مقاله پژوهشی

جداسازی و شناسایی یک پپتید جدید آنتی‌اکسیدانتی از بتاکازئین شیر شتر با پپسین و پانکراتین

مسعود همایونی تبریزی[۱]، احمد آسوده[۲]، هدا شبستریان[۳]

[۱] استادیار، گروه بیوشیمی بیوفیزیک، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

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

[۳] دانشجوی کارشناسی ارشد ، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

نشانی نویسنده مسوول: مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، دانشکده علوم پایه، گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، مسعود همایونی تبریزی

E-mail: mhomayouni6@gmail.com

وصول:۹۳/۵/۲۲، اصلاح:۹۳/۶/۱، پذیرش:۹۳/۸/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: از آنجاکه آنتی‌اکسیدانت‌های سنتزی، دارای اثرات جانبی است، لذا استخراج آنتی‌اکسیدانت‌ها از منابع طبیعی فاقد اثرات جانبی مورد نیاز است. هدف از این تحقیق، شناسایی پپتید حاصل از هیدرولیز آنزیمی β-کازئین شیر شتر با پپسین و پانکراتین است.

مواد و روش‌ها: هیدرولیز آنزیمی پروتئین β-کازئین شیر شتر با استفاده از آنزیم‌های پپسین و پانکراتین انجام‌شد. سپس فرکشن‌ها بااستفاده ازRP-HPLC جداشدند و توالی پپتید با استفاده از اسپکتروفتومتریMALD-TOF شناسایی‌شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانتی پپتید جداشده با روش‌های جذب رادیکال‌های DPPH، ABTS، هیدروکسیل و سوپراکسید و مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید سنجش‌شد.

یافته‌ها: نتایج تعیین توالی نشان‌داد که پپتید خالص‌شده با نام RQ-8 دارای توالی RGLHPVPQ و وزن ملکولی۹۰۳/۴۱ دالتون است. این پپتید اکسیداسیون لینولئیک اسید را، مهار و به‌عنوان جذب‌کننده‌ی رادیکال ۱،۱- دیفنیل-۲- پیکریل ـ هیدرازیل (DPPH)(IC50 = 0.046 mg/ml و۲،۲-آزینو بیس(۳-اتیل بنزوتیازولین ٦- سلفونیک اسید)(ABTS)(IC50 = 0.085 mg/ ml)، سوپراکسید =IC50)($O2^{o-}$) (0.156 mg/ml، و هیدروکسیل (IC50 = 0.021 mg/ml) (OH^{o-}) عمل‌کرده است. علاوه برآن، سنجش‌های فعالیت سلولی نشان‌داد که این پپتیدRQ-8 شناسایی‌شده، هیچ سمیّتی بر روی سلول‌های سرطانی ریه A549 ندارد.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان‌داد که پپتید RQ-8جداشده از پروتئین کازئین شیر شتر، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانتی است.

واژه‌های‌کلیدی: *شیر شتر، پپتید، فعالیت آنتی اکسیدانت*

مقدمه

استرس اکسیداتیو به‌علت عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و واکنش‌های متابولیسمی ایجادمی‌شود. در سلول‌ها، ترکیبات اکسیدانت یا گونه‌های واکنشی اکسیژن (ROS) باید به‌وسیله‌ی سازوکارهای حفاظتی حذف شوند. سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانتی، تحت شرایط طبیعی می‌توانند گونه‌های فعال واکنشی را به-واسطه‌ی روش آنزیماتیک (مانند سوپراکسید دیسموتاز

سیتوزولی و میتوکندریایی، گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز) و آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی (مانند ویتامین‌های آنتی‌اکسیدانتی A، C و E- کوآنزیم‌ها و کوفاکتورها) خنثی‌کنند. بنابراین، سیستم دفاعی آندوژن، بدن را در مقابل رادیکال‌های واکنشی حفظ می‌کند. در شرایط استرس اکسیداتیو تولید ملکول‌های واکنشی با قدرت بالایی مانند: ROS (گونه‌های واکنشی اکسیژن)، رادیکال هیدروکسیل (OH·)، رادیکال پروکسیل (OOR·)، آنیون سوپر اکسید(O2-·) و RNS (گونه‌های واکنشی نیتروژن) مانند پراکسید نیترید (ONOO-) افزایش‌می‌یابد (۱و۲). در انسان استرس اکسیداتیو معمولاً در شروع بیماری‌های مزمن نقش بازی می‌کند و ازاین‌رو، ضرورت-دارد تا آنتی‌اکسیدانت‌های سنتزی و طبیعی تولیدشوند که بتواند از استرس اکسیداتیو و اثرات زیان‌آور آنها جلوگیری‌کنند. استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌های سنتزی برای جلوگیری از اثرات زیان‌بار رایکال‌های آزاد موثرتر است، اما با بروز اثرات جانبی همراه هستند. رویکرد دیگر استفاده از پپتیدهای آنتی‌اکسیدانتی با منشاء طبیعی است که اثرات جانبی کمتری ازخود نشان‌می‌دهند(۳).

