# دراسة العلاقة بين درجة كراهة الماء للببتيدات وقدرتها على تثبيط البكتريا المرضية

**حسين لفته الجبوري**
**كلية الزراعة /جامعة القاسم الخضراء**
**hblcf@yahoo.com**

**المستخلص**

تمت الدراسة لتحديد العلاقة التي تربط بين درجة كراهة للماء Hydrophobicity للببتيدات الموجوده في الاجزاء المفصوله من حليب الابل المتخمر باستخدام تقنية كروموتوغرافيا السائل عالي الاداء ذو الطور المعكوس Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) حيث تم تخمير الحليب باستخدام بادئ بكتريا حامض اللاكتيك المختلط *Streptococcus thermophilus* ، *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*، وتم فصل الاجزاء وتحديد قدرتها على تثبيط البكتريا المرضية ومن ثم تحديد علاقة ذلك بدرجة Hydrophobicity.

من خلال النتائج وجد ان معظم الببتيدات الموجودة في الاجزاء المفصوله والتي لها القدرة على تثبيط بكتريا *Escherichia coli* BL21 وبكتريا *Shigella dysenteriae* ATCC كانت لها درجة Hydrophobicity بحدود 30- 60 في حين اظهرت الببتيدات قدرة ضعيفة في تثبيط بكتريا *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 وبكتريا *Streptococcus faecalis* ATCC 13048.

*الكلمات الاستفتاحية : الكاره للماء،الببتيدات ،التثبيط*

# STUDY THE RELATIOMNSHIP BETWEEN HYDROPHOBICITY PEPTIDES AND THEIR ABILITY TO INHBIIT PATHOGENIC BACTERIA

Hussein L. Algboory

**ABSTRACT**

The study was conducted to determine the relationship between the degree of Hydrophobicity of the peptides found in the separated parts of fermented camel milk using the Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). Milk was fermented by using mixed of lactic acid bacteria *Streptococcus thermophilus* ، *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* The fractions were separated and their ability to inhibit the pathogenic bacteria was determined and then determined the relation between the inhibition effect and Hydrophobicity .

The results showed that most of the peptides found in the separated parts have the ability to inhibit bacteria *Escherichia coli* BL21 and *Shigella dysenteriae* ATCC Had a degree of Hydrophobicity of (30-60), while peptides showed a slight ability to inhibit bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Streptococcus faecalis* ATCC 13048.

Keywords: Hydrophobicity, peptides, inhibition

**المقدمة**

يعتبر حليب الأبل من الانواع التي تمتناز بانها غنية بالاحماض الامينية الحرة والببتيدات اذا ما قورنة بحليب الابقار[14] وإن الكثير من الببتيدات الحيوية تتولد من بروتينات حليب الأبل خلال عمليات التصنيع ولاسيما عند استخدام بكتريا حامض اللاكتيك بعملية التخمر[5] وهذه المركبات الحيوية تظهر فعاليات حيوية مختلفة منها القدرة على خفض ضغط الدم كذلك القدرة على الارتباط بالمعادن وتقوية الجهاز المناعي ومضادات للبكتريا.

في دراسة الببتيدات الحيوية من بروتينات الحليب (البيتا كازين والبيتا لاكتوكلوبيولين) وجد Malinowski (2012) ان الببتيدات ذات الوزن الجزيئي الاقل من 5 كيلو دالتون اعطت فعالية ACE-Inhibitory ، اما [3] في دراسة تشخيص ACE-Inhibitory من حليب الأبل المتخمر ذات السنام الواحد بفعل بكتريا *Lb. helveticus* او بكتريا *Lb. acidophilus* تمكن من عزل سبعة ببتيدات منخفضة الوزن الجزيئي.

