مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بررسی محتوای پروتئینی و ارتباط فعالیت آنزیمی با اثر ضد میکروبی نمونه‌های عسل ایرانی

محدثه نقادیان مقدم[۱]، الهه محمودی خالدی[۲*]

۱- کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

۲- استادیار، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۹۹ /۰۹/۰۳

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۱۱

کلمات کلیدی:

عسل‌های ایرانی،

فعالیت ضد باکتریایی،

گلوکزاکسیداز،

اینورتاز،

آمیلاز.

DOI: 10.52547/fsct.18.05.26

* مسئول مکاتبات:

e.mahmoodi_kh@kashanu.ac.ir

چکیده

عسل محصولی طبیعی است که از دیرباز علاوه بر تغذیه، برای درمان نیز کاربرد داشته است. در این ارتباط، اثر ضد میکروبی چند عسل ایرانی علیه سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک و ارتباط این اثر با فعالیت آنزیمی نمونه‌های عسل مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه، محتوای پروتئینی ۲۰ نمونه عسل قبل و بعد از استخراج تعیین و با تکنیک SDS-PAGE بررسی گردید. سپس میزان فعالیت آنزیم‌های گلوکزاکسیداز، آمیلاز، اینورتاز و کاتالاز هر عسل اندازه‌گیری شد. مهار سویه‌های باکتریایی مورد آزمون در حضور عسل با روش انتشار از چاهک بررسی شد و ارتباط فعالیت آنزیمی با اثر ضد باکتریایی و تازگی عسل ارزیابی گردید. محتوای پروتئینی نمونه‌ها قبل از استخراج در محدوده ۰/٤±۰/۰٦ تا ٦٤/۱۹±۱/۰ میلی‌گرم بر گرم عسل قرار داشت و پس از استخراج این میزان حدود ۵۰٪ یا کمتر کاهش یافت. در نمای پروتئینی همه عسل‌ها پس از الکتروفورز، ۳ باند مربوط به آنزیم‌های آمیلاز، اینورتاز و گلوکزاکسیداز قابل مشاهده بود. میزان فعالیت آنزیم‌ها به ترتیب به گلوکزاکسیداز> اینورتاز> آمیلاز> کاتالاز اختصاص داشت. نمونه‌های عسل منتخب فاقد اثر بر سویه‌ی *Staphylococcus epidermidis* و دارای کمترین اثر بر سویه‌ی *Pseudomonas aeruginosa* بودند. الگوی مهاری سویه‌های *Escherichia coli* و *Enterococcus faecalis* مشابه بود، اما الگوی مهاری متفاوتی از سویه‌ی *Staphylococcus aureus* پس از تلقیح عسل‌ها مشاهده شد. این بررسی نشان داد که آنزیم گلوکزاکسیداز نقش مهمی در مهار باکتری‌ها دارد، اما این نقش در سویه‌های کاتالاز مثبت دچار نوسان است. همچنین آنزیم‌های آمیلاز و اینورتاز می‌توانند معیاری از تازگی عسل‌ها باشند.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/fsct.18.114.319]

۱- مقدمه

عسل از مهمترین محصولات طبیعی است و از دیرباز علاوه بر تغذیه، برای درمان نیز استفاده شده است [۱]. کربوهیدرات‌ها از عمده‌ترین ترکیبات موجود در عسل‌ها هستند، اما ترکیبات مهم دیگری از جمله: آنزیم‌ها، پروتئین‌ها، آمینواسیدها، ویتامین‌ها، لیپیدها و مواد معدنی نیز در انواع عسل‌ها وجود دارد [۲]. عسل دارای خواص ضد میکروبی بالایی می‌باشد که منشأ گیاهی، شرایط محیطی، شرایط پردازش و نگهداری و همچنین تازگی نمونه‌های عسل نقش مؤثری در آن دارند [۱]. پراکسید هیدروژن تولید شده از آنزیم گلوکزاکسیداز موجود در عسل مهمترین عامل در ایجاد خواص ضد میکروبی عسل است و پس از آن می‌توان به نقش pH، میزان رطوبت عسل، متیل‌گلی‌اکسال، پروتئین‌ها، پپتیدها، فلاوونوئیدها و سایر مواد پلی‌فنولی عسل اشاره کرد [۳-۶]. عسل شناخته شده‌ی مانوکا از گیاه بومی استرالیا و نیوزیلند به نام *Leptospermum scoparium*، توسط یک سیستم طبقه‌بندی منحصر به فرد نشانه‌گذاری می‌شود که این سیستم با میزان متیل‌گلی‌اکسال و محتوای کلی فنول‌ها در ارتباط است. فعالیت ضد باکتریایی غیر پراکسیدی عسل مانوکا نیز تحت تأثیر ماده‌ی متیل‌گلی‌اکسال آن است [۳].

آنزیم‌ها از مهمترین پروتئین‌های موجود در عسل هستند. از شناخته‌شده‌ترین آنزیم‌های عسل می‌توان به گلوکزاکسیداز، آمیلاز، اینورتاز و کاتالاز اشاره کرد [۷, ۸]. آنزیم گلوکزاکسیداز واکنش تبدیل گلوکز به گلوکونیک اسید و پراکسید هیدروژن را کاتالیز کرده که به ترتیب در پایداری عسل و ایجاد خاصیت ضد میکروبی آن نقش دارند، پراکسید هیدروژن بسیار ناپایدار است و در حضور یون‌های فلزی با میکروارگانیسم‌ها واکنش داده و آن‌ها را از بین می‌برد. آنزیم دیاستاز یا آمیلاز و آنزیم اینورتاز نیز شاخصی برای نشان دادن تازگی عسل هستند که هر سه این آنزیم‌ها از غدد تحت بزاقی زنبور کارگر وارد شهد شده و سپس در روند تبدیل شهد به عسل، وارد عسل می‌شوند. آنزیم اینورتاز یا آلفا گلوکوزیداز بیشترین سهم (۵۰٪) را در محتوای کلی پروتئین‌های بزاقی زنبور دارد [۸]. آنزیم کاتالاز منشأ گیاهی داشته و در همه‌ی انواع عسل‌ها وجود ندارد، این آنزیم در تعدیل پراکسید هیدروژن نقش دارد [۷].

عسل‌ها دارای خاصیت ضد باکتریایی در برابر طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها از جمله باکتری‌های جدا شده از زخم‌های آلوده به عفونت هستند [۹]. امروزه افزایش باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها از بزرگترین علل مرگ و میر در جهان است که این مشکل، اهمیت تحقیقات برای یافتن جایگزین‌های مناسب آنتی بیوتیک‌ها را نشان می‌دهد [۱۰]. طی گزارشات متعددی نشان داده شده است که باکتری‌های مقاوم به دارو نسبت به عسل‌های مختلف به میزان متفاوتی حساسیت نشان داده‌اند [۱۱]. عسل‌های ایرانی در مقایسه با عسل‌های کشور مجاور یعنی عراق و عسل-های تولید شده از برخی دیگر از مناطق جهان خواص ضد میکروبی بیشتری از خود نشان داده‌اند [۱۲]. اگر چه مطالعات متعددی به بررسی فعالیت ضد میکروبی عسل پرداخته‌اند، اما ارتباط این فعالیت با محتوای پروتئینی و فعالیت آنزیمی عسل کمتر مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه حاضر به جداسازی پروتئین‌های بیست نمونه عسل ایرانی و بررسی میزان فعالیت آنزیمی آن‌ها پرداخته می‌شود. سپس ارتباط فعالیت آنزیم‌های گلوکزاکسیداز و کاتالاز پنج نمونه عسل منتخب با فعالیت ضد باکتریایی آن‌ها در مهار سویه‌های گرم مثبت و گرم منفی جدا شده از عفونت‌های زخم مورد بررسی قرار می‌گیرد. در ادامه به ارتباط فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و اینورتاز موجود در عسل‌ها در بررسی تازگی عسل نیز پرداخته می‌شود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌های عسل

