



مقاله پژوهشی

ارزیابی اثرات ضداکسایشی و سیتوتوکسیک پپتیدهای به دست آمده از هیدرولیز آنزیمی و میکروبی عضله ماهی مید (*Liza klunzingeri*)

ثنا ربیعی^۱، مسعود رضایی^{۲*}، مهدی نیکو^۳، محمود رفیعیان کوپایی^۴

تاریخ پذیرش: مهر ۹۷

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۹۷

چکیده

استرس اکسیداتیو ناشی از عدم تعادل در وضعیت ردوکس بدن است که در ایجاد و پیشرفت بسیاری از بیماری‌ها انسان از جمله سرطان نقش اساسی دارد. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات ضداکسایشی و سیتوتوکسیک پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی و میکروبی عضله ماهی مید (*Liza klunzingeri*) بود. پروتئین عضله ماهی مید با روش هیدرولیز آنزیمی توسط آنزیم الکالاز و میکروبی توسط باکتری *Bacillus licheniformis* هیدرولیز شد. فعالیت ضداکسایشی نمونه‌های به دست آمده در مهار رادیکال‌های ABTS، DPPH و هیدروکسیل، کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی و شلاته‌کنندگی یون آهن دو ظرفیتی تعیین شد. علاوه بر این اثرات سیتوتوکسیک نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بر رده سلول سرطان سینه 4T1 با استفاده از آزمون MTT بررسی شد. محدوده وزن مولکولی پروتئین‌های به دست آمده از هیدرولیز توسط دستگاه HPLC تعیین شد. نمونه میکروبی در مقایسه با نمونه آنزیمی فعالیت ضداکسایشی بیشتری در مهار رادیکال‌های ABTS، شلاته‌کنندگی و کاهندگی یون آهن نشان داد ($P < 0.05$). فعالیت سیتوتوکسیک نمونه میکروبی نیز به طور معنی‌داری بیشتر از نمونه آنزیمی بود ($P < 0.05$). در پروتئین هیدرولیز آنزیمی، درصد پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از ۱۰۰۰ دالتون ۲۶/۱۵ درصد ولی در نمونه میکروبی ۷۵/۱۷ درصد بود. پروتئین هیدرولیز شده به روش میکروبی فعالیت ضداکسایشی و سیتوتوکسیک بیشتری در مقایسه با نمونه آنزیمی نشان داد که احتمالاً به دلیل حضور پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین بود.

واژگان کلیدی: ماهی مید، هیدرولیز آنزیمی، هیدرولیز میکروبی، فعالیت ضداکسایشی، فعالیت سیتوتوکسیک.

- ۱- دانشجوی دکتری فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.
 - ۲- استاد گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، مازنداران، نور، ایران.
 - ۳- استادیار گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده آرتیمیا و آبزی‌پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
 - ۴- استاد مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.
- * نویسنده مسئول: rezai_ma@modares.ac.ir

مقدمه

پیشرفت فرآیند سرطان‌زایی می‌شوند که شامل القای جهش‌های ژنی و اثرگذاری بر مسیرهای انتقال پیام و رونویسی است. زمانی که سلول دارای DNA آسیب دیده یا اکسید شده توسط رادیکال‌های آزاد، تقسیم می‌شود، متابولیسم و تکثیر آن بی‌نظم شده، جهش اتفاق می‌افتد که فاکتور مهمی در سرطان‌زایی است. علاوه بر این، محصولات پراکسیداسیون لیپیدها با یون‌های فلزی واکنش داده، ترکیبات فعال همانند اپوکسید و آلدئید را تولید می‌کنند که سبب ایجاد جهش در DNA سلول می‌شود (aAleman et al., 2011).

پژوهشگران ثابت کرده‌اند که رژیم غذایی روزانه افراد نقش مهمی در پیشگیری، بروز و درمان انواع سرطان‌ها ایفا می‌کند. مصرف غذاهای غنی از ضداکساینده‌های طبیعی از طریق مقابله با رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن، مانع توسعه و پیشرفت برخی از سرطان‌ها می‌شود (Sheih et al., 2010). در سال‌های اخیر پپتیدهای زیست‌فعال (۲) تا کمتر از ۲۰ اسید آمینه) به دلیل وزن مولکولی پایین، جذب راحت، فعالیت ضداکسایشی قابل ملاحظه، حساسیت‌زایی پایین و ثبات بالا تحت شرایط مختلف توجه پژوهشگران را به خود

در سیستم‌های زیستی رادیکال‌های آزاد به طور معمول از مولکول‌های اکسیژن، نیتروژن و گوگرد ایجاد می‌شوند. مهم‌ترین رادیکال‌های آزاد شامل گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS)^۱ و نیتروژن (RNS)^۲ است که به طور طبیعی از طریق مسیرهای مختلف متابولیسمی مانند متابولیسم هوازی در زنجیره تنفسی میتوکندری، تولید می‌شوند و نقش‌های فیزیولوژیکی متعددی همانند پیام‌رسانی سلول، القای آپوپتوز، تنظیم بیان ژن و انتقال یون‌ها را به عهده دارند (Sheih et al., 2010). با این حال تولید بیش از حد این ترکیبات تحت برخی شرایط، اثرات زیان‌آوری برای بسیاری از مولکول‌های حیاتی به دنبال دارد. رادیکال‌های ROS و RNS با اسیدهای نوکلئیک، زنجیره‌های جانبی اسید آمینه در پروتئین‌ها و پیوندهای دوگانه اسیدهای چرب غیراشباع واکنش داده، سبب آغاز و پیشرفت استرس اکسیداتیو می‌شوند که نقش مهمی در ایجاد بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان دارد (Nikoo et al., 2014). گونه‌های فعال اکسیژن از طریق دو مسیر احتمالی منجر به