پپتیدهای فعال زیستی، پپتیدهای مشتق‌شده‌ی غذایی هستند که فراتر از ارزش غذایی‌شان اثرات فیزیولوژیک و شبه‌هورمونی در بدن دارند. این گونه پپتیدها در شیر، تخم‌مرغ، گوشت و ماهی‌ها و همچنین در گیاهان یافته‌می‌شوند(٤). پپتیدهای فعال زیستی در توالی پروتئین والد خود غیرفعال هستند (پپتیدهای فعال زیستی قطعه‌های پروتئینی خاص غیرفعال با توالی پروتئین پیش-ساز هستند) و می‌توانند به‌وسیله‌ی هیدرولیز آنزیمی درطی هضم معدی روده‌ای یا درطی پردازش غذایی آزادشوند (همانند کامل‌شدن پنیر و تخمیر شیر). پپتیدهای فعال‌زیستی معمولا دارای ۲ تا ۲۰ اسید آمینه می‌باشند(۵). به‌دنبال هضم، پپتیدهای فعال‌زیستی می‌توانند ازطریق روده، وارد گردش خون شوند و اثر سیستماتیک خود را اعمال‌کنند، یا اثری موضعی در مجرای معدی روده‌ای ایجادکنند. خصوصیت ساختاری و ترکیب آمینواسید و توالی این پپتیدها، ممکن‌است نقش‌های متنوعی را، شامل: شبه-افیونی، اتصال مواد معدنی، تعدیل ایمنی، ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانت، ضد انعقادی، کاهش‌دهنده‌ی کلسترول و کاهش‌دهنده‌ی فشار خون بازی‌کنند. بسیاری از پپتیدهای فعال‌زیستی شناخته‌شده، چند عملکردی هستند و می‌توانند بیش ازیک اثر زیستی داشته و حتی به‌عنوان ترکیبات غذاهای فعال یا مواد مغذّی مورداستفاده قرارگیرند. به‌هرحال، پروتئین‌های شیر شتر، می‌توانند به-عنوان منبع اصلی برخی از پپتیدهای فعال‌زیستی عمل‌کنند که تاکنون تحقیقی دراین زمینه انجام‌نشده‌است. هدف از این تحقیق، شناسایی پپتیدآنتی‌اکسیدانتی حاصل از هیدرولیز آنزیمی β-کازئین شیر شتر با پپسین و پانکراتین است(۹ و ۸،۷،٦).

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده دراین پژوهش، شامل آنزیم پپسین و پانکراتین، ترکیب 2,2-Dipheny-l-(DPPH) picrylhydrazyl، فنانترولین، گلوتاتیون احیاءشده، محلول-ABTS2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulphonic acid)، Butylated hydroxyanisole(BHA)، کلریدآهن $FeCl_2$ و نیز تری‌کلرواستیکاسید، اتانول،EDTA و استونیتریلاز بوده که به‌ترتیب از شرکت‌های سیگما ـ آلدریش آمریکا و مرک آلمان خریداری شدند.

تهیه‌ی هیدرولیزات: برای این منظور، در پروتئین β-کازئین شیر شتر با استفاده از آنزیم‌های پپسین و پانکراتین، هضم انجام‌شد(۱۰). عصاره‌ی پروتئین β-کازئین شیر شتردر بافر سدیم فسفات و در pH بهینه‌ی آنزیم ۵ بار رقیق‌سازی‌شد. سپس به پروتئین رقیق‌شده به-نسبت ۱/۲۰ (آنزیم به سوبسترا، وزنی/ وزنی) آنزیم پپسین در pH اپتیمم ۲/۵ اضافه‌شد. دراین لحظه، هیدرولیز پروتئین توسط پپسین شروع‌شد و به‌مدت ۱۲۰ دقیقه در انکوباتور در دمای ^{o}C ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت تا

پروتئین به هیدرولیزات خود تبدیل‌شود. سپس به مخلوط واکنش برای هضم بیشتر آنزیم پانکراتین به‌نسبت ۱/۲۰(وزنی/ وزنی آنزیم به سوبسترا) اضافه‌شد ولی قبل از اضافه‌کردن این آنزیم، pH مخلوط به ۷/۵ رسانده‌شد. پس ازاتمام زمان هیدرولیز، محلول برای ۱۵ دقیقه در آب جوش قرارگرفت تا فعالیت آنزیم متوقف‌شود. سپس سوسپانسیون حاصل در ۸۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) برای ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی به‌عنوان هیدرولیزات جداسازی‌شد. سپس با کمک دستگاه اولترافیلتراسیون و با غشائ ۳۰۰۰ دالتون، پپتیدهای کوچکتر از این محدوده تهیه‌شد. فرایند جداسازی پپتیدها طی چند مرحله صورت‌گرفت. در هر مرحله، برای انجام فرایند کروماتوگرافی بر روی هیدرولیزات، از ستون C-18 مخصوص جداسازی نیمه کمی استفاده‌شد. برای این منظور، دو حلال آب و استونیتریل که حاوی۰/۱٪ تری فلوئورو استیک اسید در هر حلال بودند، موزد استفاده قرارگرفت. همچنین نمونه هر بار با غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در آب، تهیه و به دستگاه تزریق شد. فرایند تفکیک پپتیدها در شیب غلظت متغیری از دو حلال نسبت به زمان صورت‌گرفت. به‌گونه‌ای که درصد ترکیب دو حلال در زمان شروع فرایند تا دقیقه‌ی پنجم، شامل ٪۹۵ آب و ٪۵ استونیتریل بود. این ترکیب طی مدت ٤٠ دقیقه به ٪٦٠ آب ٪٤٠ استونیتریل رسید و سپس طی مدت ۱۵ دقیقه مجدداً به وضعیت اول؛ یعنی ٪۹۵ آب و ٪۵ استونیتریل بازگشت. طی این مدت سرعت جریان حلال مورد استفاده، برابر با ۲ میلی لیتر بر دقیقه بود. فراکشن‌های مختلف پس از جمع‌آوری با فریز درایر خشک شدند.

بررسی قابلیت حذف رادیکالDPPH: این آزمایش با کمی تغییرات در روش وو و همکاران صورت‌گرفت(۱۱). ۰/۵ میلی لیتر محلول DPPH ۰/۱ میلی مولار تهیه‌شده در اتانول ٪۹۵ با ۱۰۰ میکرولیتر محلول پپتید یا استاندارد مخلوط‌شد. محلول حاصل‌شده به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرارگرفت. سپس جذب نمونه‌ها درطول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده‌شد. به‌منظور مقایسه‌ی فعالیت پپتید از ترکیب استاندارد، گلوتاتیون احیاء(GSH) به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان استاندارد استفاده‌شد. برای تعیین مقدار IC_{50}(IC_{50} غلظت مورد نیاز برای مهار ۵۰ درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانتی تعریف‌می‌شود). برای پپتید و ترکیب استاندارد، آزمایش در هشت غلظت مختلف از محلول پپتید و استاندارد صورت‌گرفت. هر آزمایش در سه نوبت، انجام شد و مقادیر میانگین ملاک محاسبات قرارگرفت. درصد فعالیت رادیکال زدایی ازطریق رابطه‌ی ذیل محاسبه شد:

$$\text{درصد جذب رادیکال} = \frac{\text{جذب}_{\text{بلانک}} - \text{جذب}_{\text{واکنش}}}{\text{جذب}_{\text{بلانک}}} \times ۱۰۰$$

در این رابطه، جذب بلانک، نشان‌دهنده‌ی جذب محلول شاهد است که محتوای ۰/۵ میلی‌لیتر محلول DPPH ۰/۱ میلی مولار و۱۰۰ میکرولیتر اتانول ٪۹۵ به‌جای محلول پپتید است و جذب واکنش، نشان‌دهنده‌ی جذب محلول محتوای نمونه‌ی پپتید است.

