

A Bioinformatics Analysis of Antibacterial Peptides in Five Species of Prokaryote and Eukaryote and the Evaluation of Antibacterial Effects of Nisin on Gram-positive and Gram-negative Bacteria

Masoumeh Fallah Ziarani

Department of Plant Biotechnology, Faculty of Life Science and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, m_fallah@sbu.ac.ir

Masoud Tohidfar*

Department of Plant Biotechnology, Faculty of Life Science and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, m_tohidfar@sbu.ac.ir

Mohammad Hosein Mirjalili

Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Faculty of Medicinal Plants, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, m-mirjalili@sbu.ac.ir

Hassan Ahmadi Gavlighi

Departeman of Agriculture, Faculty of Food Science and Technology, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran, momeniman@yahoo.com

Abstract

Introduction: Nowadays, the widespread use of antimicrobial peptides as a natural preservative due to the side effects of synthetic preservatives (cancers and liver damages in medicines and foods) has received much attention.

Materials and methods: In the present study, five antibacterial peptides including Nisin A of *Lactococcus lactis*, melitin of *Apis mellifera*, cospin from *Coprinopsis cinerea*, Terpene of *Erythrolobus australicus*, and thionin from *Arabidopsis thaliana* were studied using bioinformatics analysis.

Results: The results showed that these peptides (peptides studied in eukaryotics and prokaryotics) had cytoplasmic targeting and the studied peptides were not protected in different organisms. There was a variation in the number of α helixes and β sheets among the studied peptides. The results of the phylogenetic tree by Mega5 showed that besides *Apis mellifera*, four other species were located in the same cluster. The domains were different in the five studied species, but all domains had antibacterial properties. These peptides showed a wide range of physicochemical properties. The substitution template, substitution model, and D-Tajima sequence of the studied peptides showed that *Apis mellifera* was isolated from other species during evolution. Three-dimensional (3-D) modeling of peptides by the homology modeling method and Swiss Model database showed that the three-dimensional structure of terpene and thionin had high quality. Using peptidecutter and allermatch websites, it was found that nisin A, melitin, cospine, terpene, and thionin were not allergenic. To determine the minimum lethal concentration and minimum inhibitory concentration, the disk diffusion method was used. The highest inhibition of nisin of *Lactococcus Lactis* was obtained in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by disk diffusion. Blank discs were 19, 23 mm, 5, and 1 mm, respectively.

Discussion and conclusion: The results showed that nisin can be used as a natural preservative to delay food spoilage against gram-positive bacteria.

Key words: Bioinformatic Analysis, Antibacterial Peptides, Eukaryote and Prokaryote, Allergen, Inhibitory Effects

* Corresponding author

Received: December 2, 2020 / Accepted: September 12, 2015

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)

سال دهم، شماره ۳۹، پاییز ۱۴۰۰، صفحه ۵۰ - ۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۱۲

Doi: [10.22108/BJM.2020.125232.1331](https://doi.org/10.22108/BJM.2020.125232.1331)

بررسی بیوانفورماتیکی پتیدهای ضدباکتری در پنج گونه پروکاریوت و یوکاریوت و بررسی اثر ضدباکتری نایسین بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

معصومه فلاح زیارانی: دانشجوی دکتری گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، m_fallah@sbu.ac.ir
مسعود توحیدفر*: دانشیار گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، m_tohidfar@sbu.ac.ir
محمدحسین میرجلیلی: دانشیار گروه گیاهان دارویی، دانشکده گیاهان دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، m-mirjalili@sbu.ac.ir
حسن احمدی گاولیقی: استادیار گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، ahmadi.ha@gmail.com

چکیده

مقدمه: امروزه، کاربرد گسترده پتیدهای ضد میکروبی به شکل نگهدارنده طبیعی به علت عوارض نگهدارنده‌های مصنوعی (ایجاد سرطان‌ها و آسیب به کبد در داروها و غذاها) مدنظر قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، پنج پتید ضدباکتریایی شامل نایسین A از *Lactococcus lactis*، ملتین از *Apis mellifera* کوپسین از *Coprinopsis cinerea*، ترپن از *Erythrolobus australicus* و تیونین از *Arabidopsis thaliana* با تحلیل‌های بیوانفورماتیکی مطالعه شدند.

نتایج: نتایج نشان دادند پتیدهای بررسی شده در یوکاریوت‌ها و پروکاریوت مطالعه شده دارای هدف‌گیری سیتوپلاسمی هستند و در موجودات مختلف محافظت شده نیستند. پتیدهای بررسی شده از نظر تعداد ماریچ‌های آلفا و صفحه‌های بتا تنوع داشتند. نتایج درخت فیلوژنتیکی با Mega5 نشان دادند به‌غیر از *Apis mellifera*، چهار گونه دیگر در یک خوشه قرار می‌گیرند. دومین‌ها در پنج گونه بررسی شده متفاوت بودند، اما همگی دارای ویژگی‌های ضدباکتری بودند. پتیدهای مطالعه شده دامنه متنوعی از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی را نشان دادند. الگوی جانمایی، مدل جایگزینی و D- Tajima توالی پتیدهای مطالعه شده نشان داد *Apis mellifera* در طول تکامل از سایر گونه‌ها جدا شده است. مدل‌سازی سه‌بعدی پتیدهای بررسی شده به روش همولوژی مدلینگ و با استفاده از پایگاه داده Swiss Model نشان داد ساختار سه‌بعدی ترپن و تیونین کیفیت زیادی دارد. مراجعه به سایت‌های peptid cutter و allermatch نشان داد پتیدهای نایسین A، ملتین، کوپسین، ترپن و تیونین حساسیت‌زا نیستند. به‌منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت بازدارندگی از روش دیسک بلانک و روش چاهک‌گذاری استفاده شد. نتایج بازدارندگی با پتید نایسین استخراج شده از باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس نشان دادند بیشترین هاله بازدارندگی در استافیلوکوکوس اورئوس و اش‌ریشیا کلی به روش چاهک‌گذاری و دیسک بلانک به ترتیب ۱۹ و ۲۳ میلی‌متر و ۵ و ۱ میلی‌متر است.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند نایسین می‌تواند به شکل نگهدارنده طبیعی برای تأخیر در فاسدشدن مواد غذایی در برابر باکتری‌های گرم مثبت استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: تحلیل‌های بیوانفورماتیک، پتیدهای ضدباکتری، یوکاریوت و پروکاریوت، حساسیت‌زایی، آثار بازدارندگی

* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright©2021, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

باکتری‌هایی که منافع مشترک دارند، ترکیبات ضد میکروبی را به منظور بقای خود تولید می‌کنند؛ پپتیدهای ضد میکروبی نوعی ترکیب ضد میکروبی از این گروه هستند که به اختصار AMP نامیده می‌شوند. پپتیدهای ضد میکروبی متنوعی از منابع مختلف گیاهان و حشرات تا مهره‌داران پست و پستانداران شناسایی شده‌اند (۱-۴). ترکیبات یادشده به طور مشخص شامل دو گروه باکتریوسین‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های پپتیدی می‌شوند که بر پایه سازوکار بیوستنز طبقه‌بندی شده‌اند. باکتریوسین‌ها، ترکیباتی هستند که ریبوزوم‌ها آنها را سنتز می‌کنند و در باکتری‌ها تولید می‌شوند و علیه باکتری‌هایی فعال هستند که خویشاوندی نزدیکی با باکتری تولیدکننده دارند (۵). بیشتر باکتریوسین‌ها با ویژگی آبدوستی یا آبگریزی، غشای سلولی را هدف می‌گیرند؛ در حالی که برخی از آنها بیوستنز پلیمرهای زیستی یا فعالیت آنزیم‌ها را مهار و آثار مهاری خود را اعمال می‌کنند (۶).

این ترکیبات در برابر حرارت، اسیدیته کم، حلال‌های آلی ضعیف، سرما و یخ، نمک‌ها و آنزیم‌ها مقاوم هستند و در نتیجه، این ترکیبات به شکل نگهدارنده در مواد غذایی استفاده می‌شوند (۶).

یکی از کاربردهای پپتیدهای ضد باکتری، استفاده از آنها به شکل نگهدارنده در داروها و مواد غذایی است (۴). با توجه به اهمیت این پپتیدها، داده‌های بررسی روابط تکاملی و بررسی ساختار ژن و پروتئین ضروری است.

هدف پژوهش حاضر، بررسی *in silico* شباهت‌ها و تفاوت‌های پپتیدهای ضد باکتری در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌های تک‌سلولی و پرسلولی از جمله قارچ *Coprinopsis cinerea*، گیاه *Arabidopsis thaliana*

زنبر عسل *Apis mellifera* (یوکاریوت‌های پرسلولی)، باکتری *Lactococcus lactis* (موجود پروکاریوت) و جلبک *Erythrolobus australicus* (پروکاریوت تک‌سلولی) است؛ علاوه بر این، تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک این پپتیدها و مشخص کردن عملکرد آنها، بررسی ساختمان دوم و سوم پروتئین، تغییرات پس از ترجمه، هدف‌گیری و بررسی تحلیل‌های بیوانفورماتیکی آنها در راستای تعیین ویژگی‌های این پروتئین‌ها از دیگر اهداف پژوهش حاضر است. هدف اصلی پژوهش حاضر، بررسی شباهت‌ها و تفاوت‌های پپتیدهای ضد میکروبی در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌های تک‌سلولی و پرسلولی است؛ همچنین در پژوهش حاضر، اثر پروتئین نایسین روی یک باکتری گرم مثبت و یک باکتری گرم منفی بررسی می‌شود. **مواد و**

روش‌ها

توالی‌های mRNA و پروتئین پنج پپتید ضد باکتری شامل نایسین A از *Lactococcus lactis*، ملیتین از *Apis mellifera* کوپسین از *Coprinopsis cinerea*، ترپن از *Erythrolobus australicus* و تیونین از *Arabidopsis thaliana* که در بانک ژن در دسترس بودند، از پایگاه داده NCBI دریافت شدند؛ به این منظور، ابتدا برنامه T-Coffee برای هم‌ردیفی چندگانه توالی‌ها به کار رفت و از نرم‌افزار MEGA 5 برای رسم درخت فیلوژنتیکی استفاده شد. ویژگی‌های پروتئین با مراجعه به بانک swissprot بررسی شدند. ساختار دوم و سوم پپتیدهای ضد باکتری تحلیل شدند. به منظور بررسی هدف‌گیری این پپتیدها از بانک TargetP استفاده شد. دومین‌های محافظت‌شده پنج نوع پپتید مطالعه شده در پژوهش حاضر با Interproscan بررسی شدند. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی شامل تعداد آمینواسید، وزن مولکولی،

و باکتری‌های صنعتی ایران^۷ تهیه شد و روش‌های دیسک‌گذاری و چاهک‌گذاری برای بررسی اثر ضد میکروبی نایسین استخراج شده از باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس استفاده شدند (۱۲).

