استخراج و شناسایی یک پپتید فعال زیستی جدید حاصل از هیدرولیزات کرم سفید ریشه

عسل خواجه پور زاوه[۱]، احمد آسوده[۲*] و حسین نادری منش[۱*]

[۱] **ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیست شناسی، گروه بیوفیزیک**

[۲] **ایران، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه شیمی**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۰۱

چکیده

امروزه، پپتیدهای فعال زیستی به دلیل گسترش فراوان، سنتز آسان ، نداشتن عواض جانبی و انباشته نشدن در کلیه‌ها و کبد به عنوان جایگزین مناسب برای داروهای شیمیایی مطرح هستند. حشرات با داشتن تنوع بالا و موفقیت در تمامی زیستگاهها منبع خوبی برای استخراج پپتید های فعال زیستی هستند. این مطالعه با هدف استخراج و خالص سازی پپتید فعال زیستی از هیدرولیزات کرم سفید ریشه انجام شد. پپتیدهای فعال زیستی حاصل از هیدرولیزات کرم سفید ریشه با استفاده از آنزیمهای پاپایین ، پانکراتین ، پروتئیناز-K و تریپسین تولید شدند. نتایج به دست آمده نشان داد که هیدرولیزات پاپایین در زمان ۴ ساعت دارای بیشترین توانایی در حذف رادیکالهای DPPH است (۲۱ درصد). این هیدرولیزات توسط فاز معکوس کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جداسازی شدند. فرکشن دارای بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی جداسازی و توسط طیف سنجی جرمی با توالی پپتیدی YPQSLRWRAK (۱۳۰۴/۶ دالتون با نام Po-1) شناسایی شد. فعالیت حذف رادیکالهای DPPH پپتید سنتتیک در ۱۰۰ میکرومولار به مقدار ۵۴/۴۱ درصد رسید و مقدار IC_{50} پپتید در حذف رادیکالهای DPPH، ۷۶/۴۵ میکرومولاربود در حالی که ترکیبات طبیعی ویتامینC و گلوتاتیون احیاء شده دارای مقادیرIC_{50} به ترتیب برابر با ۳/۲۷ و ۹/۹۶ میکرومولار بودند. نتایج نشان می‌دهد که پپتید فعال زیستی Po-1 دارای خاصیت آنتی اکسیدانی است که می‌تواند به عنوان ترکیب طبیعی در طراحی دارو در آینده استفاده شود.

واژه های کلیدی: کرم سفید ریشه؛ پپتید؛ کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

* نویسندگان مسئول، تلفن؛ ۳۸۸۰۵۵۲۵ ۵۱ ۹۸+ ، **پست الکترونیکی**: naderman@modares.ac.ir ، Asoodeh@um.ac.ir

مقدمه

حشرات اهمیت بسیار زیادی در زندگی انسان‌ها دارند. بشر از بدو خلقت دارای رابطه کاملاً نزدیکی با این موجودات بوده است و از بسیاری جهات نیز زندگی سایر موجودات از جمله انسان‌ها به این جانداران کوچک وابسته است. در واقع حشرات موفق ترین گروه از حیوانات روی کره زمین هستند که دارای اهمیت اقتصادی نیز می‌باشند(۶). حشرات در هر منطقه از جهان زندگی می‌کنند. آنها می‌توانند در هر نوع آب و هوایی، از جنگلهای بارانی گرمسیری تا مناطق قطبی یخی، تا زمانی که بتوانند غذا پیدا کنند، زنده بمانند(۹). اقیانوسها، تنها مکانهایی هستند که حشرات کمی در آن جا زندگی می‌کنند. از آنجا که این موجودات بسیار کوچک هستند، می‌توانند در مناطقی زندگی کنند که سایر حیوانات نمی‌توانند زنده بمانند، آنها حتی در غارهای زیرزمینی زندگی می‌کنند. قاب‌بالان یا سخت‌بالپوشان یا سوسکها متنوع ترین راسته از حشرات هستند(۱۹). سرگین چرخان با ۲۷۸۰۰ گونه یکی از سمی‌ترین و خطرناک ترین آفتهای گیاهان، درختان جنگلی و گیاهان زینتی می‌باشد(۲۰). امروزه استفاده گسترده‌ای از حشرات می‌شود به طوری که برای تولید مواد دارویی، رنگ، مواد خوراکی و غیره از آنها بهره

می‌برند. حشرات با توجه به تنوع زیاد در طبیعت به عنوان یک گروه پیشگام برای جداسازی و شناسایی ترکیبات فعال زیستی در نظر گرفته می‌شوند(۱۹).

رادیکالهای آزاد معلول واکنشهای شیمیایی در بدن هستند در بروز بسیاری از ناهنجاریها ازجمله اختلالات عصبی و سرطان نقش دارند. آنتی‌اکسیدانها ترکیباتی هستند که هم در داخل و هم در خارج سلولها یافت می‌شوند و توانایی واکنش با رادیکالهای آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن را دارند که در نهایت سبب کاهش و یا جلوگیری از استرس اکسیداتیو می‌شوند. این ترکیبات هم در داخل بدن سنتز می‌شوند و هم از طریق رژیم غذایی قابل دریافت می‌باشند(۱۶ و ۱۷).