تعتمد تنقية وتحليل الببتيدات على استخدام سلسلة من تقنيات الفصل ويتم ذلك اما على مستوى التحضير preparative level لكي يتم فصل واحد او اكثر من المكونات الفردية من الخليط لاغراض عمليات البحث اللاحقة او على المستوى التحليلي analytical level لغرض تمييز وتحديد الكميات النسبية لبعض المكونات، إن عمليات التنقية ضرورية قبل تحديد فعالية وصفات اي ببتيد او بروتين وما يحدد طرائق التنقية المتبعة هو طبيعة المادة الاولية هل هي نسيج أو خلايا ميكروبية او غذاء وان اول خطوة بالتنقية هي الاستخلاص والتي تتضمن تقنيات مختلفة وبعد التنقية النهائية والتحقق من التجانس تتم عملية العزل على وفق التقنيات المختلفة, إن عملية فصل الببتيدات منخفضة الوزن الجزيئي من الغذاء عملية صعبة وذلك لوجودها ضمن خليط معقد يحتوي على مواد مختلفة مثل الحوامض العضوية والاحماض الامينية الحرة والسكريات والاملاح لذلك تستعمل عادة طرائق الكرموتوغرافي وطرائق الترشيح الفائق ،وان الدراسات التركيبية تتطلب نقاوة عالية لذلك يتم استخدام توليفه من طرائق الكرموتوكرافي او طرائق تعتمد على عدة مبادئ للفصل حيث استخدم [17] عمود C18 (RP-HPLC )على مرحلتين في فصل ببتيد منخفض الوزن الجزيئيLMW من خليط تفاعل مختلف وتم ايضا عزل الببتيدات (LMW) التي تمتاز بالفعالية المثبطة للاحياء المجهرية من بكتريا *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 7994 باستخدام الترسيب بالايثانول والتنقية باستخدام RP-HPLC [2] .

استخدمت في الوقت الحاضر البحوث والدراسات كرموتغرافي السائل عالي الاداء الطور المعكوس(RP-HPLC) في فصل المجاميع المختلفة لبروتينات الحليب في وقت واحد[18]. وان الأساس بعمل جهاز كرموتوغرافي السائل عالي الاداء الطور المعكوس يتم من خلال اذابة العينة في مذيب معين(الطور المتحرك عادة) ومن ثم إمراره على عمود فصل وان الطور المتحرك يمر بمساعدة ضغط يصل الى 50 الى 200 بار ويمكن ان ترتبط مكونات العينة بدرجات مختلفة مع مكونات العمود الذي يمثل الطور الثابت ومن ثم تنقسم مكونات العينة بين الطور الثابت والطور المتحرك على وفق درجة قطبيتها وان اكثر انواع HPLC المستخدمة في عمليات الفصل تستخدم طورا ثابتا غير قطبي وطورا متحركا قطبي وهذا ما يعرف RP-HPLC وعندما يستخدم طور متحرك مكون من 50: 50 ماء الى نترات الاسيتيل هذا يشير الى ان الفصل تم تحت ظروف Isocratic(مكونات الطور المتحرك تبقى ثابتة من دون تغير في اثناء عملية الفصل) أما استخدام نسب خلط مختلف في اثناء الفصل (اي ان مكونات الطور المتحرك تتغير في عملية الفصل وتكون غير ثابتة) فيطلق عليها الغسل التدريجيgradient elution [10] .

وان الهدف من هذه الدراسة هو تحديد العلاقة بين درجة الكره للماء للببتيدات الناتجة من تحلل بروتينات حليب الابل بفعل عملية التخمر وقدرة هذه الببتيدات على تثبيط البكتريا المرضية.

**طرائق العمل**

**حليب الابل Camel milk**

تم الحصول على عينات حليب الابل من وسط وغرب العراق ونقلت العينات بطريقة معقمة ومبردة الى مختبرات قسم علوم الاغذية/ كلية الزراعة/ جامعة بغداد.

**عملية الفرز**

اجري فرز حليب الابل باستخدام الفراز في معمل البان قسم علوم الاغذية كلية الزراعة جامعة بغداد على 2500 xg بدرجة حرارة الغرفة [13].

**تنشيط البادئ**

تم تنشيط البادئ وحسب تعليمات شركة دانسكو الدنماركية (Danisco, Denmark) (*Streptococcus thermophilus* ، *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*)

**تصنيع حليب الابل المتخمر**

تم تصنيع حليب الابل المتخمر على وفق الطريقة التي وصفها[1] .

**تنقية الببتيدات باستخدام كرموتوغرافي بالسائل عالي الاداء ذو الطور المعكوسRP-HPLC**:

اتبعت طريقة [15]في تنقية الببتيدات مع بعض التحويرات باستخدام خلط لمحاليل الطور المتحرك بنسب خاصة ،حيث تم تحضير محاليل الطور المتحرك المؤلفة من الطور المتحرك A والذي يتكون من 0.1% من Trifluoroacetic acid HPLC grade ( TFA- HPLC grade) في الماء D.Wوالطور المتحرك B يتكون من 0.1% من TFA في Acetonitrile HPLC grade (ACN- HPLC grade) وتم عملية ترشيح الطور المتحرك (A، B) باستخدام ورق ترشيح (Millipore Co.) 0.45µm وازالة الغاز Degassing باستخدام جهاز ultrasonic المجهز من شركة DELTA لمدة 15 دقيقة لضمان خلوة من الشوائب والغازات وحفظة في عبوات خاصة. وتم جدول ( 1)الاسترداد بالخلط التدريجي للطور المتحرك(A،B)

| Time (min) | situation a gradual mixing |
|---|---|
| 0-10 | 100% Mobile phase A |
| 11-55 | Gradient elution |
| 55-67.5 | 100% Mobile phase B |