1- Reactive Oxygen Species

2- Reactive Nitrogen Species

- جلب کرده‌اند (bAleman et al., 2011). پپتیدهای زیست‌فعال علاوه بر ارزش غذایی بالا از حیث در اختیار گذاشتن اسیدهای آمینه ضروری، عملکردهای فیزیولوژیک متعددی همانند تحریک ایمنی، فعالیت ضد میکروبی، ضدکسایشی و ضدسرطانی نیز نشان می‌دهند (Harnedy and FitzGerald, 2012). پپتیدهای زیست‌فعال از منابع مختلف گیاهی، جانوری و میکروبی به دست می‌آیند. موجودات دریایی علاوه بر این که منبع غنی از پروتئین با ارزش غذایی بالا هستند، به عنوان ماده اولیه برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال نیز به کار برده می‌شوند (Bamdad et al., 2011).
- به طور کلی می‌توان پپتیدهای زیست‌فعال را از پروتئین پیش‌ساز توسط روش‌های تخمیر میکروبی و هیدرولیز آنزیمی جدا کرد. تخمیر یکی از قدیمی‌ترین روش‌های نگهداری مواد غذایی است، طی فرآیند تخمیر تجزیه پروتئین‌ها به وسیله میکروب‌ها و آنزیم‌های پروتئولیتیک آن‌ها سبب افزایش ارزش غذا- دارویی و ماندگاری محصول می‌شود (Harnedy and FitzGerald, 2012). مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که برخی فرآورده‌های تخمیری سنتی همانند سس تخمیر شده ماسل (Rajapakse et al., 2005) و خمیر میگو و کریل (Faithong et al., 2010) حاوی مقادیر بالایی از پپتیدهای ضدکسایشی هستند. اخیراً در تعدادی از مطالعات، از باکتری‌های جنس *Bacillus* همانند *Bacillus subtilis* A26 و *Bacillus pumilus* برای تولید پپتیدهای ضدکسایشی از منابع پروتئینی استفاده کرده‌اند (Jemil et al., Fakhfakh et al., 2011); هیدرولیز آنزیمی متداولترین روش مورد استفاده برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال است. فرآیند هیدرولیز باعث تولید پپتیدهای زیست‌فعال با عملکرد و ویژگی‌های زیستی مطلوب می‌شود. هیدرولیز آنزیمی توسط پروتئازهای تجاری و همچنین فرآیند اتولیز صورت می‌گیرد. در حال حاضر پروتئازهای تجاری مختلفی از منابع گیاهی، جانوری و میکروبی شامل تریپسین، کیموتریپسین، پپسین، آلکالاز، پاپائین، پروناز، کلاژناز و بروملئین برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال استفاده می‌شوند (Bamdad et al., 2011).
- بنا بر گزارش سازمان خواربار جهانی (FAO) میزان صید گونه‌های کفال‌ماهیان در آب‌های سواحل جنوبی ایران در سال ۲۰۱۶، ۹۳۰۰ تن برآورد شده است که از این میزان ۲۹۵۰ تن به گونه مید با نام علمی *Liza*

سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور تعیین ترکیب تقریبی عضله، ۲ گرم از گوشت چرخ شده در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت خشک شد و میزان رطوبت آن بر اساس تفاوت وزن اولیه و ثانویه نمونه محاسبه شد. برای تعیین محتوای خاکستر، نمونه در داخل یک کوره با دمای ۵۵۰ تا ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. محتوای نیتروژن و چربی کل به ترتیب توسط روش استخراج کلدال (Kjeldahl) و سوکسله انجام شد. پروتئین خام از طریق ضرب ۶/۲۵ در محتوای نیتروژن محاسبه شد (AOAC, 1990).

هیدرولیز آنزیمی

به منظور تولید پروتئین هیدرولیز شده، ۵۰ گرم گوشت چرخ شده ماهی مید در ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH ۸ به آن اضافه شد. به منظور غیرفعال‌سازی آنزیم‌های درونی، نمونه به مدت ۲۰ دقیقه درون حمام آبی در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از خنک شدن نمونه، به آن آنزیم با نسبت ۱:۵۰ (مقدار آنزیم به پروتئین نمونه، وزنی/وزنی) اضافه شد و در دستگاه انکوباتور (رایمند، ایران) در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد

klunzingeri تعلق دارد (FAO, 2016). این ماهی به دلیل اندازه کوچک و وجود پرده صفاق تیره رنگ دارای قیمت پایینی بوده و جزء ماهیان کم‌مصرف به شمار می‌رود (Kiabi et al., 1999). استفاده از ماهی مید برای تولید ترکیبات زیست‌فعال سبب ایجاد ارزش افزوده شده، امکان استفاده بهینه از ذخایر دریایی که میزان آن‌ها در حال کاهش است را فراهم می‌کند. در مطالعه حاضر از دو روش هیدرولیز آنزیمی توسط آنزیم آلکالاز و هیدرولیز میکروبی توسط باکتری *Bacillus licheniformis* (تولید کننده آنزیم آلکالاز) برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال از عضله ماهی مید استفاده شد و اثرات ضداکسایشی و سیتوتوکسیک پپتیدهای به دست آمده در محیط آزمایشگاهی تعیین شد.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی مید و تعیین ترکیب تقریبی عضله ماهی مید (*Liza klunzingeri*) به صورت تازه از بازار ماهی فروشان تهیه و توسط یخ به آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد منتقل شد. ماهی‌ها پس از شست و شو، فیله و سپس توسط چرخ گوشت چرخ شدند و تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه

غلظت باکتری‌ها با استفاده از کدورت سنجی در طول موج ۵۷۰ نانومتر روی CFU/mL^{۱۰^۸} تنظیم شد (جذب نوری ۰/۱ در ۵۷۰ نانومتر). سپس سوپانسیون به دست آمده رقیق شد تا غلظت باکتری CFU/mL^{۱۰^۴} به دست آید. برای تایید نتایج، شمارش باکتریایی به روش کشت سطحی روی محیط TSA (Tryptone Soya Agar) و گرمخانه‌گذاری به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شد.

برای انجام فرآیند هیدرولیز، ۱۰۰ گرم نمونه گوشت چرخ شده ماهی به ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد توسط اتوکلاو (PHCbi، هلند) استریل شد. سپس ۲۰۰ میلی‌لیتر سوپانسیون باکتری حاوی ۱۰^۴ باکتری در میلی‌لیتر به نمونه اضافه شد و پس از مسدود کردن ارلن با چند لایه گاز استریل فرآیند تخمیر به مدت ۶ روز در دمای ۳۷ درجه و رطوبت ۸۵ درصد صورت گرفت. پس از ۶ روز مایع به دست آمده اتوکلاو شد و سپس در دمای ۱۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه در ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت مایع رویی جمع‌آوری و لیوفلیزه شد (He et al., 2012).

با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ ساعت قرار داده شد. بر اساس مطالعات پیشین دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به عنوان دمای اپتیمم فعالیت آلکالاز در نظر گرفته شد (Diniz and Martin, 1996; Guerard et al., 2001; Ovissipour et al., 2009). در پایان واکنش به منظور قطع واکنش آنزیمی، نمونه برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از خنک شدن در دمای اتاق نمونه به دست آمده در دمای ۱۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار (Hettich، آلمان) سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی جمع‌آوری و لیوفلیزه شد (Ovissipour et al., 2009).

