

Bożenna Baranowska\*, Katarzyna Kurzepa\*, Ewa Marczak\*  
Aleksandra Szczucińska\*, Andrzej W. Lipkowski\*\*

\* Instytut Chemii Przemysłowej im. prof. I. Mościckiego w Warszawie

\*\* Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie

## Utylizacja odpadu nasion ostropestu plamistego II. Biologicznie czynne peptydy z odpadu nasion ostropestu plamistego

### Utilisation of milk thistle seed waste II. Biologically active peptides from milk thistle seed waste

Słowa kluczowe: *Silybum marianum*, nasiona roślin oleistych, peptydy antibakteryjne i przeciwgrzybicze, hydroliza enzymatyczna, frakcjonowanie peptydów

Key words: *Silybum marianum*, oil plant seeds, antibacterial and antifungal peptides, enzymatic hydrolysis, peptide fractionation.

Oleje, zarówno jadalne jak też stosowane do celów przemysłowych (w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym) są otrzymywane na ogół z nasion. Oprócz tłuszczów nasiona roślin zawierają wiele cennych składników, w tym białka. Przy produkcji olejów substancje te zawarte w makuchach traktowane są często jako uciążliwy odpad, czasem tylko utylizowany na cele paszowe. Celem naszych badań było wykorzystanie białek występujących w odpadach poprodukcyjnych w celu uzyskania peptydów antibakteryjnych i przeciwgrzybiczych. Opracowano metodę hydrolizy białek zawartych w odpadzie nasion ostropestu plamistego (*Silybum marianum*) oraz przeprowadzono szereg prób frakcjonowania peptydów zawartych w hydrolizatach. Zastosowana procedura prowadzi do otrzymania preparatów wykazujących aktywność skierowaną przeciwko mikroorganizmom powodującym najczęstsze skażenia kosmetyków.

In general, edible oils and many oils used in cosmetic and pharmaceutical industries are obtained from plant seeds. Oilseeds, besides the oils, contain many valuable substances as for example proteins. Seed cakes, containing these substances, obtained after production of oils are often troublesome waste, sometimes utilized as animal feed. The purpose of the present study was utilisation of proteins from seed cakes for preparation of antibacterial and antifungal peptides. Cake of milk thistle (*Silybum marianum*), waste product from herbal industry, was selected for the study. Enzymatic hydrolysis of proteins from the seed waste of *Silybum marianum* and fractionation procedure of hydrolysate peptides was elaborated. Applied procedure results in products active against most of bacteria, which cause contaminations of cosmetics.

## Wstęp

---

Oleje roślinne — tak jadalne, jak i wykorzystywane do celów przemysłowych (przemysł kosmetyczny, przemysł farmaceutyczny) pozyskiwane są głównie z nasion, obfitujących we wszelkie niezbędne do tworzenia nowego życia substancje odżywcze, a zwłaszcza substancje białkowe. Te cenne substancje towarzyszące olejom stanowią odpad, często uciążliwy, czasem utylizowany na cele paszowe, o ile nie zawierają substancji toksycznych.

W pracy podjęliśmy próby wykorzystania białek występujących w odpadach nasion roślin oleistych w celu uzyskania peptydów biobójczych.

Znane są występujące powszechnie reakcje obronne organizmów roślinnych narażonych w procesie kiełkowania na stosunkowo długotrwały kontakt z glebą, skierowane przeciwko bakteriom, grzybom i pleśniam. Istnieje obecnie opinia, że rośliny bronią się przed inwazją patogennych mikroorganizmów za pomocą kationowych peptydów, które niszczą bakterie i grzyby wywierając selektywne oddziaływanie na anionowe membrany bakteryjne za pośrednictwem elektrostatycznych interakcji (Katsumi 1999). Znalaziono już szereg tego rodzaju związków peptydowych. Wyizolowano między innymi:

- nowy przeciwgrzybiczy peptyd z nasion miłorzębu (*Ginkgo biloba*) (Wang i Ng 2000),
- pięć różnych peptydów roślinnych, w tym alfa-tioninę z pszenicy, białko LTP2 z jęczmienia, defenzynę PTH1 z ziemniaka (Caaveiro i in. 1997),
- nową rodzinę białek przeciwgrzybiczych bogatych w cysteinę z nasion roślin kapustnych, wśród których dwa okazały się identyczne z przeciwgrzybiczymi peptydami wyizolowanymi uprzednio z nasion rzodkiewki (Zhang i Lewis 1997),
- dwa nowe peptydy przeciwbakteryjne należące do rodziny gamma-tionin (Tarras i in. 1993), wyekstrahowane z nasion fasoli *Vicia faba*. Peptydy te, nazwane fabatynami, są naładowane dodatnio. Wykazują aktywność skierowaną zarówno przeciw bakteriom Gram-dodatnim, jak i Gram-ujemnym, nie posiadając jednak działania przeciwgrzybiczego

Podejmując niniejszą pracę spodziewaliśmy się więc znaleźć substancje biobójcze wśród fragmentów peptydowych otrzymanych w drodze enzymatycznej hydrolizy białek odpadowych nasion ostropestu plamistego (*Silybum marianum*).