**السلالات البكتيرية**

استخدمت سلالات قياسية *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ، *Streptococcus faecalis* ATCC 13048، *Shigella dysenteriae* ATCC 11311 ، المجهزة من مختبرات كلية علوم وتكنلوجيا الاغذية جامعة University Sains Islam Malaysia (USIM) وسلالة *Escherichia coli* BL21(DE3) origami المجهزة من مختبرات كلية التقنات الاحيائية جامعة UPM وقد تمت تنمية السلالات المرضية في وسط مرق Tryptone soya broth المعقم في انابيب اختبار في درجة حرارة 37°م لمدة 18ساعة .

**تقدير الفعالية المضاده للبكتريا**

تم قياس الفعالية المضادة للبكتريا على فق الطريقة التي وصفها[8] .

**تحديد العلاقة بين درجة الكره للماء والقدره على تثبيط البكتريا**

تم اتباع الطريقة التي وصفها[8] بتحديد العلاقة بين درجة الكرة للماء Hydrophobicity وقدرة الببتيدات على تثبيط البكتريا المرضية

**النتائج والمناقشة**

تم استخدام كرموتوغرافي السائل عالي الأداء معكوس الطور RP-HPLC في تنقية الببتيدات الموجودة في المستخلص المائي لحليب الابل المتخمر ، اذ يلاحظ من الشكل (1) أن استخدام الخلط التدريجي في الطور المتحرك للمذيب B ( 0.1% TFA/Acetonitrile) مع المذيب A (0.1%TFA/water) لضمان عملية تنقية الببتيدات وفقا لقابلية الكره للماء ( Hydrophobicity). وخلال المراحل الاولى من التنقية قد تم إستخدام الطور المتحرك المكون من المذيب A فقط (100%) لضمان استرداد كل الببتيدات التي تمتاز بالقطبية (Polarity) والمحبة للماء(Hydrophilic) وبعد الزيادة التدريجية للمذيب B في الطور المتحرك سوف تزداد درجة كره الماء وتقل القطبية حتى النهاية(بعد وقت احتجاز 55 دقيقية ) إذ يستخدم الطور المتحرك المكون من المذيب B فقط (100%) (الشكل 1) وتم استرداد كل الببتيدات التي امتازت بعدم قطبيتها والكارهة للماء وهذا هو الاساس بعمل كرموتوغرافي عالي الاداء ذو الطور المعكوس [11]. ومع قياس الامتصاصية على طول موجي 205 نانوميتر الخاص بالببتيدات(الشكل 1) وقياس الامتصاصية على طول موجي 280 نانوميتر لتقدير البرروتينات(الشكل 2) وتقدير الفعالية التثبيطية باستخدام تقنية اطباق well 96 لكل الاجزاء المفصولة ، لوحظ من (الشكل 1) أن بعض الببتيدات التي ظهرت خلال وقت الاحتجاز لل 10 دقائق الاولى من الاسترداد والتي تشير الى أن هذه الببتيدات امتازت بأن لها قطبية عالية ومحبة للماء وأن الطور المتحرك مكون من المذيب A ( الماء مع TFA) ولذلك تم استردادها نتيجة عدم ارتباطها بمادة عمود الفصل (الطور الثابت الكاره للماء ) فضلا عن ذلك فقد ظهرت عدة بروتينات