هیدرولیز میکروبی

سویه استاندارد و لیوفلیزه باکتری *Bacillus licheniformis* از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. باکتری به محیط کشت BHI (Brain Heart Infusion) منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه باکتری کشت شبانه مجدداً به محیط کشت BHI اضافه و ۲۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از گذشت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق، جذب نوری نمونه در ۵۶۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نمونه شاهد به جای نمونه از آب مقطر استفاده شد. درصد فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن (Ch_{Fe}) بر حسب رابطه ۲ محاسبه شد (Aleman et al., 2011b).

رابطه ۲:

$$\text{Ch}_{\text{Fe}} (\%) = (A_S - A_C) \times 100$$

A_S : جذب نوری نمونه؛ A_C : جذب نوری شاهد.

فعالیت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی

۲ میلی‌لیتر از نمونه پروتئین هیدرولیز شده در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۲ مولار، pH ۶/۶) ترکیب شد و سپس ۲ میلی‌لیتر پتاسیم فری‌سیانید ۱ درصد به آن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، ۲ میلی‌لیتر TCA ۱۰ درصد به نمونه‌ها اضافه شد و ۲ میلی‌لیتر از محلول به دست آمده با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و ۴ میلی‌لیتر FeCl_3 ۰/۱ درصد ترکیب شد. پس از ۱۰ دقیقه جذب نوری در طول موج ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و گزارش شد (Aleman et al., 2011b).

فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH

غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نمونه پروتئین هیدرولیز شده در آب مقطر تهیه و ۱ میلی‌لیتر از آن با ۱ میلی‌لیتر محلول DPPH^۱ (Sigma-Aldrich، آمریکا) ۰/۱ میلی‌مولار (تهیه شده در اتانول ۹۵ درصد) ترکیب شد. پس از انکوباسیون نمونه در تاریکی، جذب نوری آن در ۵۱۷ نانومتر تعیین شد. در نمونه شاهد به جای پروتئین هیدرولیزه، از آب مقطر استفاده شد. درصد مهار رادیکال‌های DPPH (IA_{DPPH}) بر اساس رابطه ۱ محاسبه شد (Aleman et al., 2011b).

رابطه ۱:

$$\text{IA}_{\text{DPPH}} (\%) = (A_S - A_C) \times 100$$

A_S : جذب نوری نمونه؛ A_C : جذب نوری شاهد.

فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن دو ظرفیتی

۱ میلی‌لیتر از محلول پروتئین هیدرولیزه شده با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ۰/۱ میلی‌لیتر FeCl_2 ۲ میلی‌مولار و ۰/۲ میلی‌لیتر فروزین^۲ (Sigma-Aldrich، آمریکا) ۵ میلی‌مولار ترکیب و حجم آن توسط آب مقطر

1- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
2- (3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic Acid Sodium Salt)

ابتدا ۱۰ و ۱ - فنانتروپین (۱/۸۶۵ میلی مولار، ۱ میلی لیتر؛ Sigma-Aldrich، آمریکا) و نمونه پروتئین هیدرولیز شده (۲ میلی لیتر، ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) به لوله آزمایش اضافه و مخلوط شدند. سپس محلول FeSO_4 (۱/۸۶۵ میلی مولار، ۱ میلی لیتر) به مخلوط اضافه شد و در نهایت با افزودن ۱ میلی لیتر H_2O_2 (۳ درصد حجمی/حجمی) واکنش آغاز شد. پس از ۶۰ دقیقه در ۳۷ درجه جذب نوری در ۵۳۶ نانومتر اندازه گیری شد. مخلوط فاقد پروتئین هیدرولیز شاهد منفی و مخلوط فاقد H_2O_2 و حاوی پروتئین هیدرولیز شده به عنوان بلانک در نظر گرفته شد. فعالیت مهارکنندگی رادیکال های هیدروکسیل (IA_{OH}) توسط رابطه ۴ محاسبه شد (Aleman et al., 2011b).

رابطه ۴:

$$\text{IA}_{\text{OH}} (\%) = [(A_S - A_{\text{NC}}) / (A_B - A_{\text{NC}})] \times 100$$

A_S : جذب نوری نمونه؛ A_{NC} : جذب نوری شاهد منفی؛ A_B : جذب نوری بلانک.

سنجش فعالیت سیتوتوکسیک با روش
MTT

فعالیت مهارکنندگی رادیکال های ABTS
ابتدا $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (Sigma-Aldrich، آمریکا) ۷/۴ میلی مولار با پتاسیم پرسولفات ۲/۶ میلی مولار به نسبت (۱:۱) ترکیب و ۱۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. پیش از آزمایش، محلول ABTS فعال شده توسط متانول رقیق شد تا به جذب نوری ۱/۱ در طول موج ۷۳۴ نانومتر برسد. ۱۵۰ میکرولیتر از نمونه پروتئین هیدرولیز شده با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر با ۲۸۵۰ میکرولیتر ABTS مخلوط شد و پس از ۲ ساعت در دمای اتاق جذب نوری آن اندازه گیری شد. در نمونه شاهد به جای پروتئین هیدرولیز شده، آب مقطر استفاده شد. درصد مهار رادیکال های ABTS (IA_{ABTS}) بر حسب رابطه ۳ محاسبه شد (Aleman et al., 2011b).

رابطه ۳:

$$\text{IA}_{\text{ABTS}} (\%) = (A_S - A_C) \times 100$$

A_S : جذب نوری نمونه؛ A_C : جذب نوری شاهد.

فعالیت مهارکنندگی رادیکال های
هیدروکسیل

1- 2,2'-Azinobios-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

شد. سپس سلول‌ها به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد قرار داده شدند. بعد از انکوباسیون، محیط داخل چاهک‌ها خارج شد و ۱۵۰ میکرولیتر از DMSO^۲ به هر چاهک اضافه شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در جای تاریک انکوبه شدند. چاهک‌های حاوی سلول و بدون پروتئین هیدرولیز شده به عنوان شاهد و چاهک‌های فاقد سلول و دارای محیط کشت به عنوان بلانک در نظر گرفته شد. در نهایت جذب پلیت‌ها توسط دستگاه الیزاریدر (BioTek، آمریکا) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. درصد سمیت سلولی (CT) توسط رابطه ۵ محاسبه شد.

