

مقایسه سمیت سلولی پپتیدهای زیست فعال استخراج شده از عضله ماهی مرکب ببری به سه روش خشک کن انجمادی، پاششی و تحت خلاء بر پروماستیگوت‌های انگل *لیشمانیا* مازور

فرهاد فرهنگ‌پژوه^{۱*}، محمد حسین راضی جلالی^۲، علیرضا البرزی^۳، سمیه بهرامی^۳ و مهدی نیکو^۴

تاریخ دریافت: ۹۹/۹/۲

تاریخ پذیرش: ۹۹/۹/۱۷

^۱ دانشجوی دکتری تخصصی انگل شناسی، گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز

^۲ استاد گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز

^۳ دانشیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز

^۴ استادیار گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده آرتمیا و آبی پروری دانشگاه ارومیه

*مسئول مکاتبه: Email: f.farhangpajuh@gmail.com

چکیده

سابقه و هدف: در سال‌های اخیر، درمان بیماری لیشمانیوزیس بدلیل بروز مقاومت دارویی و مشکلات مربوط به اثرات جانبی داروهای متداول با مخاطراتی مواجهه شده است. این مطالعه با هدف بررسی اثر سمیت سلولی پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز عضله ماهی مرکب ببری بر پروماستیگوت‌های انگل *لیشمانیا* مازور انجام شد. روش کار: متغیرهای نوع آنزیم، نسبت غلظت آنزیم به سوبسترا، زمان هیدرولیز و روش خشک کردن بر ویژگی‌های درصد تولید، پروتئین پودر پپتید، ظرفیت آنتی اکسیدانی تام، فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH، نیتریک اکساید و گروه‌های تیول مورد مطالعه قرار گرفت. پس از تعیین درصد پروتئین عضله سفید ماهیان مرکب، از آنزیم‌های آلکالاز و پاپائین ۵ درصد و زمان ۱۸۰ دقیقه جهت هیدرولیز استفاده گردید. خاصیت سمیت سلولی بر پروماستیگوت انگل *لیشمانیا* مازور با استفاده از روش MTT ارزیابی گردید. **نتایج:** نتایج نشان داد که درجه هیدرولیز پروتئین در عضله با آنزیم آلکالاز ۵ درصد، بیشتر از سایر آنزیم‌های مورد مطالعه بود. با کمک آنزیم آلکالاز ۵ درصد در زمان ۱۸۰ دقیقه و با استفاده از روش خشک کردن پاششی بهترین فعالیت آنتی اکسیدانی در روش‌های سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی تام، سنجش قدرت آنتی اکسیدانتی، فعالیت جاروکنندگی نیتریک اکساید، گروه‌های سولفیدریل کل و بیشترین خاصیت سمیت سلولی حاصل گردید. **نتیجه‌گیری کلی:** نتایج نشان داد که با افزایش غلظت پودر پپتید بدست آمده، میزان مرگ و میر پروماستیگوت‌های انگل *لیشمانیا* مازور در تمام گروه‌های مورد مطالعه افزایش یافته است. بهترین میزان IC₅₀ در بین گروه‌های مورد مطالعه در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر از هیدرولیزات حاصل از آنزیم آلکالاز ۵٪ با روش خشک کن پاششی نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید.

واژگان کلیدی: هیدرولیز، آلکالاز، پپتید، پروماستیگوت، انگل *لیشمانیا* مازور، ماهی مرکب ببری

مقدمه

بیماری لیشمانیوز (سالک)، یکی از بیماری‌های انگلی درون سلولی است که بعنوان شایع‌ترین بیماری عفونی پس از ایدز، سل و مالاریا از آن یاد می‌گردد. لیشمانیوز در میان شش بیماری آندمیک با شیوع بالا و در واقع یک بیماری گرمسیری و نیمه گرمسیری ناشی از انگل درونی سلولی در سراسر جهان است (تورس گوئرو و همکاران، ۲۰۱۷). در چرخه زندگی انگل *لیشمانیا* دو فرم اصلی پروماستیگوت در پشه خاکی و آماستیگوت در میزبان پستاندار وجود دارد (سانتر و گول، ۲۰۱۷). این بیماری در همه قاره‌ها به غیر از اقیانوسیه یافت می‌شود و در مناطق محصور شده در شمال آفریقا، جنوب اروپا، خاورمیانه، جنوب شرقی مکزیک، و آمریکای مرکزی و جنوبی، آندمیک می‌باشد (تورس گوئرو و همکاران، ۲۰۱۷). بیش از ۲۰ گونه تک یاخته لیشمانیا باعث ایجاد بیماری لیشمانیوز می‌شوند که حدود ۰/۷ تا ۱ میلیون مورد جدید در سال با ۲۰ تا ۳۰ هزار مرگ و میر در میان جمعیت ۳۵۰ میلیون نفری پنج قاره در ۸۸ کشور را مبتلا می‌نمایند (سانتر و گول، ۲۰۱۷). تغییر روند بیماری سالک در سال‌های اخیر، نمایانگر افزایش موارد بیماری در کشور است. لیشمانیوز پوستی گرچه از لحاظ مرگ و میر مشکل زیادی به وجود نمی‌آورد ولی به دلیل طولانی بودن دوره زخم و هزینه‌های سنگین درمانی، وجود جوشگاه زخم، احتمال ایجاد عفونت‌های ثانویه و یا ایجاد عوارض و گاهی بدخیمی‌هایی که در محل اسکار و عوارض ناشی از درمان با داروهای موجود مشکلات مختلفی را ایجاد می‌کند اهمیت پیدا می‌نماید و در این میان هدف از درمان بیماری بهبود سریع زخم، عدم ایجاد جوشگاه و جلوگیری از عفونت ثانویه است، این بیماری به طور عمده بر کودکان، نوجوانان و بزرگسالان تاثیر می‌گذارد (گرینسون و همکاران، ۲۰۱۶). در حال حاضر، برای درمان بیماری از ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان از جمله پنتوستام و گلوکانتیم به عنوان خط اول درمان این بیماری استفاده می‌شود و مقاومت به این داروها به

صورت یک مشکل بزرگ در آمریکا، اروپا، خاورمیانه و هند مطرح گردیده است. در ایران دامنه مقاومت به ترکیبات آنتیموان از ۲/۹٪ تا ۶/۹۴٪ گزارش شده است (تالاری، ۲۰۱۹). پپتیدهای زیست‌فعال توالی‌های خاصی از اسیدهای آمینه هستند که تا زمانی که با دیگر اسیدهای آمینه موجود در ساختار اولیه پروتئین متصل شده‌اند بصورت غیرفعال باقی می‌مانند. این پپتیدها معمولاً از ۲ تا ۲۰ اسید آمینه تشکیل شده‌اند و طی هضم گوارشی، فرآوری یا هضم آنزیمی توسط آنزیمهای تجاری آزاد می‌شوند. شکل آزاد شده این پپتیدها بدلیل داشتن خصوصیات زیست فعال دارای عملکردهای فیزیولوژیک متعددی همانند تحریک ایمنی، ضدسرطانی، ضد میکروبی، آنتی اکسیدان، کاهنده فشارخون، ضد استرس اکسیداتیو و کاهنده کلسترول خون هستند. بیشترین تحقیقات بر روی پپتیدهای زیست فعال جدا شده از منابع گوشتی، با کمک آنزیم‌های ((angiotensin-1-converting enzyme ACE)) مهار کننده و پپتیدهای آنتی اکسیدانی انجام شده است (رایان، ۲۰۱۱). مزیت پپتیدهای آنتی اکسیدانی دارا بودن گروه‌های آبدوست و آبگریز و قابلیت فعالیت آن‌ها در هر دو فاز آبی و چربی است. این فعالیت‌های آنتی-اکسیدانی در پروتئین‌ها با کمک ساختارهای فضایی آنها محدود می‌شود و پپتیدها نمی‌توانند در معرض اکسیدان‌ها قرار بگیرند از این رو بمنظور آزادسازی این پپتیدها از روش هیدرولیز استفاده می‌گردد (چالامیا و همکاران، ۲۰۱۲). از دیگر روش‌های استخراج در صنایع استفاده از محیط‌های قلیایی و اسیدی و رسوب مواد می‌باشد (ابکاخواجویی و همکان، ۱۳۹۸). ترکیبات زیست فعال دریایی شامل پپتیدهای زیست‌فعال، الیگوساکاریدها، اسیدهای چرب امگا، آنزیم‌ها، مواد معدنی، رنگدانه‌ها و پلیمرهای زیستی هستند (ربیعی و همکاران، ۲۰۱۸). ماهی مرکب ببری در بین ماهی‌های خلیج فارس و دریای عمان با دارا بودن ترکیب شیمیایی شامل ۱۵-۵ درصد آب، ۱۵-۱۳ درصد پروتئین، ۱/۵-۱ درصد چربی و ۲-۱ درصد خاکستر، با فراوانی صید بالا در حدود ۳ میلیون تن در