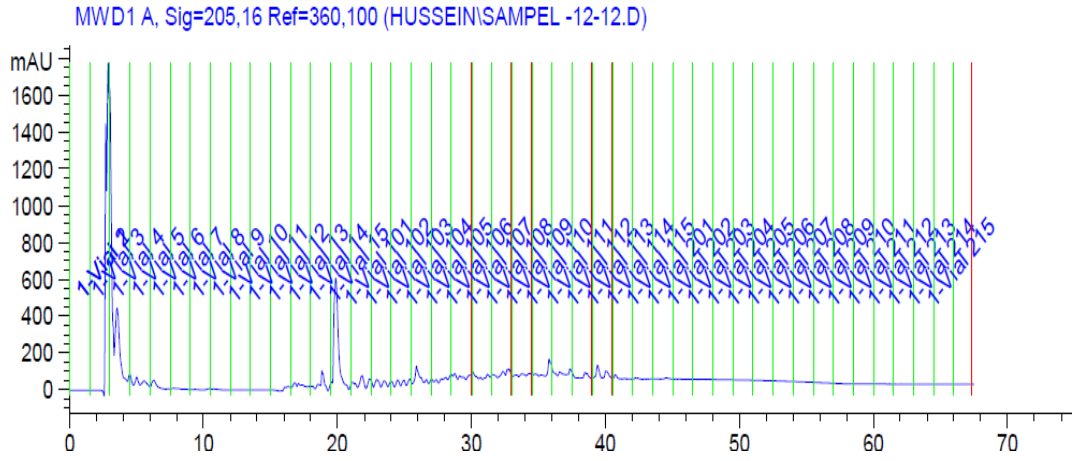
تحميل العينة على جهاز RP-HPLC المحتوي على عمود الفصلcolumn a zorbax 300 SB-C18 (5 µm , 250 mm × 9.4 mm Agilent Technologies , USA) وكان حجم النموذج المحقون داخل الجهاز هو 500 مايكروليتر ، وبمعدل جريان 4 مل/دقيقة ، وجمعت الاجزاء المفصولة بمعدل 6 مل لكل جزء وقيست الامتصاصية على الطولين الموجيين هما 205 و280 نانوميتر. وتم استرداد العينة باستخدام الخلط المتدرج Gradient elution من نوعين من المذيبات كطور A و B في الأوقات والاضافات الموضحة بالجدول(1) .بعد جمع الاجزاء المفصولة من جهاز RP-HPLC تم تجفيدها باستخدام جهاز التجفيد وحفظها بالتجميد -85° م لتقدير الفعالية المضادة للبكتريا .

(الشكل 2) وعدد من الببتيدات (الشكل1) وبعد وقت احتجاز 20 دقيقة اي في الجزء F13 ازدادت نسبة المذيب B بنسبة اكبر على حساب نسبة المذيب A في الطور المتحرك (الشكل 3) مما ادى الى زيادة اللاقطبية على حساب القطبية ومن ثم استرداد عدد من الببتيدات المرتبطة بمادة عمود الفصل. ومع استمرار خلط المذيبين A وB في الطور المتحرك تظهر عدد من الببتيدات وفقا لدرجة Hydrophobicity من خلال قراءة الامتصاصية على 205 نانوميتر (الشكل 1) وظهور عدد قليل من البروتينات من خلال قراءة الامتصاصية على 280 نانوميتر وبتراكيز قليلة جدا (الشكل2) .مع استمرار الفصل ووصل نسبة الطور المتحرك B الى 100% بعد مرور 50دقيقة ظهر عدد قليل من الببتيدات التي تمتلك درجة عالية من الكره للماء حيث أصبحت ظروف الفصل لاقطبية بشكل كامل .

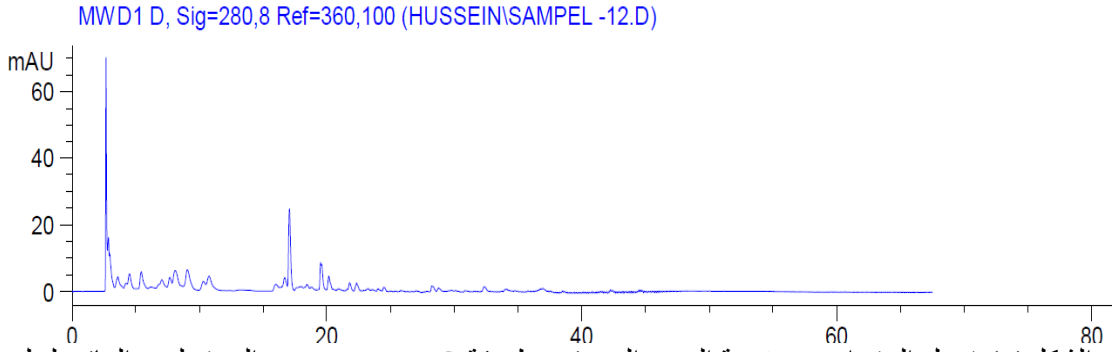
من خلال النتائج نلاحظ ان الغالبية من الببتيدات قد ظهرت في مرحلة وسطية من الخلط بين الطور المتحرك A والطور المتحرك B وبدراسة قدرة هذه الببتيدات على تثبيط أنواع مختلفة من البكتريا المرضية يلاحظ انها قد أظهرت تباين في نسبة التثبيط ومن تحديد العلاقة من درجة الكاره للماء Hydrophobicity والقدرة التثبيطية الشكل (4) الذي يوضح العلاقة بين درجة الكاره للماء والنسبة المؤية لتثبيط بكتريا *Escherichia coli* BL21 يلاحظ ان اغلب الببتيدات التي امتلكت قدرة على تثبيط البكتريا قد كانت لها درجة Hydrophobicity تراوحت 30-60 (الشكل4 ) وهذه بالطبع يعود الى طبيعة تكوين هذه الببتيدات من الأحماض