رابطه ۵:

$$CT(\%) = [1 - ((A_S - A_B) / (A_B - A_C))] \times 100$$

A_S : جذب نوری نمونه؛ A_{NC} : جذب نوری شاهد منفی؛ A_B : جذب نوری بلانک.

تعیین دامنه وزن مولکولی

دامنه وزن مولکولی پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط دستگاه HPLC (۱۱۰۰، Agilent، آمریکا) با ستون TSK-gel 2000

آزمون MTT^۱ یک روش رنگ سنجی است که برای بررسی میزان تکثیر سلول‌ها و اثرات سیتوتوکسیک داروها استفاده می‌شود. MTT ماده تترازولیوم زرد رنگ محلول در آب است که توسط میتوکندری سلول‌های زنده احیا شده، به نمک فورمازان (بنفش) غیرمحلول در آب تبدیل می‌شود. سلول‌های 4T1 از انستیتو پاستور تهیه و در فلاسک‌های T شکل کوچک (۷۵ سانتی‌متر مربع) کشت داده شدند. سلول‌ها بعد از رسیدن به تراکم مورد نظر، توسط EDTA-تریپسین (Sigma-Aldrich، آمریکا) از کف فلاسک جدا شدند. تعداد سلول‌ها با استفاده از لام هموسیتومتر شمارش شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی $10^3 \times 15$ سلول به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد. در مرحله بعد سلول‌ها به صورت سه بار تکرار با استفاده از پروتئین هیدرولیز شده در غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از گذشت زمان انکوباسیون کل محیط داخل چاهک‌ها خارج شد، سپس ۶۰ میکرولیتر محلول MTT (۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر PBS) به هر چاهک اضافه

1- 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium)

2- Dimethyl Sulfoxide

SWX1 (۳۰۰ mm × ۷/۸) تعیین شد. فاز متحرک حلال استونیتریل:آب (۴۰:۶۰، حجمی/حجمی) حاوی ۰/۱ درصد تری فلورواتیک اسید (TFA) بود. سرعت جریان ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه بود و جذب در ۲۲۵ نانومتر بررسی شد. سیتوکروم c (۱۲۳۸ دالتون)، باسیتراسین (۱۴۲۲ دالتون)، Gly-Arg-Try-Gly (۴۵۱ دالتون) و Gly-Gly (۱۸۹ دالتون) به عنوان استانداردهای وزن مولکولی پروتئین مورد استفاده قرار گرفتند. از رابطه ۶ برای محاسبه میانگین وزن مولکولی (M_w) نمونه استفاده شد. لگاریتم وزن مولکولی و مدت زمان بازداری رابطه خطی داشتند (Nikoo et al., 2015).

رابطه ۶:

$$M_w(Da) = \sum(M_n \times A_i) / 100$$

M_n : میانگین وزن مولکولی عددی؛ A_i : فراوانی.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SPSS 18 و آزمون‌های آماری t-Test و تحلیل واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵٪ ($P < 0/05$) تجزیه و تحلیل شدند. نتایج به دست آمده بر حسب میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند.

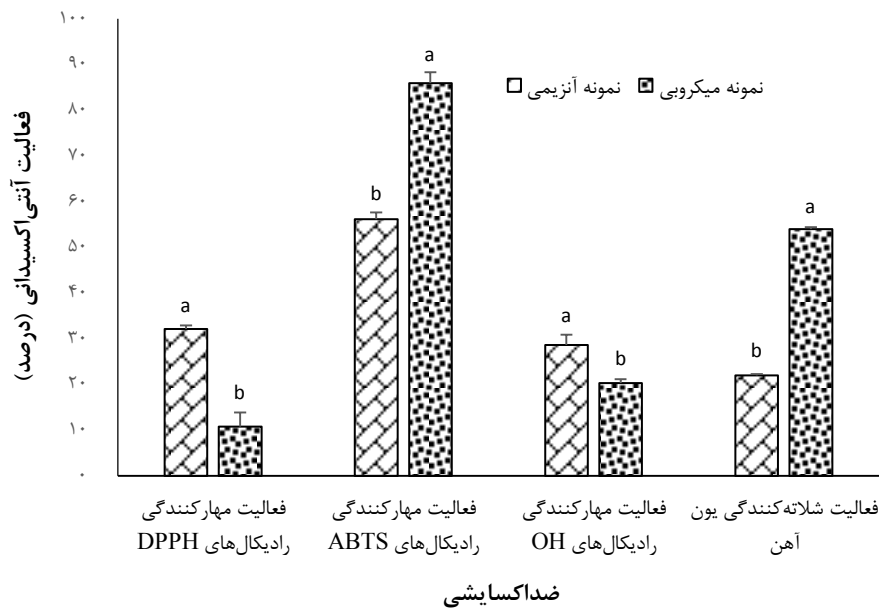
نتایج

در جدول ۱ نتایج مربوط به محتوای پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت عضله ماهی مید نشان داده شده است. نتایج مربوط به فعالیت ضد اکسایشی نمونه پروتئین هیدرولیز آنزیمی و میکروبی در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، ABTS، هیدروکسیل و شلاته‌کنندگی یون آهن دو ظرفیتی در شکل ۱ و نتایج مربوط به فعالیت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده در شکل ۲ نشان داده شده است. با توجه به نتایج، نمونه آنزیمی در مقایسه با نمونه میکروبی فعالیت مهارکنندگی بیشتری بر رادیکال‌های DPPH و هیدروکسیل نشان داد ($P < 0/001$)، در حالی که نمونه میکروبی فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های ABTS، شلاته‌کنندگی یون آهن دو ظرفیتی و کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی بیشتری در مقایسه با نمونه آنزیمی نشان داد ($P < 0/001$). با توجه به نتایج شکل ۳ نمونه پروتئین هیدرولیز میکروبی در غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میلی گرم بر کیلوگرم فعالیت سیتوتوکسیک بیشتری بر سلول‌های سرطانی 4T1 نشان داد ($P < 0/001$).