در روش دیسکی، کلنی ۲۴ ساعته باکتری *اشریشیا کلی* به عنوان نمونه گرم منفی و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان نمونه گرم مثبت کشت شده با لوپ برداشته و در ۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل درون لوله آزمایش استریل به طور کامل مخلوط شدند؛ سپس سوسپانسیون یکنواختی به غلظت نیم مک فارلند معادل $10^6 \times 1/5$ CFU/ml از باکتری آزمایش شده تهیه و با سواب استریل به طور چمنی روی محیط LB آگار کشت داده شد. به منظور تهیه دیسک‌های حاوی عصاره نایسین، ۲۰۰ ماکرولیت پروتئین حاوی نایسین حل شده در حلال مربوطه روی دیسک‌های بلانک استریل اضافه و دو ساعت زمان داده شد تا عصاره به طور کامل جذب دیسک‌های کاغذی شود؛ سپس دیسک‌ها در فواصل مناسب روی پلیت قرار داده شدند و نمونه‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

در روش چاهک از پلیت‌های حاوی محیط کشت LB آگار آغشته به باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد؛ به این ترتیب که با پیپت پاستور استریل مخصوص ایجاد چاهک، گودی در محیط کشت ایجاد شد و با سمپلر ۵۰ لاندا از پروتئین مدنظر در هر چاهک قرار داده شد؛ سپس پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. عملیات یاد شده دو بار برای هر نمونه تکرار شد؛ سپس قطر هاله رشد نکردن ارزیابی و بر اساس میلی متر محاسبه و میانگین آن ثبت شد. کانامایسین برای شاهد مثبت و سرم فیزیولوژی برای

نقطه ایزوالکتریک، درصد چربی و درصد آبگریزی در پپتیدهای ضدباکتری مطالعه شده با protparam server بررسی شدند. الگوی جانیشینی، مدل جایگزینی و D-Tajima توالی پپتیدهای مطالعه شده نیز تعیین شدند. به منظور پیش‌بینی ساختار ثانویه پروتئین‌ها از نرم افزار PSIPRED و سرور GoRI استفاده شد. به منظور تعیین مدل ساختاری این پپتیدها، ابتدا توالی آمینواسیدی آنها از پایگاه داده NCBI به فرمت FASTA ذخیره شد و سپس با ابزار BLAST^۸ و PSIBLAST در پایگاه داده PDB جستجو شد تا از این طریق، الگوی مناسبی برای انجام مشابهت مدلینگ به دست آید. در انتخاب الگو، معیارهایی نظیر وضوح کمتر از ۳ آنگستروم مربوط به کریستالوگرافی اشعه X، R-value کمتر از ۰/۳، شباهت بیش از ۳۵ درصد الگو با توالی مطالعه شده و E-value کم اعمال شدند (۷) تا اعتبار و اطمینان پذیری مدل افزایش یابد. پس از هم‌ردیفی توالی الگو با توالی مطالعه شده، مدل‌سازی به روش مدلینگ و با استفاده از پایگاه اطلاعاتی Swiss Model انجام شد (۷)؛ در ادامه، ساختار مدل‌سازی شده با برنامه SPDB viewer (۱۰-۸) بهینه‌سازی انرژی (Energy minimization) شد. ارزیابی کیفیت شاخص‌های ساختاری مدل ساخته شده و ترسیم نمودار رامانچاندرا با سرور Rampage (۹) انجام شد. به منظور تأیید ساختارهای مدل‌سازی شده از سرور PROSA استفاده شد و در نهایت، حساسیت‌زایی پپتیدهای مدنظر با دو سایت Allermatch^۹ و peptidecutter^۹ بررسی شد.

به منظور سنجش اثر ضد میکروبی پپتید نایسین، پروتئین مدنظر از باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس استخراج شد (۱۱). باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس سویه ATCC 11454 از مرکز منطقه‌ای مجموعه قارچ‌ها

می‌کند)، از فالكون‌هایی که تعیین رقت شده بودند با سوآپ روی محیط کشت LB آگار کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و رشد نکردن باکتری نشان‌دهنده^۹ MBC بود (MBC، حداقل غلظتی از پپتید ضدباکتری است که باکتری را از بین می‌برد). سرم فیزیولوژی برای شاهد منفی و کانامایسین برای شاهد مثبت استفاده شد.

نتایج

نتایج T-coffee و هم‌ردیفی توالی‌های پپتیدهای مطالعه‌شده با نرم‌افزار MEGA 5 نشان دادند پپتیدهای ضدباکتری در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌های تک‌سلولی و پرسلولی بررسی شده طی تکامل محافظت شده نیستند و در موجودات مختلف تغییر یافته‌اند (شکل ۱). در هم‌ردیفی پپتیدهای مطالعه‌شده با استفاده از T-coffee مشخص شد تمام نمونه‌ها در بخش N ترمینال سه آمینواسید اول محافظت شده‌اند و در هم‌ردیفی توالی‌های آنها، ۱۸ آمینواسید در سه نمونه از پنج نمونه و ۴۴ آمینواسید در دو نمونه از پنج نمونه بررسی شده در طول تکامل محافظت شده‌اند که از دلایل آن می‌توان به درصد GC در این توالی‌ها اشاره کرد (۱۱).

تحلیل فیلوژنتیکی نشان داد پنج پپتید بررسی شده در مطالعه حاضر در دو خوشه قرار می‌گیرند. بر اساس نتایج خوشه‌بندی مشخص شد ملیتین در *Apis mellifera* بیش‌تر از چهار پپتید دیگر اشتقاق یافته است و چهار پپتید دیگر شامل نایسین از *Lactococcus lactis*، کوپسین از *Coprinospin cinerea*، تروپین از *Arabidopsis*

شاهد منفی در هر دو روش چاهک‌گذاری و دیسک‌بلانک استفاده شدند. قطر هاله رشد بیشتر از ۱۱ میلی‌متر به معنای رشد نکردن، هاله ۸ تا ۱۰ میلی‌متر و هاله ۵ تا ۷ میلی‌متر به عنوان شاهد متوسط و هاله کمتر از ۵ میلی‌متر به معنای عدم مهارکنندگی محسوب می‌شود (۱۲).

در روش تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی^{۱۰}، ۱۰ عدد فالكون ۵۰ میلی‌لیتری برای هر باکتری تهیه و به هر فالكون، ۵۰۰ ماکرولیتر LB مایع اضافه شد. به منظور رقت‌سازی، ۵۰۰ ماکرولیتر از عصاره به لوله شماره ۱ اضافه و با شیکر کاملاً مخلوط شد؛ سپس از لوله شماره ۱، ۵۰۰ ماکرولیتر محلول (عصاره + LB) به لوله شماره ۲ اضافه شد و این کار با ترتیب یادشده تا فالكون شماره ۷ ادامه یافت؛ در نهایت پس از شیکر کردن فالكون شماره ۷، ۵۰۰ ماکرولیتر از محلول آن دور ریخته شد. مقدار ۱۰۰ ماکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت نیم مک‌فارلند ($10^6 \times 1/5$ CFU/ml) که از پیش تهیه شده بود، به تمام هفت فالكون اضافه شد. فالكون شماره ۸ حاوی عصاره + LB (بدون باکتری) بود. فالكون شماره ۹ حاوی محیط LB + باکتری بدون عصاره بود و به عنوان شاهد رشد برای تعیین کدورت رشد باکتری استفاده شد. فالكون شماره ۱۰ که تنها حاوی محیط LB بود، شاهدی برای کنترل استریلیتی محیط کشت بود؛ به این معنا که اگر باکتری رشد نکند، شفافیت محیط درون فالكون باید به این شکل باشد. به منظور انجام آزمایش یادشده، غلظت‌هایی از ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۳، ۷/۸۱ استفاده شدند. نتیجه MIC بر اساس کدورت محیط کشت که نشان‌دهنده رشد باکتری است، بررسی شد (۱۲).

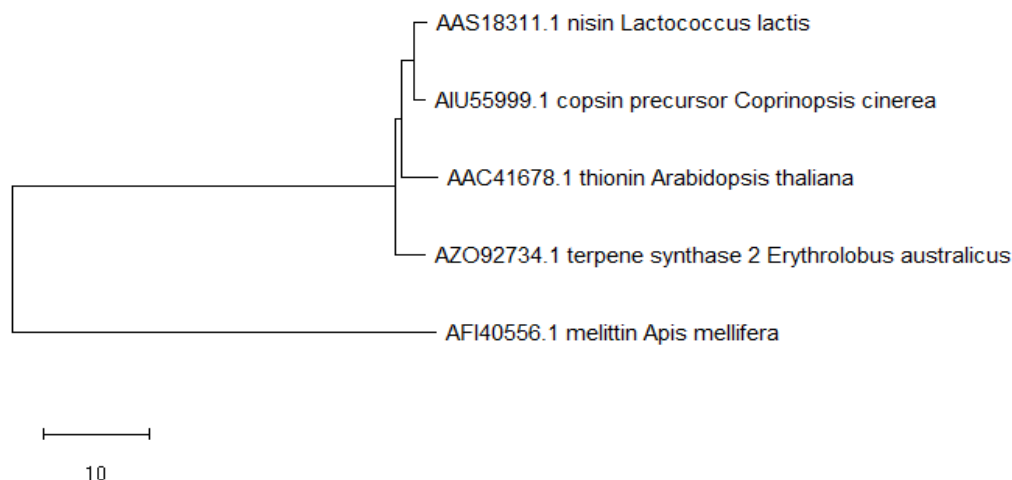
به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی پس از تعیین MIC (غلظتی از آنتی‌بیوتیک که رشد باکتری را مهار

Lactococcus lactis با سه گونه موجود از یوکاریوت‌ها در یک گروه قرار دارد و ملیتین در *Apis mellifera* که جزو گروه یوکاریوت‌هاست، در گروه جداگانه‌ای قرار می‌گیرد (شکل ۲).

thaliana به تازگی اشتقاق یافته‌اند و در یک گروه قرار گرفته‌اند (شکل ۱). نتایج خوشه‌بندی نشان دادند خوشه‌بندی پپتیدهای ضدباکتری ارتباطی با گونه مدنظر ندارد؛ به طوری که پپتید موجود در باکتری



شکل ۱- نتایج هم‌ردیفی پپتیدهای بررسی شده با T-Coffee



شکل ۲- درخت فیلوژنی بر اساس توالی پپتیدهای ضدباکتری پنج گونه مطالعه شده با استفاده از روش خوشه‌بندی Maximum likelihood

عدد ۲/۹۴ به دو گونه *Apis mellifera* و *Lactococcus lactis* تعلق دارد که *Apis mellifera* جزو یوکاریوت‌های پرسلولی و *Lactococcus lactis* جزو پروکاریوت‌هاست و کمترین شباهت را به هم دارند (جدول ۱)؛ یکی از دلایل شبیه‌نبودن این دو گونه، متفاوت بودن درصد GC آنهاست (۱۳).

