



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

محدثه نقادیان مقدم<sup>۱</sup>، الهه محمودی خالدي<sup>۲\*</sup>

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	چکیده
تاریخ های مقاله :	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 $0.4 \pm 0.6$ تا $1.0 \pm 1.9$ 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 سویه <i>Staphylococcus epidermidis</i> و دارای کمترین اثر بر سویه <i>Pseudomonas aeruginosa</i> بودند. الگوی مهار سویه‌های <i>Escherichia coli</i> و <i>Enterococcus faecalis</i> مشابه بود، اما الگوی مهار متفاوتی از سویه <i>Staphylococcus aureus</i> 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.
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	

## 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 عسل‌های 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.

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

No.	Code	Floral origin	Date of collection	Origin
1	A <sub>1</sub>	Multifloral	September 2018	Ardabil
2	A <sub>2</sub>	Multifloral	September 2018	Fars Province
3	A <sub>3</sub>	Sun flower	March 2018	Mount Damavand-Alborz
4	A <sub>4</sub>	Chamomile	March 2018	Yasuj
5	A <sub>5</sub>	Astragal	March 2018	Kerman
6	A <sub>6</sub>	Multifloral	June 2019	Kurdistan Province
7	B <sub>1</sub>	Alfalfa	March 2018	Sabalan
8	B <sub>2</sub>	Multifloral	August 2019	Sabalan
9	B <sub>3</sub>	Multifloral	August 2019	Sabalan
10	H <sub>1</sub>	Persian rose	September 2018	Hamedan
11	H <sub>2</sub>	Multifloral	September 2018	Hamedan
12	U <sub>1</sub>	Multifloral	September 2018	Urmia
13	U <sub>2</sub>	Multifloral	September 2018	Urmia
14	U <sub>3</sub>	Locust tree	August 2019	Urmia
15	U <sub>4</sub>	Multifloral	June 2019	Urmia
16	U <sub>5</sub>	Multifloral	June 2019	Urmia
17	U <sub>6</sub>	White clover	June 2019	Urmia
18	U <sub>7</sub>	Multifloral	June 2019	Urmia
19	U <sub>8</sub>	Hawthorn	June 2019	Urmia
20	U <sub>9</sub>	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 ۱۲۴۰۰ 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 ۴ 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 ۴ 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 [۱۴]. 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 ۴۶۰ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=۶)، ۲۰ میکرولیتر گلوکز ۱٪، ۴۸۰ میکرولیتر از محلول A (فنول و ۴-آمینو آنتی‌پیرین ۰.۰۴ میلی‌مولار در بافر فسفات) و ۲۰ میکرولیتر آنزیم پراکسیداز (۲۰ واحد ≤) ترکیب شد. پس از ۶۰ دقیقه گرماگذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جذب محلول در طول موج ۵۱۰nm خوانده شد. از منحنی جذب پراکسید هیدروژن در غلظت‌های ۰ تا ۰.۱۴ میلی‌مولار بر میلی‌لیتر در بافر فسفات برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد [۱۶].

## ۲-۴- 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 ۴۰۰ میکرولیتر بافر با pH=۴/۵ مخلوط شده و بلافاصله پس از ورتکس، به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب

## ۲-۸- سنجش فعالیت ضد باکتریایی نمونه‌های

### عسل

پیش از این سنجش، جهت تعیین آلودگی احتمالی نمونه‌های عسل، محلول ۵۰٪ (وزنی/حجمی) هر نمونه روی محیط آگار خون‌دار کشت داده شد. محلول عسل‌های آلوده پیش از هر آزمایش از فیلترهای استریل نیتروسلولز (۰.۴۵ میکرومتر) عبور داده شدند.

به منظور تعیین فعالیت ضد میکروبی نمونه‌ها، پنج نمونه عسل B<sub>1</sub> ، B<sub>3</sub> ، U<sub>5</sub> ، U<sub>6</sub> و U<sub>9</sub> 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 هیتون آگار استریل، ۵۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عسل (۰.۵٪، ۱.۰٪، ۲.۵٪، ۵.۰٪، ۷.۵٪ و ۱۰.۰٪) با ۳ تکرار در چاهک‌های جداگانه داخل پلیت‌ها ریخته شده و پس از ۱۸-۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله‌ی عدم رشد اندازه‌گیری شد [۲۰].