هیدرولیز آنزیمی

قسمت عضله سفید که برای تهیه پپتیدهای زیست فعال مورد نیاز بود با استفاده از چرخ گوشت پارس خزر ساخت ایران دارای مش ۳ میلی متر بصورت خمیر عضله در آمد. ابتدا میزان ۱۰۰ گرم از خمیر عضله در مخزن دستگاه راکتور ۲ لیتری (PH state) (درسا تک، ایران) در مجاورت غلظت‌های ۲/۵٪ و ۵٪ از آنزیم پروتئیناز پاپائین و آلکالاز قرار گرفت (حمزه، ۱۳۹۵). برای این منظور، ابتدا خمیر عضله ماهی با ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه مخلوط، به بمدت ۲۰ دقیقه جهت غیر فعال سازی آنزیم-های اتولیز کننده در دمای ۸۵ درجه قرار گرفته و سپس محلول پروتئینی غیرفعال شده در مخزن دستگاه راکتور و در شرایط اپتیمم فعالیت آنزیم قرار گرفت. هیدرولیز در درجه حرارت اپتیمم برای فعالیت آنزیم های آلکالاز و پاپائین به ترتیب ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. در زمان هیدرولیز pH با کمک سود ۱ نرمال برای فعالیت هر آنزیم (۸ و ۷ برای آلکالاز و پاپائین) ثابت نگه داشته می‌شد. پس از پایان زمان هیدرولیز، محلول پروتئین هیدرولیز جهت غیر فعال شدن آنزیم بمدت ۱۰ دقیقه در دمای حدود ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس نمونه‌ها تا دمای آزمایشگاه (حدود ۲۴ درجه سانتی‌گراد) بمدت ۳۰ دقیقه سرد شده و در التراسانتریفیوژ یخچالدار (فرزانه آرمان، ایران) در دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی با سه روش خشک‌کن پاششی (درساتک، ایران) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و در زمان ۱ ثانیه پاشش، خشک‌کن انجمادی (دنا صنعت پرداز، ایران) و خشک‌کن خلاء (فن آزما، ایران) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و زمان ۲۴ ساعت خشک گردید.

تعیین درجه هیدرولیز (DH)

درجه هیدرولیز توسط فرمول $DH (\%) = B \times N / a$ محاسبه می‌گردد. در این معادله B حجم باز مصرفی بر حسب میلی لیتر، Nb نرمالیه باز (۱ مول)، Mp وزن

هر سال (و قیمت ارزان) می‌تواند از جمله منابع تهیه پپتیدهای زیست فعال دریایی باشد (فائو، ۱۹۹۱). در کشور ایران این نرم تن دریایی بدلیل اینکه مردم علاقه‌ای به مصرف مستقیم آن ندارند جزء سبذ غذایی قرار ندارد ولی بومیان محلی با اهداف درمانی در زمان خونریزی-های ناشی از ضربه و درمان عفونت‌های خارجی از آن بعنوان یک داروی سنتی استفاده می‌کنند، با در نظر گرفتن گزارشات علمی از خواص سمیت سلولی پپتیدهای زیست فعال بر روی رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی، در مطالعه حاضر سعی شده است که خاصیت سمیت سلولی پپتیدهای زیست فعال مستخرج شده از ماهی مرکب ببری بر پروماستیگوت‌های انگل *لشمانیا ماژور* مورد ارزیابی قرار گیرد. قابل ذکر است که خصاصیت سمیت سلولی پپتیدهای زیست فعال بدست آمده از سه روش مختلف خشک کردن هیدرولیزات عضله ماهی (روش‌های خشک-کن انجمادی، خشک‌کن پاششی و خشک‌کن خلاء) مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ماهیان مرکب (*Sepia Pharaonis*) از بندر بوشهر با وزن 140.2 ± 13.5 گرم تهیه گردید. نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در جعبه یونولیت از طریق پست هوایی (حدود ۲۴ ساعت) به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه ارومیه انتقال یافتند. در این مطالعه از آنزیم‌های پروتئیناز پاپائین (لیکویی پانول، ۸۰۰، آمریکا) با منشاء گیاهی و آلکالاز با منشاء جانوری (P4860، سیگما، آمریکا)، کیت‌های سنجش پروتئین، ظرفیت آنتی‌اکسیدانت تام (TAC)، نیتریک اکساید (NO)، تیول تام (شرکت آرسام فرا زیست، ایران) استفاده شد.

سنجش پروتئین عضله

میزان پروتئین عضله به روش کدال با استفاده از دستگاه کج‌دال اتوماتیک (تکتاز تجهیز کاران شهریار، ایران) و با ضریب تبدیل تعیین شد (AOAC, 2005).

(NO) توسط آنها با استفاده از کیت تجاری و طبق دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شد.

سنجش گروه‌های سولفیدریل کل

گروه‌های سولفیدریل کل بر استفاده از کیت تجاری سنجش تیول تام و بر اساس واکنش با معرف المان (Ellman reagent) اندازه‌گیری شد.

ارزیابی سمیت سلولی بر پروماستیگوت‌های انگل

لیشمانیا ماژور با روش MTT

بررسی خاصیت سمیت پپتیدهای زیست فعال تهیه شده بر سلول‌های پروماستیگوت انگل *لیشمانیا ماژور* با استفاده از روش MTT و کیت ارزیابی سمیت سلولی (آرسام فرا زیست، ایران) انجام شد. از غلظت‌های ۱/۲۵، ۲/۵۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پودر پپتید بدست آمده از روش‌های مختلف خشک کردن بر رقت 10^{-1} تا 10^{-6} X از سلول‌های پروماستیگوت انگل *لیشمانیا ماژور* MRHO/IR/75/ER تهیه شده از بخش انگل شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۵ درصد آلبومین سرم گاوی در سه تکرار استفاده گردید و پس از ۲۴ ساعت میزان IC_{50} (Inhibitory concentration 50%) اندازه‌گیری شد. IC_{50} غلظتی از عصاره است که از رشد ۵۰٪ پروماستیگوت‌های انگل جلوگیری می‌نماید. از غلظت‌های ۱۵/۶۲ mg/ml، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵۰، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ داروی گلوکانتیم بعنوان کنترل مثبت و چاهک‌های حاوی رقت 10^{-1} تا 10^{-6} X انگل بعنوان کنترل منفی استفاده شد. آزمایش در میکروپلیت-های ۹۶ خانه ته صاف BIOFIL از نوع Non treated مدل TCP001048 ویژه کشت سلول، انجام شد.

با استفاده از نرم افزار اکسل درصد زنده بودن سلول‌های انگل و سلول‌های کنترل مواجه شده با داروی گلوکانتیم با استفاده از فرمول زیر به دست آمد:

$$Viable\ cells\ \% + ((A_T - A_B) / (A_C - A_B) * 100)$$

در فرمول فوق A_C جذب نوری سلول‌های کنترل، A_T جذب نوری سلول‌های درمان شده در حضور غلظت‌های پودر پپتید زیست فعال و گلوکانتیم و A_B جذب نوری بلانک

پروتئین بر حسب گرم، $htot$ مقدار کل پپتیدهای موجود برای هیدرولیز (۱۱/۱ میلی‌اکی والان/گرم) و α از طریق معادله $\alpha = 10pH - pK/1 + 10pH - pK$ می‌باشد (آدلر-نيسن، ۱۹۸۶).