پپتیدهای فعال زیستی به عنوان مولکولهایی با فعالیت شبه هورمونی یا شبه دارویی شناخته می‌شوند که در نهایت اعمال فیزیولوژیک را از طریق واکنش با گیرنده‌های خاص روی سلولهای هدف تنظیم کرده و منجر به القای پاسخهای فیزیولوژیک می‌گردند. این پپتیدها در سلول به صورت پری-پرو پپتیدهای بزرگ سنتز شده و سپس به صورت محصولات فعال برش خورده و تغییر پیدا می‌کنند (۲۲). در سالهای اخیر، استفاده از پپتیدها جهت درمان انواع بیماریها بسیار توسعه یافته است. پپتیدهای درمانی دارای چندین مزیت نسبت به پروتئینها و آنتی بادیها می‌باشند. از جمله مهم‌ترین مزیت پپتیدها می‌توان به اندازه کوچکتر آنها، سنتز راحت تر و توانایی نفوذ آنها در غشای سلولی را نام برد. همچنین پپتیدها، دارای تنوع بیولوژیکی و شیمیایی می‌باشند(۱۳). مزیت دیگر استفاده از پپتیدها به عنوان عوامل درمانی این است که آنها در اندامهای خاص مانند کبد و کلیه انباشته نمی‌شوند که این امر منجر به کاهش عوارض جانبی سمی آنها می‌شود. پپتیدها همچنین به راحتی سنتز و تغییر می‌یابند و نسبت به آنتی بادیهای نوترکیب و پروتئینها، ایمنی زایی کمتری ایجاد می‌کنند. پپتیدهای درمانی پتاسیل بسیار بالایی برای درمان بیماریها دارند (۲، ۱۳ و ۱۴). امروزه حشرات به دلیل تنوع زیاد می‌توانند منبع بسیار مفیدی برای تهیه ترکیبات فعال از منابع طبیعی باشند. پپتیدهای طبیعی کمی از هیدرولیزات حشرات گزارش شده است که تنها می‌توان به پپتیدهای حاصل از هیدولیزات حشرات خوراکی نظیر کرم ابریشم(*Bombyx mori*) (۱۲) *Spodoptera littoralis* (۲۳)، *Zophobas morio* (۲۷) ملخ (*Blaptica dubia*) (۲۷) اشاره کرد. با توجه به مطالعات انجام شده تاکنون گزارشی در رابطه با پپتیدهای فعال زیستی حاصل از هیدرولیزات کرم سفید ریشه صورت نگرفته است. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر، خالص سازی و شناسایی پپتید فعال زیستی جدید با خاصیت آنتی اکسیدانی از هیدرولیزات کرم سفید با استفاده از کروماتوگرافی با کارایی بالاو طیف سنج جرمی بوده است.

مواد و روشها

ترکیبات و مواد شیمیایی: لاروهای تازه کرم سفید ریشه (*Polyphylla adspersa*)از منطقه‌ای در تربت حیدریه ، (استان خراسان رضوی ، ایران) جمع آوری شد. تریپسین ، پانکراتین (از لوزالمعده گاو ، نوع۲)، پاپایین (از شیره پنجه پا) و پروتئیناز-K از سیگما (سنت لوئیس ، مونیا ، ایالات متحده) خریداری شد. غشای اولترافیلتراسیون با محدودیت وزن مولکولی ۳ کیلو دالتونی از Millipore تهیه شد(بردفورد ، ایالات متحده). ۱،۱-دی فنیل-۲-پیکریل-هیدرازیل(DPPH) و تری فلوئور استیک اسید (TFA) از شرکت مرک(آلمان) تهیه شد.

تهیه عصاره: پنجاه لارو بالغ *P. adspersa* جمع آوری و هویت لاروها در آزمایشگاه بیوکنترل و آسیب شناسی حشرات (دانشگاه فردوسی مشهد) تأیید شد. پس از انجماد لاروها توسط نیتروژن مایع، نمونه‌ها توسط هاون چینی در ۲۰ میلی لیتر بافر فسفات (pH 7) خرد شدند. عصاره حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰،۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سولفات آمونیوم (۸۵ درصد) به ماده رویی

اضافه شد. پس از ۸ ساعت ، با استفاده از ۲۰ میلی لیتر بافر فسفات (pH 7) دیالیز شدند و در نهایت برای تجزیه و تحلیلهای بعدی لیوفیلیزه شدند.