## ۲-۹- 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 ( $P < 0.05$ ) در نظر گرفته شد.

## ۳- نتایج

### ۳-۱- میزان پروتئین عسل‌ها قبل و بعد از

#### استخراج

همانطور که در جدول ۲ قابل مشاهده است، محتوای پروتئینی نمونه‌ها قبل از استخراج در محدوده  $0.6 \pm 0.4$  تا  $19/19 \pm 0.1$  و پس از استخراج در محدوده  $0.2 \pm 0.21$  تا  $0.1 \pm 0.08$  میلی‌گرم بر گرم عسل قرار دارد. در نتایج حاصل از پروفایل پروتئینی نمونه‌ها پس از الکتروفورز که در شکل ۱ نشان داده شده است، تعداد ۱۰ تا ۱۴ باند مختلف در نمونه‌ها قابل تشخیص است که شش باند ۱۱۶، ۹۷، ۶۸، ۶۵، ۵۷ و ۵۰ کیلودالتونی در همه نمونه‌ها مشترک هستند.

گرم با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۵۰۰ میکرولیتر محلول DNS به مخلوط واکنش اضافه و ویال‌ها به مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفتند. در نهایت پس از رسیدن سریع به دمای محیط، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ nm خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از مالتوز در غلظت‌های ۰.۵ تا ۵ میکرومول بر میلی‌لیتر استفاده شد [۱۷].

## ۲-۵- سنجش فعالیت ویژه آنزیم اینورتاز

به منظور سنجش فعالیت آنزیم اینورتاز، ۲۵۰ میکرولیتر بافر و ۲۰۰ میکرولیتر سوکروز ۰/۱ مولار را به ۵۰ میکرولیتر محلول ۵۰٪ (وزنی/حجمی) عسل اضافه کرده و بعد از ۳۰ دقیقه آنکوباسیون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، ۵۰۰ میکرولیتر محلول DNS به لوله‌ها اضافه کرده و جذب در طول موج ۵۴۰ nm خوانده شد. برای محاسبه فعالیت آنزیم از منحنی استاندارد بر حسب غلظت‌های مختلف مالتوز (۰.۵ تا ۵ میکرومول بر میلی‌لیتر) استفاده شد [۱۸].

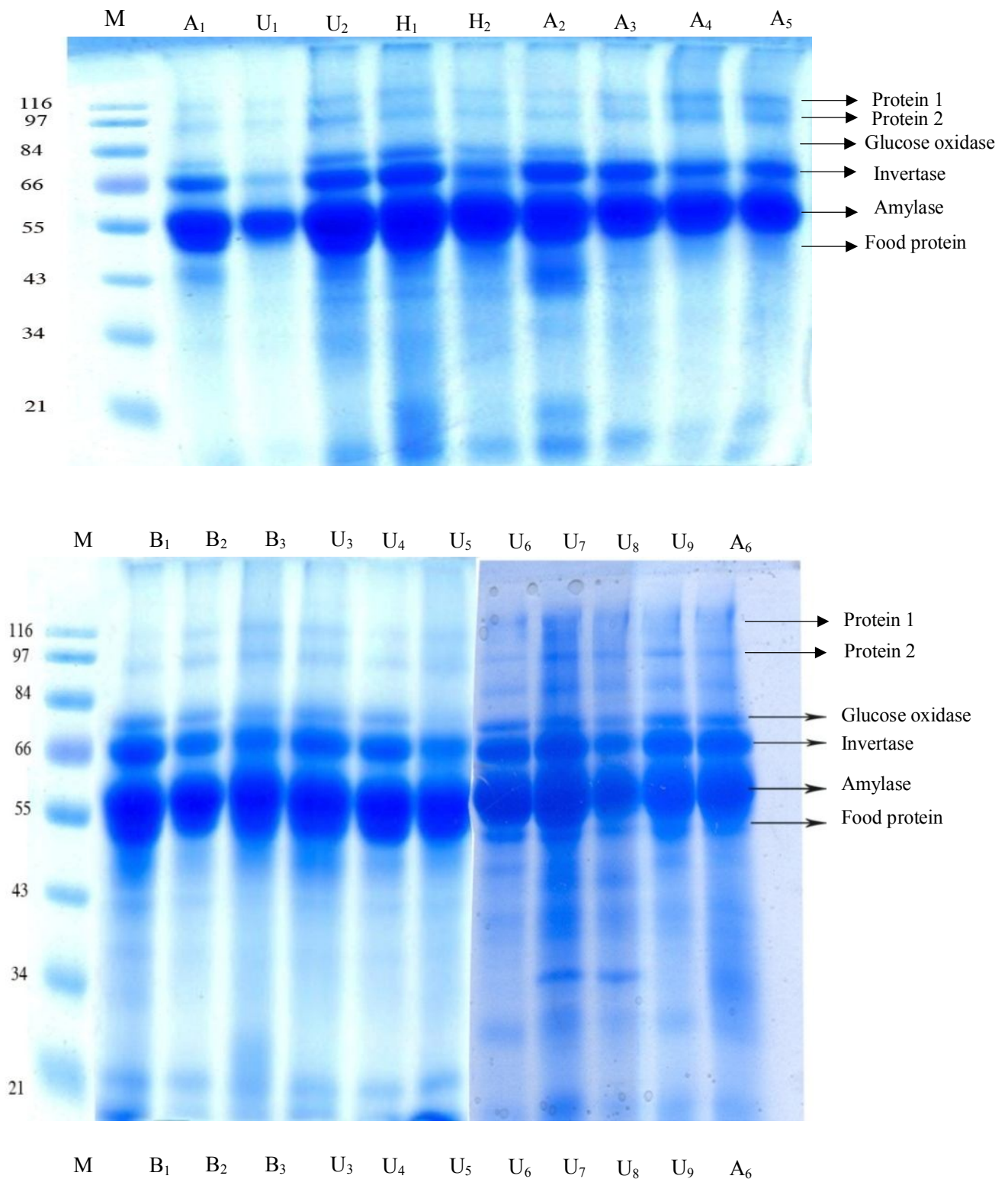
## ۲-۶- سنجش فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز

ابتدا ۵۰ میکرولیتر محلول ۵۰٪ (وزنی/حجمی) عسل را به ۵۰ میکرولیتر بافر پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با  $pH=7$  و حاوی پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی‌مولار اضافه و کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ nm طی ۳۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم بر حسب میکرومول پراکسید هیدروژن مصرف شده (با ضریب خاموشی ۴۳/۶) در دقیقه طبق فرمول زیر محاسبه شد [۱۹].

$$\text{Activity} = \frac{\Delta A_{240} / \text{min} \times 1000}{43.6 \text{ mg protein reaction mixture}}$$

## ۲-۷- نمونه‌های باکتریایی

در این مطالعه، پنج سویه‌ی بالینی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی شامل *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* 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.



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

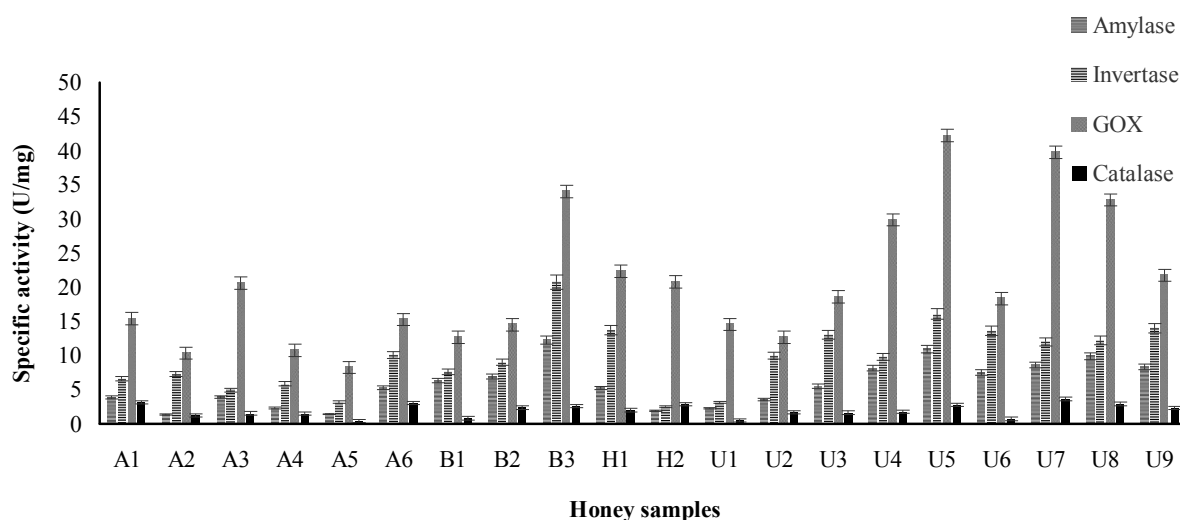
**Table 2** Comparison of protein content of 20 honey samples, before and after extraction (similar letters reveal no significant difference).