تعیین درصد پروتئین

غلظت پروتئین نمونه‌های هیدرولیزات با استفاده از روش لوری و دستگاه اسپکتروفتومتر (یونیکو، ژاپن) با استفاده از کیت تجاری اندازه‌گیری شد. اساس این روش مشابه روش بیوره است، با این تفاوت که حساسیت تشخیصی روش لوری بیشتر است. حد تشخیص روش لوری بین ۵-۱۰۰ میکروگرم پروتئین در هر میلی‌لیتر است. پس از تعیین غلظت پروتئین نمونه‌ها غلظت ۱ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه‌ها تهیه گردید. نمونه‌ها جهت انجام آزمایشات تکمیلی در لوله‌های فالكون استریل ۵۰ میلی‌لیتری و در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی تام (TAC)

ظرفیت آنتی اکسیدانی تام با استفاده از $ABTS^{+}$ که در حضور یک اکسیدانت مناسب به رادیکال کاتیونی $ABTS^{+}$ سبز اکسید شده تعیین گردید. ظرفیت آنتی اکسیدانت تام (TAC) در طول موج ۴۱۴nm اندازه‌گیری گردید. کلیه مراحل سنجش با استفاده از کیت تجاری صورت پذیرفت.

سنجش قدرت آنتی اکسیدانتی DPPH

تاثیر مهار رادیکال‌های DPPH به روش نیکو و همکاران (۲۰۱۴) اندازه‌گیری شد. یک میلی‌لیتر محلول پپتیدی با یک میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد مخلوط و بمدت ۱۰ ثانیه هم زده شد. نمونه‌ها بمدت ۳۰ دقیقه در تاریکی گرمخانه گذاری شده و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۹ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico، ژاپن) قرائت گردید. فعالیت آنتی اکسیدانی بر حسب درصد بیان گردید (نیکو و همکاران، ۲۰۱۴).

سنجش قدرت جارو کنندگی رادیکال‌های NO

توانایی پپتیدهای زیست فعال بدست آمده با بررسی فعالیت جارو کنندگی (scavenging activity) نیتریک اکساید

همکاران، ۲۰۱۹). پس از ۱۵ دقیقه، درجه هیدرولیز به میزان آهسته‌تر افزایش یافت. کاهش هیدرولیز با گذشت زمان واکنش آنزیمی به دلیل کاهش نواحی قابل هیدرولیز در پروتئین، تجزیه آنزیم و تولید محصولات بازدارنده حین هیدرولیز است (نیکو و همکاران، ۲۰۱۹؛ سنجان و بنجاکول، ۲۰۱۴).

در تجزیه واریانس نتایج بدست آمده نشان داده شد که اثر آنزیم، زمان و روش خشک کردن بر روی همه متغیرهای اندازه‌گیری شده اختلاف آماری معنی داری را در سطح یک درصد داشت ($p < 0.01$). اثر غلظت بر روی مقادیر پودر خشک پپتید، میزان پروتئین پپتید، میزان TAC و تیول معنی‌دار بود. با این حال اختلاف آماری معنی‌داری بین غلظت‌های آنزیم درمیزان DPPH و Nitric Oxide مشاهده نشد. اثر متقابل دوگانه آنزیم × غلظت بر روی متغیرهای پودر خشک پپتید و Thiol در سطح یک درصد اختلاف آماری معنی داری را نشان داد ($p < 0.01$). با این حال اثر متقابل آنزیم × غلظت بر روی سایر متغیرها معنی‌دار نبود. نتایج نشان داد که اثر متقابل دوگانه آنزیم × زمان بر روی همه متغیرهای مورد مطالعه اختلاف آماری معنی داری را نشان داد ($p < 0.01$). اثر متقابل دوگانه آنزیم × روش خشک کردن تنها بر روی متغیرهای Nitric Oxide و Thiol معنی‌دار بود ($p < 0.01$). همچنین نتایج آماری با استفاده از روش تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل دوگانه غلظت × زمان بر روی متغیرهای پودر خشک پپتید، پروتئین پودر پپتید و Thiol اختلاف آماری معنی داری داشت ($p < 0.01$). اثر متقابل دوگانه غلظت × روش خشک کردن بر روی متغیرهای پودر خشک پپتید، پروتئین پودر پپتید، DPPH و Thiol نیز معنی‌دار بود ($p < 0.01$). نتایج آماری نشان داد که اثر متقابل دوگانه زمان × روش خشک کردن بر روی همه متغیرهای مورد مطالعه به جز TAC اختلاف آماری معنی‌داری را نشان داده است ($p < 0.01$). نتایج تجزیه واریانس اثرات متقابل سه گانه آنزیم × غلظت × زمان و آنزیم × غلظت × روش خشک کردن تنها بر روی Thiol در سطح یک درصد اختلاف آماری

است. در نهایت نتایج به صورت IC50 به وسیله رگرسیون خطی با استفاده از نرم افزار اکسل محاسبه شد. جذب نوری به دست آمده با تعداد سلول‌های زنده و فعال از نظر متابولیک رابطه مستقیم دارد.

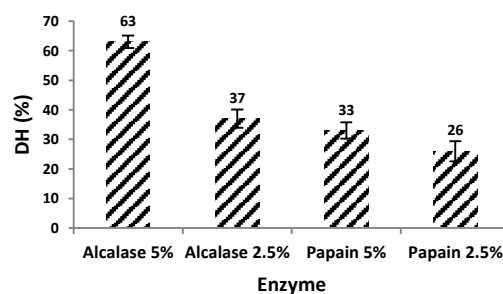
تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایشها در سه تکرار انجام و نتایج ثبت گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و برای مقایسه‌ی میانگین‌ها از آزمون آماری دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. میانگین مقادیر و انحراف معیار در نرم افزار اکسل محاسبه شد. از نرم افزار آماری SAS نسخه ۹ برای آنالیز داده‌ها و از نرم افزار اکسل برای رسم نمودارها استفاده گردید.

نتایج و بحث

درجه‌ی هیدرولیز

هیدرولیز عضله، با آنزیم آلكالاز ۵ درصد سبب بیشترین درجه هیدرولیز (۶۳٪) گردید و به طور کلی غلظت ۵ درصد آنزیم‌ها نسبت به غلظت ۲/۵ درصد درجه هیدرولیز بیشتری را داشته است (شکل ۱).

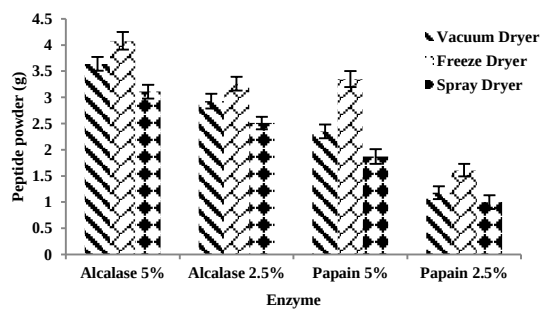


شکل ۱- درجه هیدرولیز عضله در مجاورت غلظت های

مختلف آنزیم

Figure 1- Degree of muscle hydrolysis in the vicinity of different concentrations of enzyme

این امر نشانگر هیدرولیز پروتئین‌های عضله به پپتیدهای با اندازه‌های مختلف است. بیشترین میزان هیدرولیز مربوطه به ۱۵ دقیقه اول هیدرولیز بوده که نشان می‌دهد بیشترین میزان پیوندهای پپتیدی شکسته شده‌اند (نیکو و



شکل ۲- مقادیر پودر پپتید بدست آمده در روش‌های مختلف

Figure 2- Peptide powder values obtained in different methods

بیشترین میزان پروتئین پودر پپتید با روش لوری $0.93/93 \pm 0.0$ میکروگرم بر میلی لیتر مربوط به هیدرولیز با آنزیم پاپائین ۲/۵ درصد در مدت ۱۸۰ دقیقه با روش خشک کن سرمایشی و کمترین میزان پروتئین پودر پپتید $0.49/32 \pm 0.0$ میکروگرم بر میلی لیتر مربوط به روش خشک کن پاششی در حضور آنزیم آلکالاز ۵ درصد در زمان ۱۸۰ دقیقه بدست آمد. در کلیه گروه‌ها بیشترین مقادیر مربوط به روش خشک کن سرمایشی و کمترین مقادیر مربوط به روش خشک کن پاششی بود (شکل ۳). از آنجائیکه در این روش ابتدا در یک محیط قلیایی، پروتئین با سولفات مس و تارتارات واکنش داده و کمپلکسی را با چهار پیوند پپتیدی تشکیل می‌دهد. در نتیجه چنانچه پپتیدی با کمتر از چهار اسید موجود باشد توسط روش لوری واکنش نشان نمی‌دهد و نهایتاً میزان پروتئین در نمونه کمتر قرائت خواهد شد. کم بودن میزان پروتئین احتمالاً، نشانگر شکستن بیشتر پیوندهای پپتیدی با گذشت زمان هیدرولیز و تولید بیشتر اسیدهای آمینه آزاد باشد (کاسانکالا و همکاران، ۲۰۱۲). کمترین میزان پروتئین در نمونه‌های مورد مطالعه مربوط به هیدرولیز عضله در حضور آنزیم آلکالاز ۵٪ در زمان ۱۸۰ دقیقه با استفاده از روش خشک کن پاششی بود (کاسانکالا و همکاران، ۲۰۱۲).