مقایسه گونه‌های بررسی شده در ماتریس تشابه نشان داد کمترین تفاوت با عدد ۱/۵۶ (یعنی دو گونه‌ای که بیشترین شباهت را به هم دارند) به دو گونه *Coprinopsis cinerea* و *Lactococcus lactis* تعلق دارد که گونه *Coprinopsis cinerea* جزو یوکاریوت‌های پرسلولی و *Lactococcus lactis* جزو پروکاریوت‌های تک‌سلولی است و بیشترین تفاوت با

جدول ۱- ماتریس عدد تشابه

	1	2	3	4	5
1. AAS18311.1 nisin <i>Lactococcus lactis</i>					
2. AFI40556.1 melittin <i>Apis mellifera</i>	2.94				
3. AIU55999.1 copsin precursor <i>Coprinopsis cinerea</i>	1.56	2.30			
4. AZO92734.1 terpene synthase 2 <i>Erythrolobus australicus</i>	2.66	2.30	2.38		
5. AAC41678.1 thionin <i>Arabidopsis thaliana</i>	2.43	2.86	2.70	2.60	

Isoprenoid synthase خانواده *australicus* جزو خانواده domain superfamily است و اگرچه دومین‌ها متفاوت هستند، تمام دومین‌های بررسی شده ویژگی‌های ضدباکتری مشابه دارند.

تحلیل هدف‌گیری نشان داد تمام پپتیدهای ضدباکتری مطالعه شده جزو پروتئین‌های سیتوپلاسمی

دومین پپتیدهای بررسی شده در *Arabidopsis thaliana* جزو خانواده Thionin-like superfamily، در *Lactococcus lactis* جزو خانواده Gallidermin، در *Apis mellifera* جزو خانواده Melittin/Api، در *Coprinopsis cinerea* جزو خانواده allergen، و در *Erythrolobus* و *Fungal defensin Copsin*

هستند که این امر به علت نقش پپتیدهای ضدباکتری است. در سلول‌های پروکاریوت (سلول باکتری)، پپتیدهای ضد میکروبی آبدوست لیپیدهای آنیونی موجود در سطح خارجی غشای باکتری را می‌شناسند و در سلول‌های یوکاریوت، لیپیدهای آنیونی یادشده در سمت سیتوپلاسمی غشا قرار می‌گیرند (۱۴).

درصد GC (درصد گوانین و سیتوزین در توالی بررسی شده) نشان داد در یوکاریوت‌های بررسی شده، بیشترین درصد GC با مقدار ۵۹/۴۶ درصد به *Arabidopsis thaliana* و کمترین درصد GC با مقدار ۲۳/۵۳ درصد به *Apis mellifera* تعلق دارد. تحلیل محتوای GC نشان داد ژن‌های دارای محتوای GC زیاد نسبت به ژن‌های دارای محتوای GC کمتر پایداری بیشتری در برابر حرارت دارند (۱۲). نتایج نشان دادند پایداری این پپتیدها متنوع است و ارتباطی با گونه بررسی شده، پروکاریوت یا یوکاریوت تک‌سلولی و پرسلولی بودن این گونه‌ها ندارد.

مقایسه پپتیدهای بررسی شده در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها نشان داد تعداد آمینواسید، وزن مولکولی، مقدار دامنه ایزوالکتریک، شاخص آلیفاتیک، شاخص ناپایداری و متوسط GRAVY (ویژگی آبگریزی پروتئین) پپتیدهای بررسی شده متنوع است. شاخص آلیفاتیک نشان داد ساختار پپتیدهای مطالعه شده در یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها از نظر دامنه پایداری در دما متنوع است؛ پپتیدهای پایدار در دمای زیاد می‌توانند به شکل نگهدارنده در مواد غذایی استفاده شوند. نتایج نشان دادند شاخص ناپایداری در پپتیدهای بررسی شده در گستره‌ای از پروتئین‌های پایدار تا ناپایدار قرار می‌گیرد و پایداری پروتئین‌ها در استفاده از آنها شکل نگهدارنده مؤثر است. متوسط GRAVY کل

محاسبه شده برای پروتئین‌ها از تقسیم مجموع هیدروپاتی (شاخصی از میزان آبگریزی آمینواسید) محاسبه شده برای تمام آمینواسیدها در پروتئین بر تعداد کل آمینواسیدهای آن پروتئین به دست می‌آید. در بررسی GRAVY پروتئین در یوکاریوت و پروکاریوت‌های بررسی شده مشخص شد پپتیدهای بررسی شده در دامنه متفاوتی از نظر آبگریزی قرار دارد. از پپتیدهای آبگریزی می‌توان به شکل نگهدارنده در داروها استفاده کرد؛ زیرا این پپتیدهای ضدباکتری را می‌توان درون پپتیدهای آبدوست قرار داد و با توجه به هدف مدنظر استفاده کرد. آزمون فرضیه خنثی نشان داد پپتیدهای مطالعه شده در یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌های بررسی شده مشابهت زیادی باهم دارند، ولی ملیتین در *Apis mellifera* الگوی جانمایی بسیار متفاوتی دارد که نشان می‌دهد در طول تکامل، این گونه از دیگر گونه‌ها جدا شده است. بر اساس تحلیل انتخاب مدل جایگزینی؛ بهترین مدل جایگزینی برای تحلیل فیلوژنتیکی، مدل WAG + I است. تحلیل تنوع ژنتیکی در یوکاریوت‌های تک‌سلولی و پرسلولی و پروکاریوت بررسی شده نشان داد در حدود ۵۵ درصد از طول توالی پپتیدهای مطالعه شده، جهش‌های نوع جایگزینی رخ داده‌اند که در این میان، حدود ۲۶ درصد از طول توالی ژن دارای چندشکلی‌های آگاهی‌بخش (تعداد سایت‌های تفرق یافته به کل سایت‌ها) است. تنوع نوکلئوتیدی در یوکاریوت‌های تک‌سلولی و پرسلولی و پروکاریوت مطالعه شده حدود ۲۴ درصد است. نتایج نشان دادند D-Tajima که به منظور بررسی اثر فشار انتخاب روی یک ژن در پروکاریوت و یوکاریوت‌های بررسی شده به کار برده می‌شود، ۰/۴۲ است؛ با استفاده از D-Tajima که برای آزمون تئوری خنثی به کار برده می‌شود،

ژنتیکی در یوکاریوت‌های تک‌سلولی و پرسلولی و پروکاریوت‌ها به‌طور هم‌زمان دقیقاً مانند نتایج تحلیل تنوع ژنتیکی در یوکاریوت‌های تک‌سلولی و پرسلولی است.

مشخص شد ژن‌هایی که تنوع فراوانی اللی آنها کم است، D- Tajima منفی (کمتر از صفر) دارند و ال‌های نادر افزایش می‌یابند و جمعیت پس از یک bottleneck جمعیتی که شامل تعداد محدودی از جمعیت اولیه است) جدید گسترش می‌یابد (جدول ۲). تحلیل تنوع

جدول ۲- نتیجه آزمون D- Tajima برای پپتیدهای مطالعه‌شده

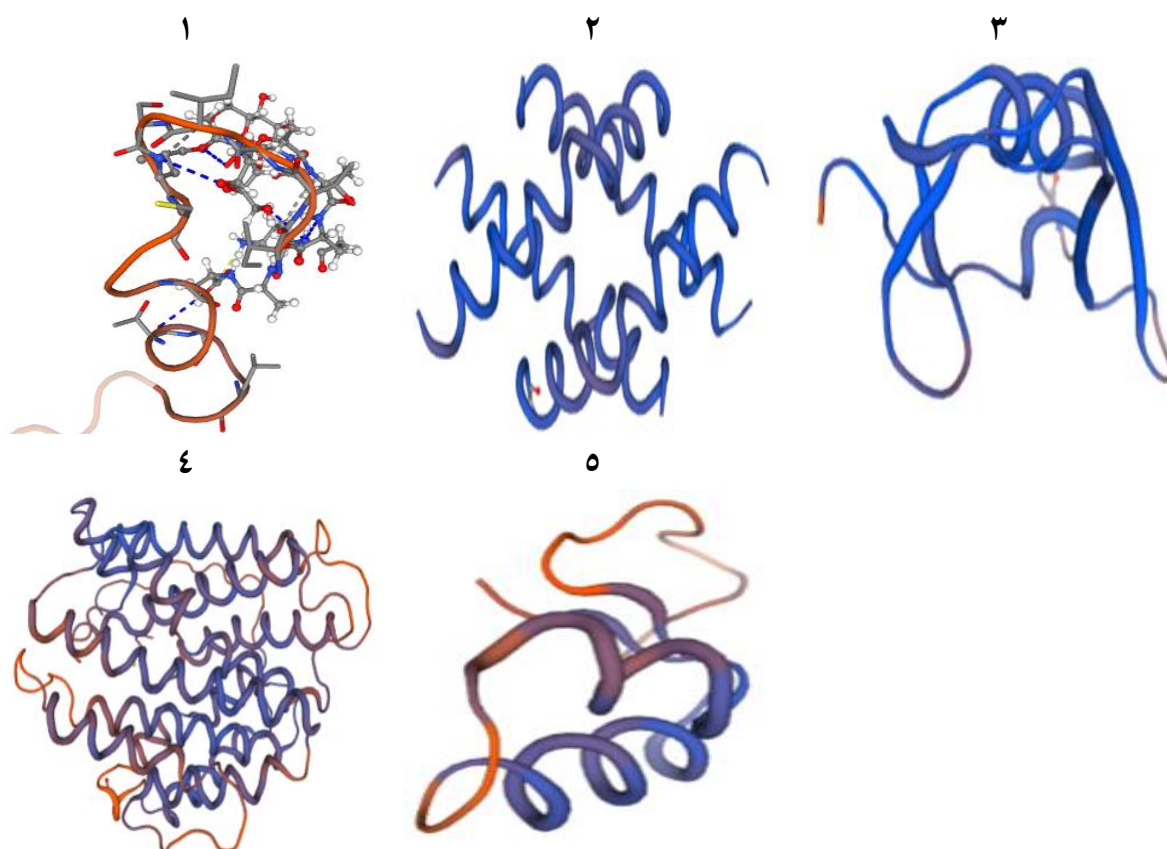
m	S	P_s	θ	Π	D
۵	۱۷۹	۰/۵۴۵۷۳۲	۰/۲۶۱۹۵۱	۰/۲۴۷۵۶۱	-۰/۴۱۸۸۰۵

Erythrolobus australicus (5dz2.1.A) با قدرت تفکیک ۴ آنگستروم از Germacradienol/geosmin synthase و تیونین در *Arabidopsis thaliana* (1orl.1.A) از Viscotoxin C1 کریستالوگرافی شد و این مدل‌ها به‌ترتیب دارای ۳۴، ۷۰، ۵۷، ۷۳ و ۴۶ آمینو اسید بودند. میزان یکسانی الگوهای پیش‌بینی شده با پپتیدهای هدف به‌ترتیب ۹۴/۱۲، ۱۰۰، ۹۸/۲۵، ۲۳/۰۵ و ۴۱/۸۶ درصد بود؛ با مدل‌سازی مناسب می‌توان پپتیدهای دیگر را که خاصیت ضدباکتری دارند، شناسایی کرد. نتایج نشان دادند میزان یکسانی الگوهای پیش‌بینی شده با پپتیدهای هدف در پروکاریوت بررسی شده و در یوکاریوت‌های پرسلولی و تک‌سلولی قابل قبول است.

باتوجه به میزان شباهت کم الگوی 5dz2.1.A و 1orl.1.A با پپتید هدف، این احتمال وجود داشت که مدل‌سازی به‌شکل ضعیف‌تری انجام شده باشد؛ از این رو و باتوجه به اهمیت این پپتیدها به‌عنوان ضدباکتری، نخستین گام در مطالعه‌های بعدی، مدل‌سازی این پروتئین بود که از طریق سایت Swiss Model انجام شد.