تهیه هیدرولیز کرم سفید: عصاره پروتئینهای کرم سفید ریشه با استفاده از آنزیمهای مختلف پاپایین، پانکراتین، پروتئیناز-K و تریپسین هیدرولیز شد. ۱۰۰ میلی گرم عصاره در ۵ میلی لیتر از بافر فسفات ۲۰ میلی مولار (pH 7) حاوی $CaCl_2$ یک میلی مولار، حل شد. ۶/۷ میلی گرم پروتئاز به محلول عصاره اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در زمانهای مختلف هیدرولیز شد (۰ ، ۰/۵، ۱ ، ۲ ، ۳ ، ۴ ، ۵ ، ۶ و ۷ ساعت). برای غیرفعال کردن آنزیمها ، هیدرولیزات به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شدند و سپس هریک از آنها به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و محلول رویی آن جمع آوری شد سپس از غشای آمیکون با محدودیت وزن مولکولی ۳ کیلو دالتون (لوییس، ایالات متحده) عبور داده شدند. محلول تصفیه شده متشکل از پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین تر از ۳ کیلو دالتون بود که لیوفیلیزه و برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

الکتروفورز: به منظور بررسی هیدرولیزات از روش تریسین– SDS-PAGE استفاده شد (۲۱). این ژل شامل ژل متراکم ۵ درصد (w/v) و ژل جداکننده ۱۲/۵ درصد (w/v) بود. هر نمونه با ۲۰ میکروگرم پروتئین آماده شد. نمونه ها با بافر نمونه به نسبت ۱: ۴ ، v/v (بیو–راد ، کالیفرنیا ، ایالات متحده) مخلوط شدند و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه قبل از انجام الکتروفورز جوشانده شدند. الکتروفورز برای ژل متراکم در ۸۰ ولت (۰/۵ ساعت) و برای ژل جداکننده در ۱۲۰ ولت (۵ ساعت) اجرا شد. ژلها با کوماسی برلیانت بلو و نیترات نقره رنگ آمیزی شدند. دو نشانگر وزن مولکولی به عنوان استاندارد در محدوده ۱۳۵–۲/۶ کیلو دالتون استفاده شد.

کروماتوگرافی مایع با فاز معکوس: در ابتدا ، ۷۸ میلی گرم از هیدرولیزات پاپایین فیلتر شده توسط غشاء با محدودیت وزن مولکولی ۳ کیلو دالتون در ۳ میلی لیتر حلال A (۰/۱درصد TFA در آب مقطر) حل شد، ۱ میلی لیتر از نمونه به ستون آنالیتیکالC_{18} دستگاه کروماتوگرافی فاز معکوس (شرکت Knauer آلمان با Smart line manager 5000 Model E4320V2، پمپ مدل EA4800 و ردیاب UV2500 Model E4310)تزریق شد. فازهای متحرک شامل حلال A (۰/۱درصد TFA در آب مقطر) و B (۰/۰۹۸درصد TFAدر استونیتریل) بودند. برای تفکیک سازی، شیب خطی ۵۵–۵ درصد حلال B با سرعت جریان ۲ml/min برای مدت ۶۰ دقیقه استفاده شد. جذب پیکها در طول موج ۲۱۴nm اندازه‌گیری شد. پیکهای مهم جمع‌آوری و توسط دستگاه فریز درایر مدل Ilshin Korea خشک گردیدند.

شناسایی و سنتز پپتید: تعیین توالی *De Novo* پپتیدهای یک پیک اصلی حاصل از کروماتوگرافی توسط دستگاه اسپکتروسکوپی جرمی (MALDI-TOF) در مؤسسه بین المللی پروتئومیکس (Pty Ltd) واقع در غرب استرالیا انجام شد. سپس توالی شناسایی شده پپتید مورد نظر به منظور سنتز به مؤسسه Gl Biochem واقع در شهر شانگهای چین فرستاده شد. توالی پپتید شناسایی شده با توالیهای گزارش شده موجود در پایگاه داده مقایسه گردید.

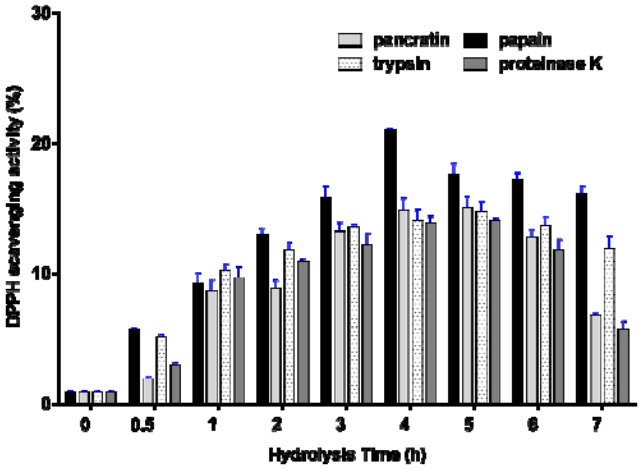
سنجش فعالیت پپتید در حذف رادیکالهای DPPH : DPPH به عنوان یک ترکیب شیمیایی به منظور تعیین میزان رادیکالهای آزاد انواع مختلف سیستمها معرفی می‌شود. DPPH، ترکیبی پودری و دارای رنگ تیره (بنفش مایل به سیاه) با وزن مولکولی ۳۹۴/۳۲ گرم در مول است و در دمای اتاق دارای پایداری خوبی است. این ترکیب با گرفتن یک اتم هیدروژن یا به طور کلی یک الکترون به پایداری بیشتری می‌رسد. DPPH، پس از حل شدن در اتانول به شکل رادیکالی خود در می‌آید و در طول موج ۵۱۷ نانومتر دارای بیشترین جذب است (۱۱). این رادیکال تولید شده پس از واکنش با ترکیبی که دارای فعالیت