Code of honey	The amount of protein (mg/g)	The amount of protein after (mg/g)
	before extraction	extraction
A <sub>1</sub>	0.67±0.01 <sup>e</sup>	0.38±0.00 <sup>e</sup>
A <sub>2</sub>	1.64±0.19 <sup>a</sup>	1.08±0.01 <sup>a</sup>
A <sub>3</sub>	0.49±0.03 <sup>f</sup>	0.28±0.01 <sup>de</sup>
A <sub>4</sub>	0.42±0.06 <sup>g</sup>	0.26±0.00 <sup>de</sup>
A <sub>5</sub>	0.40±0.06 <sup>g</sup>	0.31±0.02 <sup>d</sup>
A <sub>6</sub>	0.66±0.04 <sup>e</sup>	0.47±0.03 <sup>b</sup>
B <sub>1</sub>	0.78±0.05 <sup>d</sup>	0.38±0.01 <sup>c</sup>
B <sub>2</sub>	0.75±0.02 <sup>d</sup>	0.41±0.03 <sup>c</sup>
B <sub>3</sub>	0.65±0.07 <sup>e</sup>	0.35±0.01 <sup>c</sup>
H <sub>1</sub>	0.77±0.03 <sup>d</sup>	0.41±0.01 <sup>c</sup>
H <sub>2</sub>	0.51±0.08 <sup>f</sup>	0.30±0.01 <sup>d</sup>
U <sub>1</sub>	0.41±0.02 <sup>g</sup>	0.21±0.02 <sup>e</sup>
U <sub>2</sub>	0.65±0.03 <sup>e</sup>	0.38±0.01 <sup>c</sup>
U <sub>3</sub>	0.95±0.03 <sup>c</sup>	0.37±0.04 <sup>c</sup>
U <sub>4</sub>	0.72±0.02 <sup>d</sup>	0.47±0.03 <sup>b</sup>
U <sub>5</sub>	0.76±0.03 <sup>d</sup>	0.50±0.08 <sup>b</sup>
U <sub>6</sub>	0.75±0.02 <sup>d</sup>	0.33±0.05 <sup>d</sup>
U <sub>7</sub>	0.64±0.07 <sup>e</sup>	0.44±0.03 <sup>bc</sup>
U <sub>8</sub>	0.73±0.02 <sup>d</sup>	0.32±0.01 <sup>d</sup>
U <sub>9</sub>	1.33±0.07 <sup>b</sup>	0.39±0.02 <sup>c</sup>

**۲-۳- میزان فعالیت آنزیمی نمونه‌ها**

(میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین) محلول پروتئینی ۲۰  
نمونه عسل ایرانی در شکل ۲ نشان داده شده است.

فعالیت ویژه آنزیم‌های آمیلاز، اینورتاز، گلوکز اکسیداز و کاتالاز

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

۸/۳۵±۱/۰۴ تا ۴۲/۳۴±۲/۲۲ واحد قرار دارد. فعالیت  
گلوکز اکسیدازی نمونه‌ی U<sub>5</sub> و پس از آن U<sub>7</sub> بیشتر از سایر

بر این اساس، فعالیت ویژه گلوکز اکسیدازی نمونه‌ها بیشتر از  
سایر آنزیم‌هاست و با میانگین ۲۰/۸۸±۰/۰۳ در محدوده‌ی

فعالیت ویژه آنزیم اینورتاز نمونه‌های عسل مطابق شکل ۲، در محدوده  $۲/۵۲ \pm ۰/۰۳$  تا  $۲۰/۷۶ \pm ۰/۲۴$  و میانگین  $۹/۰ \pm ۷۸/۲۵$  واحد قرار دارد. بیشترین فعالیت اینورتازی مربوط به نمونه  $B_3$  و کمترین آن مربوط به نمونه  $H_2$  می‌باشد.

نمونه‌هاست و کمترین فعالیت آنزیمی نیز مربوط به نمونه  $A_5$  می‌باشد. فعالیت آمیلازی نمونه‌های عسل با میانگین  $۵/۷۹ \pm ۰/۱۴$  در محدوده  $۱/۳۹ \pm ۰/۱۵$  تا  $۱۲/۲۹ \pm ۰/۲$  واحد قرار دارد. بیشترین فعالیت آنزیم آمیلاز مربوط به نمونه  $B_3$  و کمترین میزان مربوط به نمونه‌های  $A_2$  و  $A_5$  می‌باشد.