الامينية .الشكل (5) اظهر ان الأجزاء المفصولة بتقنية RP HPLCكانت ضعيفة في قدرتها على تثبيط بكتريا *Staphylococcus aurous* ATCC 25923 حيث ان معظم الببتيدات التي امتلكت درجة الكره للماء بحدود 60 لم تكن لها القدرة العالية على تثبيط نمو بكتريا *Staphylococcus aurous* ATCC 25923 وهذه ما ينطبق على بكتريا *Streptococcus faecalis* ATCC 13048 في الشكل (6)حيث لم تظهر الببتيدات في الاجزاء المفصوله اي قدرة على تثبيط البكتريا ، واظهر الشكل (7) ان للاجزاء المفصول قدرة في تثبيط بكتريا *Shigella dysenteriae* ATCC حيث كانت تمتلك درجة الكاره للماء بحدود 30-60 من هذه يلاحظ ان معظم الببتيدات الموجوده في الاجزاء المفصوله والتي تمتلك قدرة على تثبيط البكتريا المرضية هي متوسطة درجة الكاره للماء وقد ظهرت في مرحلة متوسطة من الاسترداد باستخدام الطور المتحرك (A+B) وهو انعكاس لطبيعة الاحماض الامينية المكونة لها والتي بدورها تؤدي دورا مهما في الفعالية الحيوية والصفات الوظيفية للببتيدات المختلفة ومنها القدرة على تثبيط البكتريا المرضية . وجاءت هذه النتائج متوافقة مع ما وجده [9] في أن الببتيدات المفصولة من الحليب المتخمر تركز ظهورها في منطقة Hydrophobic zone من خلط نترات الاسيتيلAcetonitrile في الطور المتحرك،واشار [16] من أن اول القمم التي ظهرت في تنقية الببتيدات باستخدام RP-HPLC من WSE للجبن المصنع من حليب الاغنام هي عبارة عن ببتيدات محبة للماء Hydrophilic ناتجة عن تحلل كازينات الحليب .

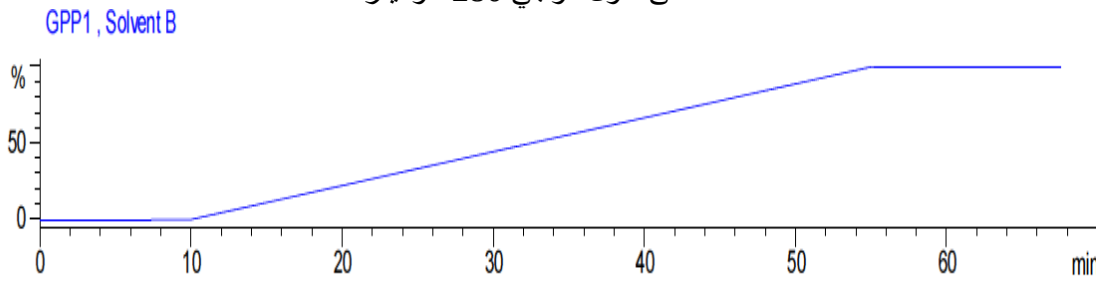
وتستند الفعالية لكل الببتيدات المضادة للبكتريا على مبدأ انها محللة للجدار الخلوي للبكتريا – membrane lytic activity والتي تؤدي الى أحداث قناة في الجدار الخلوي للبكتريا [7]، وأن عددا من الببتيدات المضادة للميكروبات تكون α-helical، cationic و amphipathic فضلا عن انها تكون كارهة للماء [6] . إن الميكانيكية التي تعمل بها الببتيدات في تثبيط او قتل البكتريا تتم من خلال دخول الببتيد الى داخل الخلية او التاثير في عملية الاستساخ او عملية تخليق البروتينات او من خلال الارتباط الكهربائي بين الببتيد والغشاء البلازمي والذي يتطلب أن تكون الببتيدات بترتيب معين مثل وجود تجمعات من الاحماض الامينية الكارهة للماء او أنها تحمل شحنة موجبة ويمكن أن تنظم نفسها بشكل amphipathic form اي جزء محب للماء وجزء كاره للماء وفي هذه الحالة الجانب الكاره للماء يرتبط مع دهون الغشاء أما الجانب الاخر من الببتيد فيرتبط بالشحنة السالبة للغشاء[4].