جدول ۱: ترکیبات تقریبی عضله ماهی مید (میانگین \pm انحراف معیار)

ترکیبات*	چربی (%)	خاکستر (%)	پروتئین (%)	رطوبت (%)
عضله	۲/۲۱ \pm ۰/۵۳	۲/۰۰ \pm ۰/۴۲	۲۲/۴۵ \pm ۳/۴۱	۷۳/۳۶ \pm ۳/۹۰

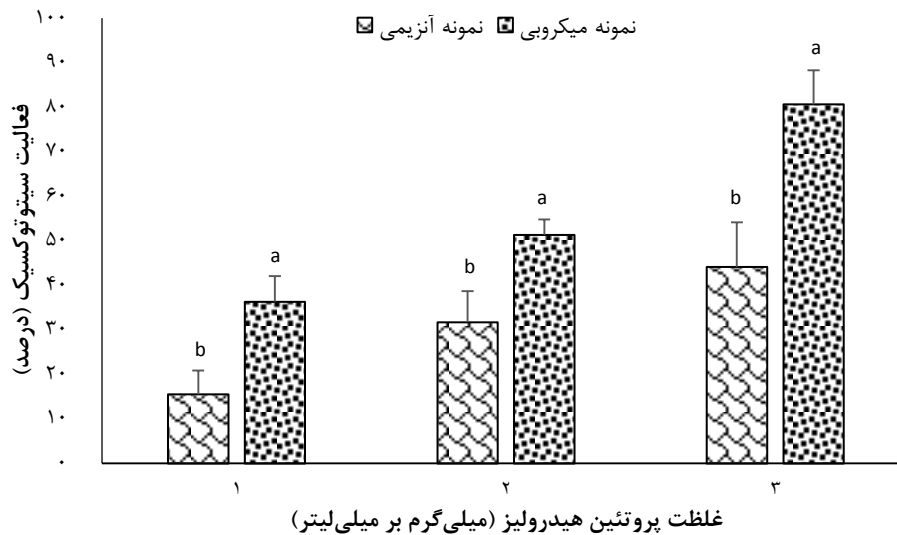
*: درصد وزن تر نمونه



شکل ۱: فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH، ABTS، هیدروکسیل (OH) و شلاته‌کنندگی یون آهن نمونه پروتئین هیدرولیز آنزیمی و میکروبی (میانگین \pm انحراف معیار). حروف a و b نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.001$).



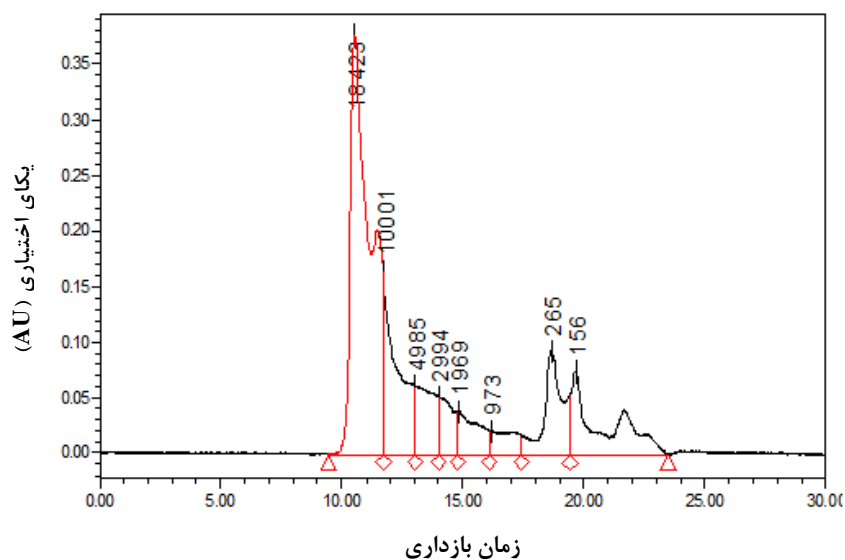
شکل ۲: فعالیت کاهندگی یون آهن نمونه پروتئین هیدرولیز میکروبی و آنزیمی (میانگین \pm انحراف معیار). حروف a و b نشان دهنده اختلاف معنی دار است ($P < 0.001$).



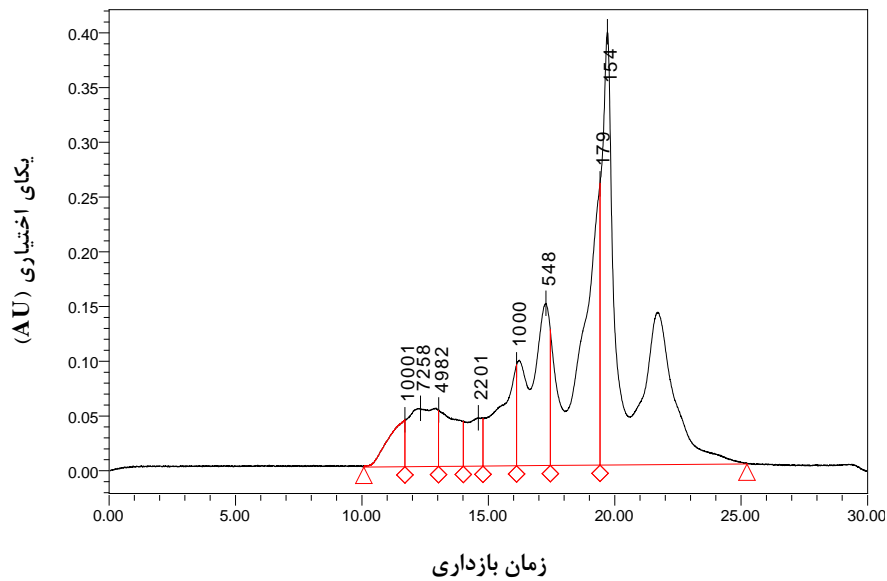
شکل ۳: فعالیت سیتوتوکسیک نمونه پروتئین هیدرولیز میکروبی و آنزیمی (میانگین \pm انحراف معیار). حروف a و b نشان دهنده اختلاف معنی دار است ($P < 0.001$).