در مطالعه حاضر ۲۰ نمونه عسل مطابق جدول ۱ از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری شده و تا زمان آزمایش در ظروف شیشه‌ای تیره رنگ داخل یخچال در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی-گراد قرار گرفتند. اصالت نمونه‌های عسل علاوه بر ادعای زنبورداران، با آزمون‌های فیزیکوشمیایی مرسوم مورد بررسی قرار گرفت. کلیه محیط‌های کشت و مواد مصرفی در این مطالعه از شرکت Merck (کشور آلمان) خریداری شد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/fsct.18.114.319]

Table 1 Floral origin, date of collection, and origin of honey samples

No.	Code	Floral origin	Date of collection	Origin
1	A_1	Multifloral	September 2018	Ardabil
2	A_2	Multifloral	September 2018	Fars Province
3	A_3	Sun flower	March 2018	Mount Damavand-Alborz
4	A_4	Chamomile	March 2018	Yasuj
5	A_5	Astragal	March 2018	Kerman
6	A_6	Multifloral	June 2019	Kurdistan Province
7	B_1	Alfalfa	March 2018	Sabalan
8	B_2	Multifloral	August 2019	Sabalan
9	B_3	Multifloral	August 2019	Sabalan
10	H_1	Persian rose	September 2018	Hamedan
11	H_2	Multifloral	September 2018	Hamedan
12	U_1	Multifloral	September 2018	Urmia
13	U_2	Multifloral	September 2018	Urmia
14	U_3	Locust tree	August 2019	Urmia
15	U_4	Multifloral	June 2019	Urmia
16	U_5	Multifloral	June 2019	Urmia
17	U_6	White clover	June 2019	Urmia
18	U_7	Multifloral	June 2019	Urmia
19	U_8	Hawthorn	June 2019	Urmia
20	U_9	Multifloral	June 2019	Urmia

۲-۲- استخراج و جداسازی پروتئین‌ها

در ابتدا به منظور تعیین محتوای پروتئینی نمونه‌های عسل، رقت ۵۰٪ (وزنی/حجمی) هر نمونه تهیه و پس از واکنش با محلول برادفورد، جذب هر محلول در ۵۹۵ nm با سه تکرار خوانده شد [۱۳]. برای جداسازی محتوای پروتئینی، از غشاهای دیالیز ۱۲٤۰۰ دالتون با عرض ۲.۵ سانتی‌متر استفاده شد. به این منظور، هر نمونه عسل در بافر فسفات تا رقت ۵۰٪ (وزنی/حجمی) حل شده و به کیسه‌های دیالیز فعال شده اضافه شد و دیالیز به مدت ۱۲ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. بعد از سانتریفوژ، میزان مشخصی سولفات آمونیوم برای رسیدن به غلظت ۸۰ درصد به مایع روئی اضافه و روی همزن مغناطیسی در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سانتریفوژ مجدد، بافر فسفات به رسوب پروتئینی به دست آمده اضافه شده و دیالیز به مدت یک شبانه روز تکرار شد [۱٤]. محتوای پروتئینی نمونه‌ها پس از استخراج نیز با روش برادفورد مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت با استفاده از تکنیک SDS-PAGE و رنگ-آمیزی ژل‌ها با رنگ آبی کوماسی، باندهای پروتئینی مورد بررسی قرار گرفت [۱۵].

۲-۳- سنجش فعالیت ویژه آنزیم گلوکزاکسیداز

برای سنجش فعالیت گلوکزاکسیداز از یک روش رنگ‌سنجی مبتنی بر واکنش Trinder استفاده شد. به این منظور ۲۰ میکرولیتر از رقت ۵۰٪ (وزنی/حجمی) عسل با ٤٦۰ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=٦)، ۲۰ میکرولیتر گلوکز ۱۰٪، ٤۸۰ میکرولیتر از محلول A (فنول و ٤-آمینو آنتی‌پیرین ۰.۰٤ میلی‌مولار در بافر فسفات) و ۲۰ میکرولیتر آنزیم پراکسیداز (۲۰ واحد ≤) ترکیب شد. پس از ٦۰ دقیقه گرماگذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جذب محلول در طول موج ۵۱۰nm خوانده شد. از منحنی جذب پراکسید هیدروژن در غلظت‌های ۰ تا ۰.۱٤ میلی‌مولار بر میلی‌لیتر در بافر فسفات برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد [۱٦].

۲-٤- سنجش فعالیت ویژه آنزیم آمیلاز

برای سنجش فعالیت آنزیم آمیلاز به روش نقطه پایان، ۲۰ میکرولیتر از رقت ۵۰٪ (وزنی/حجمی) عسل با ۸۰ میکرولیتر محلول نشاسته ۱٪ و ٤۰۰ میکرولیتر بافر با pH =٤/۵ مخلوط شده و بلافاصله پس از ورتکس، به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/fsct.18.114.319]

گرم با دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ٥٠٠ میکرولیتر محلول DNS به مخلوط واکنش اضافه و ویال‌ها به مدت ٥ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفتند. در نهایت پس از رسیدن سریع به دمای محیط، جذب نمونه‌ها در طول موج nm ٥٤٠ خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از مالتوز در غلظت‌های ٠.٥ تا ٥ میکرومول بر میلی‌لیتر استفاده شد [١٧].

٢-٥- سنجش فعالیت ویژه آنزیم اینورتاز

به منظور سنجش فعالیت آنزیم اینورتاز، ٢٥٠ میکرولیتر بافر و ٢٠٠ میکرولیتر سوکروز ٠/١ مولار را به ٥٠ میکرولیتر محلول ٥٠٪ (وزنی/حجمی) عسل اضافه کرده و بعد از ٣٠ دقیقه انکوباسیون در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد، ٥٠٠ میکرولیتر محلول DNS به لوله‌ها اضافه کرده و جذب در طول موج ٥٤٠nm خوانده شد. برای محاسبه فعالیت آنزیم از منحنی استاندارد بر حسب غلظت‌های مختلف مالتوز (٠.٥ تا ٥ میکرومول بر میلی‌لیتر) استفاده شد [١٨].

٢-٦- سنجش فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز

ابتدا ٥٠ میکرولیتر محلول ٥٠٪ (وزنی/حجمی) عسل را به ٥٠ میکرولیتر بافر پتاسیم ٥٠ میلی‌مولار با pH=٧ و حاوی پراکسید هیدروژن ١٠ میلی‌مولار اضافه و کاهش جذب در طول موج ٢٤٠nm طی ٣٠ ثانیه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم بر حسب میکرومول پراکسید هیدروژن مصرف شده (با ضریب خاموشی٤٣/٦) در دقیقه طبق فرمول زیر محاسبه شد [١٩].

$$\text{Activity} = \frac{\Delta A240/\text{min} \times 1000}{43.6 \text{ mg protein reaction mixture}}$$

٢-٧- نمونه‌های باکتریایی

در این مطالعه، پنج سویه‌ی بالینی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی شامل *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک، *Staphylococcus aureus* و *Staphylococcus epidermidis* مقاوم به متی‌سیلین و *Enterococcus faecalis* مقاوم به ونکومایسین که از دو بیمار مبتلا به زخم پای دیابتی جداسازی شده بودند، مورد استفاده قرار گرفتند. شناسایی سویه‌ها بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی سویه‌ها انجام گرفت.