آنتی‌اکسیدانی است حذف شده و جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر کاهش می‌یابد. به منظور بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی در حذف رادیکالهای DPPH از روش Göçer و همکاران استفاده گردید (۷). برای تهیه محلول بنفش رنگ DPPH (۰/۱۵ میلی مولار) ۱ میلی‌گرم از DPPH در ۱۷ میلی‌لیتر اتانل حل شد. به منظور سنجش حذف رادیکال DPPH، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظتهای نهایی مختلف پپتید (۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰میکرومولار) به ۴۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH افزوده و محلول تهیه شده به شدت تکان داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط و در تاریکی نگهداری شد. در نهایت جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. برای نمونه کنترل ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر به جای پپتید به کار برده شد. میزان فعالیت پپتید در حذف رادیکالهای DPPH توسط معادله زیر ارزیابی شد:

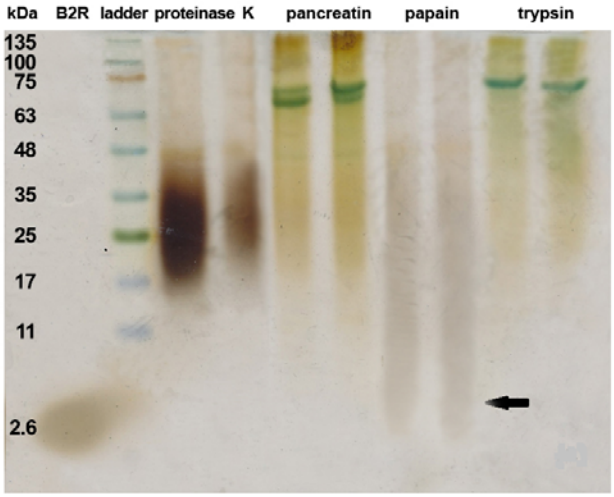
۱ معادله مهار رادیکال DPPH (٪) = [(جذب نمونه کنترل/جذب نمونه – جذب نمونه کنترل)] × ۱۰۰

نتایج و بحث

آماده سازی هیدرولیزات: سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی هیدرولیزات آنزیمی کرم سفید ریشه مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج در **شکل- ۱**نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود به مرور زمان تولید پپتیدهای آنتی اکسیدانی برای همه هیدرولیزها به حداکثر مقدار می‌رسد. بهترین زمان برای تولید پپتیدهای آنتی اکسیدانی در هیدرولیزات پاپین ۴ ساعته بود ، در حالی که این مقدار برای هیدرولیزهای پانکراتین ، تریپسین و ، پروتئیناز -K ، ۵ ساعت بود. همچنین هیدرولیزات به دست آمده توسط پاپاین، خاصیت آنتی اکسیدانی بالاتری را نشان دادند (**شکل** -۱). مقادیر مهار رادیکال DPPH برای هیدرولیز ۴ ساعت –پاپین، ۲۱ درصد بود ، در حالی که مقادیر مربوط به پانکراتین (۱۵ درصد) ، تریپسین (۱۴/۷ درصد) و هیدرولیزات پروتئیناز-K (۱۴/۳ درصد) بود که همگی دارای مقادیر پایین تر از هیدرولیزات پاپین داشتند. برای بررسی فرایند هیدرولیز، عصاره‌های هضم شده آنزیمی با استفاده از الکتروفورزSDS-PAGE مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج الکتروفورز نشان داد که هیدرولیزات پاپاین دارای نوار اسمیر مانند هستند که الیگوپپتیدهایی با وزن مولکولی کم را نشان می‌دهد(**شکل** -۲).



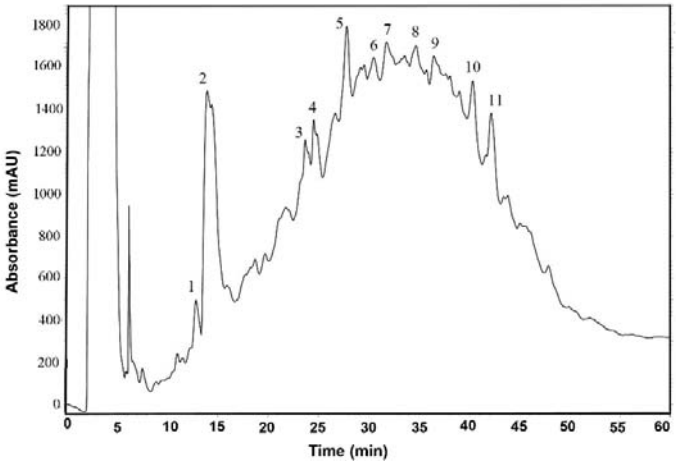
شکل ۱- سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی هیدرولیزات کرم سفید ریشه در حذف رادیکالهای DPPH