Tłuszcze z ostropestu plamistego, doskonałe do celów kosmetycznych, były już przedmiotem wielu prac badawczych, a sposób ich pozyskiwania i utylizacji był wielokrotnie modyfikowany i patentowany. Na temat białek z ostropestu nie znaleziono żadnych wzmianek literaturowych.

Prace nasze objęły enzymatyczną hydrolizę białek, próby frakcjonowania uzyskanych tą drogą peptydów oraz badania aktywności biobójczej frakcji peptydowych.

## Materiały i metody

---

**Surowiec** — bielmo nasion ostropestu plamistego uzyskane z Poznańskich Zakładów Zielarskich „Herbapol” o następującym składzie chemicznym:

białka	— 31–36%
tłuszcze	— 30–35%
pochodne tłuszczowe i flawonoidy	— 8–9%
sole mineralne	— ok. 5%
woda	— ok. 7%
inne	— 8–14%

### Hydroliza enzymatyczna białek

Bielmo nasion ostropestu poddawano odtłuszczeniu przez sześciokrotną ekstrakcję eterem naftowym w aparacie Soxhleta. Po zakończeniu ekstrakcji bielmo suszono pod próżnią w celu usunięcia rozpuszczalnika, a następnie poddawano hydrolizie enzymatycznej przy użyciu pankreatyny. W tym celu przygotowywano zawiesinę bielma (10% w/w) w wodzie destylowanej, doprowadzono pH zawiesiny do około 8 przy użyciu 0,1 N roztworu NaOH, po czym dodawano enzym (1% w stosunku do białka) i termostatowano w temperaturze 37°C przez 5 godzin. Następnie enzym inaktywowano przez ogrzanie mieszaniny reakcyjnej do wrzenia. Po schłodzeniu do temperatury pokojowej, mieszaninę reakcyjną wirowano (5 tys. obr/min. przez 20 min.), a uzyskany supernatant liofilizowano. Otrzymaną po liofilizacji mieszaninę peptydów poddawano frakcjonowaniu.

### Frakcjonowanie peptydów

Rozdział peptydów hydrolizatu na frakcje prowadzono wstępnie na kolumnie wypełnionej Sephadexem LH-20, w metanolu. Skład frakcji sprawdzano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent mieszaninę n-butanol : kwas octowy : woda w stosunku 4 : 1 : 1. Frakcje o zbliżonym składzie łączono, odparowywano i liofilizowano.

Dla ułatwienia ewentualnego wdrożenia wyników prac w warunkach przemysłowych przeprowadzono również próby rozfrakcjonowania peptydów metodami strąceniowymi z wykorzystaniem dehydratacji cząsteczek peptydów wskutek dodatku soli nieorganicznych, a zwłaszcza siarczanu amonu oraz niektórych mieszających się z wodą rozpuszczalników organicznych jak etanol i aceton.

### Badanie aktywności biobójczej frakcji peptydowych

Określano Minimalne Stężenie Inhibujące (MIC) wzrost drobnoustrojów w podłożu metodą rozcieńczeń. Badanie prowadzono na następujących szczepach testowych:

- gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*) nr NCTC 4163,

- pałeczka okrężnicy (*Escherichia coli*) nr NCTC 8196,
- pałeczka ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*),
- grzybnia (*Candida albicans*).

Wybrane organizmy należą do drobnoustrojów powodujących najwięcej zakażeń, tak w kosmetykach, jak i zakażeń szpitalnych.

#### Metody analityczne

- oznaczanie całkowitej zawartości azotu — metodą Kjeldahla,
- oznaczanie zawartości azotu alfa-aminowego — metodą Pope'a i Stevensa,
- przeciętną wielkość cząsteczki wyliczano na podstawie proporcji zawartości azotu alfa-aminowego do całkowitej zawartości azotu.