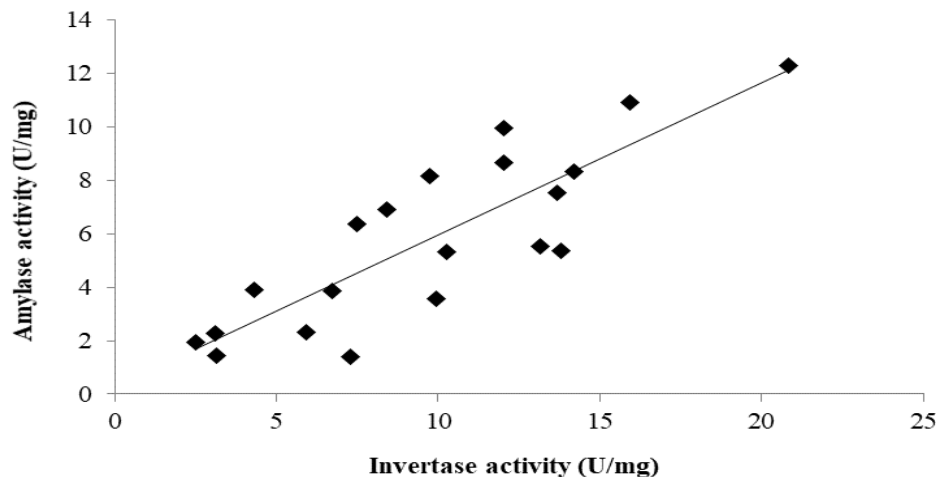


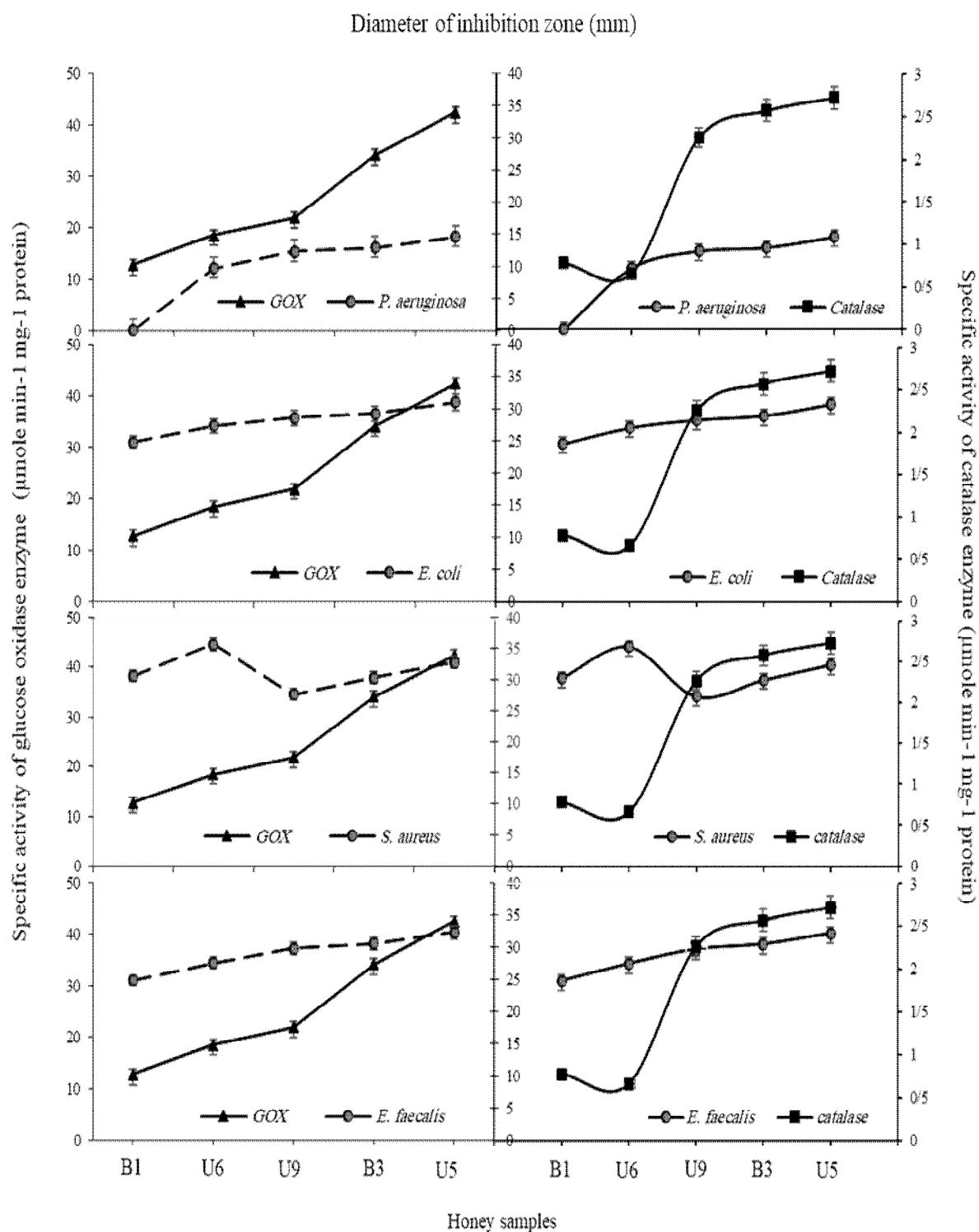
Fig 3 The regression curve for specific activity of amylase versus invertase of 20 Iranian honey samples.