بررسی قابلیت حذف رادیکال ABTS: این روش هم برای ترکیبات هیدروفیل و هم برای ترکیبات لیپوفیل قابل‌استفاده است. برای انجام این آزمایش، از روش ری و همکاران استفاده‌شد(۱۲). به‌منظور تهیه‌ی محلول رادیکال ABTS،۲میلی‌لیتر ABTS ۷ میلی مولار و ۱ میلی‌لیتر پتاسیم پرسولفات ۲/٤۵ میلی مولار با یکدیگر مخلوط‌گردید و به‌مدت ۱٦ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرارداده‌شد. محلول حاصل با افزودن آب، تا رسیدن به جذب ۰/۷۵٦ درطول موج ۷٤۳ نانومتر رقیق شد. غلظت محلول رقیق‌شده حدود ۰/۵۱٤ میلی مولار بود. سپس۱ میلی لیتر از محلول رقیق‌شده‌ی رادیکال ABTS با ۱۰۰ میکرولیتر محلول پپتید مخلوط‌شد و جذب محلول واکنش تا حدود دقیقه‌ی هفتم؛ یعنی تا زمانی که فعالیت نمونه به‌مقدار بیشینه‌ی خود برسد، پیگیری‌شد.

این آزمایش برای به‌دست‌آوردن IC_{50} در هشت غلظت مختلف از پپتید و ترکیب استاندارد صورت‌گرفت. ترکیب استفاده‌شده‌ی استاندارد در اینجا، ترکیب گلوتاتیون بود. محلول شاهد محتوای ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر به جای محلول پپتید یا استاندارد بود. این آزمایش در سه نوبت انجام‌شد و مقادیر میانگین، ملاک محاسبات قرارگرفت. درصد فعالیت حذف رادیکال از رابطه‌ی ذیل به‌دست‌آمد:

درصد جذب رادیکال = (جذب بلانک − جذب واکنش) / جذب بلانک × ۱۰۰

در این رابطه بلانک نماینده‌ی جذب محلول شاهد و جذب واکنش نشان‌دهنده‌ی جذب محلول نمونه است.

اندازه‌گیری و محاسبه‌ی اثرگذاری پپتید در حذف رادیکال‌های هیدروکسیل $^{\cdot}OH$: دراین آزمایش، رادیکال‌های هیدروکسیل در سیستم فنانترولین/ H_2O_2/EDTA، تولید و حذف آن توسط پپتید اندازه‌گیری‌شد. روش کار به‌صورت ذیل انجام شد :

$$e^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^-$$

فعالیت حذف رادیکال‌های هیدروکسیل با استفاده از روش Lijun و همکاران صورت‌گرفت(۱۱). به‌این ترتیب‌که در ابتدا، مخلوطی از ۶۰۰ میکرولیتر فنانترولین با غلظت ۵ میلی‌مولار، ۶۰۰ میکرولیتر سولفات آهن با غلظت ۵ میلی‌مولار، ۶۰۰ میکرولیتر EDTA با غلظت ۱۵ میلی‌مولار و ۴۰۰ میکرولیتر بافر سدیم فسفات با غلظت ۰/۲ مولار و pH=۷/۴ آماده‌شد، سپس ۶۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ی پپتیدی با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به محلول و درنهایت ۸۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه اضافه‌شد. مخلوط ساخته‌شده به‌مدت ۱ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ ، انکوبه و جذب آن توسط دستگاه طیف‌سنجی UV درناحیه‌ی ۵۳۶ نانومتر اندازه‌گیری‌شد. نتایج حاصل از فعالیت پپتید، توسط فرمول ذیل محاسبه‌شد(۱۳):

درصد فعالیت حذف رادیکال‌های هیدروکسیل $= (A_S - A_0) \times 100 / (A_C - A_0)$

در رابطه‌ی بالا A_S جذب نمونه، A_0جذب محلول شاهد(محلول حاوی آب به‌جای نمونه) و A_Cجذب محلول کنترل در غیاب H_2O_2 است.

سنجش فعالیت جذب رادیکال سوپر اکسیدبا استفاده از روش پونال انجام‌شد(۱۴). ۸۰ میکرولیتر از پپتید یا آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد با ۸۰ میکرولیتر بافر تریس۵۰ میلی مولار pH=۸/۳ به داخل پلیت ۹۶ چاهک ریخته‌شد.۴۰ میکرولیتر از محلول پیروگالول در HCl ۱۰ میلی مولار به هر چاهک اضافه‌گردید. جذب پس از ۴ دقیقه درطول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده‌شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانت در حضور و غیاب پیروگالول و پپتید از رابطه‌ی ذیل محاسبه‌شد:.

درصد جذب رادیکال = (جذب کنترل − جذب واکنش) / جذب کنترل × ۱۰۰

سنجش فعالیت مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید: فعالیت مهار اکسیداسیون اسید چرب لینولئیک اسید پپتید RQ-8، اندازه‌گیری‌شد(۱۵). به‌طورخلاصه، پپتید در ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات۵۰ میلی مولارpH=۷حل شد و ۲/۵ میلی‌لیتر اتانل۹۹/۵ درصدو ۳۲/۵ میکرولیتر لینولئیک اسید به آن اضافه‌شد و حجم نهایی با استفاده از آب مقطر به ۶/۲۵ میلی‌لیتر رسید. محلول در یک لوله‌ی در پیچ‌دار، ریخته و به‌مدت ۷ روز نگهداری با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرارداده‌شد. سپس در زمان‌های مختلف مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول انتخاب‌شد و ۲/۳۵ میلی‌لیتر از اتانول ۷۵٪، ۵۰ میکرولیترآمونیوم تیوسیانات ۳۰٪ و ۵۰ میکرولیتر دی کلرید آهن با غلظت۲۰ میلی‌مولار حل‌شده در اسیدکلریک ۳/۵٪، به آن اضافه‌گردید. پس از ۵ دقیقه جذب محلول در طول موج ۵۰۰ نانومتر ثبت‌شد. هرچه پپتید فعالیت بهتری داشته‌باشد، افزایش جذب کمتر، پیش‌خواهدآمد. دراین آزمایش، از گلوتاتیون به‌جای پپتید، به‌عنوان پپتید استاندارد و از بافر سدیم فسفات، به‌عنوان استاندارد منفی استفاده شد.