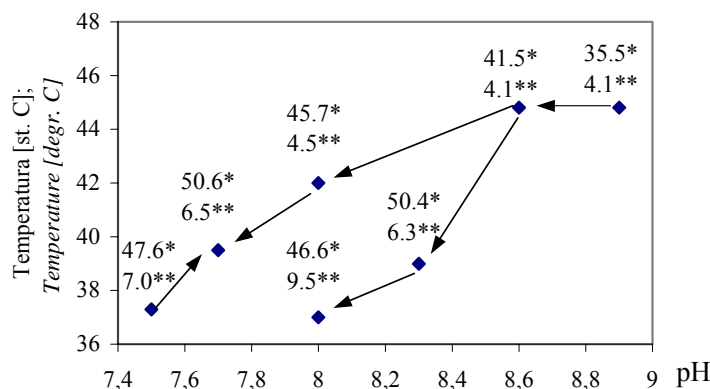
## Wyniki i dyskusja

Hydrolizaty jako całość nie wykazywały działania przeciwbakteryjnego, jednakże po rozdzieleniu na frakcje wszystkie uzyskane preparaty posiadały mniej lub bardziej nasilone działanie antybakteryjne (tab. 1), porównywalne z działaniem konserwantów stosowanych aktualnie w preparatach kosmetycznych. W tej sytuacji, stosując metodę największego spadku przeprowadzono próby optymalizacji procesu hydrolizy uwzględniające zarówno wpływ parametrów na wydajność reakcji, jak i na wielkość cząsteczek otrzymywanych peptydów. Wyniki doświadczeń przedstawiono na wykresach 1 i 2.

Tabela 1  
Minimalne Stężenie Inhibujące (MIC) hydrolizatu ostropestu plamistego i jego frakcji peptydowych wobec badanych szczepów bakterii — *Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of milk thistle digest and its peptide fractions on tested bacteria strains*

Fracja <i>Fraction</i>	MIC [%]	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
1	0,06	0,25
2	0,25	0,25
3	0,125; 0,25	0,50
4	0,125	0,50
Hydrolizat ostropestu plamistego <i>Digest of milk thistle</i>	+	+

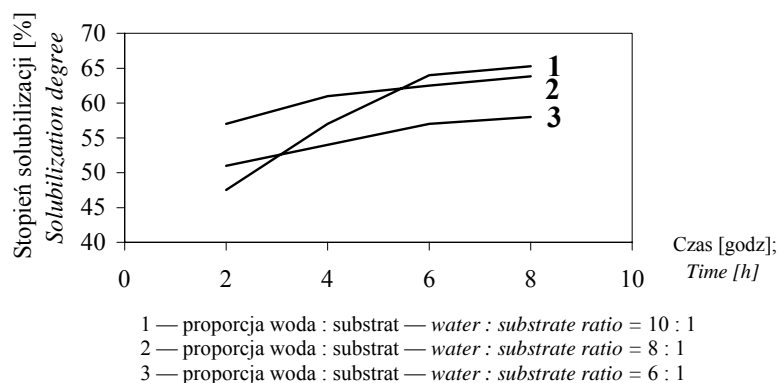
+ — brak hamowania wzrostu drobnoustrojów — *no inhibition of microorganism growth*



\* stopień solubilizacji białka — *protein solubilisation degree* [%]  
 \*\* średnia liczba reszt aminokwasowych w cząsteczce peptydu  
*mean number of amino acid residues in peptide molecule*

Wykres 1. Optymalizacja hydrolizy białek nasion ostropestu plamistego. Wpływ pH i temperatury na stopień solubilizacji białek i wielkość cząsteczki (czas = 4 h; proporcja woda : substrat = 6 : 1) *Optimisation of hydrolysis of milk thistle seeds protein. Effect of pH and temperature on degree of protein solubilisation and molecule size (time = 4 h; water : substrate ratio = 6 : 1)*

Wykres 1 obrazuje wpływ pH i temperatury na stopień solubilizacji białek i przeciętną wielkość cząsteczki. Przeciętna ilość grup aminokwasowych w cząsteczce peptydu najkorzystniej przedstawia się w możliwie niskiej temperaturze — 37,5°C. Na wykresie 2 widać wpływ czasu trwania i rozcieńczenia środowiska reakcji na stopień solubilizacji białek. Reakcję, praktycznie rzecz ujmując można zakończyć po 6 godzinach. Stopień solubilizacji białek rośnie wraz z rozcieńczeniem.



