آلمان) انتقال و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و پس از طی مدت زمان انکوباسیون جهت بررسی اثرات ضد میکروبی از کشت حاصل استفاده گردید. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی ۲۴ ساعته به لوله حاوی مولر هینتون براث (مرک-آلمان) سترون انتقال داده و سپس کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده، با استفاده از استاندارد مک فارلند تنظیم گردید و با دستگاه اسپکتوفتومتر (shimadzu-Japan) در طول موج ۶۲۵ نانومتر با میزان جذب ۰/۱۳ - ۰/۰۸ تهیه شد (۱۶).

۲-۶. تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) به روش میکرودایلوشن

جهت انجام تست‌های (MIC و MBC) از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای مسطح استریل استفاده شد. بعد از مشخص کردن کدورت نیم مک فارلند، به هر ردیف به شماره‌های ۲ تا ۱۱ مقدار ۵۰ ماکرولیتر محیط مولرهینتون براث (مرک-آلمان) استریل اضافه گردید. از شماره ۲ تا ۹ به تمام چاهک‌ها مقدار ۵۰ ماکرولیتر از پپتید آنتی‌باکتریال اضافه و پاساژ داده شد و به تمام چاهک‌های شماره ۱ تا ۱۰، مقدار ۵۰ ماکرولیتر سوسپانسیون میکروبی اضافه گردید. پلیت را به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. همچنین چاهک‌هایی حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط براث به عنوان کنترل منفی و چاهک‌هایی حاوی محیط کشت و باکتری به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. پس از طی مدت زمان انکوباسیون، میکروپلیت از انکوباتور خارج و توسط دستگاه قرائت‌گر الایزا در طول موج ۴۹۰ و ۶۳۰ نانومتر قرائت شد. چاهکی که مانع رشد باکتری گردیده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد (۱۸و۱۷). جهت مشخص نمودن MBC از چاهک‌ها مقدار ۱ ماکرولیتر برداشته و روی محیط مولرهینتون آگار (مرک-آلمان) کشت داده شد. عدم رشد باکتری نشان‌دهنده‌ی تعیین MBC می‌باشد.

۲-۷. انتشار در حفره آگار

این روش به صورت گسترده‌ای به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی پپتیدهای آنتی‌باکتریال استفاده می‌شود. در این روش، سوسپانسیون میکروبی به گونه‌ای در سطح پلیت آگار پخش می‌شود که به طور یکنواخت تمام سطح پلیت را بپوشاند. سپس یک حفره با قطر ۸-۶ میلی‌متر در شرایط استریل با پانچ استریل در سطح محیط کشت ایجاد شد و غلظت معین عامل ضد میکروبی (Trypsin-Camel-Lac-1) و داخل حفره‌های ایجاد شده اضافه گردید.

غلظت‌های مربوطه در این مطالعه بدین گونه می‌باشد: پپتید آنتی‌باکتریال درون ۵ میکروتیوپ استریل پاساژ داده شد، به میکروتیوپ شماره ۲ تا ۵ مقدار ۱۰۰ ماکرولیتر آب استریل اضافه شد. سپس به میکروتیوپ شماره ۱ مقدار ۱۰۰ ماکرولیتر پپتید آنتی باکتریال اضافه گردید. به میکروتیوپ شماره ۲ مقدار ۱۰۰ ماکرولیتر پپتید آنتی باکتریال افزوده و تا شماره ۵ پاساژ داده شد. تمام میکروتیوپ‌ها را شماره‌گذاری کرده و به ترتیب مقدار ۱۰۰ ماکرولیتر از میکروتیوپ را برداشته و به حفره‌های پلیت آگار اضافه شد. سپس میکروتیوپ به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور قرار گرفته و نتیجه براساس هاله‌های ایجاده شده اطراف حفره‌ها بررسی گردید.

۳. نتایج

۳-۱. این سیلیکو پروتئولیز لاکتوفرین

توالی اسیدهای آمینه لاکتوفرین در پروتئولیز درون سیلیکوی انجام شده توسط پایگاه داده BIOPEP قرار گرفت. در این مطالعه از پایگاه داده برش پپتید[1] استفاده شد، می‌توان با استفاده از برخی ابزارهای بیوانفورماتیک، پروتئولیز درون رایانه‌ای را انجام داد (۱۹و۲۰).