٢-٨- سنجش فعالیت ضد باکتریایی نمونه‌های عسل

پیش از این سنجش، جهت تعیین آلودگی احتمالی نمونه‌های عسل، محلول ٥٠٪ (وزنی/حجمی) هر نمونه روی محیط آگار خون‌دار کشت داده شد. محلول عسل‌های آلوده پیش از هر آزمایش از فیلترهای استریل نیتروسلولز (٠.٤٥ میکرومتر) عبور داده شدند.

به منظور تعیین فعالیت ضد میکروبی نمونه‌ها، پنج نمونه عسل B_1 ، B_3، U_5، U_6 و U_9 با توجه به فعالیت‌های آنزیمی و شاخص‌های فیزیکوشیمیایی انتخاب و با استفاده از روش انتشار چاهک (Well Diffusion) مورد بررسی قرار گرفتند. پس از کشت باکتری‌ها به روش پورپلیت در محیط مولر هینتون آگار استریل، ٥٠ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عسل (٥٪، ١٠٪، ٢٥٪، ٥٠٪، ٧٥٪ و ١٠٠٪) با ٣ تکرار در چاهک‌های جداگانه داخل پلیت‌ها ریخته شده و پس از ٢٤-١٨ ساعت گرماگذاری در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله‌ی عدم رشد اندازه‌گیری شد [٢٠].

٢-٩- آنالیز آماری

به منظور آنالیز آماری نتایج از نرم‌افزار IBM SPSS 23 (محصول شرکت IBM، ایالات متحده آمریکا) استفاده گردید و سطح معناداری در کلیه آزمون‌ها ($P<٠/٠٥$) در نظر گرفته شد.

٣- نتایج

٣-١- میزان پروتئین عسل‌ها قبل و بعد از استخراج

همانطور که در جدول ٢ قابل مشاهده است، محتوای پروتئینی نمونه‌ها قبل از استخراج در محدوده ٠/٠٦±٠/٤ تا ٦٤/١٩±١/٠ و پس از استخراج در محدوده ٠/٠٢±٠/٢١ تا ٠/٠١±١/٠٨ میلی‌گرم بر گرم عسل قرار دارد. در نتایج حاصل از پروفایل پروتئینی نمونه‌ها پس از الکتروفورز که در شکل ١ نشان داده شده است، تعداد ١٠ تا ١٤ باند مختلف در نمونه‌ها قابل تشخیص است که شش باند ١١٦، ٩٧، ٦٨، ٦٥، ٥٧ و ٥٠ کیلودالتونی در همه نمونه‌ها مشترک هستند.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/fsct.18.114.319]

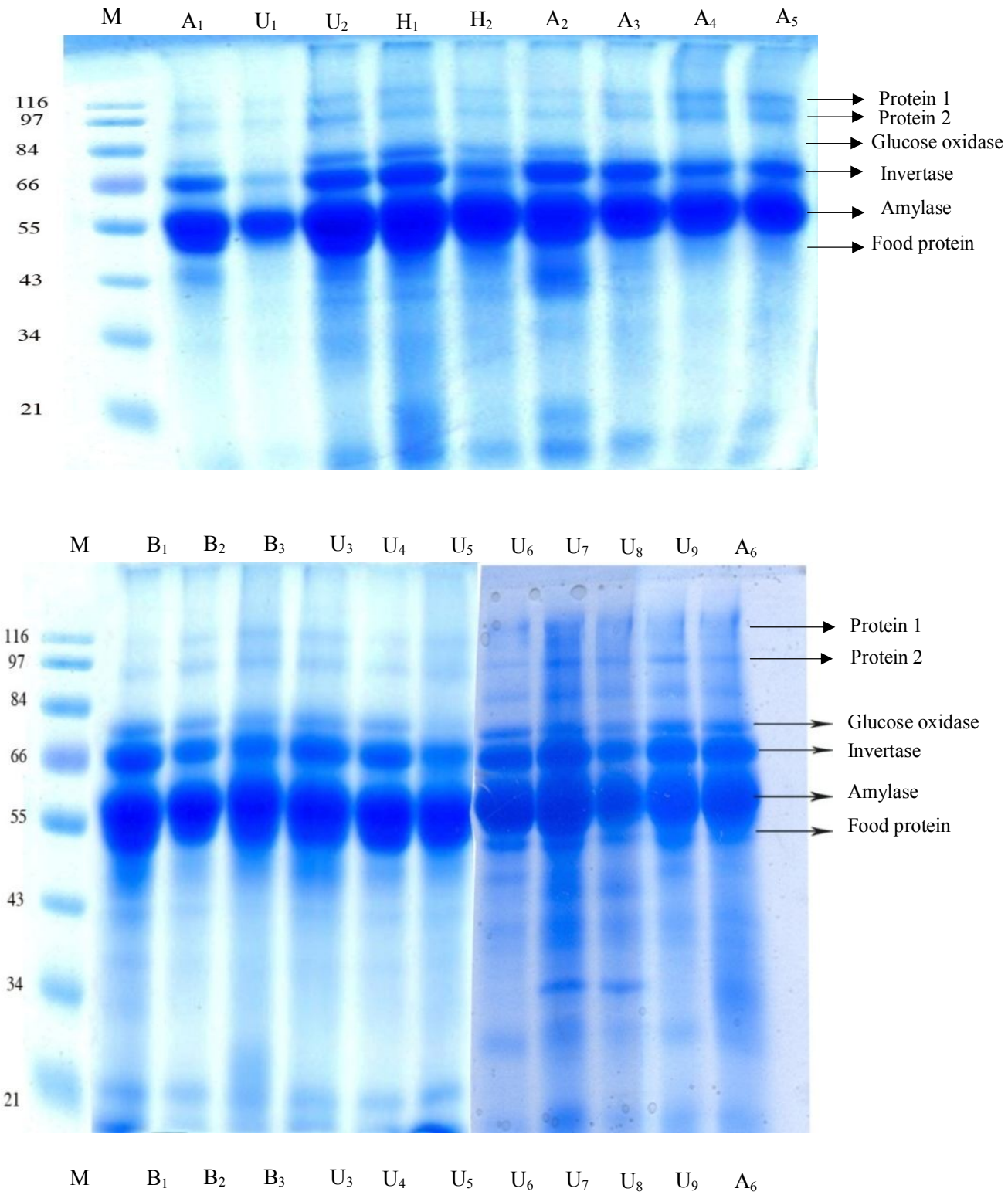

Fig 1 Stained gel electrophoresis related to protein bands extracted from 20 Iranian honey samples (M: Molecular weight marker).

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/fsct.18.114.319]

Table 2 Comparison of protein content of 20 honey samples, before and after extraction (similar letters reveal no significant difference).

Code of honey	The amount of protein (mg/g) before extraction	The amount of protein after (mg/g) extraction
A_1	0.67 ± 0.01^{e}	0.38 ± 0.00^{c}
A_2	1.64 ± 0.19^{a}	1.08 ± 0.01^{a}
A_3	0.49 ± 0.03^{f}	0.28 ± 0.01^{de}
A_4	0.42 ± 0.06^{g}	0.26 ± 0.00^{de}
A_5	0.40 ± 0.06^{g}	0.31 ± 0.02^{d}
A_6	0.66 ± 0.04^{e}	0.47 ± 0.03^{b}
B_1	0.78 ± 0.05^{d}	0.38 ± 0.01^{c}
B_2	0.75 ± 0.02^{d}	0.41 ± 0.03^{c}
B_3	0.65 ± 0.07^{e}	0.35 ± 0.01^{c}
H_1	0.77 ± 0.03^{d}	0.41 ± 0.01^{c}
H_2	0.51 ± 0.08^{f}	0.30 ± 0.01^{d}
U_1	0.41 ± 0.02^{g}	0.21 ± 0.02^{e}
U_2	0.65 ± 0.03^{e}	0.38 ± 0.01^{c}
U_3	0.95 ± 0.03^{c}	0.37 ± 0.04^{c}
U_4	0.72 ± 0.02^{d}	0.47 ± 0.03^{b}
U_5	0.76 ± 0.03^{d}	0.50 ± 0.08^{b}
U_6	0.75 ± 0.02^{d}	0.33 ± 0.05^{d}
U_7	0.64 ± 0.07^{e}	0.44 ± 0.03^{bc}
U_8	0.73 ± 0.02^{d}	0.32 ± 0.01^{d}
U_9	1.33 ± 0.07^{b}	0.39 ± 0.02^{c}

۳-۲- میزان فعالیت آنزیمی نمونه‌ها

فعالیت ویژه آنزیم‌های آمیلاز، اینورتاز، گلوکز اکسیداز و کاتالاز (میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) محلول پروتئینی ۲۰ نمونه عسل ایرانی در شکل ۲ نشان داده شده است.