سنجش سمیّت: سنجش سمیّت با استفاده از روش موسمان انجام‌شد(۱۶).سلول‌های A549 مورد

استفاده دراین پژوهش از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری‌شد. این سلول‌ها در محیط کشت RPMI حاوی پنیسیلین و استرپتومایسین و سرم جنین گاوی ۱۰ درصد و در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 و۹۵ درصد رطوبت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری‌شد. سلول-ها به میزان 1×10^5 cells/ml در میکرو پلیت ۹۶ خانه ریخته‌شد. سپس سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت پپتید صفر تا یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌مدت ٤٨،٢٤ و٧٢ ساعت انکوبه‌شد. محلول بافر فسفات به‌عنوان کنترل استفاده-گردید. بعد از انکوباسیون محیط کشت دور ریخته‌شد و مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول۳ – (٤و ۵ – دی متیل تیازول ۲– ایل) ۲و ۵– دی فنیل تیازولیوم برمیدMTT به هر چاهک، اضافه و پلیت برای ٤ ساعت در انکوباتور قرارداده شد.پس از گذشت این زمان، محیط کشت وMTT از چاهک، خارج و بلورهای فورمازان تشکیل‌شده در سلول‌های زنده در ۱۵۰ میکرولیتر محلول دی متیل سولفواکساید(DMSO) حل‌شد و محلول بنفش رنگی با درجات رنگ متفاوت آماده‌گردید. شدت رنگ این محلول‌ها که معیاری از تعداد سلول‌های زنده در محیط است، در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA plate reader سنجش‌شد و میزان حیات سلولی با استفاده از معادله‌ی ذیل محاسبه‌گردید:

۱۰۰×جذب.کنترل/(جذب.نمونه–۱)=درصد سمیت

جذب.نمونه=جذب نمونه تیمار شده در ۵۷۰ نانومتر

جذب.کنترل =جذب نمونه سلول بدون تیمار در ۵۷۰ نانومتر

سنجش فعالیت همولیز: فعالیت همولیز پپتید RQ-8 با استفاده از سلول‌های قرمز خونی تازه‌ی فردی از انسان با گروه خونی (O^+) مطالعه شد.۵میلی‌لیتر از خون در۵۰ میکرولیتر EDTA در دور rpm ٤۵۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی (پلاسما)، دور ریخته و سلول‌های قرمز خون با بافر فسفات ۳ بار شسته-شد و درrpm ٤۵۰۰ سانتریفیوژگردید تا اریتروسیت‌ها به-طور کامل از پلاسما جدا شود. سپس فعالیت همولتیک با روش اسپکتروفتومتری انجام‌شد. سرانجام ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات به سلول‌های قرمز خون اضافه‌شد. درانتها، ۱۰ میکرولیتر از پپتید RQ-8 در غلظت‌های۱۲,۵، ۲۵،۵۰، ۱۰۰و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ۱۹۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی اضافه‌شد. مخلوط برای ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری‌شد. سپس نمونه‌ها در دور rpm ٤۰۰۰ برای ۵ دقیقه سانتریفیوژشد. ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول رویی با یک میلی‌لیتر از بافر فسفات رقیق-گردید و هموگلوبین در محلول رویی در ٥٦۰ نانومتر با اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری‌شد. بافر فسفات به‌عنوان کنترل منفی استفاده‌شد(۱۷).

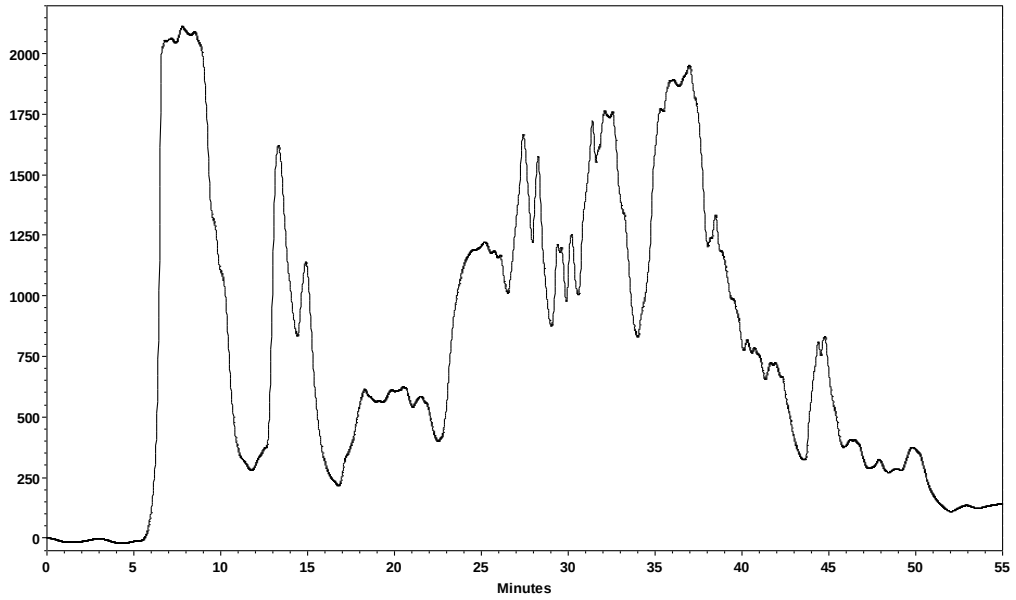
روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: درصد زنده‌ماندن سلول‌ها، با استفاده از نرم‌افزار اکسل محاسبه-گردید. همچنین انحراف معیار و انحراف از میانگین داده-ها و روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها به‌وسیله‌ی نرم-افزارSPSS محاسبه‌شد. به‌منظور مقایسه‌ی بقاع سلول‌های تیمار شده با پپتید و بررسی وجود اختلاف معنادار در نتایج حاصل شده، از نرم‌افزارSPSS و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه(one-way ANOVA) و تست Tukey استفاده شد.