Name of enzyme	No. of cleavages	Positions of cleavage sites
Trypsin	80	2 22 23 26 37 43 44 46 47 49 57 58 61 72 92 118 119 132 140 166 170 183 199 216 229 240 243 255 268 277 282 288 292 296 299 315 320 328 332 348 351 360 361 376 382 405 423 450 459 460 464 471 473 474 482 495 501 517 519 533 541 550 563 574 581 584 597 619 622 632 639 647 654 656 669 673 690 692 693 708

1. https://web.expasy.org/peptide_cutter/

۳-۲. نتایج MTT

تمام آنالیزهای MTT در ۳ تکرار انجام شد. به منظور دستیابی به معادله رگرسیون خطی غلظت در مقابل مهار رشد، از نرم‌افزار Microsoft Excel استفاده شده و مقادیر به عنوان معنی و انحراف معیار از سه آزمایش جداگانه بیان گردید. از معادله زیر برای اندازه‌گیری منحنی رشد و رسم نمودار استفاده شده است:

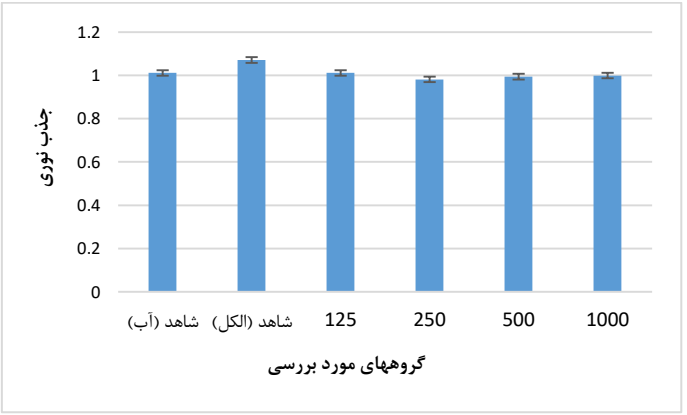
Growth inhibition= (control OD-sample OD) / control OD*100

جدول ۲. نتایج تست MTT

	کنترل (آب)	کنترل (الکل)	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰
OD	۰/۹۱۱	۰/۹۷۱	۰/۹۵۰	۰/۸۵۱	۰/۸۱۳	۰/۸۹۰

برای تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده از نرم‌افزار SPSS نسخه۲۰ استفاده شد و تفاوت بین تیمارهای مختلف با تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه[1] مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج تحلیل آماری نشان داد که سطح معناداری برای پپتید مورد مطالعه (کمتر از ۰/۰۵) بدست آمده و بنابراین پپتید مورد مطالعه اثر کشندگی بر سلول‌ها نداشته است.



نمودار۱- نتایج MTT بر روی رده سلولی ورو

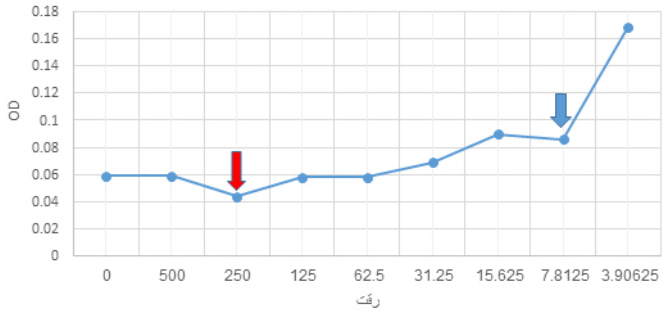
1. ANOVA

جدول ۳- نتایج آنالیز تریپسین بر رده سلولی ANOVA

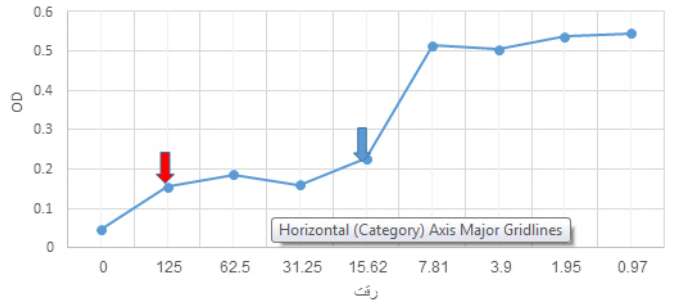
OD	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.775	5	.355	17.842	.000
Within Groups	.239	12	.020		
Total	2.014	17			