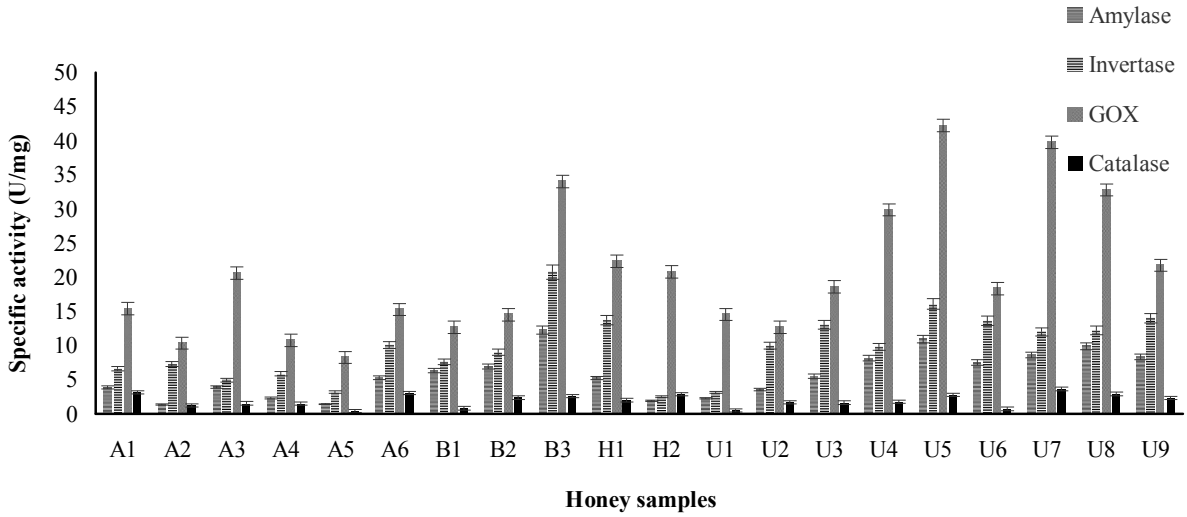

Fig 2 Specific activity of amylase, invertase, glucose oxidase, and catalase enzymes (µmole min^{-1} mg^{-1} protein) in protein solution of 20 Iranian honey samples.

بر این اساس، فعالیت ویژه گلوکزاکسیدازی نمونه‌ها بیشتر از سایر آنزیم‌هاست و با میانگین ۰/۰۳±۲۰/۸۸ در محدوده‌ی ۱/۰٤±۸/۳۵ تا ۲/۲۲±٤۲/۳٤ واحد قرار دارد. فعالیت گلوکزاکسیدازی نمونه‌ی U_5 و پس از آن U_7 بیشتر از سایر

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/fsct.18.114.319]

نمونه‌هاست و کمترین فعالیت آنزیمی نیز مربوط به نمونه‌ی A_5 می‌باشد. فعالیت آمیلازی نمونه‌های عسل با میانگین ۰/۱٤±۵/۷۹، در محدوده ۰/۱۵±۱/۳۹ تا ۰/۲±۱۲/۲۹ واحد قرار دارد. بیشترین فعالیت آنزیم آمیلاز مربوط به نمونه‌ی B_3 و کمترین میزان مربوط به نمونه‌های A_5 و A_2 می‌باشد.

فعالیت ویژه آنزیم اینورتاز نمونه‌های عسل مطابق شکل ۲، در محدوده ۰/۰۳±۲/۵۲ تا ۰/۲٤±۲۰/۷٦ و میانگین ۷۸/۲۵±۹/۰ واحد قرار دارد. بیشترین فعالیت اینوتازی مربوط به نمونه‌ی B_3 و کمترین آن مربوط به نمونه‌ی H_2 می‌باشد.

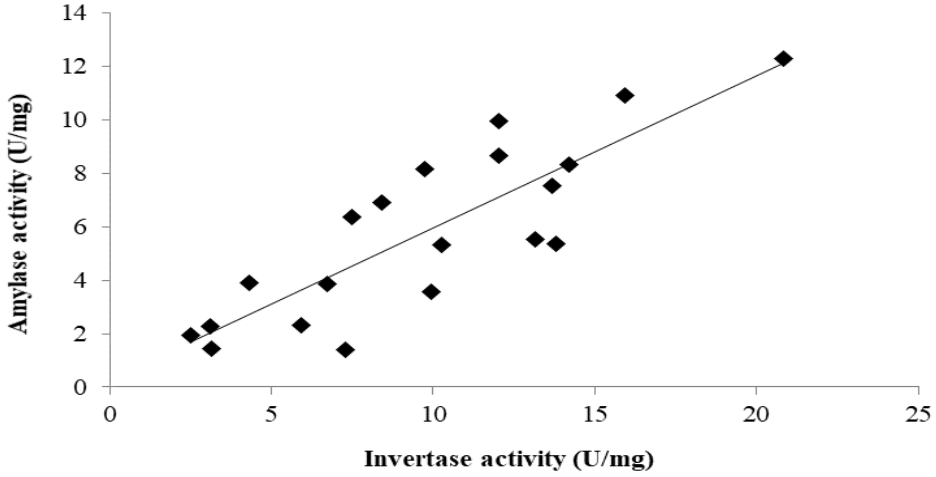

Fig 3 The regression curve for specific activity of amylase versus invertase of 20 Iranian honey samples.

شکل ۳ رگرسیون فعالیت اینورتاز در برابر فعالیت آمیلاز هر نمونه عسل را نشان می‌دهد. با توجه به شکل ۲، فعالیت آنزیم کاتالاز در محدوده‌ی ۰/۰۲±۰/۳۸ تا ۰/۲٤±۳/۵۹ قرار دارد که علی‌رغم فعالیت ناچیز این آنزیم، به دلیل نقش در تجزیه‌ی پراکسید هیدروژن در فعالیت ضد باکتریایی عسل اهمیت دارد.