یافته‌ها

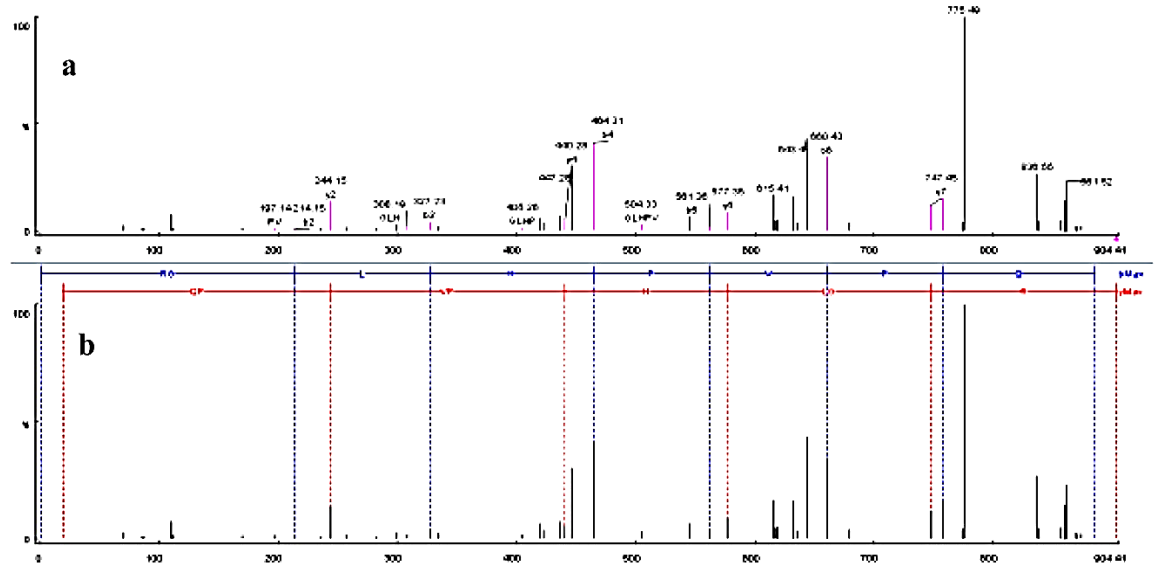
در این پژوهش، پروتئین‌های شیر شتر با استفاده از دو آنزیم پپسینو پانکراتین هیدرولیز شد. هیدرولیزات‌ها با استفاده از روش‌های اولترافیلتراسیونو RP-HPLC جداسازی شدند. یک فراکشن با بیشترین مقدار سطح پیک در کروماتوگرام RP-HPLC دیده شد (شکل.۱). به-منظور دست‌یابی به خلوص بیشتر، نمونه‌ی جمع‌شده از پیک اصلی، مجدداً با روش RP-HPLC با همان شرایط خالص سازی شدند. پپتید خالص با دستگاه اسپکتروفتومتری MALDI-TOF/TOF تعیین توالی شد. آنالیز نتایج طیف‌سنجی جرمی توالی، پپتید RGLHPVPQ (که وزن ملکولی آن۹۰۳/٤۱ دالتون می‌باشد) را برای پپتید

جداشده نشان‌داد. این پپتید به‌اختصار RQ-8 نام‌گذاری‌شد (شکل.۲).

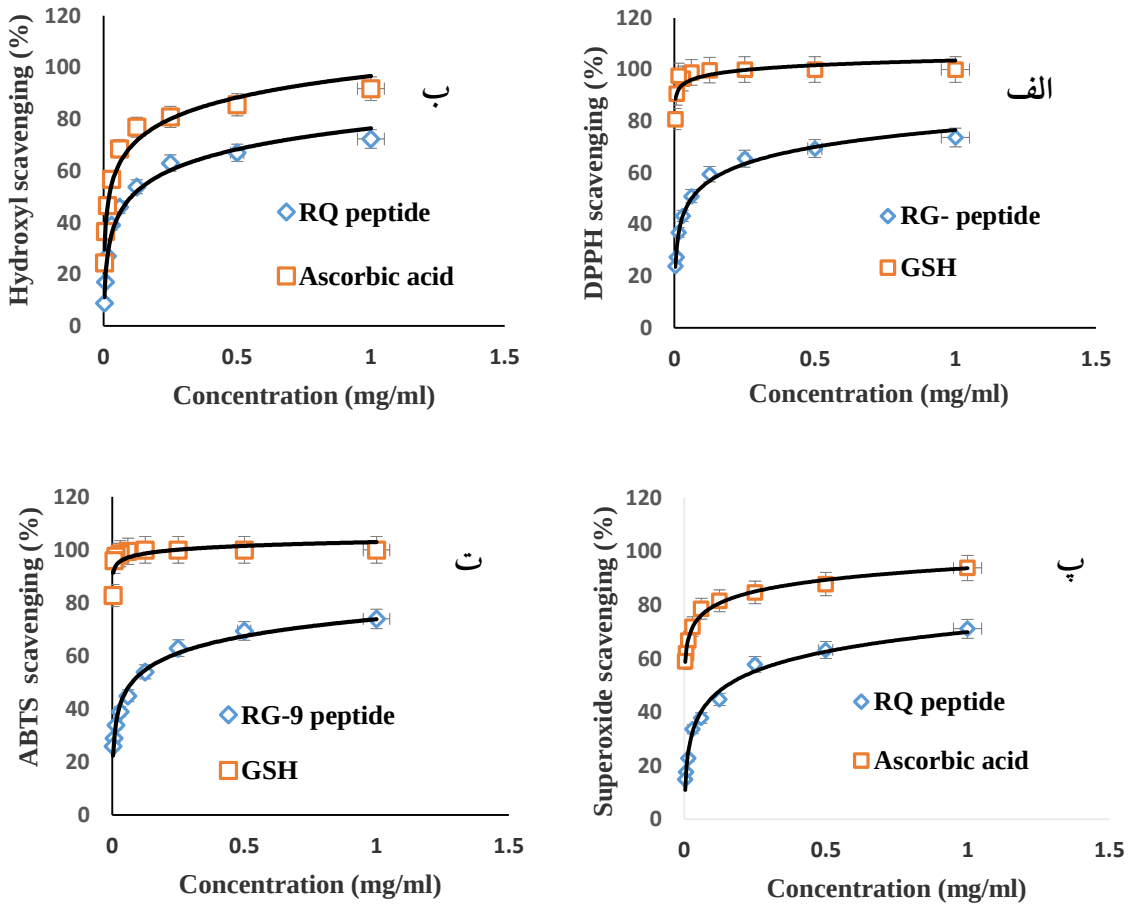
توالی پپتید مورد نظر به‌وسیله‌ی موسسه‌ی "GL Biochem" واقع در شهر شانگهای چین سنتزشد. خصوصیات آنتی‌اکسیدانتی پپتید جداشده از هیدرولیز پروتئین β-کازوئین ارزیابی‌شد. دراین مطالعه، فعالیّت جذب رادیکال‌های DPPH،ABTS هیدروکسیل و سوپراکسید بررسی‌گردید(شکل ۳.الف). فعالیت جذب رادیکال DPPHپپتیدRQ-8 را در مقایسه با گلوتاتیون به‌عنوان استاندارد نشان می‌دهد. فعالیت جذب رادیکال DPPH پپتید با زیادشدن غلظت افزایش‌می‌یابد. فعالیت جذب رادیکال‌های ABTS و هیدروکسیل و سوپر اکسید اندازه‌گیری‌شد و مشابه با آزمایش DPPH با افزایش غلظت پپتید میزان حذف رادیکال‌های مزبور افزایش‌یافت