Wykres 2. Optymalizacja hydrolizy białek nasion ostropestu. Wpływ czasu trwania reakcji i rozcieńczenia na stopień solubilizacji białka — *Optimisation of hydrolysis of milk thistle seeds protein. Effect of the reaction time and reaction mixture concentration on degree of protein solubilisation*

Przedstawione prace optymalizacyjne dostarczyły materiałów do badań nad frakcjonowaniem peptydów i doprowadziły do wyselekcjonowania szeregu grup substancji antybakteryjnych. Badania skupione zostały przede wszystkim na metodach strąceniowych, łatwych do wprowadzenia w praktyce przemysłowej. W tabeli 2 przedstawiono przykłady możliwości uzyskania grup związków hamujących rozwój poszczególnych mikroorganizmów. Jak widać średnia wielkość cząstek i aktywność antybakteryjna wysalanych frakcji zależy nie tylko od zastosowanego medium strącającego, ale także od jego stężenia. Widać to doskonale na przykładzie wytrącania peptydów siarczanem amonu. Preparaty wysolone siarczanem amonu mogą w zależności od warunków operacji posiadać niską lub bardzo wysoką aktywność biobójczą w stosunku do organizmów testowych. Uzyskana z wysoką wydajnością (ok. 47%) frakcja przedstawiona w pozycji 3 jest frakcją bardzo silnie działającą na testowy szczep gronkowca złocistego oraz pałeczki ropy błękitnej. Pozostałe dwa preparaty tak intensywnego działania nie posiadają. Frakcje aktywne można otrzymać również stosując do wytrąceń glikol polietylenowy lub powodując wytrącenie peptydów z roztworu w punkcie izoelektrycznym.

## Wnioski

---

Frakcje peptydowe otrzymane w wyniku wytrącania z hydrolizatów ostropestu plamistego pankreatyną posiadają zdolność hamowania rozwoju mikroorganizmów na poziomie konserwantów stosowanych obecnie w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym. Takie też przewidujemy zastosowanie opracowanych preparatów. Wyniki pracy są przedmiotem zgłoszenia patentowego.

## Conclusions

---

Peptide fractions obtained in result of precipitation from pancreatin digests of milk thistle inhibit microorganism growth with the activity comparable to activity of preservatives, which are currently used in cosmetic and pharmaceutical industry. There is a high probability that peptide fractions from milk thistle may be used as natural antibacterial agents in these industries. Results of the study are subject of patent application.

Tabela 2  
 Wpływ sposobu wytrącania frakcji peptydowych z hydrolizatów ostropestu plamistego na wydajność otrzymanych frakcji i ich właściwości hamowania wzrostu mikroorganizmów — *Effect of precipitation procedure of peptide fractions from hydrolysates of milk thistle on yield of fractions and their antimicrobial properties*

Lp. No.	Hydrolizat <i>Hydrolysate</i>		Medium strącające <i>Precipitating agent</i>		Strącona frakcja peptydowa <i>Precipitated peptide fraction</i>		Minimalne Stężenie Inhibujące (MIC) [%] wobec mikroorganizmów <i>Minimal Inhibitory Concentration [%] on microorganisms</i>			
	stężenie concentration [%]	n*	substancja strącająca <i>precipitating agent</i>	dotatek amount added	wydajność yield [%]	n*	<i>Staphylo- coccus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudo- monas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
1	7,75	4,28	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20,0%	13,2	4,90	0,25	0,25	0,125	+
2	11,1	5,56	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25,0%	22,62	6,53	+	+	0,031	0,25
3	11,1	5,56	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30,0%	46,9	6,88	0,0075	0,125	0,031	+
4	10,0	3,32	PEG 400**, pH 5,6	35,0%	22,46	10,29	0,5	1,00	0,50	1,00
5	7,9	4,01	CH <sub>3</sub> COOH	do pH 6,8 do pH 4,8 do pH 4,5 do pH 4,0	5,88 47,07 15,09 1,21	5,19 7,31 7,55 8,10	+	+	+	+

\* n — średnia liczba aminokwasów w cząsteczce peptydu — *mean number of amino acids in peptide molecule*

\*\* PEG 400 — glikol polietylenowy 400 — *Polyethylene glycol 400*

+ brak hamowania wzrostu drobnoustrojów — *no inhibition of microorganism growth*

## Literatura

---

- Caaveiro J.M., Molina A., Gonzalez-Manas J.M., Rodriguez-Palezuela P., Garcia-Olmedo F., Goni F.M. 1997. Differential effects of five types of antipathogenic plant peptides on model membranes. *FEBS Lett.*, 410 (2-3): 338-342.
- Matsuzaki K. 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archatypes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1462: 1-10.
- Tarras F.R., Torrekens S., Van Leuven F., Osborn R.W., Vanderleyden J., Cammue B.P., Broekaert W.F. 1993. A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Lett.*, 316 (3): 233-240.
- Wang H., Ng T.B. 2000. Ginkbilobin, a novel antifungal protein from Ginkgo biloba seeds with sequence similarity to embryo-abundant protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270 (2): 407-411.
- Zhang Y., Lewis K. 1997. Fabatins: new antimicrobial plant peptides. *FEMS Microbiol. Lett.*, 149 (1): 9-64.