معنی‌داری نشان داد ($p < 0.01$). اثر متقابل سه گانه آنزیم × زمان × روش خشک کردن بر روی پروتئین پودر پپتید، DPPH، Nitric Oxide و Thiol در سطح یک درصد اختلاف آماری معنی دار نشان داد ($p < 0.01$). نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل سه گانه غلظت × زمان × روش خشک کردن بر روی میزان پروتئین پودر پپتید، DPPH، TAC، Nitric Oxide و Thiol در سطح یک درصد اختلاف آماری معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.01$). نهایتاً نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل چهار گانه آنزیم × غلظت × زمان × روش خشک کردن بر روی همه متغیرهای مورد مطالعه در سطح یک درصد اختلاف آماری معنی داری وجود داشته است ($p < 0.01$).

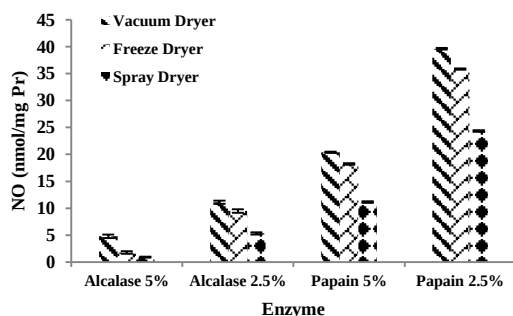
بر مبنای آنالیز واریانس، نتایج میزان پودر پپتیدهای بدست آمده در هر کدام از گروه‌های، غلظت آنزیمی پاپائین ۲/۵٪، پاپائین ۵٪، آلکالاز ۲/۵٪ و آلکالاز ۵٪، اختلاف معنی داری بین گروه‌های مختلف مشاهده شد. این امر موید تاثیر متفاوت اثر آنزیم‌ها بر مبنای نوع، زمان و غلظت مورد استفاده در هیدرولیز سوبسترا است.

بیشترین میزان پودر هیدرولیز عضله $4/08 \pm 0.244$ گرم، از هیدرولیز عضله در حضور آنزیم آلکالاز ۵ درصد در زمان ۱۸۰ دقیقه و روش خشک کردن فریز درایر یا خشک کن سرمایشی حاصل شد. با توجه به روش تهیه و خشک کردن محصول بوسیله دستگاه خشک کن سرمایشی این اختلاف وزن را می‌توان به وجود میزان کمی رطوبت در محصول نسبت به روش‌های دیگر ارتباط داد. کمترین مقدار پودر پپتید $1/00 \pm 0.097$ گرم در روش خشک کن پاششی و در حضور آنزیم پاپائین ۲/۵ درصد در زمان ۱۸۰ دقیقه بدست آمد (شکل ۲).

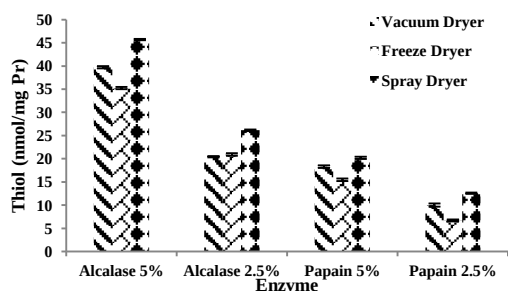
بطور کل محصول بدست آمده با روش خشک کن سرمایشی در کلیه گروه‌های مورد مطالعه دارای بیشترین وزن و در روش خشک کن پاششی بدلیل هدر رفت بخشی از محصول در قسمت‌های مختلف دستگاه کمترین مقادیر را بخود اختصاص دادند.

خشک کن پاششی و کمترین میزان فعالیت 0.27 ± 0.15 نانومول در میلی گرم پروتئین در هیدرولیزات بدست آمده از فعالیت آنزیم پاپائین ۲/۵٪ در زمان ۱۸۰ دقیقه در شرایط خلاء مشاهده شد. در کلیه گروه‌ها مقادیر بدست آمده با روش خشک کن خلاء بیشترین و روش خشک کن پاششی کمترین مقادیر را به خود اختصاص دادند (شکل ۵).

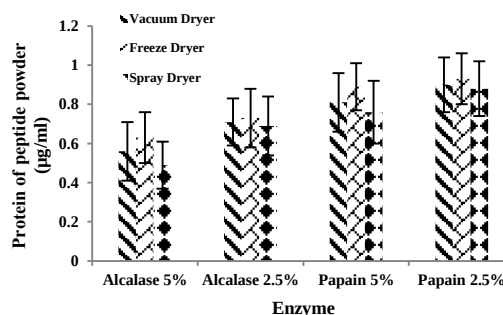
در اندازه گیری میزان گروه تیول پپتیدها، بیشترین میزان در هیدرولیزات در حضور آنزیم آلکالاز ۵٪ در زمان ۱۸۰ دقیقه و روش خشک کن پاششی به میزان 41.71 ± 0.138 نانومول در میلی گرم پروتئین و کمترین میزان گروه تیول در پپتیدهای بدست آمده از هیدرولیزات در حضور آنزیم پاپائین ۲/۵٪ در زمان ۱۸۰ دقیقه و روش خشک کن سرمایشی به میزان 6.73 ± 0.121 نانومول در میلی گرم پروتئین است. در کلیه گروه‌های مورد مطالعه بیشترین مقادیر در روش خشک کردن بوسیله خشک کن پاششی و کمترین مقادیر در روش خشک کردن به روش خشک کن سرمایشی رویت گردید.



شکل ۵- مقادیر فعالیت آنتی اکسیدانی در مهار رادیکال NO
Figure 5- Chart of antioxidant activity values in NO radical scavenging



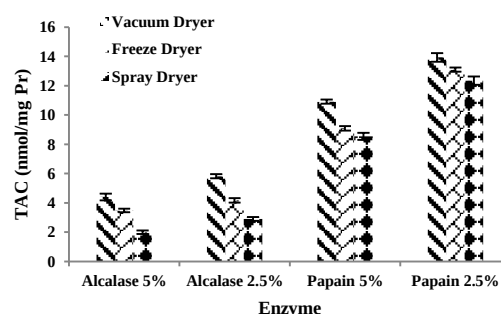
شکل ۶- مقادیر گروه‌های تیول پپتیدهای استخراج شده
Figure 6- Values of extracted thiol peptide groups



شکل ۳- مقادیر پروتئین پودر پپتید

Figure 3- Protein values of peptide powder

در بررسی مقادیر فعالیت آنتی اکسیدانی تام (TAC) کمترین مقادیر $ABTS^+$ به میزان $1.0 \pm 0.99/0.97$ نانومول در میلی گرم پروتئین مربوط به پپتیدهای بدست آمده از هیدرولیز عضله سفید در حضور آنزیم آلکالاز ۵٪ در زمان ۱۸۰ دقیقه و روش خشک کن پاششی و بیشترین میزان $ABTS^+$ به میزان 13.90 ± 0.170 نانومول در میلی گرم پروتئین مربوط به هیدرولیزات بدست آمده از هضم در حضور آنزیم پاپائین ۲/۵٪ در زمان ۱۸۰ دقیقه در شرایط خلاء بدست آمد. در تمامی گروه‌ها بیشترین مقادیر مربوط به روش خشک کردن با روش خشک کن پاششی بود (شکل ۴).



شکل ۴- مقادیر فعالیت آنتی اکسیدانی تام

Figure 4- Graph of total antioxidant activity values

در مطالعه فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدها، بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در مهار رادیکال NO به میزان $0.0 \pm 0.4/1.68$ نانومول در میلی گرم پروتئین در هیدرولیز بدست آمده از فعالیت آنزیم آلکالاز ۵٪ در زمان ۱۸۰ دقیقه با روش

۵/۰±۲۷/۱۷۵ نانومول در میلی گرم پروتئین مربوط به هیدرولیزات بدست آمده از فعالیت آنزیم پاپائین ۲/۵٪ در زمان ۱۸۰ دقیقه در شرایط خشک کن خلاء مشاهده گردید. در کلیه گروه‌های مورد مطالعه کمترین مقادیر در روش خشک کن پاششی و بیشترین مقادیر در روش خشک کن خلاء مشاهده شد (شکل ۷).