شکل۱: کروماتوگرام های RP-HPLC هیدرولیزات پروتئین کازوئین شیر شتر با آنزیم های پپسین و پانکراتین. پیک اصلی خارج شده در دقیقه۲۷ (مشخص شده با ستاره) جمع آوری و پس از خالص سازی مجدد، توالی پپتید آن با کمک طیف سنجی جرمی تعیین شد.



شکل ۲: طیف اسپکتروفتومتری جرمی پپتید خالص شده. (a) جرم قطعاتایجاد شده از پپتید اولیه RQ-8، (b) تفسیر نتایج جرمی و تعیین توالی پپتید RQ-8..



شکل۳: فعالیت جذب رادیکالهای (الف) DPPH، (ب) هیدروکسیل، (پ) سوپراکسید، (ت) ABTS.گلوتاتیون (GSH) و اسید آسکوربیک به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند.

(شکل‌های **۳.ب، پ، ت**). میزانIC_{50}(برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتید در تست-های DPPH برابر با ۰/۰٤٦، ABTS برابر با ۰/۰۸۵، هیدروکسیل برابر با ۰/۰۲۱ و سوپراکسید برابر با ۰/۰۱۵٦ به‌دست‌آمد.

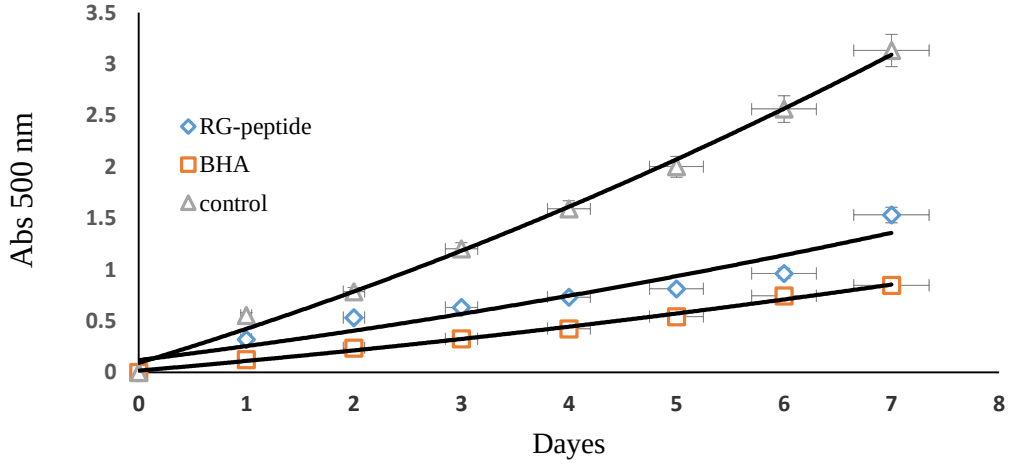
(شکل ٤) مهار اکسیداسیون اسید لینولئیک را نشان‌می‌دهد. پپتید RQ-8 ازتشکیل محصول اکسیداسیون لیپیدی جلوگیری‌کرده است. دوره‌ی مهار اکسیداسیون لیپید با آنتی‌اکسیدانتBHA مقایسه‌شد. میزان فعالیت مهاریBHA بیشتر از پپتید مشاهده‌شد.

تاثیر سمیّت پپتید RQ-8 بر روی سلول‌های A549 و فعالیت همولیز: تاثیر سمیّت پپتید خالص‌شده بر روی سلول‌های A549 انجام‌شد. شکل.۵.الف، نشان‌می-دهد که در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، تنها ۲۰ درصد از حیات سلولی کم‌شده‌است. در غلظت حداقل آزمایش-شده (۳,۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر)۹۰ درصد سلول‌های سرطانی حیات خود را حفظ کردند. حفظ حیات سلولی در مقابل غلظت‌های مختلف پپتیدی، می‌تواند به علت این باشد که این پپتید از یک منبع طبیعی غذایی مانند شیر مشتق شده‌است(**شکل.۵.ب**). فعالیت همولیز، پپتید RQ-8 را بر روی اریتروسیت‌های خون نشان‌می‌دهد. نتایج نشان-داد که پپتید RQ-8 اثر همولتیک بر روی سلول‌های قرمز خون ندارد.