بررسی ساختار دوم پپتید نایسین در *Lactococcus lactis* نشان داد این پروتئین حاوی ۳ رشته مارپیچ β است. ساختار دوم پپتید ملیتین در *Apis mellifera* حاوی ۴ رشته مارپیچ α helix، ساختار دوم پپتید کوپسین در *Coprinopsis cinerea* حاوی ۵ رشته مارپیچ α helix و ۳ رشته مارپیچ β ، ساختار دوم پپتید ترپن در *Erythrolobus australicus* حاوی ۱۶ رشته مارپیچ α helix و ۲ رشته مارپیچ β و ساختار دوم پپتید تیونین در *Arabidopsis thaliana* حاوی ۲ رشته مارپیچ α helix است. هرچه تعداد مارپیچ α helix بیشتر باشد، انعطاف پروتئین کمتر و پایداری آن بیشتر می‌شود و می‌توان آن را به‌شکل نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی ای که آماده کردن آنها در دمای زیاد انجام می‌شود، استفاده کرد. نتایج نشان دادند ساختار دوم پپتیدهای بررسی شده در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌های بررسی شده متنوع است.

الگوی منتخب برای مدل‌سازی پپتید نایسین در *Lactococcus lactis* (1wco.1.A) با قدرت تفکیک ۴ آنگستروم از نایسین Z، ملیتین در *Apis mellifera* (2mlt.1.A) از ملیتین، کوپسین در *Coprinopsis cinerea* (2mn5.1.A) از کوپسین، ترپن در



شکل ۳- ساختار مدل‌سازی شدهٔ ۱. پپتید نایسین در *Lactococcus lactis*، ۲. پپتید ملیتین در *Apis mellifera*، ۳. پپتید کوپسین در *Coprinopsis cinerea*، ۴. پپتید ترپن در *Erythrolobus australicus*، ۵. پپتید تیونین در *Arabidopsis thaliana*

جدول ۳- میزان همسانی آمینواسیدهای پپتید هدف با الگو

Template	Seq identity (%)	Oligo- state	Resolution	Range	Description
1wco.1.A	۹۴/۱۲	Monomer	۴ Å	۲۴-۵۷	NISIN Z
2mlt.1.A	۱۰۰	Homo-tetramer (matching prediction)	-	۴۴-۶۹	MELITTIN
2mn5.1.A	۹۸/۲۵	Monomer	-	۱۲۸-۱۸۴	Copsin
5dz2.1.A	۲۳/۰۵	Monomer	۴ Å	۱۵-۳۲۷	Germacradienol/geosmin synthase
1orl.1.A	۴۱/۸۶	Monomer	-	۲۵-۶۷	Viscotoxin C1

برای هر آمینواسید در مدل (محور X)، شباهت موردانتظار به ساختار طبیعی^۳ (محور Y) را نشان می‌دهد. به طور معمول، آمینواسیدهایی که اسکور زیر ۰/۶ را نشان بدهند، کیفیت کمی دارند. تابع QMEAN4 شامل چهار توصیف ساختاری پتانسیل زاویه چرخش، پتانسیل فاصله اتم‌ها، اثر متقابل کرین بتا و پتانسیل

ساختار سه‌بعدی پروتئین‌های مدل‌سازی شده در شکل ۳ آورده شده است. ارزیابی مدل‌های پیشنهادشده در Swiss Model بر اساس شاخص‌های GMQE و QMEAN4 انجام می‌شود. تابع QMEAN4، تابع حسابی مرکب برای ارزیابی کیفیت ساختار کلی و آمینواسید ساختار مدل‌سازی شده است. نمودار کیفیت

با خاصیت مشابه (ضدباکتری) یافت. برهم کنش انرژی برای هر باقیمانده از ساختار با پلات انرژی PROSA ارزیابی شد. اعتبار هر پنج مدل تأیید شد (شکل ۴). نتایج نشان دادند به جز ملتین که بخشی از پلات انرژی آن در قسمت مثبت و بخشی از آن در قسمت منفی قرار دارد، پلات انرژی ترین، نایسین، کوپسین و تیونین کلاً در قسمت منفی قرار دارد (شکل ۵).

این نمودار، کیفیت مدل ورودی را با محاسبه درصد آمینواسیدهای قرار گرفته در نواحی مطلوب، مجاز یا غیرمجاز تعیین می‌کند. همان‌طور که در شکل ۶ دیده می‌شود، ۹۵/۷، ۴/۳ و صفر درصد آمینواسید برای ساختار مدل‌شده برای کوپسین، ۹۷/۹، ۲/۱ و صفر درصد آمینواسید برای ساختار مدل‌شده برای ملتین، ۷۳/۹، ۱۹/۳ و ۶/۸ درصد آمینواسید برای ساختار مدل‌شده برای ملتین، ۱۰۰، صفر و صفر درصد برای ساختار مدل‌شده برای ترین و ۸۱/۲، ۱۵/۴ و ۳/۴ درصد آمینواسید برای ساختار مدل‌شده برای تیونین به ترتیب در مناطق مطلوب، مجاز و غیرمجاز قرار دارند و این بدان معناست که هر پنج مدل برای پروکاریوت و یوکاریوت‌های تک‌سلولی و پرسلولی برای پتیدهای ضدباکتری کیفیت زیادی دارند و از این طریق می‌توان به ویژگی‌های دومین‌های آنها پی برد.

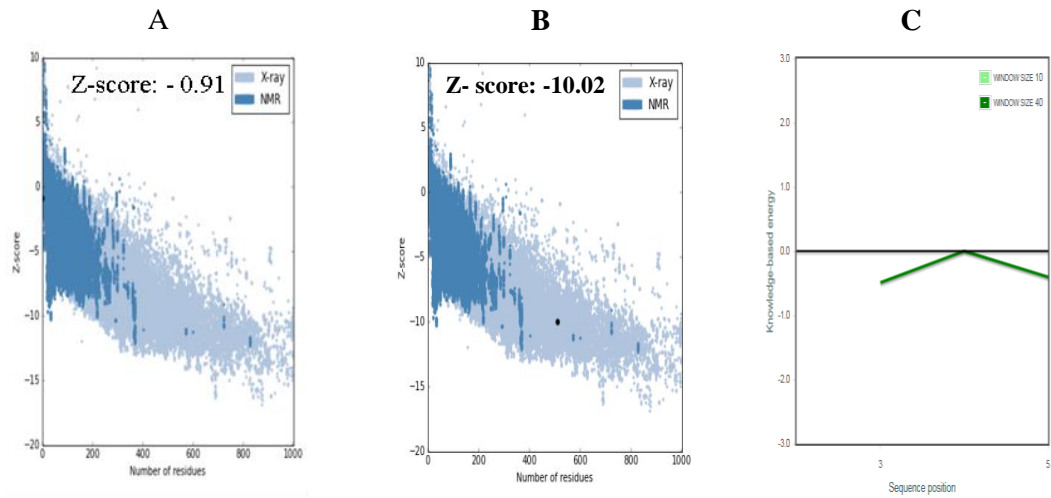
حلال‌پوشی است. GMQE، یک ارزیابی کیفی است که ویژگی‌های هم‌ترازی مدل‌الگو را ترکیب می‌کند. نمودارهای ارزیابی کیفی موضعی، ساختار و میزان Z-score برای تابع حسابی مرکب QMEAN4، تمام اتم‌ها، کربن بتا، حلالیت و زوایای چرخشی در شکل ۳ نشان داده شده‌اند. ارزیابی کیفیت ساختار مدل‌شده پس از بهینه‌سازی انرژی از طریق نمودار رامانچاندرا^۴ با استفاده از ابزار Rampage انجام شد. نمودار رامانچاندرا، روش بسیار پرکاربردی برای پلات زوایای چرخشی پروتئین و ارزیابی کیفیت استرئوشیمیایی ساختار مدل‌سازی شده است.

بخش مشکل‌ساز مدل پیش‌بینی شده با سرو^{۱۵} proSA بررسی شد؛ این سرور ابزاری است که به‌طور گسترده برای چک کردن مدل 3D از ساختار پروتئین پیش‌بینی شده برای پتانسیل خطا استفاده می‌شود.

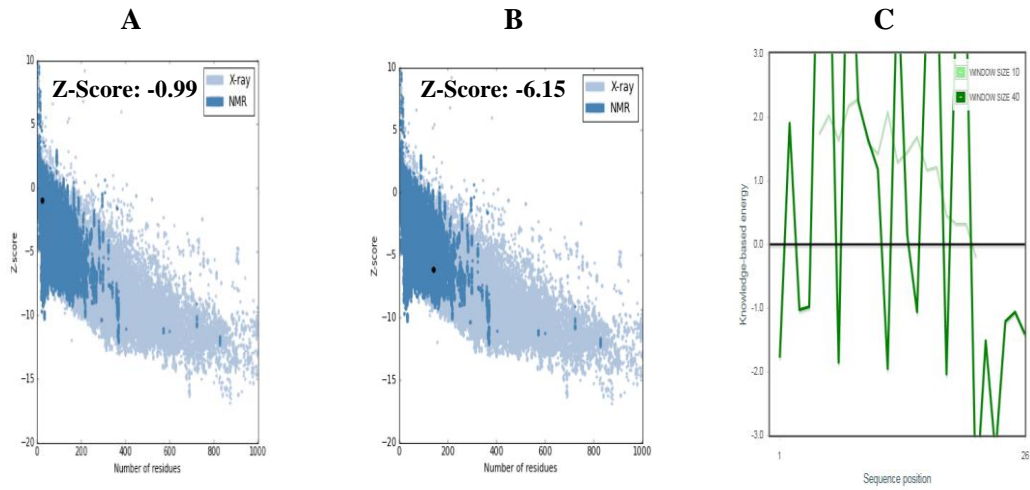
کیفیت کل مدل سه‌بعدی پروتئین با PROSA-Web (Z-Score) ارزیابی شد. روش PROSA مجموع فولد صحیح و غیرصحیح را به‌طور جداگانه و دقیق حساب می‌کند؛ این مدل برای مقایسه Z-Score مدل مشابه و الگو استفاده می‌شود.