دامنه وزن مولکولی نمونه پروتئین هیدرولیز میکروبی در شکل ۵ نشان داده شده است. با توجه به نتایج ۴۳/۴۱ درصد پپتیدهای هیدرولیز آنزیمی در شکل ۴ و نمونه پروتئین

نمونه آنزیمی دارای وزن مولکولی بیشتر از ۱۰۰۰۰ دالتون (۱۰ کیلودالتون) و عمدتاً شامل پلی‌پپتیدها بود. ۱۴/۱۶ درصد پپتیدها نیز وزن مولکولی بین ۵ تا ۱۰ کیلودالتون داشتند. در این نمونه پروتئین هیدرولیز شده، درصد پپتیدهای d با وزن مولکولی کمتر از ۱۰۰۰ دالتون تنها ۲۶/۱۵ درصد بود و نشان داد که آنزیم آلکالاز توانایی کمی در هیدرولیز پیوندهای پپتیدی عضله ماهی می‌داشت (جدول ۲). برخلاف هیدرولیز آنزیمی، هیدرولیز میکروبی سبب افزایش درصد پپتیدهای کوچک در نمونه شد به طوری که ۷۵/۱۷ درصد پپتیدها وزن مولکولی کمتر از ۱۰۰۰ دالتون نشان دادند. در این نمونه پروتئین هیدرولیز شده، ۴۰/۰۷ درصد پپتیدها دارای وزن مولکولی کمتر از ۱۸۰ دالتون و عمدتاً به شکل اسید آمینه آزاد بودند. دی‌پپتیدها و تری‌پپتیدها نیز حدود ۲۲ درصد کل جزء پپتیدی بودند (جدول ۳).



شکل ۴: دامنه وزن مولکولی پروتئین هیدرولیز آنزیمی



شکل ۵: دامنه وزن مولکولی پروتئین هیدرولیز میکروبی

جدول ۲: دامنه وزن مولکولی پروتئین هیدرولیز آنزیمی

شماره	زمان بازداری	وزن مولکولی	سطح زیر منحنی	درصد توزیع وزن مولکولی
۱	۱۰/۵۳۱	۱۰۰۰۱-۱۸۴۲۳	۲۰۹۶۴۶۰۸	۴۳/۴۱
۲	۱۱/۷۰۳	۴۹۸۵-۱۰۰۰۱	۶۸۳۷۳۲۴	۱۴/۱۶
۳	۱۳/۰۳۹	۲۹۹۴-۴۹۸۵	۳۳۹۰۷۲۰	۷/۰۲
۴	۱۴/۰۱۷	۱۹۶۹-۲۹۹۴	۲۱۳۴۹۲۴	۴/۴۲
۵	۱۴/۸۲۲	۹۷۳-۱۹۶۹	۲۳۳۴۰۳۹	۴/۸۳
۶	۱۶/۱۷۵	۲۶۵-۹۷۳	۱۵۹۰۰۴۸	۳/۲۹
۷	۱۸/۶۶۸	۱۵۶-۲۶۵	۴۸۵۷۸۵۵	۱۰/۰۶
۸	۱۹/۶۸۹	<۱۵۶	۶۱۸۰۷۹۰	۱۲/۸۰

جدول ۳: دامنه وزن مولکولی پروتئین هیدرولیز میکروبی

شماره	زمان بازداری	وزن مولکولی	سطح زیر منحنی	درصد توزیع وزن مولکولی
۱	۱۱/۷۰	۷۲۵۸-۱۰۰۰۱	۱۹۳۹۴۸۲	۳/۱۹
۲	۱۲/۳۱۹	۴۹۸۲-۷۲۵۸	۴۰۲۹۸۲۷	۶/۶۳
۳	۱۳/۰۴۱	۲۲۰۱-۴۹۸۲	۲۶۳۲۲۳۰	۴/۳۳
۴	۱۴/۶۰۸	۱۳۸۶-۲۲۰۱	۱۹۵۸۶۷۷	۳/۲۲
۵	۱۶/۱۲۲	۵۴۸-۱۳۸۶	۴۵۲۲۲۱۹	۷/۴۴
۶	۱۷/۲۷۲	۱۷۹-۵۴۸	۸۱۵۰۷۳۰	۱۳/۴۲
۷	۱۹/۴۲۰	۱۵۴-۱۷۹	۱۳۱۶۸۷۱	۲۱/۶۸
۸	۱۹/۷۱۲	<۱۵۴	۲۴۳۳۹۸۴	۴۰/۰۷

بحث

و کاهندگی یون آهن (۵۳/۹۹±۰/۴۱ درصد) و کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی (جذب نوری ۰/۶۷±۰/۰۰۳ در طول موج ۷۰۰)، فعالیت متوسطی در حذف رادیکال‌های هیدروکسیل (۲۰/۳۱±۰/۸۲ درصد) و فعالیت ضعیفی در حذف رادیکال‌های DPPH (۱۰/۷۹±۱/۰۶ درصد) نشان داد. در پروتئین هیدرولیز آنزیمی، درصد پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از ۱۰۰۰ دالتون ۲۶/۱۵ درصد ولی در نمونه میکروبی ۷۵/۱۷ درصد بود. بنابراین به نظر می‌رسد فعالیت بالای نمونه میکروبی در حذف رادیکال‌های ABTS و شلاته‌کنندگی و کاهندگی یون آهن به دلیل حضور مقادیر بالایی از پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین باشد.

بر اساس نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز فعالیت قابل ملاحظه‌ای در حذف رادیکال‌های DPPH (۳۲/۱۱±۰/۸۳ درصد)، ABTS (۵۶/۱۶±۱/۴۵ درصد) و هیدروکسیل (۲۸/۶۴±۲/۲۵ درصد)، فعالیت متوسطی در شلاته‌کنندگی یون آهن دو ظرفیتی (۲۱/۹۷±۰/۲ درصد) و فعالیت نسبتاً ضعیفی در کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی (جذب نوری ۰/۱۳±۰/۰۰ در طول موج ۷۰۰) نشان داد. پروتئین هیدرولیز شده توسط باکتری *Bacillus licheniformis* فعالیت چشمگیری در حذف رادیکال‌های ABTS (۸۵/۹۲±۲/۴۰ درصد)، شلاته‌کنندگی یون آهن دو ظرفیتی

پپتیدهای زیست فعال تحت تاثیر عوامل دیگری مانند نوع اسیدهای آمینه، توالی اسیدهای آمینه و قرارگیری در موقعیت‌های C و N انتهای زنجیره یا نزدیک به این موقعیت‌ها قرار می‌گیرد (Giri and Ohshima, 2012). عواملی چون تیمار ماده اولیه، نوع آنزیم، درجه حرارت، مدت واکنش و تراکم پروتئین بر ساختار پپتید و عملکرد پپتید تاثیر می‌گذارند (Harnedy and FitzGerald, 2012).