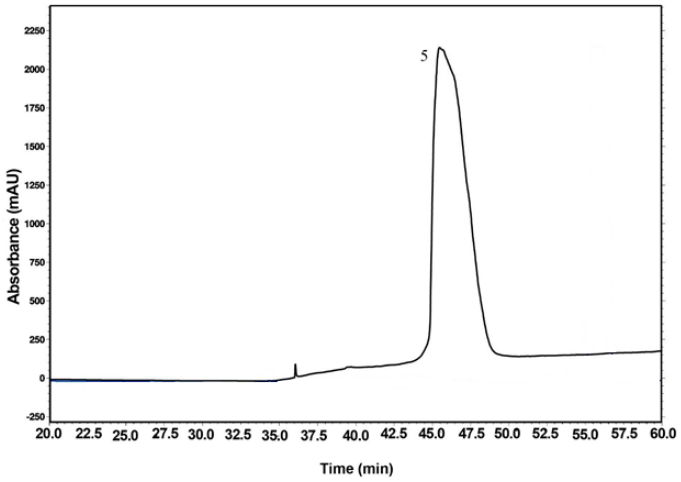
شکل ۲- الگوی الکتروفورزی (SDS-PAGE) هیدرولیزات کرم سفید ریشه. هرکدام از هیدرولیزات در دو چاهک مورد بررسی قرار گرفتند. B2R، پپتید بروینین -2R با وزن مولکولی ۲/۶ کیلو دالتون است. فلش موقعیت الیگوپپتیدهای با وزن مولکولی کم را نشان می دهد.

به دلیل تأثیر پاپایین که می‌تواند پیوندهای پپتیدی را در محل اسید آمینه‌های آبگریز هضم کند ، الیگوپپتیدهایی با وزن مولکولی پایین در هیدرولیزات پاپایین مشاهده شد. در مطالعه انجام شده توسط یو و همکاران (۲۶) از پاپایین برای هیدرولیز کردن Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) استفاده شد و نتایج آنها نشان داد که هیدرولیزات قادر به حذف رادیکالهای DPPH (۰/۴۵ ±۱۷/۰= IC_{50} میلی گرم بر میلی لیتر) و رادیکالهای هیدروکسیل (۰/۲۹ ±۲/۶۴= IC_{50} میلی گرم بر میلی لیتر) هستند. کیو و همکاران (۱۸) ، پروتئین *Mytilus edulis* را با پاپایین ۱ درصد هیدرولیز کردند که در آن بالاترین فعالیت حذف رادیکالها در هیدرولیزات ۳ ساعته به میزان ۲۸/۷۴ درصد نشان داده شد. مشابه این مطالعات ، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که هیدرولیزات ۴ ساعته پاپایین بیشترین فعالیت را برای حذف رادیکالهای DPPH نشان می دهد.

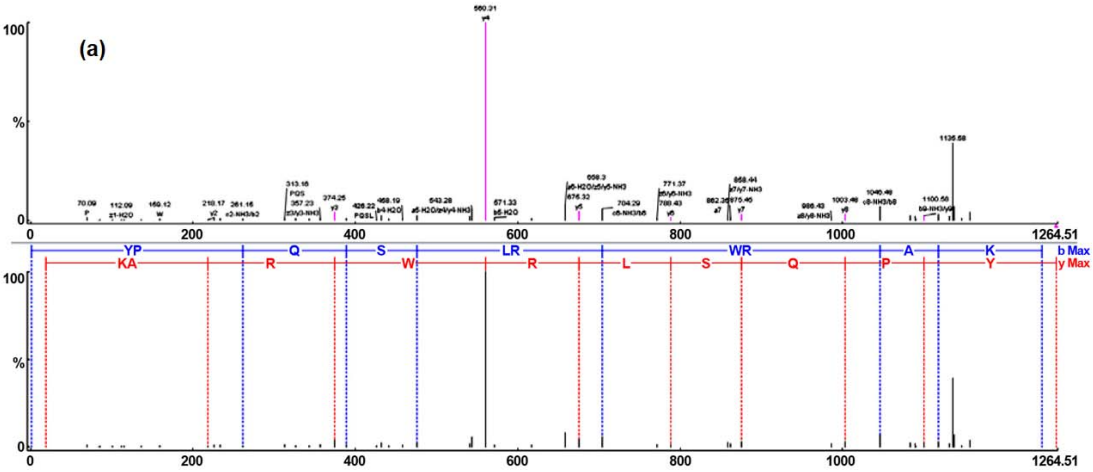
کروماتوگرافی با فاز معکوس و تعیین توالی: مطالعات نشان داده‌اند که پپتیدها با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی دارند. بنابراین، هیدرولیزات ۴ ساعته پاپایین عبورداده شده از غشای با محدودیت وزن مولکولی ۳ کیلو دالتون برای به دست آوردن پپتیدهای مولکولی کوچک انتخاب شدند. هیدرولیزات پاپایین فیلتر شده به ستون C_{18} کروماتوگرافی فاز معکوس تزریق شدند. همان طور که در شکل-۳ و ۴ نشان داده شده است هیدرولیزات به ۱۱ پیک اصلی جداسازی شدند. فرکشنها به طور متوالی شماره‌گذاری شدند. پس از تکرارچندین مرحله کروماتوگرافی ، نمونه-های کافی به دست آمد و سپس فعالیت حذف رادیکالهای DPPH فرکشنهای جدا شده بررسی شد. نتایج نشان داد که فرکشن ۵ با زمان خروج ۴۵/۵ و فعالیت ۴۱ درصد خاصیت آنتی اکسیدانی بالاتری داشت. سایرفرکشنها همگی فعالیتی در محدوده ۲۰ درصد یا کمتر نشان دادند. این فرکشن برای شناسایی توسط طیف سنجی جرمی MALDI-TOF / TOF انتخاب شد. نتایج حاصل از طیف سنجی نشان داد که فرکشن ۵، دارای توالی پپتیدی YPQSLRWRAK (۱۳۰۴/۶ دالتون) می‌باشد که Po-1 نامگذاری شد(**شکل-۵**). تجزیه و تحلیل با استفاده از ابزار ExPASypI / MW (http://wwwexpasy.ch/tools/pi_tool.html) برای این پپتید نقطه ایزوالکتریک ۶/۱۹ را پیش بینی کرد.