نتایج Z-Score ترین و تیونین برای همولوژی مدل و نمونه نزدیک به هم بود و نشان داد ساختار سه‌بعدی پیش‌بینی شده از کیفیت زیادی دارد (شکل ۴). با توجه به همولوژی مدل و نمونه، نتایج Z-Score نایسین، ملتین و کوپسین فاصله زیادی از هم دارد و ساختار سه‌بعدی پیش‌بینی شده برای این سه پروتئین کیفیت مناسبی ندارد (شکل ۴)؛ اما از طریق دومین‌های این پروتئین‌ها می‌توان به نقش آنها پی برد و از آنها در کارهای پژوهشی بعدی مانند داکینگ استفاده کرد و از این طریق پروتئین‌هایی

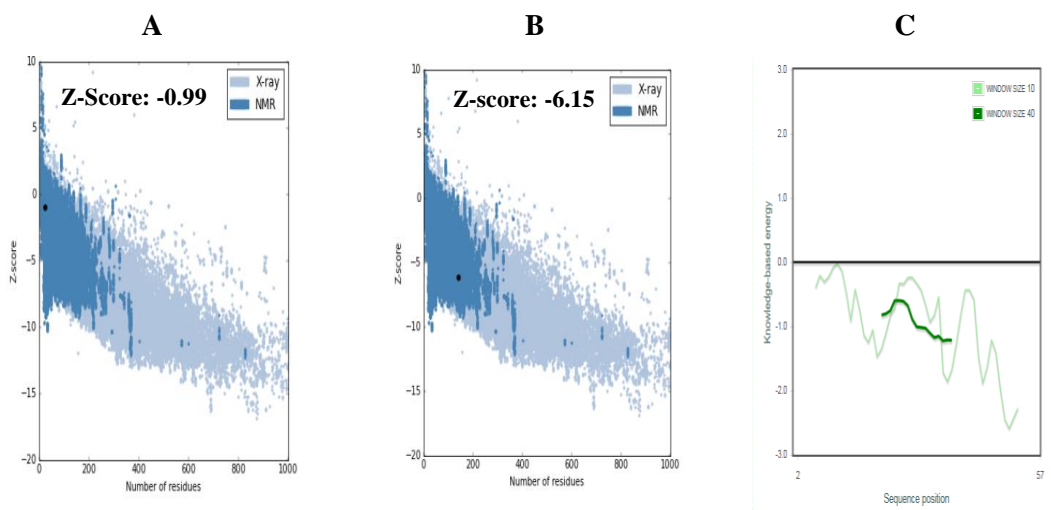
نایسین



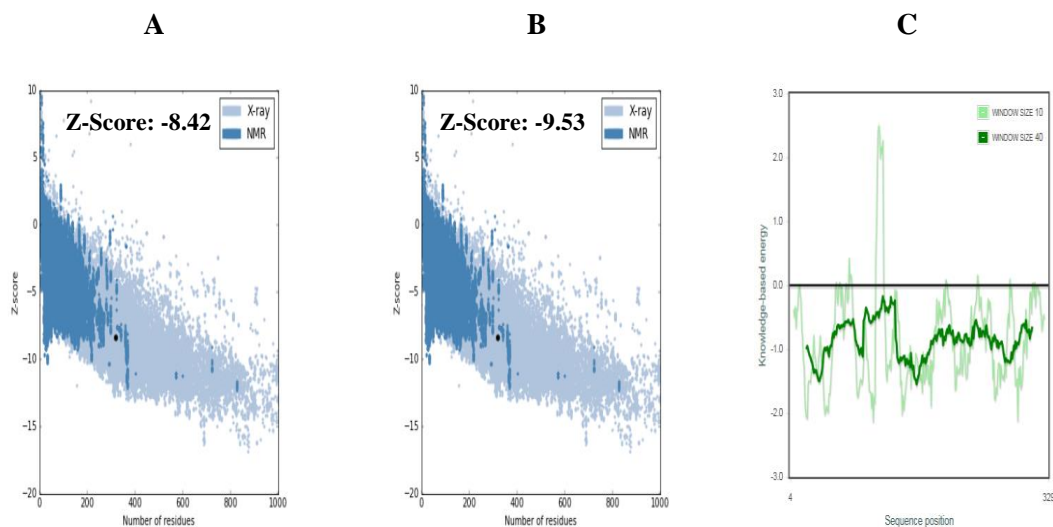
ملیتین



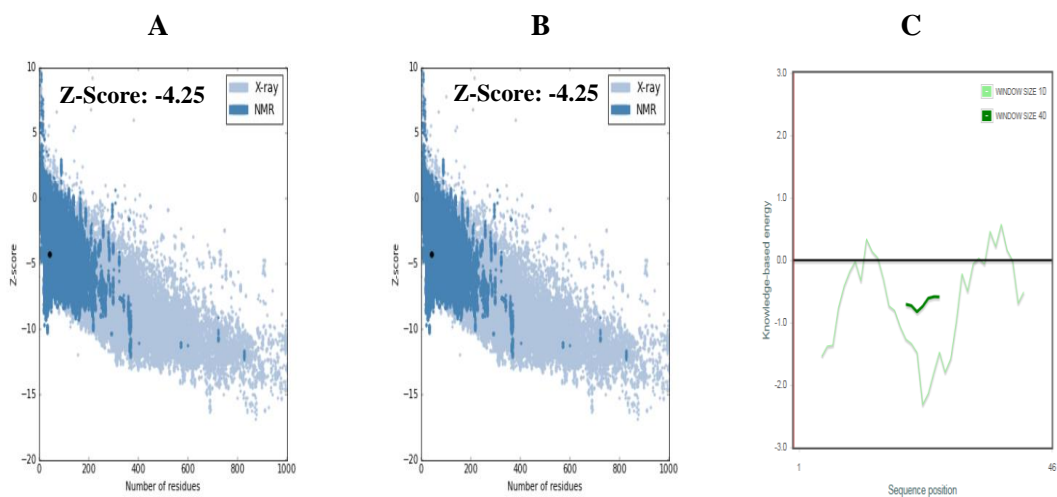
کوپسین



توپن



تیونین



شکل ۴- انرژی محاسبه شده به وسیله Z- Score با استفاده از نرم افزار PROSA کیفیت مدل سرتاسری پروتئین را مشخص می کند و ارزش آنها در پلاتی که حاوی Z- Score از آزمایش های مشخص شده از زنجیره های α و β پروتئین در PDB است، آشکار می شود؛ A. مدل مشابه، B. الگو، C. محاسبه پلات انرژی PROSA برای مدل مشابه

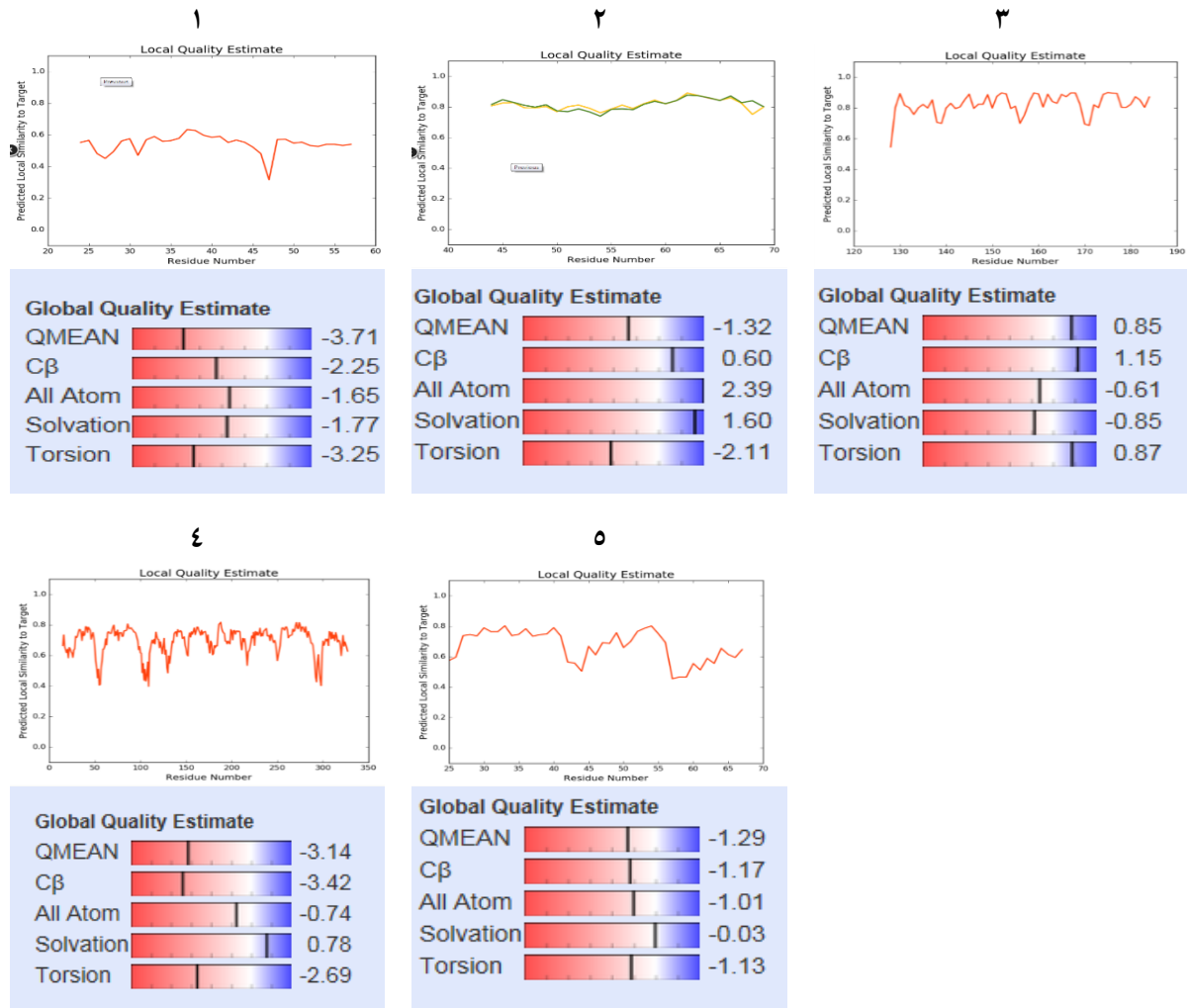
بررسی شده هیچ گونه حساسیت زایی را نشان ندادند. از آنجا که ملیتین در سایت allermatch و سایت peptidecutter حساسیت زایی را نشان نمی دهد، پس حساسیت زایی نیست. نتایج نشان دادند پپتیدهای ضدباکتری در پروکاریوت و یوکاریوت های تک سلولی و پرسلولی حساسیت زایی نیستند. نتایج سایت

به منظور بررسی حساسیت زایی از دو سایت allermatch و peptidecutter استفاده شد.