۳-۳. نتایج MIC وMBC به روش میکرودایلوشن

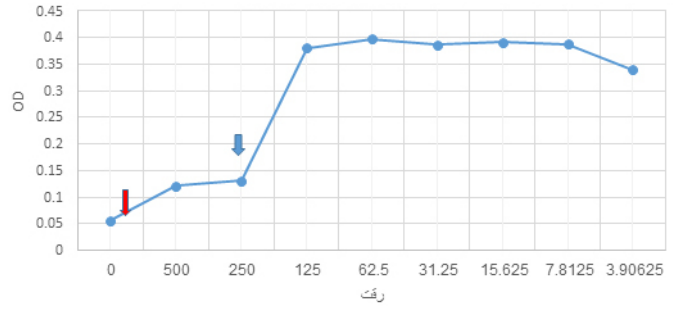
نمودارهای ۲، ۳، ۴ و ۵ مقادیر MIC وMBC این مطالعه را به روش میکرودایلوشن نشان می‌دهد.



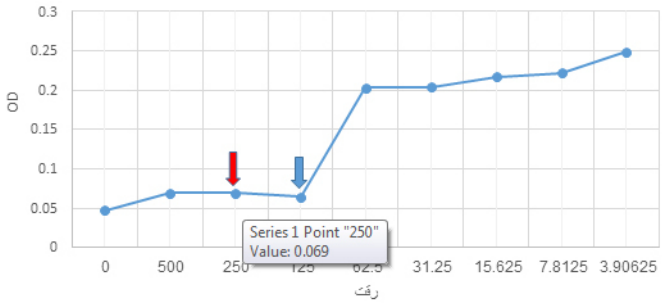
نمودار۲- MIC و MBC باکتری استافیلوکوک اورئوس برای تریپسین



نمودار ۳- MIC و MBC باکتری سودوموناس آئروژینوزا برای تریپسین



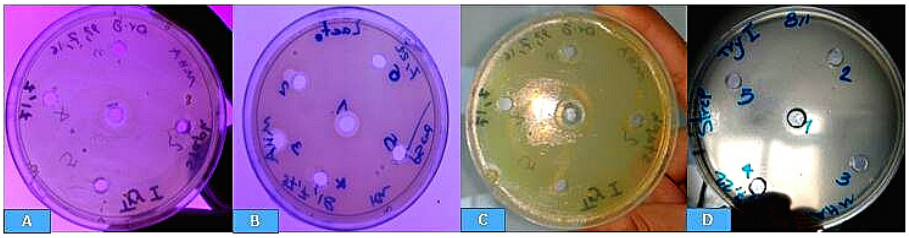
نمودار ٤ - MIC و MBC باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز برای تریپسین



نمودار ۵- MIC و MBC باکتری آسینتوباکتربومانی برای تریپسین

۳-٤. نتایج انتشار در حفره آگار

وقتی پپتیدهای آنتی‌باکتریال موثر باشد، هاله‌های ممانعت در سطح محیط کشت تشکیل می‌شود که این هاله‌های ایجاد شده بیانگر از بین رفتن باکتری و حساسیت باکتری به پپتیدهای آنتی‌باکتریال موجود در چاهک است.