شکل ۳- کروماتوگرام RP-HPLC عصاره زیر غشاء هیدرولیزات پاپاین *P. adspersa*.



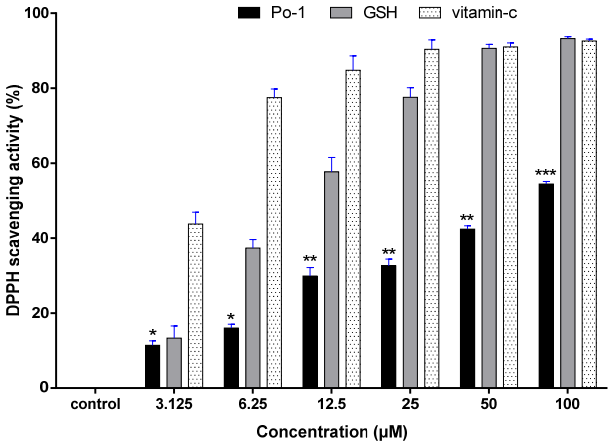
شکل ۴- کروماتوگرام RP-HPLC. پیک ۵ خالص شده با کمک ستون C_{18}.



شکل۵- کروماتوگرام و تفسیر نتایج طیف سنجی جرمی

نتایج آنالیز توالی نشان داد که پپتید Po-1 ، بیشترین شباهت را به DNA-targeting ADP-ribosyltransferase pierisin-1 در پروانه سفید کلم(*Pieris rapae*) با شماره دسترسی (5H6N_A) دارد. در واقع باقی مانده‌های ۸–۵ در این پپتید دارای شباهت ۱۰۰ درصد به این آنزیم در محدوده باقی مانده‌های ۵۷–۴۵ است. در مطالعه‌ای که توسط دانشمند و همکاران انجام شد، به کمک روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا پپتید ۳۱ آمینو اسیدی با فعالیت ضد میکروبی از گیاه عناب (*Ziziphus Jujuba*) ، استخراج شد. بررسی همردیفی این پپتید در پایگاه داده نشان داد که این پپتید بیشترین شباهت را به Snakin-2 دارد؛ ولی با هیچیک از پپتیدهای کشف شده همسانی کامل ندارد (۱).

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی: DPPH یک رادیکال آزاد حاوی نیتروژن پایدار است ، که دارای جذب قوی در ۵۱۷ نانومتر (رنگ بنفش) در محلول اتانولی است. این ماده به طور گسترده‌ای برای اندازه گیری فعالیت اهداکنندگی هیدروژن یا فعالیت رادیکال آزاد ترکیبات آنتی اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفته است(۱۰). نتایج نشان داد که درصد فعالیت پپتید در حذف رادیکال DPPH همراه با افزایش غلظت پپتید، به طور معنی‌داری ($P\leq 0.01$) افزایش یافت (**شکل**–۶) میزان فعالیت آنتی اکسیدانی پپتید در غلظت ۱۰۰ میکرومولار، به ۵۴/۴۱ درصد رسید. همچنین مقادیر IC_{50} برای ویتامین -C و گلوتاتیون احیاء شده(GSH) به عنوان استاندارد و پپتید Po-1 به ترتیب ۳/۲۷ ، ۹/۹۶ و ۷۶/۴۵ میکرومولار) به دست آمد. وانگ و همکاران در سال۲۰۱۲ گزارش کردند که میزان IC_{50} پپتیدهای WDR وPYFNK مشتق شده از هیدرولیزات عضله *Sphyrna lewini* ، در حذف رادیکالهای ABTS به ترتیب، ۰/۳۴ و ۰/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است (۲۴). مطالعات متعددی تأکید کرده‌اند که ترکیب و توالی اسید آمینه بر فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدها تأثیر می‌گذارد(۸).