نتایج حساسیت زایی نشان دادند به جز ملیتین در *Apis mellifera* که در سایت allermatch در قسمت 80- amino- acid sliding window alignment cut of 35 حساسیت زایی را نشان می دهد، سایر پپتیدهای

استفاده شدند، عبارتند از: تریپسین^۶، پپسین^۷ و چموتریپسین^۸. تمام پپتیدهای بررسی شده با آنزیم‌های برشی هضم شدند، پس حساسیت‌زا نیستند (جدول ۴).

peptidecutter در جدول ۴ نشان داده شده‌اند. اگر پپتیدهای بررسی شده با آنزیم‌های برشی هضم شوند، حساسیت‌زا نیستند. آنزیم‌هایی که در این پژوهش

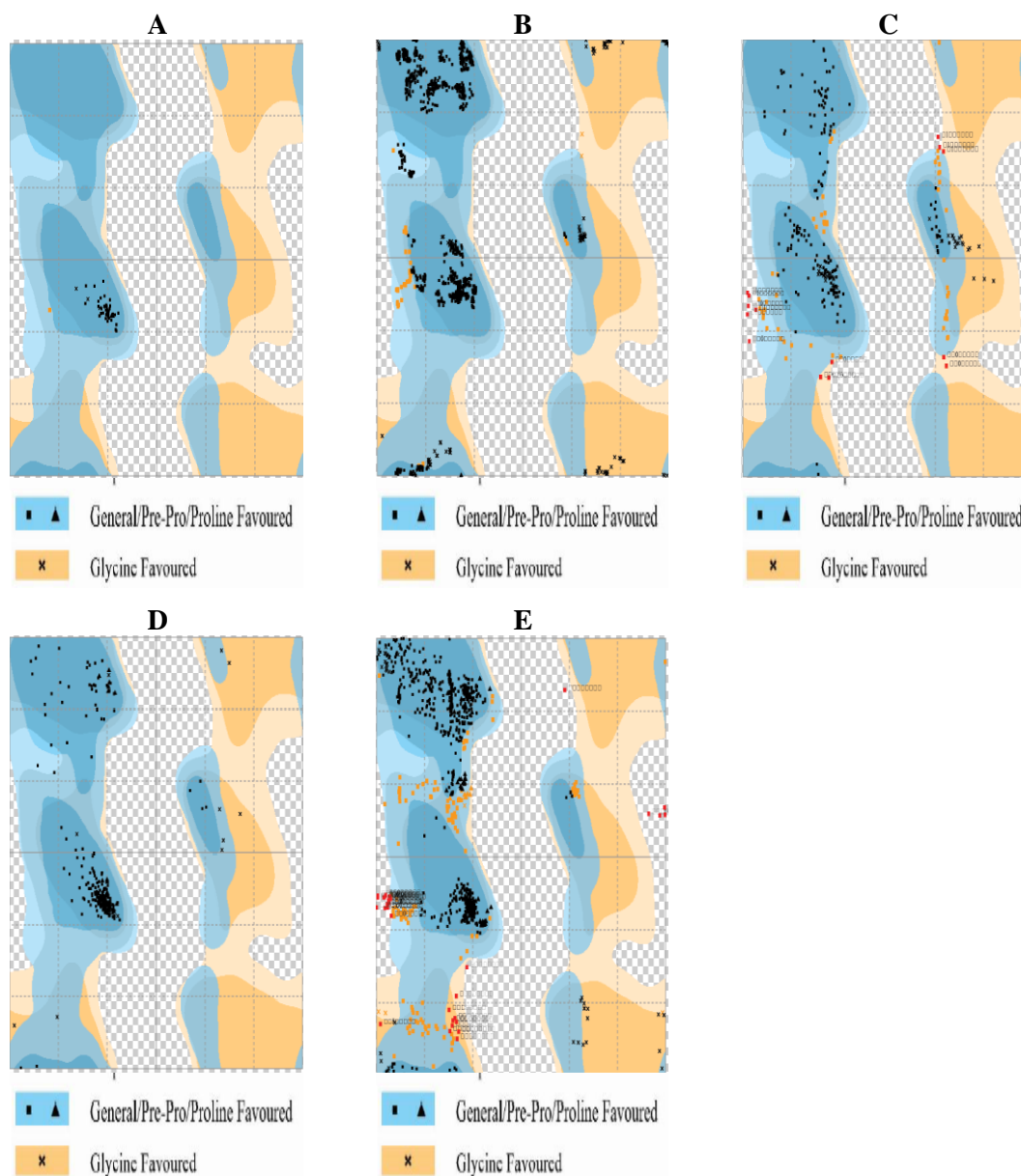


شکل ۵- نمودارهای ارزیابی کیفی موضعی ساختار و نمودار Z-score

روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است. قطر هاله رشد کردن توسط نایسین در هر دو باکتری بیشتر از آنتی‌بیوتیک بود. در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، بیشترین هاله بازدارندگی در روش چاهک گذاری برابر ۱۹ میلی‌متر و در روش دیسک بلانک برابر ۲۳ میلی‌متر بود.

نتایج بررسی آثار ضد میکروبی نایسین و مقایسه با آنتی‌بیوتیک تتراساکلین به روش انتشار دیسک در آگار و چاهک گذاری نشان دادند قطر منطقه رشد کردن ایجاد شده در اثر این ترکیبات در استافیلوکوکوس اورئوس (باکتری گرم مثبت) بیشتر از اشریشیا کلی (باکتری گرم منفی) است. نتایج نشان دادند اثر نایسین

اندازه‌گیری‌ها با خط‌کش انجام شدند (شکل ۷).
 در باکتری *اشریشیا کلی* بر اساس روش
 چاهک‌گذاری و استفاده از دیسک بلانک، بیشترین هاله
 بازدارندگی ۹ میلی‌متر بود (شکل ۸).



شکل ۶- نمودار رامچاندران ساختار پپتیدهای ضدباکتری مدل‌سازی شده در A. کوپسین، B. ملیتین، C. نایسین، D. ترین، E. تیونین

کشت کاسته می‌شود. در غلظت ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر
 عصاره پروتئین، بازدارندگی کامل *استافیلوکوکوس*
اورئوس انجام شد؛ ولی همین غلظت سبب بازدارندگی
 کامل *اشریشیا کلی* نشد که نشان‌دهنده تأثیر کمتر نایسین

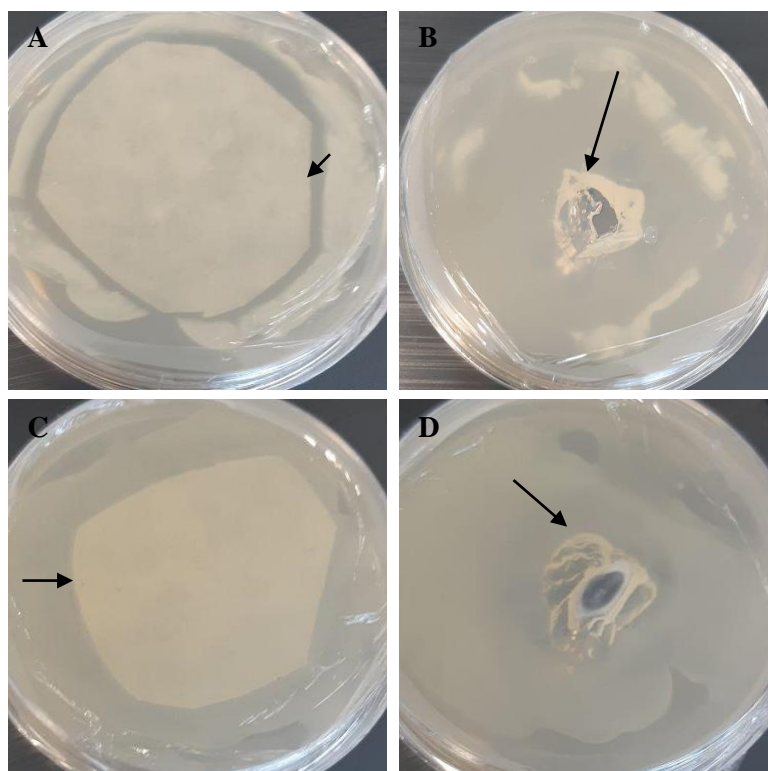
نتایج آزمایش‌های MIC و MBC مشخص کردند
 میزان مهار رشد باکتری توسط عصاره با میزان عصاره
 موجود در رقت‌ها رابطه مستقیم دارد و با افزایش میزان
 عصاره در هر رقت، از تعداد کلنی‌های باکتری پس از

همچنین در استافیلوکوکوس اورئوس بر اساس روش چاهک گذاری و روش دیسک بلانک، کمترین هاله بازدارندگی به ترتیب برابر با ۵ و ۱ میلی متر بود (شکل ۷). در باکتری اشریشیا کلی، کمترین هاله بازدارندگی در روش های چاهک گذاری و دیسک بلانک به ترتیب ۲ و ۱ میلی متر به دست آمد (شکل ۸).

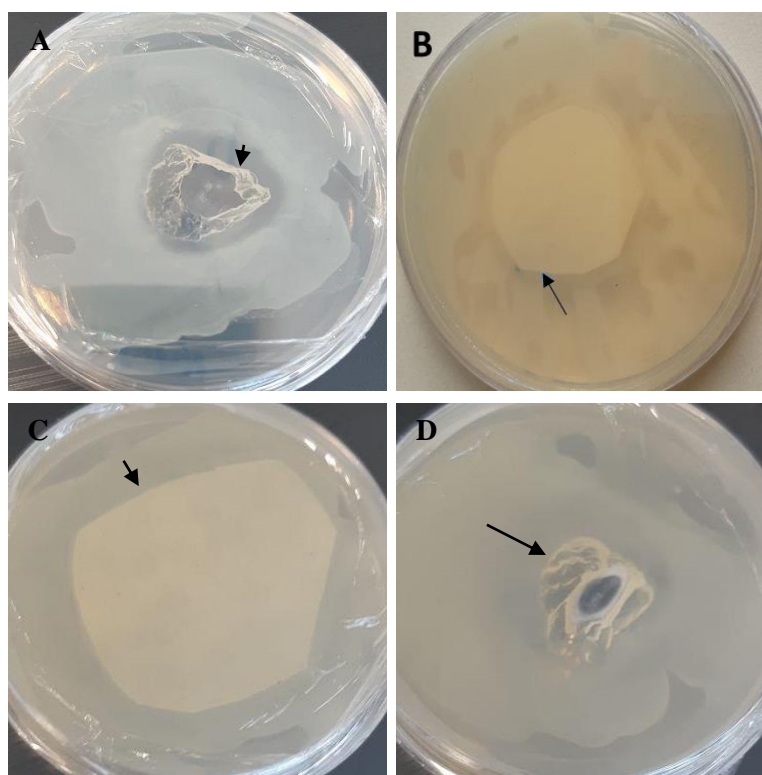
روی باکتری های گرم منفی است. حداقل غلظت ممانعت کنندگی در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (گرم مثبت) در غلظت ۱۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد؛ اما در باکتری گرم منفی اشریشیا کلی حداقل غلظت ممانعت کنندگی در غلظت ۲۵ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد.

جدول ۴- تعداد قطعه های ایجاد شده در اثر هضم آنزیمی به وسیله سایت پپتیدکتر

نوع موجود بررسی شده	پپتیدهای بررسی شده	تعداد سایت های برش ایجاد شده به وسیله آنزیم های برشی		
		تریپسین	پپسین	چیموتریپسین
پروکاریوت	A نایسین	۷	۹	۱۰
یوکاریوت پرسولوی	ملیتین	۶	۱۹	۱۳
یوکاریوت پرسولوی	کوپسین	۱۴	۳۳	۲۳
یوکاریوت تک سلولی	ترین	۳۰	۹۹	۸۶
یوکاریوت پرسولوی	تیونین	۱۳	۲۰	۲۱



شکل ۷- هاله بازدارندگی در باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس؛ A. با استفاده از دیسک بلانک، B. با استفاده از چاهک گذاری، C و D. شاهد منفی



شکل ۸- هاله بازدارندگی در باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی*؛ A. با استفاده از چاهک گذاری، B. با استفاده از دیسک بلانک، C و D. شاهد منفی

بحث

باتوجه به اهمیت پتیدهای ضدباکتری؛ در پژوهش حاضر به بررسی بیوانفورماتیکی پتیدهای ضدباکتری پرداخته شد و با بررسی جامعی که انجام شد، تاکنون مطالعه‌ای به‌طور جامع در زمینه بررسی پتیدهای ضدباکتری انجام نشده است.