۳-۳- بررسی ویژگی ضدباکتریایی نمونه‌های عسل

نتایج حاصل از اثر مهارکنندگی پنج نوع عسل علیه سویه‌های مورد مطالعه در جدول ۳ نشان داده شده است. بر این اساس، حداقل غلظت مهارکنندگی علیه سویه‌ی *P. aeruginosa* مربوط به عسل U_5 و در غلظت ۵۰٪ است درحالیکه عسل B_1 در هیچ یک از غلظت‌ها اثر مهار کنندگی از خود نشان نداد. اثر مهارکنندگی عسل‌ها بر روی این سویه کمتر از سه باکتری دیگر است. با توجه به جدول ۳، همه‌ی نمونه‌های عسل به جز B_3 دارای اثر مهارکنندگی علیه سویه *E. coli* از غلظت ۱۰٪ هستند و کمترین قدرت مهارکنندگی علیه این سویه مربوط به نمونه B_1 است. با استناد به جدول ۳ همه‌ی نمونه‌های عسل قدرت مهارکنندگی علیه سویه *S. aureus* دارند و حداقل غلظت مهارکنندگی، مربوط به نمونه‌ی B_3 در غلظت ۵٪ است. نکته قابل توجه در این بررسی اثر مهارکنندگی بیشتر U_6 نسبت به سایر نمونه‌ها و همچنین افزایش اثر مهارکنندگی نمونه B_1 نسبت به دیگر سویه‌ها است. مطابق جدول ۳ بیشترین اثر مهارکنندگی سویه‌ی *E. faecalis* در نمونه‌های U_5، B_3 و U_9 مشاهده می‌شود به طوریکه در اکثر نمونه‌های عسل، حداقل غلظت مهارکنندگی ۵٪ است. هیچ کدام از نمونه‌های عسل دارای قدرت مهارکنندگی علیه سویه *S. epidermidis* نبودند. در شکل ٤ شیب فعالیت آنزیم‌های گلوکزاکسیداز و کاتالاز نمونه‌های عسل در رقت ۵۰٪ نسبت به قطر هاله عدم رشد سویه‌ها نشان داده می‌شود که دیده می‌شود با افزایش آنزیم گلوکزاکسیداز عسل، قدرت مهارکنندگی عسل علیه باکتری افزایش می‌یابد اما در سویه‌ی کاتالاز مثبت *S. aureus* روند غیر طبیعی در افزایش قطر هاله‌ی عدم رشد نسبت به دیگر سویه‌ها مشاهده می‌شود که با در نظر گرفتن افزایش آنزیم کاتالاز عسل، این ارتباط معنی‌دار می‌شود.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/fsct.18.114.319]

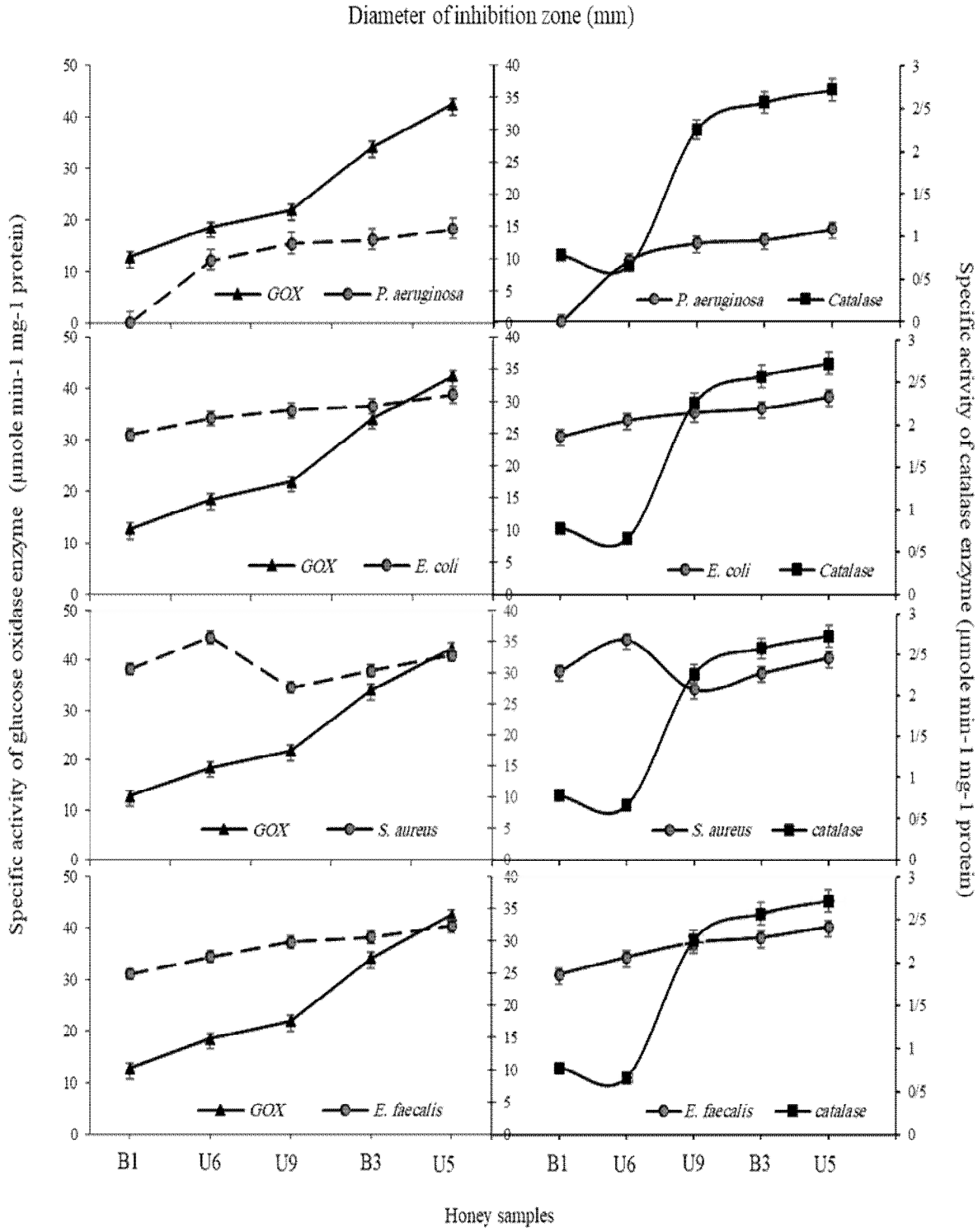

Fig 4 Comparison of the diameter of inhibition zone of the strains (mm) against the specific activity of glucose oxidase and the specific activity of catalase (µmole min^{-1} mg^{-1} protein) of selected honey samples at 50% dilution (w/v).

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/fsct.18.114.319]

Table 3 The inhibitory effect of different dilutions of five Iranian honey samples against four strains of bacteria isolated from the wound by disk diffusion method; The results are based on the diameter of the inhibition zone and in millimeters. The results are the mean of three replications± standard deviation. (similar letters reveal no significant difference).