پس از بررسی نتایج فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال بدست آمده در مهار رادیکال DPPH بیشترین میزان فعالیت ۰/۴±۰/۱۶۸ نانومول در میلی گرم پروتئین مربوط به هیدرولیزات بدست آمده از فعالیت هضمی آنزیم آلکالاز ۵٪ در زمان ۱۸۰ دقیقه و روش خشک کردن خشک کن پاششی مشاهده گردید. کمترین میزان فعالیت به میزان

جدول ۱- تجزیه واریانس متغیرهای مورد مطالعه

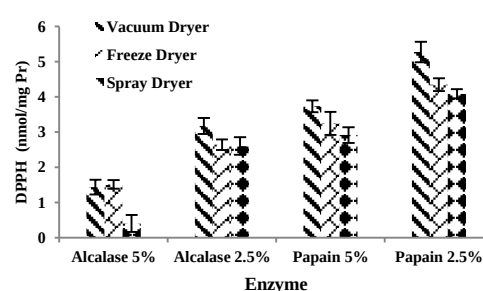
Table 1- Analysis of variance of the studied variables

S.O.V	df	Mean square					
		peptide powder	protein peptide powder	TAC	DPPH	Nitric Oxide	Thiol
Enzyme	1	18.50**	4.78**	272.36**	109.86**	1637.41**	2028.80**
Concentration	1	16.52**	2.23**	73.85**	1.86ns	99.84ns	222.05**
Time	2	17.33**	3.16**	594.21**	93.39**	3223.08**	2554.16**
Drying method	2	4.30**	1.38**	302.57**	44.37**	3226.53**	1485.70**
Enzyme × concentration	1	2.84**	0.04ns	20.35ns	0.85ns	64.14ns	417.01**
Enzyme × time	2	2.64**	0.25**	50.09*	5.70*	321.68**	374.23**
Enzyme × drying method	2	0.03ns	0.04ns	14.98ns	2.72ns	485.07**	49.96**
Concentration × time	2	1.00**	0.21**	15.99ns	0.80ns	10.40ns	22.81**
Concentration × drying method	2	3.46**	0.13**	23.08ns	8.56ns	66.11ns	70.86**
Time × Drying method	4	1.53**	0.23**	29.17ns	26.89**	432.45**	10.49**
Enzyme × concentration × time	2	0.10ns	0.12**	8.30ns	5.79*	313.37*	208.76**
Enzyme × concentration × drying method	2	0.46ns	0.01ns	16.93ns	1.45ns	45.69ns	75.01**
Enzyme × time × drying method	4	0.37ns	0.15**	13.37ns	20.92**	189.95*	45.19**
Concentration × time × drying method	4	0.13ns	0.16**	31.37*	9.52**	168.52**	169.59**
Enzyme × concentration × time × drying method	4	0.59*	0.09*	82.40*	7.26**	271.78**	83.32**
Error	72	0.21	0.02	11.99	1.75	65.50	4.10

ns: non-significant *: significant difference at P<0.05 **: significant difference at P<0.01

مهار رادیکال‌های آزاد یا حذف اکسیژن و سایر مکانیسم‌ها کردند. ترکیبات آنتی اکسیدانی که در این تعریف می‌گنجند شامل مهار کننده های رادیکال‌های آزاد، غیر فعال کننده‌های پراکسیدها و دیگر گونه‌های واکنشی اکسیژنی، شلاته کننده‌های یون‌های فلزی و مهار کننده‌های ترکیبات ثانویه اکسایش چربی هستند.

. مطالعات پیشین نشان داد که پپتیدهای جداسازی شده از پروتئین‌های آبزیان فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌ملاحظه‌ای را در محیط برون تنی و سامانه‌های غذایی نشان داده‌اند (نیکو و همکاران، ۲۰۱۴؛ نگو و همکاران، ۲۰۱۰؛ ژنگ و همکاران، ۲۰۱۸). چن و همکاران (۱۹۹۶) بیان کردند که وزن مولکولی پروتئین هیدرولیز



شکل ۷- مقادیر فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدها در مهار

رادیکال DPPH

Figure 7- Peptide antioxidant activity levels in DPPH radical inhibition

آنتی اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که زمانی که در مقادیر کم در مقایسه با سوبسترای اکسید شونده بکار برده می‌شوند، بطور معنی‌داری سبب تاخیر یا کاهش اکسایش با

¹ Free radical scavengers

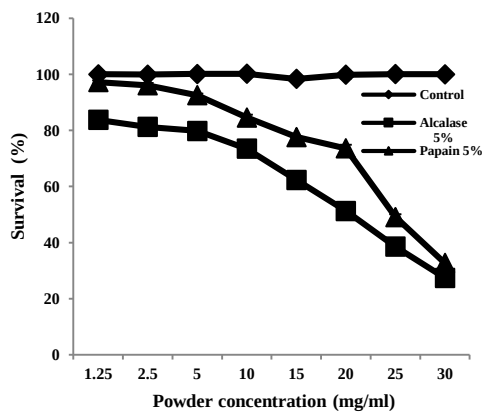
است. در کلیه گروه‌های مورد مطالعه، پپتیدهای خشک شده با روش خشک کن پاششی حاوی بیشترین فعالیت جاروکنندگی نیتریک اکساید در مقایسه با سایر روش‌ها بودند که در بهینه سازی فرایند تولید پپتیدهای زیست فعال استفاده از این روش را توصیه می‌نماید. روش خشک‌کن پاششی یکی از انواع روش‌های ریزپوشانی عملیات متداول در تبدیل مواد مایع به پودر و به منظور تسهیل انبارداری، حمل و نقل می‌باشد (اکبر بگلو و همکاران، ۱۳۹۹).

جی و همکاران (۲۰۰۷) به منظور استخراج و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال از پروتئین اسکلت ماهی Hoki، از شش آنزیم آلکالاز آ، پاپائین، تریپسین، پپسین، (پروتئاز Chymotrypsin Neutrase) استفاده نمودند و سپس فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها را با استفاده از روش مهارکنندگی رادیکال DPPH تعیین کردند. از آنجائیکه رادیکال‌های DPPH با اتصال به عوامل آنتی‌اکسیدانی پپتیدها از بنفش پررنگ به زرد کم رنگ در می‌آیند، میزان جذب رنگ DPPH را بسته به قدرت فعالیت آنتی‌اکسیدان کاهش می‌دهد. در این مطالعه بیشترین میزان فعالیت در هیدرولیزات تولید شده از آنزیم آلکالاز ۵٪ در زمان ۱۸۰ دقیقه با روش خشک کن پاششی به میزان 168 ± 0.4 nmol/mg Pr مشاهده گردیده است. در نتایج بدست آمده از مطالعه‌ای که بر روی پپتیدهای تخلیص شده از سر ماهی هوور مسقطی انجام شده، فعالیت مهارکنندگی خوبی را در مهار رادیکال DPPH از نظر فعالیت آنتی-اکسیدانی گزارش شده است (اسماعیلی و همکاران، ۲۰۱۸).

اندازه‌گیری میزان تیول و قدرت احیایی آنها سطح استرس اکسیداتیو را در نمونه نشان می‌دهد. در بررسی میزان تیول کل در پپتیدهای زیست فعال بدست آمده از هیدرولیزات عضله سفید ماهی مرکب ببری بالاترین میزان گروه تیول مربوط به هیدرولیزات بدست آمده از هضم با آنزیم آلکالاز ۵٪ در زمان ۱۸۰ دقیقه و با شرایط

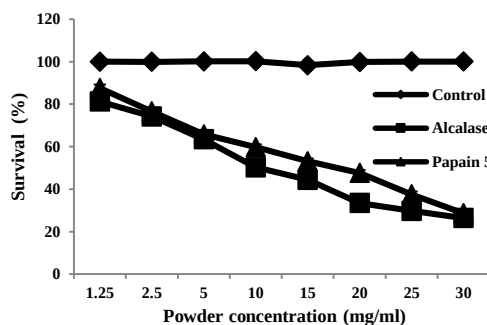
شده ماهی هیک اقیانوس آرام و فراکشن‌های آن بر فعالیت حذف کنندگی رادیکال‌های ABTS اثرگذار بود. از دیگر مواد پروتئینی که در زمینه پزشکی و داروسازی استفاده می‌گردد، می‌توان به کیتین و کیتوزان اشاره نمود (جعفری و جوادی، ۱۳۹۹).