شکل ۶- فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتید Po-1در حذف رادیکال DPPH. از ویتامین -C و گلوتاتیون احیاء شده(GSH) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

در واقع فعالیت آنتی اکسیدانی در پپتیدها، می‌تواند به دلایل کانفورماسیون، نوع، فراوانی و موقعیت اسیدهای آمینه درتوالی پپتیدی متغیر باشد (۵). وجود اسیدهای آمینه آبگریز از جمله گلایسن، آلانین، والین، لوسین، ایزولوسین، پرولین، فنیل آلانین، متیونین و تریپتوفان بیانگر ظرفیت آنتی اکسیدانی بالاتری است(۳). زهانگ و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که درصد حذف رادیکال DPPH پپتیدهای حاصل از هیدرولیزات پروتئین برنج توسط آنزیمهای پاپایین و کیمو تریپسین در غلظت ۱/۵ میلی گرم بر میلی لیتر، برابر ۴۴/۳۱ درصد و ۳۵/۲۶ درصد بود. نتایج

این محققین نشان داد که علت بالا بودن میزان حذف رادیکال آزاد DPPH پپتیدهای مورد بررسی، در ارتباط با محتوای بالای اسیدهای‌آمینه هیدروفوبی در توالی آنهاست(۲۸). مندیس و همکاران (۲۰۰۵)، دریافتند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی ژلاتین پوست ماهی مرکب، می‌تواند به دلیل نسبت بالای آب‌گریز به آبدوستی در توالی پپتیدی باشد(۱۵). کای و همکاران(۴) سه پپتید از هیدرولیزات پوست ماهی کپور (*Ctenopharyngodon idella*) با توالیهای (PYSFK، GFGPQL و VGGAP)، به دست آوردند که فعالیت آنتی اکسیدان قوی (ABTS، DPPH و رادیکال سوپر اکسید) به نمایش گذاشتند که به دلیل وزن مولکولی پایین و حضور آمینو اسیدهای آبگریز و معطر در توالی آنها بود. اسیدهای آمینه آروماتیک، سبب رساندن پروتونها به رادیکالهایی با کمبود الکترون شده و بدین ترتیب خاصیت حذف رادیکال توسط این قبیل اسیدهای-آمینه افزایش می‌یابد (۱۵). در مطالعه حاضر، فعالیت آنتی-اکسیدانی پپتید، می‌تواند به دلیل توانایی دهندگی پروتون حلقه ایندول دو اسید آمینه تریپتوفان و تیروزین در توالی آن باشد. از سوی دیگر، وجود مقادیر بالای اسیدهای آمینه آبگریز در توالی، دلالت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدPo-1 دارد. داوالوس(۵) و یانگ(۲۵) نشان دادند که آمینو اسید پرولین تمایل به قطع و تغییر ساختار ثانویه مولکول پپتید دارد. این امر ممکن است در دسترس بودن اسیدهای آمینه توالیهای پپتید را افزایش دهد تا به عنوان ترکیب آنتی اکسیدان عمل کند. همچنین داوالوس گزارش داد که موتیفها و توالیهای لوسین/ سرین-لوسین/ ترئونین-لوسین و پرولین-لوسین ، به ویژه در پایانه های N- و C- ، فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری از خود نشان می‌دهند (۵). در مطالعه حاضر ، به نظر می‌رسد وجود اسیدهای آمینه آبگریز لوسین، آرژنین و پرولین در توالی پپتید جدا شده به بهبود توانایی حذف رادیکال DPPH و فعالیت آنتی اکسیدانی پپتید کمک شایانی می‌کند. علاوه بر این ، وجود باقیمانده Pro می‌تواند فعالیت آنتی اکسیدانی این پپتید را تأیید کند.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پپتیدPo-1 استخراجی از هیدرولیزات کرم سفید ریشه *P. adspersa* ، با توالی YPQSLRWRAK دارای فعالیت حذف کنندگی رادیکالهای DPPH و خاصیت آنتی اکسیدانی است که می-تواند به عنوان عوامل محافظت کننده سلول از آسیبهای آنتی‌اکسیدان استفاده شود. بنابراین، پپتید po-1 می‌تواند به عنوان ترکیب طبیعی در طراحی دارو در آینده استفاده شود.

قدردانی و تشکر

نویسندگان از حمایتهای ارائه شده توسط شورای تحقیق و فناوری دانشگاه تربیت مدرس و دانشگاه فردوسی مشهد ، ایران (مورخه۱۳۹۵/۰۳/۲۲) قدردانی می‌کنند.

منابع

۱- دانشمند ف. استخراج و خالص سازی پپتید ضد میکروبی جدید از گیاه عناب .(*Ziziphus Jujuba*) *مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی*. ۲۰۱۴;۲۷(۲):۲۱۱-۲۳

۲- هوشمند ک، آسوده ا. بررسی اثر سمیت پپتید GL-9 بر سلول‌های خونی و حیوانی. *مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی*. ۲۰۱۷;۲۹(۴):۷۳-۴۶۳

3- Beneteau B, Baudin B, Morgant G, Giboudeau J, Baumann FC. (1986) Automated kinetic assay of angiotensin-converting enzyme in serum. *Clin. Chem.*;32(5):884-6.

4- Cai, L., Wu, X., Zhang, Y., Li, X., Ma, S., Li, J. (2015). Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *J .Funct. Foods*, 16: 234-242.

5- Davalos A, Miguel M, Bartolome B, Lopez-Fandino R. (2004) Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *J. Food Prot.*; 67(9): 1939-44.

6- Faruck MO, Yusof F, Chowdhury S. (2016) An overview of antifungal peptides derived from insect. *Peptides*;80:80-8.