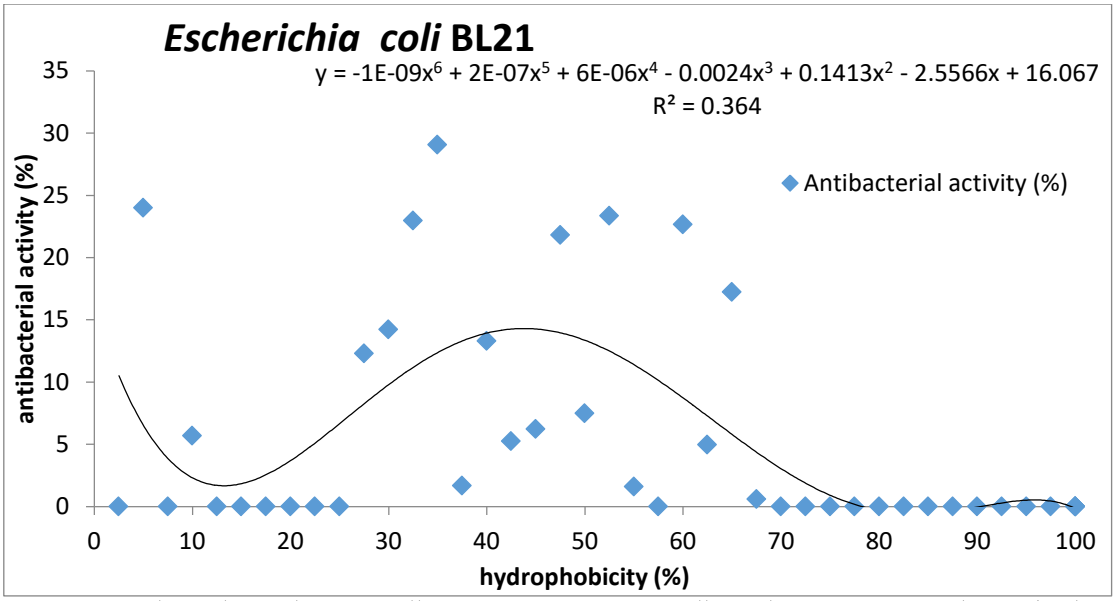

الشكل( 1) فصل الببتيدات منخفضة الوزن الجزيئي بطريقة RP-HPLC من المستخلص المائي لحليب الابل المتخمر على طول موجي 205نانوميتر



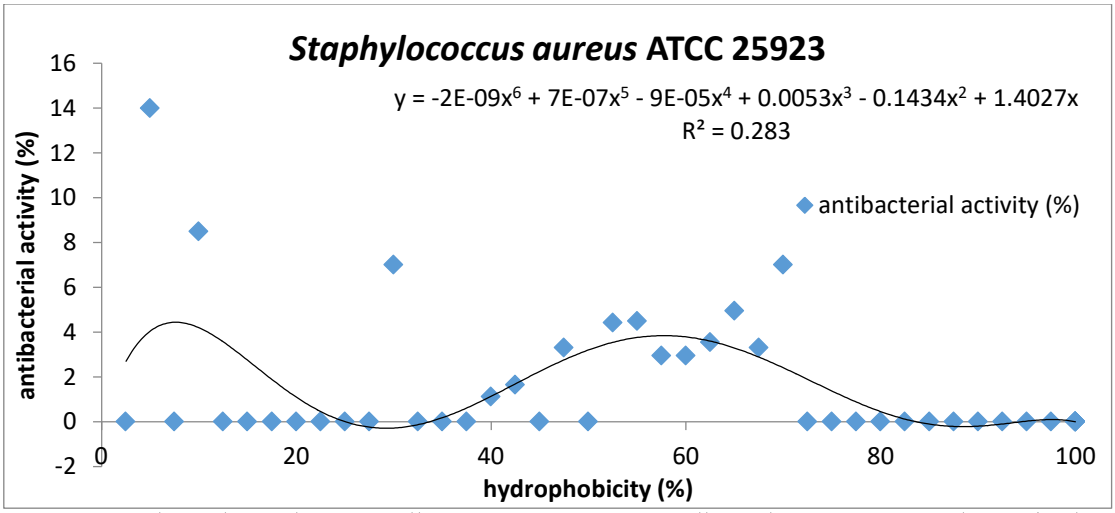

الشكل(2) فصل الببتيدات منخفضة الوزن الجزيئي بطريقة RP-HPLC من المستخلص المائي لحليب الابل المتخمر على طول موجي 280نانوميتر