مهارکنندگی علیه سویه *S. aureus* دارند و حداقل غلظت مهارکنندگی، مربوط به نمونه  $B_3$  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 سویه *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 ۴ 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 سویه *S. aureus* مثبت 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.

شکل ۳ رگرسیون فعالیت اینورتاز در برابر فعالیت آمیلاز هر نمونه عسل را نشان می‌دهد. با توجه به شکل ۲، فعالیت آنزیم کاتالاز در محدوده  $۰/۳۸ \pm ۰/۰۲$  تا  $۳/۵۹ \pm ۰/۲۴$  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 سویه *P. aeruginosa* مربوط به عسل  $U_5$  و در غلظت ۵۰٪ است درحالی‌که عسل  $B_1$  در هیچ یک از غلظت‌ها اثر مهارکنندگی 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



**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 ( $\mu\text{mole min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ) of selected honey samples at 50% dilution (w/v).



**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%)	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
B <sub>1</sub>	5%	0	7.40±0.20 <sup>d</sup>	0	0
	10%	0	12.50±0.25 <sup>c</sup>	7.66±0.50 <sup>b</sup>	10.50±0.21 <sup>d</sup>
	25%	0	19.23±0.11 <sup>c</sup>	13.33±1.04 <sup>d</sup>	21.66±0.12 <sup>b</sup>
	50%	0	20.56±0.14 <sup>c</sup>	15.03±0.64 <sup>d</sup>	25.16±0.01 <sup>b</sup>
	75%	0	22.10±0.12 <sup>d</sup>	21.96±0.25 <sup>c</sup>	27.06±0.13 <sup>b</sup>
	100%	0	24.86±0.15 <sup>d</sup>	24.86±0.34 <sup>d</sup>	30.60±0.15 <sup>c</sup>
B <sub>3</sub>	5%	0	10.83±0.32 <sup>b</sup>	0	11.66±0.13
	10%	0	13.33±0.33 <sup>b</sup>	0	14.86±0.21 <sup>b</sup>
	25%	0	21.86±0.15 <sup>b</sup>	20.90±1.07 <sup>a</sup>	20.76±0.20 <sup>b</sup>
	50%	0	25.40±0.23 <sup>b</sup>	23.70±0.42 <sup>b</sup>	24.10±0.32 <sup>b</sup>
	75%	6.66±0.52 <sup>c</sup>	27.76±0.23 <sup>b</sup>	26.83±0.44 <sup>b</sup>	27.93±0.24 <sup>b</sup>
	100%	12.80±0.61 <sup>b</sup>	30.53±0.15 <sup>b</sup>	29.33±0.36 <sup>b</sup>	30.33±0.10 <sup>c</sup>
U <sub>5</sub>	5%	0	11.33±0.15 <sup>a</sup>	0	0
	10%	0	14.70±0.02 <sup>a</sup>	11.23±0.02 <sup>a</sup>	17.83±0.12 <sup>a</sup>
	25%	0	24.86±0.14 <sup>a</sup>	18.53±0.33 <sup>c</sup>	27.20±0.14 <sup>a</sup>
	50%	4.40±0.15	28.66±0.01 <sup>a</sup>	27.30±0.02 <sup>a</sup>	28.20±0.02 <sup>a</sup>
	75%	7.66±0.31 <sup>b</sup>	31.30±0.02 <sup>a</sup>	30.33±0.22 <sup>a</sup>	31.66±0.10 <sup>a</sup>
	100%	14.46±0.52 <sup>a</sup>	32.20±0.01 <sup>a</sup>	31.10±0.01 <sup>a</sup>	32.76±0.03 <sup>b</sup>
U <sub>6</sub>	5%	0	8.90±0.16 <sup>c</sup>	0	0
	10%	0	13.73±0.14 <sup>b</sup>	7.66±0.52 <sup>b</sup>	12.46±0.12 <sup>c</sup>
	25%	0	20.63±0.22 <sup>b</sup>	17.66±0.43 <sup>c</sup>	22.46±0.25 <sup>b</sup>
	50%	0	21.03±0.13 <sup>c</sup>	22.33±0.35 <sup>c</sup>	28.80±0.34 <sup>a</sup>
	75%	6.33±0.61 <sup>c</sup>	25.30±0.04 <sup>c</sup>	25.56±0.32 <sup>b</sup>	32.86±0.14 <sup>a</sup>
	100%	9.63±0.81 <sup>c</sup>	27.53±0.11 <sup>c</sup>	27.40±0.21 <sup>c</sup>	35.65±0.02 <sup>a</sup>
U <sub>9</sub>	5%	0	0	0	0
	10%	0	14.46±0.13 <sup>a</sup>	10.86±0.53 <sup>a</sup>	11.30±0.12 <sup>c</sup>
	25%	0	24.06±0.02 <sup>a</sup>	19.16±0.52 <sup>b</sup>	16.20±0.15 <sup>c</sup>
	50%	0	27.96±0.01 <sup>a</sup>	22.56±0.32 <sup>c</sup>	24.23±0.10 <sup>b</sup>
	75%	8.26±0.23 <sup>a</sup>	28.73±0.02 <sup>b</sup>	26.83±0.33 <sup>b</sup>	26.30±0.12 <sup>b</sup>
	100%	12.26±0.32 <sup>b</sup>	29.76±0.22 <sup>b</sup>	28.66±0.23 <sup>c</sup>	27.66±0.03 <sup>d</sup>