			Inhibition zone of Strains (mm)			
	Honey samples	Concentration(w/v%)	*P. aeruginosa*	*E. faecalis*	*E. coli*	*S. aureus*
Concentration of honey (W/V%)	B_1	5%	0	7.40±0.20^{d}	0	0
		10%	0	12.50±0.25^{c}	7.66±0.50^{b}	10.50±0.21^{d}
		25%	0	19.23±0.11^{c}	13.33±1.04^{d}	21.66±0.12^{b}
		50%	0	20.56±0.14^{c}	15.03±0.64^{d}	25.16±0.01^{b}
		75%	0	22.10±0.12^{d}	21.96±0.25^{c}	27.06±0.13^{b}
		100%	0	24.86±0.15^{d}	24.86±0.34^{d}	30.60±0.15^{c}
	B_3	5%	0	10.83±0.32^{b}	0	11.66±0.13
		10%	0	13.33±0.33^{b}	0	14.86±0.21^{b}
		25%	0	21.86±0.15^{b}	20.90±1.07^{a}	20.76±0.20^{b}
		50%	0	25.40±0.23^{b}	23.70±0.42^{b}	24.10±0.32^{b}
		75%	6.66±0.52^{c}	27.76±0.23^{b}	26.83±0.44^{b}	27.93±0.24^{b}
		100%	12.80±0.61^{b}	30.53±0.15^{b}	29.33±0.36^{b}	30.33±0.10^{c}
	U_5	5%	0	11.33±0.15^{a}	0	0
		10%	0	14.70±0.02^{a}	11.23±0.02^{a}	17.83±0.12^{a}
		25%	0	24.86±0.14^{a}	18.53±0.33^{c}	27.20±0.14^{a}
		50%	4.40±0.15	28.66±0.01^{a}	27.30±0.02^{a}	28.20±0.02^{a}
		75%	7.66±0.31^{b}	31.30±0.02^{a}	30.33±0.22^{a}	31.66±0.10^{a}
		100%	14.46±0.52^{a}	32.20±0.01^{a}	31.10±0.01^{a}	32.76±0.03^{b}
	U_6	5%	0	8.90±0.16^{c}	0	0
		10%	0	13.73±0.14^{b}	7.66±0.52^{b}	12.46±0.12^{c}
		25%	0	20.63±0.22^{b}	17.66±0.43^{c}	22.46±0.25^{b}
		50%	0	21.03±0.13^{c}	22.33±0.35^{c}	28.80±0.34^{a}
		75%	6.33±0.61^{c}	25.30±0.04^{c}	25.56±0.32^{b}	32.86±0.14^{a}
		100%	9.63±0.81^{c}	27.53±0.11^{c}	27.40±0.21^{c}	35.65±0.02^{a}
	U_9	5%	0	0	0	0
		10%	0	14.46±0.13^{a}	10.86±0.53^{a}	11.30±0.12^{c}
		25%	0	24.06±0.02^{a}	19.16±0.52^{b}	16.20±0.15^{c}
		50%	0	27.96±0.01^{a}	22.56±0.32^{c}	24.23±0.10^{b}
		75%	8.26±0.23^{a}	28.73±0.02^{b}	26.83±0.33^{b}	26.30±0.12^{b}
		100%	12.26±0.32^{b}	29.76±0.22^{b}	28.66±0.23^{c}	27.66±0.03^{d}

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/fsct.18.114.319]

٤- بحث و نتیجه‌گیری

در اولین منابع نوشتاری، از عسل به عنوان غذادارو نام برده شده است [۲۱]. از مهم‌ترین ترکیبات عسل، پروتئین‌ها هستند که با توجه به جدول ۲ میزان آن‌ها پس از استخراج کاهش یافته است که می‌تواند به دلیل جدا شدن پپتیدهای کوچک و همچنین از بین رفتن مقداری از پروتئین‌ها در طی فرآیند استخراج باشد [۲۲]. میزان پروتئین پس از استخراج در همه‌ی نمونه‌ها به جز نمونه‌ی A_2 و U_9، حدوداً برابر یا بالاتر از ۵۰٪ میزان کل پروتئین نمونه‌هاست. دو نمونه A_2 و U_9 دارای پروتئین بالاتر از یک میلی‌گرم/گرم هستند که به عنوان عسل با پروتئین بالا در نظر گرفته می‌شوند؛ این نتایج با میزان پروتئین‌های گزارش شده در سایر مقالات مطابقت دارد [۲۳]. برخی از باندهای پروتئینی مانند شکل ۱ در عسل‌هایی با منشأ گیاهی متفاوت وجود دارند؛ به نظر می‌رسد باندهای ۵۷، ٦٥ و ٦٨ کیلودالتونی به ترتیب با آنزیم‌های آمیلاز، اینورتاز و گلوکزاکسیداز مطابقت داشته باشند [۸].

بازه‌ی فعالیت آنزیم‌های گلوکزاکسیداز، آمیلاز و اینورتاز نیز در این آزمایش با بازه‌ی فعالیت این آنزیم‌ها در مطالعات دیگر همپوشانی دارد [٢٤-٢٦]. با توجه به شکل ۳، علی‌رغم بیشتر بودن فعالیت آنزیم اینورتاز در برابر آمیلاز، ارتباط خطی و مستقیم بین فعالیت ویژه این دو آنزیم برقرار است. با توجه به شکل ۲ نمونه‌های عسل H_2 و A_5 که از قدیمی‌ترین نمونه‌ها در بین ۲۰ نمونه‌ی عسل هستند دارای کمترین مقدار از هر دو آنزیم آمیلاز و اینورتاز می‌باشند، زیرا این دو آنزیم نسبت به شرایط محیطی حساس بوده و از آنجا که برای تبدیل شهد به عسل ضروری هستند بیشتر فعالیت خود را در ابتدای تولید عسل دارند، در نتیجه فعالیت این دو آنزیم به عنوان یک فاکتور برای تعیین کیفیت و تازگی عسل مورد استفاده قرار می‌گیرد و با گذشت زمان مقدار آن‌ها کاهش می‌یابد [۸]. نمونه‌های عسل B_3، U_5و U_9 که از جدیدترین نمونه‌های عسل هستند، دارای بیشترین مقدار از هر دو آنزیم می‌باشند. همچنین با توجه به شکل ٤، عسل‌های B_3، U_5 و U_9 که دارای بیشترین فعالیت آمیلازی و اینورتازی بوده‌اند دارای بیشترین قدرت مهارکنندگی علیه سویه‌های باکتریایی در این آزمایش نیز می‌باشند که نشان می‌دهد عسل‌های جدیدتر به دلیل وجود آنزیم‌های فعال بیشتر، نقش ضد باکتریایی بیشتری نیز دارند.

آنزیم گلوکزاکسیداز با تولید گلوکونیک‌اسید و پراکسید هیدروژن در محافظت از عسل و ایجاد ویژگی‌های ضدباکتریایی آن اهمیت زیادی دارد [۲۷]. مقدار آنزیم گلوکزاکسیداز موجود در نمونه‌ی A_5 که قدیمی‌ترین نمونه است نیز کمتر از سایر عسل‌های این آزمایش است که با توجه به مقالات دیگر نشان می‌دهد مقدار فعالیت آنزیم گلوکزاکسیداز نیز دارای رابطه‌ی مستقیم با آنزیم‌های آمیلاز و اینورتاز است [۲۸, ۲۹]. با توجه به شکل ۲، فعالیت ویژه آنزیم گلوکزاکسیداز بیشتر از سایر آنزیم‌هاست که به دلیل مقاومت این آنزیم در برابر شرایط محیطی نسبت به دیگر آنزیم‌های آزمایش شده می‌باشد. در این مطالعه، فعالیت کمی از آنزیم کاتالاز مشاهده شد که بررسی‌های پیشین نیز این نتایج را تأیید می‌کنند [۷, ۳۰]. با توجه به اینکه آنزیم کاتالاز منشأ گیاهی دارد مقدار آن در عسل‌های مختلف بسیار متغیر است و حتی در نمونه‌های عسل A_5 و U_1 در این آزمایش مقادیر بسیار ناچیزی دارد، اما به دلیل فعالیت در تخریب پراکسید هیدروژن دارای اهمیت است [۳۱]. در این بررسی، بین میزان محتوای پروتئینی نمونه‌های عسل، قبل و پس از استخراج با میزان فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌ها ارتباط معناداری مشاهده نشد ($P<۰/۰۵$).