نتایج نشان دادند نوع دومین‌ها در پتیدهای بررسی شده متفاوت است، اما عملکرد تمام دومین‌ها در پروکاریوت و یوکاریوت‌های تک‌سلولی و پرسلولی یکسان است. بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پتیدهای ضدباکتری نشان داد این پتیدها از نظر وزن مولکولی، تعداد آمینواسید، نقطه ایزوالکتریک، شاخص آلیفاتیک، شاخص ناپایداری و حلالیت پتیدهای ضدباکتری در پروکاریوت و در یوکاریوت‌های تک‌سلولی و پرسلولی بررسی شده دارای دامنه‌ای از

تنوع هستند. تعیین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پتیدهای ضدباکتری می‌تواند برای شناخت بهتر و شناسایی آنها بسیار سودمند باشد. شاخص ناپایداری پروتئین‌ها بیان‌کننده میزان پایداری آنها در لوله آزمایش در برابر حرارت است و این به نوع آمینواسیدهای موجود بستگی دارد (۱۵). شاخص ناپایداری محاسبه‌شده برای پتیدهای بررسی شده نشان داد پروتئین‌هایی که شاخص ناپایداری آنها کمتر از ۴۰ باشد، باثبات هستند و در غیر این حالت، بی‌ثبات خواهند بود (۱۵)؛ بر اساس این تخمین می‌توان گفت پتیدهای بررسی شده در پنج گونه در دامنه‌ای از ناپایداری تا پایداری قرار دارند و این موضوع به پروکاریوت بودن یا پرسلولی و تک‌سلولی بودن یوکاریوت‌های بررسی شده بستگی ندارد. پتیدهای پایدار در شرایط تنش مانند تنش حرارتی می‌توانند ساختار سوم خود و در نتیجه، عملکردشان را در شرایط

بین پنج گونه (پروکاریوت و یوکاریوت‌های بررسی شده به‌طور هم‌زمان) مشخص کرد به‌جز گونه *Apis mellifera* سایر گونه‌ها در یک زمان اشتقاق یافته‌اند و گونه‌های بررسی شده از نظر تاکسونومی در جایگاه مناسبی از درخت فیلوژنی قرار نگرفته‌اند. آزمون فرضیه خنثی، اختلاف مشاهده شده برای یک جفت توالی را که با الگوی جایگزینی مشابه تکامل یافته‌اند، اندازه‌گیری می‌کند؛ اساس این کار، مقایسه فرکانس نوکلئوتید یا آمینواسید در توالی جفتی و تعداد تفاوت مشاهده شده بین توالی‌هاست. در زیست‌شناسی، مدل جایگزینی فرایندی را توصیف می‌کند که تغییر یک صفت را در یک فرایند زمانی بر اثر فشار انتخاب نشان می‌دهد (۱۸). این مدل در تفسیر درخت تکاملی در فیلوژنتیک و شاخه‌بندی و شبیه‌سازی توالی با آزمون روش‌ها و الگوریتم‌های دیگر کاربرد دارد. یکی از آزمون‌هایی که برای بررسی اثر فشار انتخاب روی یک ژن به کار برده می‌شود، *D- Tajima* است؛ این آزمون بر اساس مقایسه تنوع نوکلئوتیدی حاصل از فراوانی آللی جایگاه‌های چندشکلی است (۲۰). استفاده از *D- Tajima* که برای آزمون ثنوری خنثی به کار برده می‌شود، نشان داد ژن‌هایی که تنوع فراوانی آللی آنها زیاد است، *D- Tajima* مثبت (بیشتر از صفر) دارند و با انتخاب متعادل در جمعیت همراه هستند؛ در حالی که ژن‌هایی که تنوع فراوانی آللی آنها کم است، *D- Tajima* منفی دارند و با فشار انتخابی همراه هستند که یک واریانت سودمند را در جمعیت جایگزین سایر واریانت‌ها می‌کند. ژن‌هایی که به تازگی در معرض انتخاب قرار گرفته‌اند و آلل سودمند هنوز آلل اصلی در جمعیت نشده است، به سادگی با استفاده از *D- Tajima* قابل مطالعه نیستند (۲۱). منفی بودن *D- Tajima* پپتیدهای بررسی شده در

تنش حفظ کنند (۱۶). شاخص آلیفاتیک عبارتست از حجم نسبی پروتئین که با زنجیره‌های آلیفاتیک اشغال شده است (A, V, I, L) و به‌عنوان فاکتور مثبت در افزایش ثبات حرارتی پروتئین‌های گلوبول‌مانند محسوب می‌شود و به‌همین علت، در باکتری‌های مقاوم به گرما، پروتئین‌ها دارای شاخص آلیفاتیک زیادی هستند. پروتئین‌های دارای شاخص آلیفاتیک بسیار زیاد (بیشتر از ۱۰۰) ممکن است در دامنه دمایی بسیار زیادی از خود ثبات نشان دهند (۱۷). در بررسی حاضر بین یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌های بررسی شده، شاخص آلیفاتیک پپتیدهای بررسی شده در دامنه متنوعی از نظر پایداری دمایی قرار گرفتند. پپتیدهای پایدارتر را می‌توان به‌شکل نگهدارنده در مواد غذایی و داروها استفاده کرد. چنانچه متوسط هیدروپاتی کل (GRAVY) (خاصیت آبگریزی پروتئین) محاسبه شده برای پروتئین منفی باشد، بدین معناست که آن پروتئین غیرقطبی است و در صورت مثبت بودن، آن پروتئین قطبی محسوب می‌شود. پپتیدهای بررسی شده در پژوهش حاضر، در دامنه‌ای از پروتئین‌های قطبی تا غیرقطبی قرار گرفتند. پپتیدهای غیرقطبی را می‌توان به‌شکل نگهدارنده در مواد غذایی و داروها استفاده کرد. حلالیت پروتئین‌های قطبی بیشتر از حلالیت پروتئین‌های غیرقطبی است و در برابر حلال‌های ویژه هر پروتئین، پروتئین‌های غیرقطبی در وسط و پروتئین‌های قطبی در بخش بیرونی تجمع می‌یابند. پروتئین‌های غیرقطبی را می‌توان به‌شکل اهدافی برای انتقال دارو به نقطه مدنظر استفاده کرد؛ این طراحی با افزودن سیگنال خاص به پروتئین برای انتقال به قسمت مدنظر و قراردادن ماده هدف (دارو) در پروتئین انجام می‌شود (۱۸ و ۱۹). درخت فیلوژنی بر اساس توالی پپتیدهای بررسی شده

مطالعه پنج‌گونه (یوکاریوت‌ها و پروکاریوت بررسی شده) بیان‌کننده آن است که جمعیت تحت‌تأثیر selective sweep قرار داشته است و الل‌های با فراوانی کم گسترش یافته‌اند و فشار انتخاب روی آنها مؤثر بوده است.

معمول‌ترین مکان برای ماریپج آلفا، سطح هسته‌های پروتئین است که رابطی را برای تعامل با محیط آبی بیرون ایجاد می‌کند. قسمت داخلی ماریپج تمایل به داشتن آمینواسیدهای آبگریز و قسمت بیرونی تمایل به داشتن آمینواسیدهای آبدوست دارد؛ بنابراین در طول ماریپج، سه آمینواسید از هر چهار آمینواسید آبگریز خواهند بود؛ سایر آمینواسیدهای موجود در هسته پروتئین یا داخل غشای سلولی خاصیت آبگریزی دارند. به‌طور کلی ماریپج‌های قرار گرفته در سطح، تعداد کمتری آمینواسید آبگریز دارند؛ از این ویژگی می‌توان در پیش‌بینی ساختار پروتئین‌ها کمک گرفت؛ برای نمونه، نواحی با مقادیر بیشتر از آلانین، گلوتامین، لوسین و متیونین و مقادیر کمتر از پرولین، گلیسین، تیروزین و سرین تمایل به تشکیل ماریپج آلفا دارند. ساختار صفحه‌های بتا، ساختار دوم بسیار کشیده و چین‌داری است. یکی از تفاوت‌های مهم صفحه‌های بتا با ماریپج آلفا این است که آمینواسیدهایی که معمولاً در ساختار اول زنجیره پروتئینی با فاصله زیاد از هم قرار گرفته‌اند، در تشکیل این ساختار در مجاورت یکدیگر قرار می‌گیرند؛ بنابراین، صفحه‌های بتا تمایل به سختی و انعطاف‌پذیری ناچیزی دارند. پیوندهای هیدروژنی بین‌رشته‌ای که میان گروه‌های CO یک رشته بتا و NH رشته بتای مجاور ایجاد می‌شوند، به صفحه‌های بتا پایداری می‌بخشند و باعث می‌شوند این صفحه‌ها ظاهری زیگزاگ داشته باشند. بررسی ساختار دوم

پپتیدهای بررسی شده در یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌های بررسی شده نشان داد این پپتیدها در پنج گونه بررسی شده گستره متنوعی از ماریپج‌های آلفا و صفحه‌های بتا را دارند. پپتیدهایی که ماریپج‌های آلفا و صفحه‌های بتای بیشتری دارند، انعطاف کمتر و حلالیت کمتری دارند؛ انعطاف‌پذیری کمتر سبب پایداری بیشتر پروتئین می‌شود. نتایج نشان دادند نایسین در پروکاریوت و ملیتین و تیونین که جزو پپتیدهای ضدباکتری موجود در یوکاریوت‌های پرسلولی هستند و تنها ماریپج‌های آلفا را دارند نسبت به کوسین که جزو یوکاریوت‌های پرسلولی است و ترپن که جزو یوکاریوت‌های تک‌سلولی است و دارای ماریپج آلفا و صفحه‌های بتا است، پایداری کمتری دارند؛ در نتیجه مشخص شد پایداری پپتیدهای ضدباکتری به گونه مد نظر بستگی ندارد. هرچه پایداری پپتید بررسی شده بیشتر باشد، امکان استفاده از آن به شکل نگهدارنده طبیعی در محصولاتی که آماده کردن آنها به دمای زیاد نیاز دارد، وجود دارد.

در روش مشابهت مدلینگ یا مدل‌سازی مقایسه‌ای، ساختمان پروتئین بر اساس مشابهت توالی با ساختمان‌های شناخته شده با روش‌های تجربی پیش‌بینی می‌شود؛ درحقیقت، روش یادشده بر این اصل استوار است که اگر دو پروتئین مشابهت توالی زیادی داشته باشند، احتمالاً ساختمان سه‌بعدی بسیار مشابهی دارند. ساختار سه‌بعدی پروتئین منبع مهم اطلاعاتی برای درک بهتر عملکرد پروتئین و برهم‌کنش آن با اجزای دیگر (لیگاندها، پروتئین و ...) است. با توجه به سختی و پرهزینه بودن فرایند کریستالوگرافی به‌ویژه در زمینه پروتئین‌های مهمی مانند پپتیدهای ضدباکتری، پیشگویی ساختار آنها از طریق ابزار *In silico* به‌منزله میانبری برای

مطالعه‌های بعدی و بررسی جزئیات ساختاری آنهاست؛ به عبارت دیگر، طراحی یک لیگاند مؤثر برای فعال کردن یا مهار پروتئین در مسیر خاص با شبیه‌سازی ساختار سوم آن پروتئین مقرون به‌صرفه است و روند مطالعه‌ها را تسریع می‌کند. با توجه به نتایج ارزیابی کیفی مدل‌های ایجادشده، این مدل‌ها را می‌توان با ضریب اطمینان بالایی در تحلیل‌ها و طراحی‌های بعدی استفاده کرد. نتایج مدل‌سازی پژوهش ما در جدول ۳ ارائه شده است. ارتباط و وظایف دومین‌ها را می‌توان از مدل‌های به‌دست‌آمده شناسایی کرد؛ در پژوهش حاضر، پپتیدها خاصیت ضدباکتری داشتند.