در مطالعه حاضر نمونه پروتئین هیدرولیز میکروبی با فعالیت کاهندگی و شلاته‌کنندگی آهن چشم‌گیر، اثر مهاري قوی بر رادیکال‌های ABTS و اثر مهاري ضعيفی بر رادیکال‌های DPPH نشان داد. هم‌راستا با نتایج حاضر در مطالعه صورت گرفته بر روی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات کشتارگاه مشاهده شد که نمونه پروتئین هیدرولیز با بیشترین فعالیت شلاته‌کنندگی آهن کمترین اثر مهاري را بر رادیکال‌های DPPH نشان داد (Damgaard et al., 2014). در مطالعه صورت گرفته بر روی ژلاتین هیدرولیز پوست اسکوئید نیز مشاهده شد که فعالیت شلاته‌کنندگی آهن با فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های ABTS در ارتباط است (Aleman et al., 2011). در مطالعه صورت گرفته بر روی پروتئین هیدرولیز

در مطالعه صورت گرفته توسط Aleman و همکاران (۲۰۱۱a) مشاهده شد که ژلاتین هیدرولیز اسکوئید با درجه هیدرولیز بالاتر و وزن مولکولی کمتر، از فعالیت شلاته‌کنندگی آهن بهتری برخوردار بود، به طوری که نمونه با بیشترین فعالیت شلاته‌کنندگی آهن دارای پپتیدهایی با وزن مولکولی ۱۴۰۰-۵۰۰ دالتون بود (Aleman et al., 2011). این در حالی است که Bamdad و همکاران در سال ۲۰۱۱، گزارش کرد که پپتیدهایی با وزن مولکولی بیشتر، فعالیت شلاته‌کنندگی آهن بیشتری نشان می‌دهند که ناشی از به دام افتادن یون آهن داخل زنجیره پپتید است (Bamdad et al., 2011). در مطالعات مختلف نتایج متناقضی نیز در ارتباط با وزن مولکولی و فعالیت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی گزارش شده است. برخی رابطه معکوس بین فعالیت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی و وزن مولکولی (Aleman et al., 2011b) و برخی دیگر نیز رابطه مثبتی را گزارش کرده‌اند (Theodore et al., 2008). تناقضات موجود در مطالعات مختلف پیشنهاد می‌کند که وزن مولکولی عامل اصلی در تعیین فعالیت ضد اکسایشی نمونه‌های پروتئین هیدرولیز و پپتید نیست و ویژگی‌های ضد اکسایشی

سلول‌های سرطانی کبد و کولون نشان دادند (Kannan et al., 2008).

بر اساس یافته‌های این پژوهش، تلقیح عضله ماهی مید توسط باکتری *B. licheniformis* سبب تولید پپتیدهایی با فعالیت سیتوتوکسیک و ضداسپاسمی قابل ملاحظه شد، به طوری که پپتیدهای به دست آمده فعالیت سیتوتوکسیک و ضداسپاسمی به مراتب بیشتری در مقایسه با نمونه آنزیمی داشتند. بنابراین استفاده از باکتری *B. licheniformis* برای تولید پپتیدهای سیتوتوکسیک و ضداسپاسمی نسبت به روش آنزیمی از نظر اقتصادی مقرون به صرفه‌تر است و سبب کاهش هزینه‌ها خواهد شد. تاکنون در مطالعات اندکی به تولید پپتیدهای ضداسپاسمی با روش هیدرولیز میکروبی پرداخته شده است. در مطالعه Coda و همکاران (۲۰۱۲) باکتری‌های *Lactobacillus L. brevis*، *alimentarius* و *sanfranciscensis* و *L. hilgardii* به منظور تولید پپتیدهای ضداسپاسمی از آرد گندم، چاودار و جو مورد استفاده قرار گرفتند. He و همکاران (۲۰۱۲) از باکتری *Bacillus subtilis* برای تولید پپتیدهای ضداسپاسمی از پروتئین کلزا استفاده کردند. Rajendran و

شده زئین نیز روند مشابهی برای فعالیت شلاته‌کنندگی یون مس و مهارکنندگی رادیکال‌های ABTS مشاهده شد (Zhu et al., 2008).

در بررسی حاضر تخمیر عضله ماهی مید توسط باکتری *B. licheniformis* سبب تولید پپتیدهایی با فعالیت سیتوتوکسیک قابل ملاحظه شد، به طوری که فعالیت ضداسپاسمی پپتیدهای میکروبی ($36/28 \pm 5/75$ درصد) دو برابر پپتیدهای آنزیمی ($15/51 \pm 5/36$ درصد) بود که این امر ممکن است به دلیل حضور پپتیدهای با وزن مولکولی پایین (کمتر از ۱۰۰۰ دالتون) باشد که ۷۵ درصد پپتیدهای نمونه را به خود اختصاص می‌دادند. Sheih و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه بر روی پروتئین هیدرولیز جلبک گزارش کردند که نمونه حاوی پپتیدهایی با وزن مولکولی ۲۰۰-۲۰۰۰ دالتون (۹۰ درصد پپتیدهای نمونه) بیشترین فعالیت سیتوتوکسیک را علیه سلول‌های سرطانی آدنوکارسینومای معده (AGS) نشان داد. در مطالعه صورت گرفته بر روی پروتئین هیدرولیز برنج نیز مشاهده شده که جزء حاوی پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از ۵۰۰۰ دالتون فعالیت سیتوتوکسیک بیشتری بر

به عنوان ترکیبات فراسودمند و سلامتی‌بخش، کارایی آن‌ها در مدل‌های جانوری نیز ارزیابی و تایید شود. پس از تایید در مطالعات جانوری و انسانی و دریافت مجوزهای لازم، می‌توان پپتیدهای ضدکسایشی و سیتوتوکسیک عضله ماهی مید را به صورت تجاری تولید کرد و به عنوان ترکیبات فراسودمند مورد استفاده قرار داد. پپتیدهای ضدکسایشی و سیتوتوکسیک آبزیان علاوه بر تامین اسیدهای آمینه ضروری بدن، اثرات سلامتی بخش نیز نشان می‌دهند که سبب افزایش استفاده آن‌ها در آینده خواهد شد.

همکاران (۲۰۱۸) پپتیدهای ضدکسایشی را از ضایعات ماهی سالمون توسط هیدرولیز میکروبی با باکتری‌های اسیدلاکتیک تولید کردند.