7- Göçer H, Gülçin İ, nutrition. (2011) Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): correlation of structure and antioxidant properties. *Int. J. Food Sci. Nutr*.;62(8):821-5.

8- Holmquist B, Bünning P, Riordan JF. (1979) A continuous spectrophotometric assay for angiotensin converting enzyme. *Anal. Biochem*. ;95(2):540-8.

9- Karimi J, Salari E. (2015) Entomopathogenic Nematodes in Iran: *Research and Applied Aspects. Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests*: Springer; p. 451-76.

10- Kim SY, Je JY, Kim SK. (2007) Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *J. Nutr. Biochem*.; 18(1):31-8.

11- Leaves L. (2014) Antioxidant Activity by DPPH Radical Scavenging Method of *Ageratum conyzoides*. *Am. J. Chinese Med*. ;1(4):244-9.

12- Liu Y, Wan S, Liu J, Zou Y, Liao S. (2017) Antioxidant activity and stability study of peptides from enzymatically hydrolyzed male silkmoth. *J. Food Process. Preserv*.; 41(1): e13081.

13- Marqus S, Pirogova E, Piva TJ (2017) Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. *J. Biomed. Sci*.;24(1):21.

14- McGregor DP. (2008) Discovering and improving novel peptide therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol*.;8(5):616-9.

15- Mendis E, Rajapakse N, Byun HG, Kim S. (2005) Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *J. Agric. Food Chem*.;77(17):2166-78.

16- Noori S. (2012) An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. *Sci. Rep*.1(8):1-9.

17- Prior RL, Wu X, Schaich K, chemistry f. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem*.;53(10):4290-302.

18- Qu Y, Xu Y, Wang B, Wang X, Preparation and antioxidant properties of the hydrolysate and frations from *Mytilus edulis* by papain, in: Remote Sensing, Environment and Transportation Engineering (RSETE), 2011 International Conference on, IEEE, 2011, pp. 8403-8406.

19- Rader R, Bartomeus I, Garibaldi LA, Garratt MP, Howlett BG, Winfree R, et al. (2016) Non-bee insects are important contributors to global crop pollination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*;113(1):146-51.

20- Seabrooks L, Hu L. (2017) Insects: an underrepresented resource for the discovery of biologically active natural products. *Acta Pharm. Sinic. B*;7(4):409-26.

21- Schagger H, Von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.* 166: 368-379.

22- Sharma, Sh., Raghvendar, S., Rana, Sh. (2011). Bioactive peptides: a review. *Int. J. Bioautomation* 15, 223-250.

23- Vercruysse L, Smagghe G, Beckers T, Van Camp J. (2009) Antioxidative and ACE inhibitory activities in enzymatic hydrolysates of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis. Food chem.*;114(1):38-43.

24- Wang B, Li ZR, Chi CF, Zhang QH, Luo HYJ. (2012) Preparation and evaluation of antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of *Sphyrna lewini* muscle. *Peptides*,;36(2):240-50.

25- Yang JI, Ho HY, Chu YJ, Chow CJ. (2008) Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. *Food Chem*.;110(1):128-36.

26- You L, Zhao M, Regenstein JM, Ren J, (2011) In vitro antioxidant activity and in vivo anti fatigue effect of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion, *Food chem.* 124: 188-194.

27- Zielińska E, Karaś M, Jakubczyk A. (2017) Antioxidant activity of predigested protein obtained from a range of farmed edible insects. *Int. J. Food. Sci. Technol.* ;52(2):306-12.

28- Zhang W, Xiao S, Samaraweera H, Lee EJ, Ahn DU. (2010) Improving functional value of meat products. *Meat Sci*; 86(1):15-31.

Extraction and identification a novel bioactive peptide from white grub larvae hydrolysate

Khajepour-Zaveh A.[1], Asoodeh A.[2*] and Naderi-Manesh H.[1*]

[1] **Dept. of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran**

[2] **Dept. of Chemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran**

Abstract

Nowadays, bioactive peptides are considered as suitable substitutes for chemical drugs due to diversity proliferation, easy synthesis, no side effects and no accumulation in the kidneys and liver. Insects with huge diversity and success in all habitats are an appropriate source for extracting bioactive peptides. The aim of current study was to extract and purify bioactive peptide from white grub larvae hydrolysate. Bioactive peptides from white grub larvae hydrolysate were produced using papain, pancreatin, proteinase-K and trypsin. The obtained results showed that 4-hour hydrolysate of papain had the most DPPH radical scavenging (21%). This papain hydrolysate was fractionized by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). The most antioxidant fraction with the sequence of YPQSLRWRAK (1304.6 Da, named Po-1) was identified by tandem mass spectrometry. DPPH scavenging activity of synthetic Po-1 peptide at 100 μM reached to 54.41%. The IC_{50} value for DPPH scavenging activity of peptide was 76.45-μM. while, IC_{50} values natural compounds of vitamin-C and reduced glutathione (GSH) were 3.27 and 9.96 μM. In conclusion, our results showed that Po-1 bioactive peptide possesses antioxidant activity that might be used for therapeutic purposes in the future.

Key words: White grub larvae; peptide; high-performance liquid chromatography