شکل ۱- نتایج حاصل از روش انتشار چاه آگار برای استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، آسینتوباکتر بومانی و باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز به ترتیب در A، B، C، D

٤. بحث

پپتیدهای فعال زیستی، پپتیدهای مشتق شده‌ی غذایی هستند که فراتر از ارزش غذایی‌شان، اثرات فیزیولوژیک و شبه هورمونی در بدن دارند. این‌گونه پپتیدها در شیر، تخم مرغ، گوشت و ماهی‌ها و همچنین در گیاهان یافت می‌شوند (۲۱). پپتیدهای فعال زیستی در توالی پروتئین والد خود غیرفعال هستند (پپتیدهای فعال زیستی قطعه‌های پروتئینی خاص غیرفعال با توالی پروتئین پیش‌ساز می‌باشند) و می‌توانند به وسیله‌ی هیدرولیز آنزیمی در طی هضم معدی روده‌ای یا در طی پردازش غذایی آزاد شوند (همانند کامل شدن پنیر و تخمیر شیر). پپتیدهای فعال زیستی معمولاً دارای ۲ تا ۲۲ اسید آمینه می‌باشند. پپتیدهای ضد میکروبی، مولکول‌هایی با فعالیت‌های

گسترده هستند که توسط بسیاری از بافت‌های حیوانات، گیاهان و بی‌مهرگان، ترشح می‌شوند و جزء ترکیبات مهم سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی انسان و حیوانات محسوب شده و در اولین خط دفاعی میزبان بر ضد تهاجم میکرو ارگانیسم‌ها حضور دارند (۲۱).

براساس نتایج حاصل، در مورد پپتید تریپسین، برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در رقت ۷/۸۱۲۵ نقطه MIC و در رقت ۲۵۰ مقدار MBC تعیین گردید. برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا برای تریپسین در رقت۱۵/۶۲ مقدار MIC مشخص شده و در رقت ۱۲۵ مقدار MBC تعیین گردید. برای آسینتوباکتربومانی در رقت ۱۲۵، مقدار MIC از تریپسین مشخص شده و در رقت ۲۵۰ از تریپسین مقدار MBC تعیین گردید. برای باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز برای تریپسین رقت ۲۵۰ مقدار MIC مشخص شده و در رقت ۵۵۰ مقدار MBC تعیین گردید. همچنین در بررسی تست MTT جهت ارزیابی سمّیت پپتید، نتایج حاصل نشان داد پپتید انتخابی هیچ سمّیتی در برابر رده سلولی ورو استفاده شده در این مطالعه ندارد.

شعربافی و همکاران (۲۰۱۶) در پژوهشی فعالیت ضد میکروبی پروتئین لاکتوفرین را روی رشد پسودوموناس آئروژینوزا و اشریشیاکلی بررسی کردند. نتایج نشان داد که لاکتوفرین به طور موثری موجب کاهش رشد پسودوموناس آئروژینوزا می‌شود که درصد مهارکنندگی به ترتیب ۷۵، ۵۸، ۳۵ و ۸۶ درصد بوده و غلظت ۴۰۰g/ml دارای کم‌ترین اثر مها کنندگی با ۳۵ درصد مهارکنندگی و ۷۰۰µg/ml دارای بیشترین اثر مهارکنندگی تا ۸۶ درصد پسودوموناس آئروژینوزا شده است. همچنین لاکتوفرین موجب کاهش تعداد کلنی‌ها در اشریشیاکلی نیز گردید که درصد مهارکنندگی به ترتیب ۵۲، ۳۷، ۲۹ و ۶۶ درصد بود (۲۲). نتایج بدست آمده از پژوهش شعربافی و همکاران مغایر با نتایج پژوهش حاضر می‌باشد، این تفاوت را می‌توان به نفوذپذیری سطح غشاء باکتری‌های مورد مطالعه نسبت داد.

طاهری و همکاران (۲۰۱۴) نیز در مطالعه‌ای پپتید ضد میکروبی جدید با نام K–Buforin از ترشحات پوستی وزغ کویری بومی پرداختند. در این مطالعه اثرات ضد میکروبی این پپتید بر روی باکتری‌های Escherichia coli، Klebsiella، Psodomonas aeroginosa، Agrobacterium tumefaciens، Bacillus subtilis، Staphylococcus aureus و Bacillus cereus مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر این بود که پپتید K–Buforin باعث مهار کامل رشد باکتری‌های مذکور در غلظت‌های پایین (کم‌تر از 20 ml/µg) می‌گردد. همچنین نتایج

این پژوهش نشان داد که این پپتید دارای اثر بیشتری بر روی باکتری‌های گرم منفی است (۲۳). نتایج حاصل از این پژوهش در مغایرت با پژوهش زارع زردیی و همکاران می‌باشد. این تفاوت را می‌توان به سطح باکتری (اثر پپتید بر روی LPS) نسبت داد. لاکتوفرین غشای باکتری را بی‌ثبات می‌کند، در نتیجه نفوذپذیری باکتری را افزایش می‌دهد.