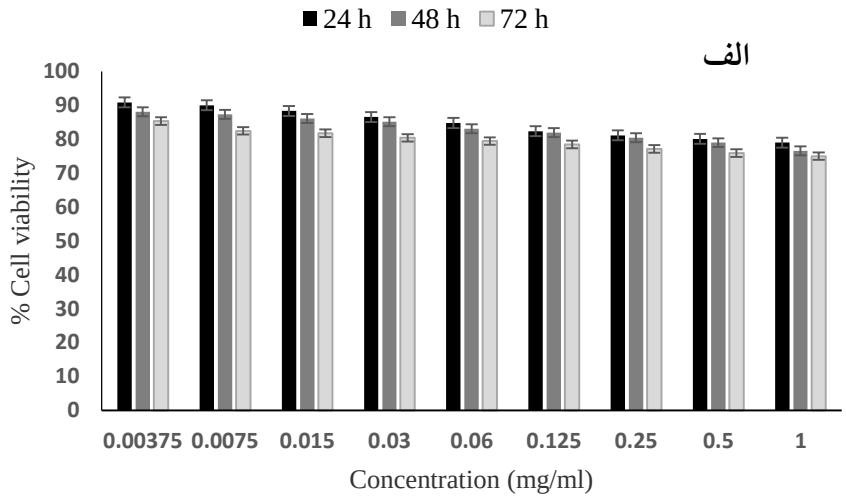
بحث

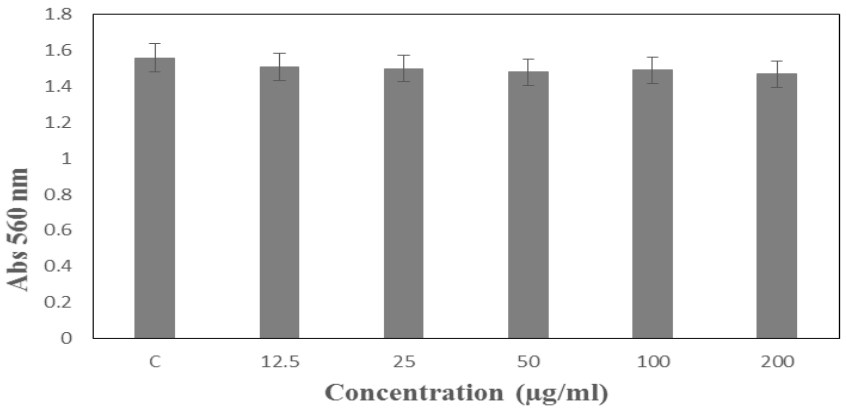
به‌طورکل، پپتیدهای آنتی‌اکسیدانت قادر به عمل

به‌عنوان جاذب رادیکالی، دهنده‌ی پروتون و شلاته‌کننده‌ی یون هستند. توالی پپتیدهای زیستی، فاکتور تعیین‌کننده در فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌هاست. حضور ریشه‌های اسید آمینه‌ای مشخص، به‌مخصوص هیستیدین، تیروزین، تریپتوفان، میتونین، سیستئین و پرولین، به‌طور معناداری با فعالیت خاموش‌کنندگی پپتیدها همبستگی دارند(۱۸و۱۹). پراکسیداسیون لیپید یک مورد اصلی در پیدایش کیفیت تغییر و زوال و بدترشدن فرایند مزه و طعم غذاهاست.



شکل٤: سنجش مهار اکسیداسیون اسید لینولئیک پپتید RQ-8، BHA به عنوان کنترل مثبت و بافر به عنوان کنترل منفی استفاده شد.





شکل٥:(الف) تاثیر پپتید RQ-8 بر قابلیت زیستی سلولهای A549..(ب) فعالیت همولیز پپتید RQ-8 در مقابل اریتروسیت- های انسانی سنجش شد.
سنجش برای همه آزمایشات بصورت ۳ بار تکرار انجام شد.

پراکسیداسیون همچنین در ارزش مغذی غذاها و در پیدایش تعدادی از بیماری‌ها موثر است. در توالی پپتید RQ-8 دو اسید آمینه‌ی غیرقطبی شامل لوسین و گلایسین وجود دارد که در خصوصیت آنتی‌اکسیدانتی پپتید سهیم هستند. با استفاده از اسیدهای چرب غیراشباع دارای چند پیوند دوگانه، مهار پراکسیداسیون درحضور ترکیبات آنتی-اکسیدانت آزمایش‌شد. پپتید RQ-8 توانایی حفاظت از پراکسیداسیون لینولئیک اسید را در یک دوره‌ی ۷ روزه داشت. دارابودن هیدروفوبیسیته بالا برای آنتی‌اکسیدانت‌ها و برای دسترسی به اهداف هیدروفوبیک بسیارمهم است. احتمالاً حضور اسیدهای آمینه‌ی هیدروفوب در توالی پپتید خالص‌شده، ممکن‌است در مهار پراکسیداسیون لیپید با افزایش حلالیّت پپتیدها در لیپید و بنابراین برهم‌کنش آسان‌تر با گونه‌های رادیکال آزاد سهیم باشد. باقی-مانده‌های آمینواسیدی شامل هیستیدین، پرولین، والین، گلایسین و لوسین که در داخل توالی پپتید وجود دارند، احتمالاً در فعالیت جذب رادیکال سهیم هستند. اسیدهای آمینه‌ی آروماتیک، می‌توانند اهداکننده‌ی پروتون یا الکترون به رادیکال‌های مراکز دچار کمبود الکترون موثر باشند. ازاین‌رو، در فعالیت جذب رادیکال موثر هستند(۲۰و۲۱). ترکیبات اسید آمینه هیدرولیزات، مستقیماً با فعالیت‌های زیستی آنها در ارتباط است. هیستیدین یا پپتیدهای حاوی هیستیدین، دارای توانایی به دام‌انداختن رادیکال لیپید به‌دلیل حلقه‌ی ایمیدازول می‌باشند. اسیدهای آمینه‌ی آروماتیک مانند تریپتوفان فعالیت آنتی‌اکسیدانتی بروزمی‌دهند. زیرا می‌توانند به آسانی به رادیکال‌های فاقد الکترون پروتون اهدانمایند. چندین اسیدآمینه مانند لوسین، آرژنین، پرولین، والین و هیستیدین به‌طور کلی به-صورت آنتی‌اکسیدانت لحاظ می‌شوند. همانطور که گفته-شد، پپتید استخراج‌شده در تحقیق ما، حاوی اسید آمینه-های فوق می‌باشد که نشان می‌دهد ممکن‌است فعالیت بالقوه‌ی آنتی‌اکسیدانتی داشته‌باشد. تاکنون، مطالعات فراوانی بر روی نقش آنتی‌اکسیدانی منابع گیاهی و جانوری انجام‌شده‌است. در مطالعه‌ای، اثرات حفاظتی پپتید خالص‌شده از هضم گوارشی صدف خوارکی صورت‌گرفت. دراین تحقیق، هضم گوارشی در شرایط vitroin به کار گرفته شد و یک پپتید آنتی‌اکسیدانتی قوی از هیدرولیز پروتئین‌های صدف خوراکی به‌دست‌آمد. این هیدرولیزات از خلال غشاء اولترافیلتراسیون ۳ کیلودالتون عبورداده‌شد و سپس توسط RP-HPLC خالص‌سازی-گردید. توالی پپتید EKQELKQELEDLL با وزن ملکولی ۱/٦۰ کیلو دالتون به‌دست آمد. فعالیت بالای مهار پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع دارای چند پیوند دوگانه بیشتر از آنتی‌اکسیدانت طبیعی آلفا توکفرول نشان-داد. سنجش جذب رادیکال هیدروکسیل و سوپراکسید انجام‌شد و مقدار IC_{50} ۲۸/۷٦ و ۷۸/۹۷ میکرومولار به ترتیب به‌دست آمد. علاوه بر آن سنجش MTT هیچ سمیّتی بر روی سلول‌های فیبروبلاست جنینی ریه‌ی انسانی (MRC-5) نداشت. این نتایج نشان‌داد که این پپتید فعالیت قوی آنتی‌اکسیدانتی دارد (۲۲).