در این مطالعه سویه‌ی *S. epidermidis* مقاوم‌ترین سویه نسبت به نمونه‌های عسل بود بطوریکه هیچ‌کدام از نمونه‌ها قادر به مهار این سویه نبودند و پس از آن سویه‌ی *P. aeruginosa* کم‌ترین حساسیت را نسبت به عسل‌ها از خود نشان داد به طوریکه نمونه‌ی عسل B_1 در همه‌ی رقت‌ها فاقد قدرت مهار این سویه بود درحالیکه در گزارشی دیگر، عسل‌های ایرانی دارای اثر مهارکنندگی مطلوبی علیه سویه‌ی *P. aeruginosa* هستند که دلیل آن می‌تواند علاوه بر تفاوت در نوع عسل، در نوع روش سنجش فعالیت ضدمیکروبی باشد [۳۲]. نمونه عسل U_5 و پس از آن B_3 که بیشترین فعالیت گلوکزاکسیدازی را دارند دارای بیشترین اثر مهارکنندگی علیه سویه‌های گرم منفی *P. aeruginosa* و *E. coli* و سویه گرم مثبت *E. faecalis* حتی در کمترین غلظت عسل‌ها نیز می‌باشند که در آزمایشات دیگر از عسل‌های ایرانی نیز بیشترین حساسیت در سویه‌ی *E. coli* و کمترین حساسیت در سویه‌ی *P. aeruginosa* مشاهده

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/fsct.18.114.319]

شده است، همچنین مهار سویه‌ی *E. faecalis* نیز در این مطالعه از رقت ۲۵٪ شروع می‌شود که رقت بسیار بیشتری نسبت به نتایج آزمایشات حاضر است [۳۲].

در یک مطالعه مشابه نیز بیشترین اثر مهاری عسل علیه سویه‌ی *S. aureus* و سپس علیه سویه‌های *E. coli*، *P. aeruginosa* و *S. epidermidis* مشاهده شده اما علیه سویه‌ی *E. faecalis* هیچ فعالیت مهاری مشاهده نشده بود [۲۰]. همچنین در بررسی عسل‌های بومی کشور پاکستان، نمونه‌ها دارای بیشترین فعالیت مهاری به ترتیب علیه سویه‌های *E. faecalis*، *S. aureus*، *K. pneumoniae*، *E. coli* و *P. aeruginosa* با روش انتشار از دیسک بوده‌اند [۳۳].

در شکل ٤ دیده می‌شود که هر چند افزایش میزان فعالیت آنزیم گلوکزاکسیداز در میزان مهار باکتری‌های *E. faecalis* و *E. coli* از یک رابطه مستقیم و با شیب مثبت تبعیت می‌کند، اما نسبت مهار این دو سویه با افزایش فعالیت آنزیم گلوکزاکسیداز نسبت به این روند در سویه‌ی *P. aeruginosa* کمتر است. کاهش یا افزایش آنزیم کاتالاز تأثیر قابل توجه و چشمگیری در جهت روند افزایش فعالیت ضدباکتریایی سویه‌های *E. faecalis* و *E. coli* ندارد اما با افزایش مقدار زیاد آنزیم کاتالاز، شیب مهار سویه‌ی *P. aeruginosa* ملایم‌تر می‌شود، به نحوی که در شکل ٤ فعالیت ضد باکتریایی نمونه‌های عسل B_3، U_5 و U_9 که دارای آنزیم کاتالاز بیشتری هستند به صورت نسبتاً یکنواختی درآمده است.

با توجه به نتایج جدول ۳، عسل B_3 در رقت ۵٪ دارای اثر مهارکنندگی علیه سویه‌ی *S. aureus* می‌باشد؛ درحالیکه مهار این سویه در مطالعات دیگر در حضور غلظت‌های بالاتر عسل صورت می‌گیرد [۳۲]. همچنین در غلظت‌های میانی، مهارکنندگی عسل U_5 در رقابت با سایر نمونه‌های عسل علیه این سویه بیشتر است که مطابق تحقیقات دیگر اهمیت فعالیت گلوکزاکسیدازی بالای این عسل را نشان می‌دهد [۳٤]. به طور کلی الگوی مهاری نمونه‌ها علیه باکتری *S. aureus* دچار تغییر شده است، به نحوی که فعالیت مهاری نمونه U_6 و پس از آن B_1 افزایش یافته است که با توجه به کاتالاز مثبت بودن این سویه و تخریب پراکسید هیدروژن، مهار این سویه می‌تواند نشان‌دهنده حساسیت این باکتری به عوامل ضدمیکروبی غیرپراکسیدی این عسل‌ها باشد؛ همچنین این دو نمونه عسل دارای کمترین میزان کاتالاز با اختلاف زیاد نسبت به دیگر نمونه‌های عسل هستند که می‌تواند نشان دهد در مواجهه با سویه‌ی کاتالاز مثبت، نمونه‌ی عسلی که دارای کاتالاز کمتری است می‌تواند با کمک عوامل غیرپراکسیدی، در نهایت فعالیت مهاری مطلوبی ایجاد کند. عسل U_9 نیز با وجود داشتن فعالیت گلوکزاکسیدازی بیشتر در مقایسه با عسل U_6 و حتی نسبت به عسل B_1، اما به دلیل فعالیت بیشتر آنزیم کاتالاز نسبت به دو نمونه‌ی دیگر دارای فعالیت ضد باکتریایی کمتری است. لذا این بررسی نشان داد که آنزیم گلوکزاکسیداز نقش مهمی در مهار باکتری‌ها دارد، اما این نقش در سویه‌های کاتالاز مثبت دچار نوسان است.

۵- نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه، نشان داد که آنزیم‌های آمیلاز و اینورتاز می‌توانند معیاری از تازگی عسل‌ها باشند. همچنین، نقش آنزیم گلوکزاکسیداز به دلیل تولید پراکسید هیدروژن که یکی از عوامل فعالیت ضد باکتریایی عسل می‌باشد، بسیار مهم است. آنزیم کاتالاز نیز با نقشی در تضاد با آنزیم گلوکزاکسیداز موجب تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌شود، پس فعالیت ضد باکتریایی نمونه‌های عسل در نمونه‌های دارای میزان کاتالاز بیشتر دارای نوسان است. از آنجا که تفاوت در پوشش گیاهی و شرایط اقلیمی عسل‌های مختلف سبب می‌شود میزان فعالیت ضد باکتریایی نمونه‌های عسل به طور قابل توجهی متفاوت باشد، بنابراین بررسی نمونه‌های عسل مختلف از منابع متنوع حائز اهمیت است.

٦- سپاسگزاری

پژوهش حاضر در قالب پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی ارشد و تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه کاشان صورت پذیرفت.

۷- منابع

[1] Sherlock, O., Dolan, A., Athman, R., Power, A., Gethin, G., Cowman, S., & Humphreys, H. (2010). Comparison of the antimicrobial

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/fsct.18.114.319]

activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. BMC complementary and alternative medicine,10(1), 1-5.

[2] Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: a review. Journal of the American College of Nutrition, 27(6), 677-89.

[3] Adams, C. J., Boult, C. H., Deadman, B. J., Farr, J. M., Grainger, M. N., Manley-Harris, M., & Snow, M. J. (2008). Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. Carbohydrate Research, 343(4), 651-9.

[4] Cantarelli, M. A., Pellerano, R. G., Marchevsky, E.J., & Camiña, J.M. (2008). Quality of honey from Argentina: study of chemical composition and trace elements. Journal of the Argentine Chemical Society, 96(1-2), 33-41.

[5] Sahin, H., Kolayli, S., & Beykaya, M. (2020). Investigation of Variations of Invertase and Glucose Oxidase Degrees against Heating and Timing Options in Raw Honeys. Journal of Chemistry, 2020, 1-7.

[6] Leyva-Jimenez, F. J., Lozano-Sanchez, J., Borras-Linares, I., de la Luz Cadiz-Gurrea, M., & Mahmoodi-Khaledi, E. (2019). Potential antimicrobial activity of honey phenolic compounds against Gram positive and Gram negative bacteria. LWT, 101, 236-45.

[7] Huidobro, J. F., Sánchez, M. P., Muniategui, S., & Sancho, M.T. (2005). Precise method for the measurement of catalase activity in honey. Journal of AOAC International, 88(3), 800-4.