حبیبی نجفی و همکاران (۲۰۱۸) نیز در پژوهشی فعالیت ضد باکتریایی و سمیت پپتید نوترکیب LasioglossinIII بر پاتوژن‌های شاخص مواد غذایی را بررسی کردند. در این پژوهش، عملکرد ضد میکروبی پپتید نوترکیب الزیوگلوسین III بر پنج عامل بیماری‌زای باکتریایی غذایی (باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی موریوم، انتروکوکوس فکالیس، لیستریا مونوسیتوژنز و اشرشیاکلی) و دوز سمیت آن بر یک رده سلول انسانی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که پپتید نوترکیب عملکرد ضد میکروبی مناسبی دارد، به طوری که حداقل غلظت بازدارندگی و کم‌ترین غلظت کشندگی پپتید الزیوگلوسین III بر باکتری‌های مورد مطالعه به ترتیب در محدوده ۸/۶۲۵-۳/۸۵۱ ml/µg و ۷/۰۳-۷/۱۵ ml/µg بود. 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 (۲۴). در بررسی نتایج دوز سمّیت با تست MTT، نتایج مطالعه حبیبی نجفی و مطالعه حاضر دارای تشابه می‌باشند و پپتیدهای مورد مطالعه اثر کشندگی نداشته‌اند.

۵. نتیجه‌گیری

پپتیدهای ضد میکروبی به علت برخورداری از خصوصیات و ویژگی‌های مناسب مانند کشندگی سریع، طیف وسیع فعالیت و همچنین پیشرفت نادر موارد ابتلاء به مقاومت دارویی، در دهه‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. بسیاری از محققان بر این باورند که توانایی پپتیدهای ضد میکروبی در چسبیدن به غشاءهای باکتریایی نقش بسیار مهمی در ایجاد خصوصیات منحصر به فرد در آنها دارد. با توجه به نتایج مشاهده شده در این پژوهش، خاصیت آنتی‌باکتریال ترکیبات جدا شده از این تحقیق می‌توانند گزینه مناسبی برای جایگزینی با آنتی‌بیوتیک‌های متداول باشند.