## ۴- بحث و نتیجه گیری

در اولین منابع نوشتاری، از عسل به عنوان غذادارو نام برده شده است [۲۱]. از مهم ترین ترکیبات عسل، پروتئین ها هستند که با توجه به جدول ۲ میزان آن ها پس از استخراج کاهش یافته است که می تواند به دلیل جدا شدن پپتیدهای کوچک و همچنین از بین رفتن مقداری از پروتئین ها در طی فرآیند استخراج باشد [۲۲]. میزان پروتئین پس از استخراج در همه ی نمونه ها به جز نمونه ی  $A_2$  و  $U_9$ ، حدوداً برابر یا بالاتر از ۵۰٪ میزان کل پروتئین نمونه هاست. دو نمونه  $A_2$  و  $U_9$  دارای پروتئین بالاتر از یک میلی گرم/گرم هستند که به عنوان عسل با پروتئین بالا در نظر گرفته می شوند؛ این نتایج با میزان پروتئین های گزارش شده در سایر مقالات مطابقت دارد [۲۳]. برخی از باندهای پروتئینی مانند شکل ۱ در عسل هایی با منشأ گیاهی متفاوت وجود دارند؛ به نظر می رسد باندهای ۵۷، ۶۵ و ۶۸ کیلودالتونی به ترتیب با آنزیم های آمیلاز، اینورتاز و گلوکزاکسیداز مطابقت داشته باشند [۸].

بازه ی فعالیت آنزیم های گلوکزاکسیداز، آمیلاز و اینورتاز نیز در این آزمایش با بازه ی فعالیت این آنزیم ها در مطالعات دیگر هم پوشانی دارد [۲۴-۲۶]. با توجه به شکل ۳، علی رغم 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 نمونه های عسل  $H_2$  و  $A_5$  که از قدیمی ترین نمونه ها در بین ۲۰ نمونه ی عسل هستند دارای کمترین مقدار از هر دو آنزیم آمیلاز و اینورتاز می باشند، 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 می گیرد و با گذشت زمان مقدار آن ها کاهش می یابد [۸]. نمونه های عسل  $B_3$ ،  $U_5$  و  $U_9$  که از جدیدترین نمونه های عسل هستند، دارای بیشترین مقدار از هر دو آنزیم می باشند. همچنین با توجه به شکل ۴، عسل های  $B_3$ ،  $U_5$  و  $U_9$  که دارای بیشترین فعالیت آمیلازی و اینورتازی بوده اند دارای بیشترین قدرت مهارکنندگی علیه سویه های باکتریایی در این آزمایش نیز می باشند که نشان می دهد

عسل های جدیدتر به دلیل وجود آنزیم های فعال بیشتر، نقش ضد باکتریایی بیشتری نیز دارند.

آنزیم گلوکزاکسیداز با تولید گلوکونیک اسید و پراکسید هیدروژن در محافظت از عسل و ایجاد ویژگی های ضدباکتریایی آن اهمیت زیادی دارد [۲۷]. مقدار آنزیم گلوکزاکسیداز موجود در نمونه ی  $A_5$  که قدیمی ترین نمونه است نیز کمتر از سایر عسل های این آزمایش است که با توجه به مقالات دیگر نشان می دهد مقدار فعالیت آنزیم گلوکزاکسیداز نیز دارای رابطه ی مستقیم با آنزیم های آمیلاز و اینورتاز است [۲۸، ۲۹]. با توجه به شکل ۲، فعالیت ویژه آنزیم گلوکزاکسیداز بیشتر از سایر آنزیم هاست که به دلیل مقاومت این آنزیم در برابر شرایط محیطی نسبت به دیگر آنزیم های آزمایش شده می باشد. در این مطالعه، فعالیت کمی از آنزیم کاتالاز مشاهده شد که بررسی های پیشین نیز این نتایج را تأیید می کنند [۷، ۳۰]. با توجه به اینکه آنزیم کاتالاز منشأ گیاهی دارد مقدار آن در عسل های مختلف بسیار متغیر است و حتی در نمونه های 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 نمونه های عسل، قبل و پس از استخراج با میزان فعالیت ضدباکتریایی نمونه ها ارتباط معناداری مشاهده نشد ( $P < 0.05$ ).