[8] Ohashi, K., Natori, S., & Kubo, T. (1999). Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age□dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). European Journal of Biochemistry, 265(1), 127-33.

[9] Mahmoodi-Khaledi, E., Kashef, N., Habibi-Rezaei, M., & Moosavi-Movahedi, A.A. (2015). In vitro characterization of antibacterial potential of Iranian honey samples against wound bacteria. European Food Research and Technology, 241(3), 329-39.

[10] Levy, S.B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nature medicine,10(12), S122-S9.

[11] Wasihun, A.G., & Kasa, B. G. (2016). Evaluation of antibacterial activity of honey against multidrug resistant bacteria in Ayder Referral and Teaching Hospital, Northern Ethiopia. SpringerPlus, 5(1), 842.

[12] Zwayen, G. F., & Mahmoodi-Khaledi, E. (2020). Antimicrobial effect of different types of honey derived from Iraqi flora on clinical strains of *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* and *Klebsiella pneumonia*. Annals of Tropical Medicine and Public Health, 23, 23-1122.

[13] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2), 248-54.

[14] Won, S-R., Lee, D-C., Ko, S. H., Kim, J-W., & Rhee, H-I. (2008). Honey major protein characterization and its application to adulteration detection. Food Research International, 41(10), 952-6.

[15] Ahmed, H. (2004). Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization, CRC press.

[16] Hou, X., Liu, B., Deng, X., Zhang, B., Chen, H., & Luo, R. (2007). Covalent immobilization of glucose oxidase onto poly (styrene-co-glycidyl methacrylate) monodisperse fluorescent microspheres synthesized by dispersion polymerization. Analytical biochemistry, 368(1), 100-10.

[17] Ghosh, S., Ahire, M., Patil, S., Jabgunde, A., Bhat Dusane, M., Joshi, B. N., Pardesi, K., Jachak, S., Dhavale, D. D., Chopade, B. A. (2012). Antidiabetic activity of Gnidia glauca and Dioscorea bulbifera: potent amylase and glucosidase inhibitors. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012, 1-10.

[18] Hong, J-M., Lee, K-A., Kim, J., & Park, I. (1990). Production and properties of invertase from *Aspergillus niger*. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 19, 577-87.

[19] Aebi, H. (1974). Catalase, Methods of enzymatic analysis, Elsevier, 673-84.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/fsct.18.114.319]

[20] Basualdo, C., Sgroy, V., Finola, M. S., & Marioli, J. M. (2007). Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. Veterinary microbiology, 124(3-4), 375-81.
[21] French, V. M., Cooper, R. A., & Molan, P. C. (2005). The antibacterial activity of honey against coagulase-negative staphylococci. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 56(1), 228-31.
[22] Bocian, A., Buczkowicz, J., Jaromin, M., Hus, K. K., & Legáth, J. (2019). An Effective Method of Isolating Honey Proteins. Molecules, 24(13), 2399.
[23] da C Azeredo, L., Azeredo, M., De Souza, S., & Dutra, V. (2003). Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. Food chemistry, 80(2), 249-54.
[24] Belay, A., Haki, G. D., Birringer, M., Borck, H., Lee, Y-C., Kim, K-T., Baye, K., Melaku, S. (2017). Enzyme activity, amino acid profiles and hydroxymethylfurfural content in Ethiopian monofloral honey. Journal of food science and technology, 54(9), 2769-78.
[25] Bucekova, M., Buriova, M., Pekarik, L., Majtan, V., & Majtan, J. (2018). Phytochemicals-mediated production of hydrogen peroxide is crucial for high antibacterial activity of honeydew honey. Scientific reports, 8(1), 1-9.
[26] Serrano, S., Espejo, R., Villarejo, M., & Jodral, M. L. (2007). Diastase and invertase activities in Andalusian honeys. International journal of food science & technology, 42(1), 76-9.
[27] Brudzynski, K. (2020). A current perspective on hydrogen peroxide production in honey. A review. Food Chemistry, 127229.
[28] Dastouri, M. R., Fakhimzadeh, K., Shayeg, J., Dolgari-Sharaf, J., Valilou, M. R., & Maheri-Sis, N. (2008). Evaluating antibacterial activity of the Iranian honey through MIC method on some dermal and intestinal pathogenic bacteria. Journal of animal and veterinary advances, 7(4), 409-12.
[29] Taormina, P. J., Niemira, B. A., & Beuchat, L. R. (2001). Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. International journal of food microbiology, 69(3), 217-25.
[30] Alonso-Torre, S. R., Cavia, M. M., Fernández-Muiño, M. A., Moreno, G., Huidobro, J. F., Sancho, M. T. (2006). Evolution of acid phosphatase activity of honeys from different climates. Food chemistry, 97(4), 750-5.
[31] Moniruzzaman, M., Khalil, M., Sulaiman, S., & Gan, S. (2012). Advances in the analytical methods for determining the antioxidant properties of honey: a review. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 9(1), 36-42.
[32] Mahmoodi-Khaledi, E., Lozano-Sánchez, J., Bakhouche, A., Habibi-Rezaei, M., Sadeghian, I., Segura-Carretero, A. (2017). Physicochemical properties and biological activities of honeys from different geographical and botanical origins in Iran. European Food Research and Technology, 243(6), 1019-30.
[33] Shah, T., Ali, N., Shah, Z., Hayat, A. (2019). Antibacterial Activity of Pakistani Honey. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research Series B, 2019;62(2):97-100.
[34] White, J. r. J. W., Subers, M. H., & Schepartz, A. I. (1963). The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. Biochimica et Biophysica Acta, 73(1), 57-70.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/fsct.18.114.319]

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Investigation of protein content and the relationship between enzymatic activity and antimicrobial effect of Iranian honey samples

Naghadian Moghadam, M.[1], Mahmoodi Khaledi, E. [2*]

1. MSc, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Chemistry, University of Kashan, Kashan, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Chemistry, University of Kashan, Kashan, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2020/ 11/ 23
Accepted 2021/ 02/ 28

Keywords:

Iranian honeys,
Antibacterial activity,
Glucose oxidase,
Invertase, Amylase.

DOI: 10.52547/fsct.18.05.26

*Corresponding Author E-Mail:
e.mahmoodi_kh@kashanu.ac.ir

ABSTRACT

Honey is a natural product that has long been used for treatment in addition to nutrition. In this regard, the antimicrobial effect of some Iranian kinds of honey against antibiotic-resistant bacterial strains and the relationship between this effect and the enzymatic activity of honey samples were evaluated. In this study, the protein content of 20 honey samples before and after extraction was determined and analyzed by SDS-PAGE technique. Then the activity of glucose oxidase, amylase, invertase, and catalase enzymes of each honey was measured. Inhibition of the tested bacterial strains in the presence of honey was investigated by ager well diffusion method and the relationship between enzymatic activity with antibacterial effect and freshness of honey was evaluated. The protein content of the samples before extraction ranged from 0.4 06 0.06 to 1.0 64 64.19 mg/g honey and after extraction this amount decreased by about 50% or less. In the protein profile of all kinds of honey after electrophoresis, 3 bands related to amylase, invertase, and glucosidase enzymes were visible. The activity of enzymes was assigned to glucose oxidase> invertase> amylase> catalase, respectively. The selected honey samples did not affect *Staphylococcus epidermidis* and had the least effect on *Pseudomonas aeruginosa*. After honey inoculation, the inhibitory pattern of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* were similar, but a different inhibitory pattern was observed from *Staphylococcus aureus* strain. This study showed that glucose oxidase plays an important role in bacterial inhibition, but this role fluctuates in catalase-positive strains. Also, Amylase and invertase enzymes can be a measure of the freshness of honey.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/fsct.18.114.319]