در بررسی حاضر پروتئین‌های هیدرولیز شده آنزیمی و میکروبی عضله ماهی مید ویژگی‌های ضدکسایشی و سیتوتوکسیک قابل ملاحظه‌ای در محیط *in vitro* نشان دادند، ولی کارایی این ترکیبات در بدن موجود زنده ممکن است تحت تاثیر فرآیندهای آنزیمی و هضمی دستخوش تغییراتی شود. بنابراین توصیه می‌شود پیش از معرفی پپتیدهای فوق

منابع

- Aleman A., Perez-Santin E., Bordenave-Juchereau S., Arnaudin I., Gomez-Guillen M. and Montero P. 2011a.** Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*, 44: 1044–1051.
- Aleman A., Gimenez B., Perez-Santin E., Gomez-Guillen M. and Montero P. 2011b.** Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food Chemistry*, 125: 334–341.
- Bamdad F., Wu J. and Chen L. 2011.** Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein. *Journal of Cereal Science*, 54: 20–28.
- AOAC. 1990.** Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*, USA. 684P.
- Coda R., Rizzello C. G., Pinto D. and Gobetti M. 2012.** Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 1087–1096.
- Damgaard T.D., Otte J.A., Meinert L., Jensen K. and Lametsch R. 2014.** Antioxidant capacity of hydrolyzed porcine tissues. *Food Science and Nutrition*, 2: 282–288.
- Diniz F.M. and Martin A.M. 1996.** Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *International Journal of Food Science and Technology*, 31: 419–426.
- Faithong N., Benjakul S., Phatcharat S. and Binsan W. 2010.** Chemical composition and antioxidative activity of Thai traditional fermented shrimp and krill products. *Food Chemistry*, 119: 133–140.
- Fakhfakh N., Ktari N., Haddar A., Mnif I.H., Dahmen I. and Nasri M. 2011.** Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1, and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity. *Process Biochemistry*, 46: 1731–1737.
- FAO. 2016.** Food and Agriculture Organization. *FAO Global Aquaculture Production Statistics*. From <http://www.fao.org/fishery/topic/16140/en>.
- Giri A. and Ohshima T. 2012.** Bioactive marine peptides:

- Nutraceutical value and novel approaches. *Advances in Food and Nutrition Research*, 65: 73–105.
- Guerard F., Dufosse L., De La Broise D. and Binet A. 2001.** Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B*, 11: 1051–1059.
- Harnedy P.A. and FitzGerald R.J. 2012.** Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*, 4: 6–24.
- He R., Ju X., Yuan J., Wang L., Girgih A.T. and Aluko R.E. 2012.** Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation. *Food Research International*, 49: 432–438.
- Jemil I., Jridi M., Nasri R., Ktari N., Salem R.B. S.B., Mehiri M., Hajji M. and Nasri M. 2014.** Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. *Process Biochemistry*, 49: 963–972.
- Kannan A., Hettiarachchy N., Johnson M. G. and Nannapaneni R. 2008.** Human colon and liver cancer cell proliferation inhibition by peptide hydrolysates derived from heat-stabilized defatted rice bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 11643–11647.
- Kiabi B.H., Abdoli A. and Naderi M. 1999.** Status of the fish fauna in the South Caspian Basin of Iran. *Zoology in the Middle East*, 18: 57–65.
- Nikoo M., Benjakul S. and Xu X. 2015.** Antioxidant and cryoprotective effects of Amur sturgeon skin gelatin hydrolysate in unwashed fish mince. *Food Chemistry*, 181: 295–303.
- Nikoo M., Benjakul S., Ehsanid A., Jing Lib F.W., Yangb N., Xue B., Jina Z. and Xua X. 2014.** Antioxidant and cryoprotective effects of a tetrapeptide isolated from Amur sturgeon skin gelatin. *Journal of Functional Foods*, 7: 609–620.
- Ovissipour M., Abedian A., Motamedzadegan A., Rasco B., Safari R. and Shahiri H. 2009.** The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115: 238–242.
- Rajapakse N., Mendis E., Jung W.K., Je J.Y. and Kim S.K. 2005.** Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, 38: 175–182.

- Rajendran S., Mohan A., Khiari Z., Udenigwe C. and Mason B. 2018.** Yield, physicochemical, and antioxidant properties of Atlantic salmon visceral hydrolysate: Comparison of lactic acid bacterial fermentation with flavourzyme proteolysis and formic acid treatment. *Journal of Food Processing and Preservation*, 13: 559–573.
- Sheih I., Fang T., Wu T. and Lin P. 2010.** Anticancer and antioxidant activities of the peptide fraction from algae protein waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 1202–1207.
- Theodore A., Raghavan S. and Kristinsson H. 2008.** Antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 7459–7466.
- Zhu L., Chen J., Tang X. and Xiong Y.L. 2008.** Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 2714–2721.



Research Paper

Antioxidant and cytotoxic activities of peptides obtained by enzymatic and microbial hydrolysis of *Liza klunzingeri* muscle

Sana Rabiei¹, Masoud Rezaie^{2*}, Mehdi Nikoo³, Mahmoud Rafeian Kopaei⁴

Received: April 2018

Accepted: September 2018

Abstract

Oxidative stress reflects an imbalance in the redox status of the body and plays an important role in the pathogenesis and development of several human diseases such as cancer. This study aimed to evaluate the antioxidant and cytotoxic effects of peptides derived from enzymatic and microbial hydrolysis of *Liza klunzingeri* muscle. *L. klunzingeri* muscle was hydrolyzed using enzymatic hydrolysis with alkalase and microbial hydrolysis by *Bacillus licheniformis*. The antioxidant activity of samples was measured using DPPH, ABTS and hydroxyl radical scavenging, Fe³⁺ reduction and Fe²⁺ chelating effects. The cytotoxic effects of hydrolysates on 4T1 cell line were evaluated using MTT assay. The molecular weight distribution of hydrolysates was determined using HPLC. The microbial sample showed better antioxidant activity in the inhibition of ABTS, chelating and reducing of iron (P<0.05). The cytotoxic activity of the microbial sample was significantly higher than that of the enzymatic sample (P<0.05). The percentage of peptides with a molecular weight of less than 1000 Da was 26.15% in enzymatically prepared protein hydrolysate and 75.15% in the microbial sample. The protein hydrolyate derived from microbial hydrolysis shows better antioxidant and cytotoxic activity, probably due to the presence of low molecular weight peptides.

Key words: *Klunzingeri* mullet, Enzymatic Hydrolysis, Microbial hydrolysis, Antioxidant Activity, Cytotoxic Activity.

1- Ph.D. Student in Seafood Science, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

2- Professor in Department of Seafood Science, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

3- Assistant Professor in Department of Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran.

4- Professor in Medical Plants Research Center, Basic Health Sciences Institutes, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

*Corresponding Author: rezai_ma@modares.ac.ir