در این مطالعه سویه ی *S. epidermidis* مقاوم ترین سویه نسبت به نمونه های عسل بود بطوریکه هیچ کدام از نمونه ها قادر به مهار این سویه نبودند و پس از آن سویه ی *P. aeruginosa* کمترین حساسیت را نسبت به عسل ها از خود نشان داد به طوریکه نمونه ی عسل  $B_1$  در همه ی رقت ها فاقد قدرت مهار این سویه بود درحالی که در گزارشی دیگر، عسل های ایرانی دارای اثر مهارکنندگی مطلوبی علیه سویه ی *P. aeruginosa* هستند که دلیل آن می تواند علاوه بر تفاوت در نوع عسل، در نوع روش سنجش فعالیت ضد میکروبی باشد [۳۲]. نمونه عسل  $U_5$  و پس از آن  $B_3$  که بیشترین فعالیت گلوکزاکسیدازی را دارند دارای بیشترین اثر مهارکنندگی علیه سویه های گرم منفی *P. aeruginosa* و *E. coli* و سویه گرم مثبت *E. faecalis* حتی در کمترین غلظت عسل ها نیز می باشند که در آزمایشات دیگر از عسل های ایرانی نیز بیشترین حساسیت در سویه ی *E. coli* و کمترین حساسیت در سویه ی *P. aeruginosa* مشاهده

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 مهاري مطلوبی ایجاد کند. عسل U و نیز با وجود داشتن فعالیت گلوکزاکسیدازی بیشتر در مقایسه با عسل U<sub>6</sub> و حتی نسبت به عسل B<sub>1</sub>، 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.

## ۶- 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

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 مهاري 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 مهاري مشاهده نشده بود [۲۰]. همچنین در بررسی عسل‌های بومی کشور پاکستان، نمونه‌ها دارای بیشترین فعالیت مهاري به ترتیب علیه سویه‌های *E. faecalis*، *S. aureus*، *K. pneumoniae* و *E. coli* با روش انتشار از دیسک بوده‌اند [۳۳].

در شکل ۴ 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 ۴ فعالیت ضد باکتریایی نمونه‌های عسل B<sub>3</sub>، U<sub>5</sub> و U<sub>9</sub> که دارای آنزیم کاتالاز بیشتری هستند به صورت نسبتاً یکنواختی درآمده است.

با توجه به نتایج جدول ۳، عسل B<sub>3</sub> 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<sub>5</sub> در رقابت با سایر نمونه‌های عسل علیه این سویه بیشتر است که مطابق تحقیقات دیگر اهمیت فعالیت گلوکزاکسیدازی بالای این عسل را نشان می‌دهد [۳۴]. به طور کلی الگوی مهاري نمونه‌ها علیه باکتری *S. aureus* دچار تغییر شده است، به نحوی که فعالیت مهاري نمونه U<sub>6</sub> و پس از آن B<sub>1</sub> 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 ضد میکروبی غیرپراکسیدی این عسل‌ها

- [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.
- 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., Boulton, 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., Borrás-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.

- 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., Bakhouch, 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.
- [20] Basualdo, C., Sgroi, 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., &



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

Naghadian Moghadam, M.<sup>1</sup>, Mahmoodi Khaledi, E.<sup>2\*</sup>

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	ABSTRACT
<p><b>Article History:</b></p> <p>Received 2020/ 11/ 23 Accepted 2021/ 02/ 28</p> <hr/> <p><b>Keywords:</b></p> <p>Iranian honeys, Antibacterial activity, Glucose oxidase, Invertase, Amylase.</p> <hr/> <p><b>DOI:</b> 10.52547/fsct.18.05.26</p> <hr/> <p>*Corresponding Author E-Mail: e.mahmoodi_kh@kashanu.ac.ir</p>	<p>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 agar 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 to 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 &gt; invertase &gt; amylase &gt; catalase, respectively. The selected honey samples did not affect <i>Staphylococcus epidermidis</i> and had the least effect on <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. After honey inoculation, the inhibitory pattern of <i>Escherichia coli</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> were similar, but a different inhibitory pattern was observed from <i>Staphylococcus aureus</i> 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.</p>