در سنجش فعالیت آنتی اکسیدانتی کل، کاهش جذب $ABTS^{+}$ نشان دهنده فعالیت بالاتر آنتی اکسیدانی است. بهترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانت تام در پپتیدهای تهیه شده در هیدرولیزات تولید شده با آلکالاز ۵٪ در زمان ۱۸۰ دقیقه و با روش خشک کن پاششی به میزان 99.09 ± 1.0 nmol/mg Pr مشاهده گردید. همچنین، نمونه‌های خشک کن پاششی نسبت به سایر نمونه‌ها، دارای فعالیت آنتای اکسیدانی تام بالاتری بودند. انواع اکسیدانت‌ها نظیر گونه‌های فعال نیتروژن (RNS) و گونه های فعال اکسیژن (ROS) با همکاری یکدیگر باعث آسیب به سلول می‌گردند. RNS از مولکول‌ها است که از نیتریک اکساید (NO) و آنیون سوپراکسید (O_2^{-}) که به ترتیب توسط آنزیم‌های نیتریک اکسید سنتاز (NOS) و NADPH اکسیداز تولید می‌شوند، مشتق می‌شود. در این مطالعه از سنجش نیتريت استفاده گردیده است، که در آن میزان نیتريت (NO_2^{-}) که یکی از دو فرآورده NO است، مورد سنجش قرار می‌گیرد. بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانتی در مهار NO در هیدرولیزات بدست آمده از هیدرولیز عضله در حضور آنزیم آلکالاز ۵٪ در زمان ۱۸۰ دقیقه و روش خشک کردن خشک کن پاششی به میزان 125.0 ± 0.95 Pr حاصل شد. با توجه به اینکه برای بررسی فعالیت آنتی اکسیدانتی پپتیدهای زیست فعال در این تست از خاصیت جاروکنندگی (scavenging activity) نیتریک اکساید (NO) توسط مواد آنتی اکسیدانت موجود در پودر بدست آمده استفاده شده و جمع کننده‌های نیتریک اکساید با اکسیژن بصورت رقابتی عمل کرده و منجر به کاهش تولید نیتريت و نیترات می‌گردند لذا کمترین میزان نیتريت و نیترات قرائت شده در نمونه‌ها حاکی از بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانتی پپتیدها بوده



شکل ۹- درصد زنده ماندن پروماستیگوت‌های انگل *لیشمانیا ماژور* در غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم‌های آلكالاز و پاپائین ۵ درصد با روش خشک کن سرمایشی بعد از ۲۴ ساعت

Figure 9- Survival percentage of *Leishmania major* promastigotes in different concentrations of protein hydrolyzed with 5% Alkalase and papain enzymes using freeze- dryer method after 24 hours



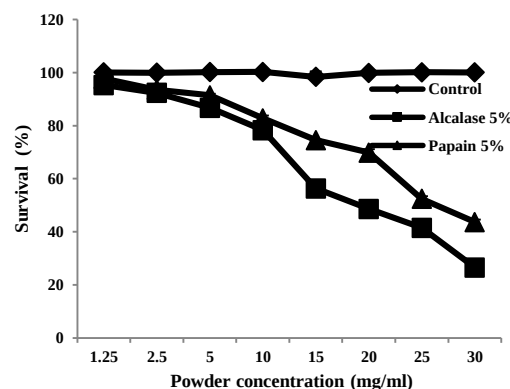
شکل ۱۰- درصد زنده ماندن پروماستیگوت‌های انگل *لیشمانیا ماژور* در غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم‌های آلكالاز و پاپائین ۵ درصد با روش خشک کن خلاء بعد از ۲۴ ساعت

Figure 10- Survival percentage of *Leishmania major* promastigotes in different concentrations of protein hydrolyzed with 5% Alkalase and papain enzymes using vacuum- dryer method after 24 hours

بهترین توانایی سمیت سلولی بر پروماستیگوت‌های انگل *لیشمانیا ماژور* در پپتیدهای زیست فعال بدست آمده از هیدرولیز در حضور آنزیم آلكالاز ۵ درصد با شرایط خشک کن پاششی در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده گردید. این غلظت حاوی ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر پپتید زیست فعال بود. نتایج حاکی از اثر کشندگی

خشک کردن پاششی به میزان $Pr = 45.0 \pm 71.08$ nmol/mg بود. همچنین در کلیه گروه‌های مورد مطالعه میزان گروه تیولی در هیدرولیزات تهیه شده با روش خشک کن پاششی نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بود.

در مطالعه خاصیت سمیت سلولی پپتیدهای زیست فعال بر پروماستیگوت‌های انگل *لیشمانیا ماژور* با روش MTT، نتایج IC_{50} برای پپتیدهای بدست آمده از اثر آنزیم آلكالاز ۵٪ و پاپائین ۵٪ در روش خشک کن پاششی با گذشت ۲۴ ساعت به ترتیب برابر با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر و ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر (شکل ۸) و در مورد پپتیدهای زیست فعال تهیه شده در روش خشک کن سرمایشی، به ترتیب ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر و ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر (شکل ۹) و در مورد پپتیدهای تهیه شده با روش خشک کن خلاء به ترتیب ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر و ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر (شکل ۱۰) مشاهده گردیده است.



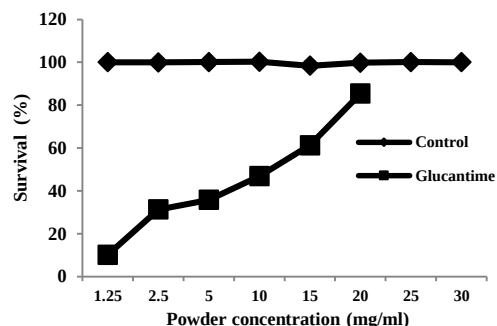
شکل ۸- درصد زنده ماندن پروماستیگوت‌های انگل *لیشمانیا ماژور* در غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم‌های آلكالاز و پاپائین ۵ درصد با روش خشک کن پاششی بعد از ۲۴ ساعت

Figure 8- Survival percentage of *Leishmania major* promastigotes in different concentrations of protein hydrolyzed with 5% Alkalase and papain enzymes using spray- dryer method after 24 hours

قرار دهیم. هیدرولیز آنزیمی از روشهای روزمره در تولید پپتیدهای زیست فعال است. هیدرولیز آنزیمی امروزه بوسیله پروتئازهای تجاری و همچنین فرآیندهای اتولیز صورت می‌گیرد. در حال حاضر پروتئازهای گوناگونی از منابع گیاهی، جانوری و میکروبی شامل تریپسین، کموتریپسین، پپسین، آکالاز، پاپائین، پروناز، کلاژناز و بروملئین در تولید پپتیدهای زیست فعال مورد استفاده قرار می‌گیرند و نوع آنزیمی که در هیدرولیز استفاده می‌شود بسیار مهم است، چرا که آنزیم‌ها هستند که الگوی شکستن باندهای پپتیدی را تعیین و کارکرد آنها را متفاوت می‌کنند. عملکردهای تخصصی پروتئازها اندازه، نوع و ترکیب اسید آمینه‌ای پپتیدها و در نتیجه فعالیت زیستی آن‌ها را تعیین می‌کنند (نیکو و همکاران، ۱۳۹۲).