References

1. Playne MJ, Bennett LE, Smithers GW. Functional dairy foods and ingredients. *Australian Journal of Dairy Technology*. 2003; 58(3): 242-64.
2. Miller GD, Jarvis JK & McBean LD. *Handbook of dairy foods and nutrition*. CRC press; 2006: 15.
3. Legrand D & Mazurier J. A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity. *Biometals*. 2010; 23(3): 365-76.
4. Feng X, Liu C, Guo J, Bi C, Cheng B, Li Z, Shan A & Li Z. Expression and purification of an antimicrobial peptide, bovine lactoferricin derivative LfcinB-W10 in Escherichia coli. *Current microbiology*. 2010; 60(3): 179-84.
5. Metz-Boutigue MH, Jollés J, Mazurier J, Schoentgen F, Legrand D, Spik G, Montreuil J & Jollès P. Human lactotransferrin: Amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *European Journal of Biochemistry*. 1984; 145(3): 659-76.
6. Baker EN. Structure and reactivity of transferrins. *Advances in inorganic chemistry*. 1994; 41: 389-464.
7. Yen CC, Shen CJ, Hsu WH, Chang YH, Lin HT, Chen HL & Chen CM. Lactoferrin: An iron-binding antimicrobial protein against Escherichia coli infection. *Biometals*. 2011; 24(4): 585-94.
8. Expósito IL & Recio I. Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. *International Dairy Journal*. 2006; 16(11): 1294-305.
9. Arnold RR, Brewer M & Gauthier JJ. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infection and immunity*. 1980; 28(3): 893-8.
10. Drago-Serrano ME, De La Garza-Amaya M, Luna JS & Campos-Rodríguez R. Lactoferrin-lipopolysaccharide (LPS) binding as key to antibacterial and antiendotoxic effects. *International immunopharmacology*. 2012; 12(1): 1-9.
11. Baker EN, Baker HM & Kidd RD. Lactoferrin and transferrin: functional variations on a common structural framework. *Biochemistry and Cell Biology*. 2002; 80(1): 27-34.
12. Kim WS, Shimazaki KI & Tamura T. Expression of bovine lactoferrin C-lobe in Rhodococcus erythropolis and its purification and characterization. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2006; 70(11): 2641-5.
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983; 65 (1-2): 55-63.
14. Frija LM, Ntungwe E, Sitarek P, Andrade JM, Toma M, Śliwiński T, Cabral LS, Cristiano ML, Rijo P & Pombeiro AJ. In Vitro Assessment of Antimicrobial, Antioxidant, and Cytotoxic Properties of Saccharin-Tetrazolyl and-Thiadiazolyl Derivatives: The Simple Dependence of the pH Value on Antimicrobial Activity. *Pharmaceuticals*. 2019; 12(4): 167.
15. Kadoughani Sani S, Jamshidian-Mojaver M, Farzin H & Amiri M. Investigation of the

effect of fungal and copper nanocomplexes on bacte-ria causing nosocomial infections. *New Findings in Veterinary Microbiology*. 2020; 3(1): 39-46.

16. Wallmann J, Böttner A, Goossens L, Hafez HM, Hartmann K, Kaspar H, Kehrenberg C, Kietzmann M, Klarmann D, Klein G & Krabisch P. Results of an interlaboratory test on antimicrobial susceptibility testing of bacteria from animals by broth microdilution. *International journal of antimicrobial agents*. 2006; 27(6): 482-90.
17. Balouiri M, Sadiki M & Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*. 2016; 6(2): 71-9.
18. Ciccaglione AF, Di Giulio M, Di Lodovico S, Di Campli E, Cellini L & Marzio L. Bovine lactoferrin enhances the efficacy of levofloxacin-based triple therapy as first-line treatment of Helicobacter pylori infection: an in vitro and in vivo study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019; 74(4): 1069-77.
19. Keil B. Proteolysis Data Bank: Specificity of alpha-chymotrypsin from computation of protein cleavages. *Protein sequences & data analysis*. 1987; 1(1): 13.
20. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Wilkins MR, Appel RD & Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *In The proteomics protocols handbook*. 2005; 74(4): 65-77.
21. De Gobba C, Espejo-Carpio FJ, Skibsted LH & Otte J. Antioxidant peptides from goat milk protein fractions hydrolysed by two commercial proteases. *International Dairy Journal*. 2014; 39(1): 28-40.
22. Sharbafi R, Moradian F, Rafiei AR. Evaluation of Antimicrobial Activity of Lactoferrin against P. Aeruginosa and E. Coli Growth. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2016; 18(7): 19-23.
23. Taheri A, Farvin KS, Jacobsen C & Baron CP. Antioxidant activities and functional properties of protein and peptide fractions isolated from salted herring brine. *Food chemistry*. 2014; 142: 318-26.
24. Habibi Najafi MB, Tanhaeiyan A, Rahnama P & Azghandi M. Study on antibacterial activity and cytotoxicity of recombinant peptide, Lasioglossin III, against foodborne pathogens. *Agricultural Biotechnology Journal*. 2018; 10(3): 31-44.

استناد به این مقاله

خواجه، الناز؛ جمشیدیان مجاور، مجید؛ نعیمی‌پور، محسن؛ فرزین، حمیدرضا (۱۳۹۹). شناسایی یک پپتید جدید مشتق از لاکتوفرین جدا شده از شیر شتر با فعالیت ضد میکروبی بالقوه. *بیولوژی کاربردی*، ۱۰(۴۰)، ص ۸۳-۹۶.