نتایج نشان دادند اثر پپتید نایسین روی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* است. قطر هاله بازدارندگی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از ۱۵ میلی‌متر و نشان‌دهنده فعالیت زیاد پپتید و مهارکنندگی کامل بود، اما هاله بازدارندگی باکتری *اشریشیا کلی* به وسیله پپتید نایسین زیر ۱۰ میلی‌متر و نشان‌دهنده فعالیت مهارکنندگی متوسط پپتید نایسین روی این باکتری بود. پپتید نایسین روی غشای باکتری‌ها مؤثر است و چون باکتری گرم منفی دو غشا دارد، اثر پپتید نایسین روی آن محدود است (۲۲). باکتری‌های گرم مثبت در برابر عصاره‌ها حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی هستند که این امر از تفاوت در ساختار سلول باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت ناشی می‌شود؛ زیرا باکتری‌های گرم مثبت موکوپپتید بیشتری در ترکیب دیواره سلولی خود دارند و این در حال است که باکتری‌های گرم منفی تنها یک لایه نازک از موکوپپتید دارند؛ بنابراین، باکتری‌های گرم منفی مقاوم‌تر هستند (۲۳). شفقت^۹ و همکاران (۲۰۱۴) حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره

زنیان بر *استافیلوکوکوس اورئوس* را ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بر *اشریشیا کلی* را ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کرده‌اند (۲۴). امیری و همکاران (۲۰۱۶)، حداقل غلظت بازدارندگی رشد عصاره زنیان را بر *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین برابر ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بر *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس به متی‌سیلین برابر ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بر *اشریشیا کلی* O157H برابر ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کرده‌اند (۲۵). در مطالعه دیگری، شفقت و همکاران (۲۰۱۵) اسانس گیاه زنیان را به روش تقطیر با آب و با دستگاه کلونجر تهیه و خاصیت ضدباکتریایی آن را روی باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مشخص کردند. حداقل بازدارندگی اسانس زنیان بر باکتری گرم مثبت برابر ۱/۸۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بر باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* برابر ۷۵/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد (۲۶-۳۰).

نتایج پژوهش حاضر نشان دادند پپتیدهای ضدباکتری با توجه به وظیفه مشترکی که دارند، ویژگی‌های متنوعی را در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌های پرسلولی و تک‌سلولی نشان می‌دهند و این امر به گونه بررسی شده مربوط نمی‌شود. در پژوهش حاضر، اثر پروتئین نایسین روی دو باکتری گرم مثبت و گرم منفی بررسی شد و نتایج مهارکنندگی خوبی حاصل شدند.

پپتیدهای ضدباکتری می‌توانند به شکل نگهدارنده در مواد غذایی و داروها استفاده شوند. از آنجاکه مواد نگهدارنده مصنوعی عوارضی مانند سرطان و آسیب به کبد را ایجاد می‌کنند، امروزه استفاده از نگهدارنده طبیعی مدنظر قرار گرفته است و با توجه به

- promises. *The International Journal of Antimicrobial Agents* 2005; 25(5): 448-449.
- (5) Shetty K., Paliyath G., Pometto A., E Levin R. Food Biotechnology. New York: CRC Press; 2005.
- (6) Cheikhoussef A., Pogori N., Chen W., Zhang H. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: From production to their application. *International Journal of Food Microbiology* 2008; 125: 215-222.
- (7) Brown AK., Sridharan S., Kremer L., Lindenberg S., Dover LG., Sacchettini JC., Besra GS. Probing the mechanism of the Mycobacterium tuberculosis beta- ketoacyl-acyl carrier protein synthase III mtFabH: factors influencing catalysis and substrate specificity. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; 18: 54-63.
- (8) Ferguson AA., Jiang N., Pack M. Recycline and reshaping genes through GC- biased acquisition. *Mobile Genetic Elements* 2011; 15: 2134-2141.
- (9) Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch MC. SWISS- MODEL: An automated protein homology- modeling server. *Nucleic Acids Research* 2003; 31: 3381-3385.
- (10) Ali S., Morteza R., Mansour E. Designing predictive models to determine the structure of the acyl carrier protein enzyme. *Journal of Qom University of Medical Sciences* 2014; 13-20 Thereza Christina VP., Angela FJ., Letícia Celia de LN., Olivia MC. Production of nisin by *Lactococcus lactis* in media with skimmed milk. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2005; 121-124(1): 619-37.
- (12) Rasoul N., Mohammad M. Investigation of antibacterial properties of ethanolic extracts of four native medicinal plants of Ardebil province by two methods of disk and well diffusion. *The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences* 2016; 40(3): 149-154.

غیر حساسیت‌زا بودن پپتیدهای مطالعه‌شده می‌توان از آنها در پژوهش‌ها و پس‌از بررسی به‌شکل نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی و داروها استفاده کرد.

نتایج مقاله حاضر در مطالعه رفتار و کنش پپتیدهای ضدباکتری بسیار کمک‌کننده است و به فهم چگونگی میان‌کنش پروتئین‌های ضدباکتری با سایر پروتئین‌ها کمک می‌کند و زمینه‌ساز روشن شدن شیوه فعالیت آنها در سلول‌هاست.

امروزه به‌علت افزایش جمعیت، صنایع غذایی یکی از صنایع مهم در ایران و جهان به‌شمار می‌آیند؛ از این‌رو، تولید مواد غذایی با ماندگاری بیشتر یکی از اهداف پژوهش‌هاست؛ هرچند در حال حاضر، نگهدارنده‌های مصنوعی زیادی استفاده می‌شوند که مضرات زیادی برای بدن دارند و به همین علت، جایگزین کردن آنها با نگهدارنده‌های طبیعی جزو الویت‌ها محسوب می‌شود. پژوهش حاضر نشان داد نایسین می‌تواند به‌شکل نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی استفاده شود و تأثیر خوب نایسین در کنترل باکتری‌های بیماری‌زا به‌ویژه باکتری‌های گرم مثبت آشکار شد.

- References** Brogden KA., Ackermann M., McCray PB., Tack BF. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *The International Journal of Antimicrobial Agents* 2003; 22(5): 465-478.
- (2) Bulet P., Stocklin R., Menin L. Antimicrobial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews* 2004; 198: 169-184.
- (3) Chen H., Xu Z., Peng L., Fang X., Yin X., Xu N., et al. Recent advances in the research and development of human defensins. *Peptides* 2006; 27: 931-940.
- (4) Reddy KV., Yedery RD., Aranha C. Antimicrobial peptides: Premises and

- (13) Lovell SC., Davis IW., Arendall WB., de Bakker PI., Word JM., Prisant MG., et al. Structure validation by C α geometry: ϕ , ψ and C β deviation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 2003; 50(3): 437-450.
- (14) De gray G., Rajasekaran K., Smith F., Sanford J., Daniell H. Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiology* 2001; 127: 852-862.
- (15) Pettersen EF., Goddard TD., Huang CC., Couch GS., Greenblatt DM., Meng EC., et al. UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 2004; 25(13): 1605-1612.
- (16) Guex N., Peitsch MC. Swiss-Model and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997; 18(15): 2714-2723.
- (17) Gelhaye E., Rouhier N., Jacquot JP. The thioredoxin h system of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 2004; 42: 265-271.
- (18) Fallah ziarani M., Tohidfar M., Aminfar Z. Bioinformatic analysis of Acyl Carrier Protein (ACP) in eukaryotes and prokaryotes. *Crop Biotechnology* 2017; 17: 15-29.
- (19) Burge C., Karlin S. Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *Journal of Molecular Biology* 1997; 268: 78-94.
- (20) Carlson CS., Thomas DJ., Eberle MA., Swanson JE., Livingston RJ., Rieder MJ., et al. Genomic regions exhibiting positive selection identified from dense genotype data. *Genome Research* 2005; 13: 120-131. Hamblin MT., Thompson EE., Rienzo D. Complex signatures of natural selection at the Duffy blood group locus. A. *The American Journal of Human Genetics* 2002; 25: 1605-1612.
- (22) Liang Z., Auke J., van H., Manuel ML., Oscar PK. Potentiating the activity of nisin against *Escherichia coli*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2016; 4: 7.
- (23) Kim JS., Kuk E., Yu KN., Kim JH., Park SJ., Lee HJ. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2007; 3(1): 95-101.
- (24) Shafeghat M., Sharifi-Mood B., Metanat M., Saeidi S., Sepehri- Rad N. The Antibacterial Activity of the Ajowan Extract. *IJIDTM Journal* 2014; 19(67): 37-40.
- (25) Amiri A., Jomehpour N. Evaluation the Effect of Anti bacterial of *Ferula assa-foetida* L, *Carum copticum*, *Mentha piperita* L Hydroalcoholic Extract on Standard Sensitive and Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157H7 and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Ilam University of Medical Sciences* 2016; 24(2): 72-79.
- (26) Shafeghat M., Najafi S., Razavi-zadeh R. Essential oil composition and antimicrobial activity of oil, from ajowan (*carum copticum*) grown in sistan- iran. *Ijdtm Journal* 2015; 20(68): 37-40.
- (27) Marius BT., Thureyah M., Mervin M., Ashley P. Antibacterial activity of rationally designed antimicrobial peptides. *International Journal of Microbiology* 2020; 24(2): 72-79.
- (28) Alysha GE., Johnny XH., Søren N., Johannes Z., Ingrid AE., Amy KC., et al. An amphipathic peptide with antibiotic activity against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Nature Communications* 2020; 19(67): 37-40.
- (29) Renee MF., Luis AM., Jennifer SB., Bryan WD. Defining principles that influence antimicrobial peptide activity against capsulated *Klebsiella pneumoniae*. *PNAS* 2020; 117(44): 27620-27626.
- (30) Narimani R., Moghaddam M. Investigation of antibacterial properties of ethanolic extracts of four native medicinal

plants of Ardebil province by two methods of disk and well diffusion. *Research on Medicine* 2016; 40(3): 149-154.

-
- 1- Antimicrobial Peptides
 - 2- www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank
 - 3- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>
 - 4- Basic Local Alignment Search Tool
 - 5- www.Allermatch.org
 - 6- expasy.org/tools/peptidecutter/
 - 7- PTCC
 - 8- M. I. C
 - 9- Minimum Bactericidal Concentration
 - 1 - Substitution model selection 0
 - 1 - Disparity index test 1
 - 1 - Global Model Quality Estimation 2
 - 1 - Native structure 3
 - 1 - <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>
 - 1 - Protein Structure Analysis 5
 - 1 - tripsine 6
 - 1 - pepsine 7
 - 1 - chimoteripsine 8
 - 1 - Shafeghat 9
 - 2 - Amiri 0