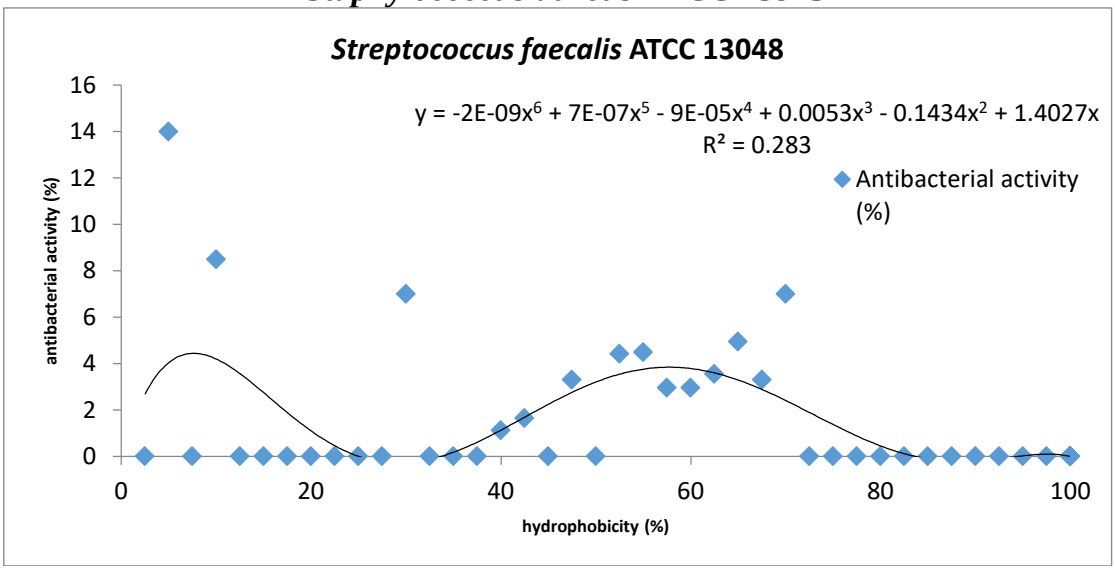

الشكل(3) النسبة المئوية لخلط الطور المتحرك للمذيب B مع المذيب A



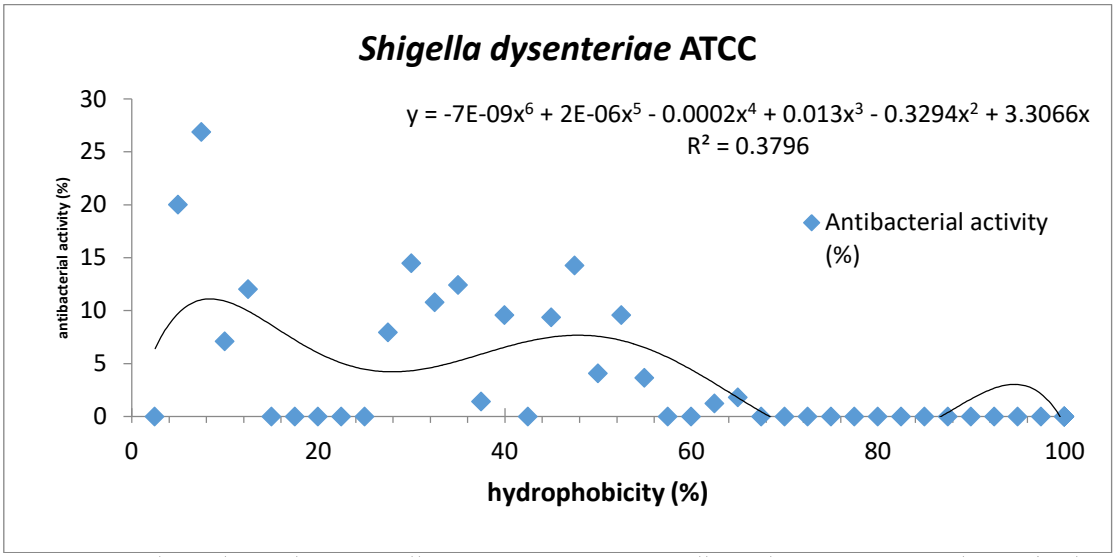

الشكل(4) العلاقة بين درجة الكاره للماءHydrophobicity للببتيدات والنسبة المؤية لتثبيط بكتريا
***Escherichia coli BL21***