اثر ضد انگلی پروتئین هیدرولیز ماهی مرکب ببری بر پروماستیگوت‌های انگل *لشمانیا ماژور* و مقایسه قدرت سمیت سلولی بر سلول انگل مورد بررسی قرار گرفت. اساس روش MTT مبتنی بر فعالیت میتوکندری در سلول زنده است. فعالیت میتوکندریایی در سلول‌های زنده به صورت پایدار است و بنابراین افزایش یا کاهش تعداد سلول‌های زنده به صورت خطی با فعالیت میتوکندری در ارتباط است. در بررسی نتایج کشت ۲۴ ساعته و آزمون MTT بعمل آمده بهترین IC_{50} در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر پپتیدهای بدست آمده از هیدرولیز عضله سفید در حضور آنزیم آکالاز ۵ درصد بود. با توجه به اینکه در تمامی گروه‌های مورد مطالعه پروتئین هیدرولیز بدست آمده از هیدرولیز عضله ماهی مرکب ببری دارای خاصیت سمیت سلولی بر پروماستیگوت‌های انگل *لشمانیا ماژور* بودند ولی هیدرولیزات بدست آمده از فعالیت آنزیم ۵٪ در غلظت کمتری نسبت به سایر نمونه‌های پروتئین هیدرولیز توانایی کشتن پروماستیگوت‌های انگل را داشته است. نتایج نشان داد که میزان زنده‌مانی پروماستیگوت‌های انگل با افزایش غلظت پپتیدها کاهش می‌یابد. در مطالعه همانین و همکاران (۲۰۰۵) نیز

پپتیدهای بدست آمده از عضله ماهی مرکب بر روی پروماستیگوت‌های انگل *لشمانیا ماژور* بود.



شکل ۱۱- درصد زنده ماندن پروماستیگوت‌های انگل *لشمانیا ماژور* در غلظت‌های مختلف داروی گلوکانتیم بعنوان کنترل مثبت، بعد از ۲۴ ساعت

Figure 11- Survival percentage of *Leishmania major* promastigotes in different concentrations of glucantime as a positive control after 24 hours

امروزه برای کم کردن یا حذف اثرات داروهای مورد استفاده در درمان فرم جلدی *لشمانیا* (CL) و جلوگیری از عوارض آنها، در جهت روش‌های جایگزین، یا کم کردن عوارض جانبی تلاش می‌نمایند. در سالهای اخیر استفاده از پروتئین‌های آبکافت شده طبیعی که به نام پپتیدهای پروتئین آبکافته (Hydrolysate protien) یا زیست فعال (Bioactive peptides) معروف هستند توجه پژوهشگران را بخود جلب نموده است. پپتیدهای زیست فعال اولین بار در سال ۱۹۵۰ توسط ملاندر گزارش شد، و به عنوان ترکیباتی غذایی که از پروتئین‌ها بدست آمده اند تعریف می‌شوند، این مواد علاوه بر نقش‌های تغذیه‌ای در واکنش‌های فیزیولوژیک هم نقش بسزایی دارند پپتیدهای زیست فعال با وزن مولکولی ۲۰۰ تا ۱۸۰۰ دالتون و دارای ۲ تا ۲۰ اسید آمینه هستند و بر اساس موقعیت قرارگیری این اسیدهای آمینه ویژگی‌های خاصی را کسب می‌نمایند (نیکو و همکاران، ۱۳۹۲). گزارش‌های مختلفی از خواص آنتی‌اکسیدانی در پپتیدهای جدا شده از زرده‌ی تخم مرغ، آبکافته سویا، ماهی ماکرل، پروتئین آب پنیر، وجود دارد. می‌توان این خواص را با آنالیز پارامترهایی نظیر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل مورد بررسی

توسط شواگنسی و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد، نشان داد که این ترکیبات زیست فعال موجب اختلال در غشای لیزوزوم و در نتیجه تشکیل واکوئل‌های بزرگ می‌گردد. این مکانیزم در میان عوامل سمی منحصر به فرد است و ممکن است موجب افزایش اسیدیته فضای داخل سلولی، که یک اثر تحریکی جهت آغاز شدن یک مسیر برای آپوپتوز است گردد. از این رو قابلیت سمی پپتیدهای زیست فعال بر روی رده‌های مختلف سلول‌های انسانی و جانوری سرطانی و یا تروفوزوایت یا اشکال واسطه انگل‌های تک سلولی مورد تأیید است.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که پروتئین هیدرولیز عضله سفید ماهی مرکب ببری تولید شده با آنزیم آلکالاز ۵٪ دارای خاصیت سمی بر پروماستیگوت‌های انگل *لشمانیا* ماثور بوده و این اثر در هیدرولیزات تهیه شده با روش خشک کن پاششی دارای فعالیت قوی تری نسبت به سایر روش‌ها بوده است.

الیسیدپسین (Elsidpesin) که یک پپتید حلقوی جدید دریایی متعلق به ترکیبات خانواده Kahalalide است، کشف شد که این ترکیب، یک دپسی پپتید در جانور نرم تن دریایی *Elysia rufescens*، یافت شده در هاوایی است که یک فعالیت سیتوتوکسیسیته قوی را در شرایط برون تنی در برابر انواع سلول‌های تومور انسانی نشان داده است. هرچند تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که پپتیدها و پروتئین‌های هیدرولیز شده با حذف کردن رادیکال‌های آزاد و شلاته کردن یون‌های فلزی از اکسیداسیون آنزیمی و غیر آنزیمی ممانعت می‌کنند (اسماعیلی و همکاران، ۲۰۱۸). پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی همانند گلوتاتیون و کارنوزین که به طور طبیعی در بافت عضله حضور دارند با دادن الکترون، شلاته کردن یون‌های فلزی و محدود ساختن اکسیداسیون لیپیدها عمل می‌کنند. بعلاوه گزارش شده است که پپتیدهای زیست‌فعال بیان ژن‌های مرتبط با آنتی‌اکسیدان‌های درون‌زای غیر آنزیمی همانند همواکسیژناز و فریتین را افزایش می‌دهند (لوبو و همکاران، ۲۰۱۰). مطالعات دیگری برای تعیین مکانیسم عمل (Kahalalide (marine-derived cyclic depsipeptide که

منابع مورد استفاده

- ابکا خواجهی ر، کرامت ج و همدی ن، ۱۳۹۸. بهینه‌سازی شرایط استخراج آلژینات سدیم از جلبک قهوه‌ای ایرانی به روش سطح پاسخ. پژوهش‌های صنایع غذایی، شماره ۲۹، صفحه ۲۸-۱۳.
- اکبربگلو ز، پیغمبردوست س ه، اولادغفاری ع و سرابندی خ، ۱۳۹۷. اثر دمای هوای ورودی، نوع و غلظت ماده حامل بر ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و ضداکسایشی عصاره مرزنجوش ریزپوشانی شده با خشک کن پاششی. پژوهش‌های صنایع غذایی، شماره ۲۸، صفحه ۳۰-۱۵.
- جعفری ف و جوادی ا، ۱۳۹۹. اثر پوشش‌دهی با کیتوزان و عصاره برگ گردو در ماندگاری پسته. پژوهش‌های صنایع غذایی، شماره ۳۰، صفحه ۲۳۲-۲۲۱.
- زندى ك، فرسنگى م، نبى پور ح و سلیمانی س م، ۲۰۰۴. شناسائی، استخراج و تخلیص پروتئین ۶۰ کیلو دالتونی ماده بنفش رنگ ترشحه از خرگوش دریایی خلیج فارس *Aplysia dactylomela* با اثرات ضدسرطانی. دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، طب جنوب، شماره ۶، صفحه ۹۷-۱۰۳.
- نیکو م ع، ماهونک ع، قربانی ص، طاهری م، اعلمی ع و کمالی م، ۱۳۹۲. بررسی اثر شرایط هیدرولیز بر فعالیت ضداکسایشی پروتئین هیدرولیز شده از ماهی کاراس (*Carassius carassius*). نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، شماره ۴، صفحه ۳۵۱-۳۶۴.