الشكل(5) العلاقة بين درجة الكاره للماءHydrophobicity للببتيدات والنسبة المؤية لتثبيط بكتريا
***Staphylococcus aureus ATCC 25923***



الشكل(6) العلاقة بين درجة الكاره للماءHydrophobicity للببتيدات والنسبة المؤية لتثبيط بكتريا
***Streptococcus faecalis ATCC 13048***




الشكل(4) العلاقة بين درجة الكاره للماءHydrophobicity للببتيدات والنسبة المؤية لتثبيط بكتريا
***Shigella dysenteriae* ATCC**

المصادر


1. Abdel Rahman, I. E.; Dirar ,H. A. & Osman, M. A. (2009). Microbiological and biochemical changes and sensory evaluation of camel milk fermented by selected bacterial starter cultures. *African Journal of Food Science* , 12: 398-405.
2. Abdel-Bar, N.; Harris, N.D. & Rill, R.L. (1987). Purification and properties of an antimicrobial substance produced by Lactobacillus bulgaricus. *Journal of Food Science*, 52: 411-415.
3. Alhaj,O. ; Bruckner,H.& Al-Khalifa.A.(2012). Identification of ACE-Inhibitory precursor peptides from fermented camel milk (Camelus dromedarius) produced by *Lactobacillus helveticus* or *Lactobacillus acidophilus* using HPLC-MS.2nd Kiel Food 2nd Kiel Food Science Symposium. Kiel .Germany pp .33-34.
4. Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nature Reviews in Microbiology*, 3: 238–250.
5. Clare. D. A. & Swaisgood. H. E. (2000). Bioactive Milk Peptides: A Prospectus. *Journal Dairy Science*, 83:1187–1195.
6. Epand, R. M .& Vogel, H.J.(1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica Biophysica Acta*, 1462:11–28.
7. Floris, R.; Recio, I.; Berkhout, B.& Visser, S. (2003). Antibacterial and antiviral effects of milk proteins and derivatives thereof. *Current Pharmaceutical Design* ,9 ;1257–1275.
8. Ghanbari, R.; Ebrahimpour, A.; Abdul-Hamid ,A.; Ismail ,A. & Saari,N. (2012). *Actinopyga lecanora* Hydrolysates as Natural Antibacterial Agents. *International Journal of Molecular Sciences*. *13*, 16796-16811
9. Gobbetti, M.; Ferranti, P.; Smacchi, E. ; Goffredi, F. & Addeo, F. (2000).

Production of angiotensin-I converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides in fermented milks started by Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus SS1 and *Lactococcus lactis subsp. cremoris* FT4. *Applied Environmental Microbiology*, 66:3898–3904.

10. Herraiz, T. (1997). Sample preparation and reversed phase-high performance chromatography analysis of food-derived peptides . *Analytical Chimica Acta*. 352 : 119-139
11. Mahoney, W. C. & Hermodson, M. A. 0(1980). Separation of Large Denatured Peptides by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography. *Journal of biological chemistry*, 255(23): 11199-11203.
12. Malinowski, J. (2012). Bioactive peptides from milk protein as functional food ingredient focus on antioxidant and ACE focus on antioxidant and ACE -inhibitory peptides.2nd Kiel Food 2nd Kiel Food Science Symposium. Kiel .Germany .May 22-23 .pp 41.
13. Moline, E. ; DE Frutos , M.& Ramos, M.(2000). Capillary electrophoresis characterization of the casein fraction of cheeses made from cows, ewes and goats milks. *Journal of Dairy Research*,67:209-216.
14. Natasa, J,; Milica . N.; Jelena , Begovic .; Branko , J.; Dragisa, S.& Ljubisa, T. (2008). A survey of the lactic acid bacteria isolated from Serbian artisanal dairy product kajmak, *International Journal of Food Microbiology*, 127: 305-3112.
15. Quiros, A.; Herna´ndez-Ledesma, B.; Ramos, M.; Amigo, L. & Recio, I. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine Kefir. *Journal of Dairy Science*, 88, 3480–3487.
16. Silva, S. V. & Malcata, F. X.(2005). Partial Identification of Water-Soluble Peptides Released at Early Stages of Proteolysis in Sterilized Ovine Cheese-Like Systems: Influence of Type of Coagulant and Starter. *Journal Dairy Science*. 88:1947–1954.
17. Talarico, T.L., Casas, I.A., Chung, T.C., & Dobrogosz, W.J. (1988). Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 32:1854-1858.
18. Veloso, A.C.A.; Teixeira, N . & Ferreira ,C. (2002). Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis: Detection of milk adulterations. *Journal Chromatography A*, 967: 209-218.