- Alder-Nissen J, 1986. Enzymic hydrolysis of food proteins. NY. Elsevier applied science publisher. pp. 110-169.
- AOAC, 2005. Official Method of Analysis (17th Ed). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Chalamaiah M, Kumar B D, Hemalatha T and Jyothirmay T, 2012. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. Food Chemistry 135 (4): 3020-3038.
- Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F and Nokihara K, 1996. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. Journal of agricultural and food chemistry 44 (9): 2619-2623.
- Esmaeili Kharyeki M, Rezaei M, Khodabandeh S and Motamedzadegan A, 2018. Antioxidant Activity of Protein Hydrolysate in Skipjack tuna Head. Fisheries Science and Technology 7 (1): 57-64.
- FAO/WHO, 1991. Protein quality evaluation. (Report of Joint FAO/ WHO Expert Consultation. FAO Food and Nutrition Paper 51). FAO/WHO, Rome, Italy.
- Hermann B, Kehrer T, Bauer L and Wenz F, 2005. Intraoperative radiotherapy (IORT) for breast cancer using the intrabeam™ system. Tumori Journal 91 (4): 339-345.
- Je JY, Qian ZJ, Byun HG and Kim SK, 2007. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. Process Biochemistry 42 (5): 840-846
- Karami Z and Akbari-adergani B, 2019. Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. Journal of Food Science and Technology 56 (2): 535-547.
- Kasankala L M, Xiong Y L and Chen J, 2012. Enzymatic activity and flavor compound production in fermented silver carp fish paste inoculated with douchi starter culture. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60 (1): 226-233.
- Kurutas EB, 2015. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. Nutrition journal 15(1): 1-22.
- Lobo V, Patil A, Phatak A and Chandra N, 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy reviews 4 (8): 118.
- Lowry OH, Rosebrough Farr NJ and Randall RJ, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry 193: 265-275.
- Ngo DH, Qian ZJ, Ryu B M, Part J W and Kim S K, 2010. In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. Journal of Functional Foods 2:107-117.
- Nikoo M, Benjakul S, Ehsani A, Li J, Wu F, Yang N and Xu X, 2014. Antioxidant and cryoprotective effects of a tetrapeptide isolated from Amur sturgeon skin gelatin. Journal of Functional Foods 7: 609-620.
- Nikoo M, Benjakul S, Yasemi M, Ahmadi Gavlighi H and Xu X, 2019. Hydrolysates from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processing by-product with different pretreatments: Antioxidant activity and their effect on lipid and protein oxidation of raw fish emulsion. LWT-Food Science and Technology 108: 120-128.
- Senphan T and Benjakul S, 2014. Antioxidative activities of hydrolysates from seabass skin prepared using protease from hepatopancreas of Pacific white shrimp. Journal of Functional Foods 6: 147-156.
- Shahidi F, Zhong H J and Ambigaipalan P, 2005. Antioxidants: regulatory status. Bailey's industrial oil and fat products 1-21.
- Shaughnessy L M, Hoppe AD, Christensen K A and Swanson JA, 2006. Membrane perforations inhibit lysosome fusion by altering pH and calcium in *Listeria monocytogenes* vacuoles. Cellular microbiology 8(5): 781-792.
- Zheng L, Yu H, Wei H, Xing Q, Zou Y, Zhou Y and Peng J, 2018. Antioxidative peptides of hydrolysate prepared from fish skin gelatin using ginger protease activate antioxidant response element-mediated gene transcription in IPEC-J2 cells. Journal of Functional Foods 51: 104-112.



Journal of Food Research, 2022,32(1):pp 61-77
<https://foodresearch.tabrizu.ac.ir>

OPEN ACCESS

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
 This is an open access article under the CC BY NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>)
 DOI: 10.22034/FR.2021.42967.1777

Comparison of cytotoxicity of bioactive peptides extracted from tiger squid muscle by three methods of freeze-drying, spray-drying, and vacuum-drying on *Leishmania major* promastigotes

F Farhangpazhouh^{1*}, M H Razi Jalali², A Alborzi³, S Bahrami³ and M Nikoo⁴

Received: November 22, 2020

Accepted: December 7, 2020

¹PhD student in Parasitology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz

²Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz

³Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz

⁴Assistant Professor, Department of Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University

*Corresponding author: f.farhangpajuh@gmail.com

Background: *Leishmaniasis* is one of the intracellular parasitic diseases that is known as the most common infectious disease after AIDS, tuberculosis and malaria. *Leishmaniasis* is among the 6 most prevalent endemic diseases and is in fact a tropical and subtropical disease caused by intracellular parasites worldwide. In recent years, treatment of *leishmaniasis* has been associated with risks due to drug resistance and problems related to the side effects of conventional drugs. The disease is found on all continents except Oceania and is endemic to enclosed areas in North Africa, southern Europe, the Middle East, southeastern Mexico, and Central and South America. The aim of this study was to investigate the cytotoxic effect of bioactive peptides obtained from hydrolysis of tiger squid muscle on promastigotes of *Leishmania major*.

Materials and methods: The variables of enzyme type, ratio of enzyme concentration to substrate, time of hydrolysis and drying method were studied on the characteristics of hydrolysis protein. After determining the percentage of white muscle protein of squid caught from Bushehr port, alkalase and papain enzymes were used at 5% levels for 180 minutes for hydrolysis. Production percentage, protein peptide powder, total antioxidant capacity (TAC), radical scavenging activity of DPPH, nitric oxide (NO) and total thiol groups were measured. Also, the cytotoxicity of *Leishmania major* promastigotes was evaluated using MTT method. Glucantime was used as a positive control and the untreated group was used as a negative control.

Results and discussion: Muscle hydrolysis with 5% Alkalase enzyme caused the highest degree of hydrolysis (63%) and in general, the concentration of 5% of enzymes had a higher degree of hydrolysis than the concentration of 2.5%. Analysis of variance showed that the effect of enzyme, drying time and drying method on all measured variables had a statistically significant difference at the level of one percent ($p < 0.01$). The effect of concentration on peptide dry powder, peptide protein, TAC and thiol was significant. However, no statistically significant difference was observed between enzyme concentrations in DPPH and Nitric Oxide. The dual interaction of enzyme $\times$ concentration

on the variables of dry powder of peptide and Thiol at the level of 1% showed a statistically significant difference ($p < 0.01$). However, the interaction of enzyme $\times$ concentration on other variables was not significant. The results showed that the dual interaction of enzyme $\times$ time on all studied variables showed a statistically significant difference. ($p < 0.01$). The dual interaction effect of enzyme $\times$ drying method was significant only on Nitric Oxide and Thiol variables ($p < 0.01$). Also, statistical results using analysis of variance showed that the dual interaction effect of concentration $\times$ time on the variables of dry peptide powder, peptide powder protein and Thiol had a statistically significant difference. ($p < 0.01$). The dual interaction effect of concentration $\times$ drying method on the variables of peptide dry powder, peptide powder protein, DPPH and Thiol was also significant ($p < 0.01$). Statistical results showed that the dual interaction of drying time $\times$ drying method on all studied variables except TAC showed a statistically significant difference ($p < 0.01$). The results of analysis of variance for the triple interactions of enzyme $\times$ concentration $\times$ time and enzyme $\times$ concentration $\times$ drying method showed statistically significant difference only on Thiol at the level of one percent ($p < 0.01$). The triple interaction effect of enzyme $\times$ time $\times$ drying method on protein peptide powder, DPPH, Nitric Oxide and Thiol showed a statistically significant difference at the level of one percent ($p < 0.01$). The results of analysis of variance showed a statistically significant difference ($p < 0.01$) with the triple interaction of concentration $\times$ time $\times$ drying method on the protein content of peptide powder, DPPH, TAC, Nitric Oxide and Thiol at the level of one percent. Finally, the results of analysis of variance showed that quadruple interaction effect of enzyme concentration $\times$ time $\times$ drying method on all studied variables had a statistically significant difference at the level of one percent ($p < 0.01$). The results of comparing the mean of the quadruple interaction effect of enzyme $\times$ concentration $\times$ time $\times$ drying method showed that the highest amount of peptide powder, the lowest protein content and the best antioxidant activity are obtained in TAC, DPPH, Nitric Oxide and Thiol using digestion method with the help of 5% Alkalase enzyme for 180 minutes using spray dryer method. The results showed that the degree of protein hydrolysis in muscle with alkalase enzyme was 5% higher than other enzymes studied. With the help of 5% alkalase enzyme in 180 minutes and using spray drying method, the lowest amount of protein in hydrolyzed powder, the best antioxidant activity was obtained in TAC, DPPH, Nitric Oxide, Thiol and the highest cytotoxicity. The highest amount of muscle hydrolysis powder was obtained in the presence of 5% alkalase enzyme in 180 minutes and cooling drying method.

Conclusion: MTT results showed that with increasing the concentration of peptide powder obtained from enzymatic hydrolysis of white tiger squid muscle, the mortality rate of *Leishmania major* promastigotes increased in all study groups. The best level of IC50 among the studied groups was observed at a concentration of 10 mg / ml of hydrolyzate from 5% alkalase enzyme by spray dryer compared to the control group. The results of this study showed that the hydrolysis protein of *Sepia pharaonis* white muscle produced with 5% Alkalase enzyme has cytotoxic effect on *Leishmania major* promastigotes and this effect has shown a stronger activity in hydrolysis prepared using spray drying method than other methods.

Keywords: Alkalase, Hydrolysis, *Leishmania major* parasite, Peptide, Promastigote, Tiger squid