در مطالعه‌ی دیگری، بررسی خصوصیات آنتی-اکسیدانتی و ضدالتهابی پپتید lunasin برای جلوگیری سلول‌های سرطانی ماکروفاژهای RAW 264.7 صورت-گرفت. استرس اکسیداتیو و التهاب دو فاکتور حیاتی نشان‌داده‌شده در سرطان و بیماری‌های نابودکننده است. دراین مطالعه، نشان داده شده که این پپتید چطور اثر ضد سرطان دارد. پپتید lunasin شامل ٤۳ اسید آمینه‌ی دانه‌ای سویای جدا شده‌است. این پپتید اکسیداسیون لینولئیک را، مهار و به‌عنوان جذب رادیکال ABTS عمل‌کرد. این پپتید همچنین آزادکردن سیتوکین‌های پیش‌برنده‌ی التهاب TNF-α و IL-6 را مهارمی‌کند. درنتیجه، پپتیدهای دارای فعالیت بالای آنتی اکسیدانتی و ضد اتهاب می‌توانند از سرطان جلوگیری‌کنند (۲۳).

مطالعه‌ی جداسازی و شناسایی پپتیدهای آنتی-اکسیدانتی حاصل از هیدرولیز پروتئین کلاژن خوک توسط لی و همکاران صورت گرفت. در این مطالعه،

کلاژن پوست خوک به‌وسیله‌ی پروتئازهای متفاوت هیدرولیز شد و پپتید های آنتی‌اکسیدانتی به‌دست‌آمد. چهار پپتید دارای فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانتی که رادیکال DPPH را، جذب و به‌عنوان شلاته‌کننده‌ی فلزات، عمل و پراکسیداسیون لینولئیک اسید را مهارمی‌کند، وجوددارد. این چهار پپتید توسط سیستم کروماتوگرافی متوالی ابتدا ژل فیلتراسیون، تعویض یونی و HPLC جداشدند. وزن ملکولی و توالی پپتیدهای جداشده توسط دستگاه اسپکترومتری جرمی محاسبه شد. یک پپتیدی دارای فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانتی با توالی RQGA سنتز شد (۲٤).

مطالعه‌ی فعالیت آنتی‌اکسیدانی vitroin و vivoin پپتیدهای جداشده از هیدرولیزات پروتئین‌های عضله‌ی وزغ، نشان‌داد که پپتید خالص‌شده دارای توالی CGRHKTF و وزن ملکولی ۸٦۱/٦ دالتون است. این پپتید به‌عنوان جذب‌کننده‌ی رادیکال DPPH، هیدروکسیل و پراکسیداسیون لیپید و آسیب به DNA را مهارمی‌کند. این پپتید فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی شامل کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در رَت را افزایش داد(۲۵).

پروتئین‌های جداشده‌ی آب پنیر توسط آلکالاز برای زمان‌های ۰/۵، تا ۸ ساعت هیدرولیزشد و مشخص-گردید که نمونه‌ی هیدرولیزاتِ ساعت پنجم، فعالیت قوی‌تری دارد. نمونه‌ی هیدرولیزات ساعت پنجم، توسط ستون سفادکس جی-۱۰ ژل کروماتوگرافی جداسازی‌شد و چهار فرکشن به‌دست‌آمد که متشکل از پپتیدهایی با وزن مولکولی بزرگتر از ٤۰ کیلودالتون، ۲/۸ تا ٤۰ کیلودالتون، ۰/۱ تا ۲/۸ کیلودالتون و کوچکتر از ۰/۱ کیلودالتون بود که فرکشن سوم فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری را نشان داد. درصد فعالیت حذف رادیکال DPPH برای نمونه‌های ساعت پنجم هیدرولیز و فرکشن های یک تا چهار و همچنین آنتی اکسیدان استاندارد آسکوربات به‌ترتیب برابر با ٪۲۱/۳۳، ٪۲۵/۳۳، ٪٤۷/۱۳، ٪۵۸/٦۷، ٪۱٤/۷۳ و ٪۹٦/۳۳ بود. همچنین مقادیر فعالیت حذف رادیکال هیدروکسیل برای نمونه‌های مذکور، به-ترتیب برابر با ٪۲۳/۳۳، ٪۳۵/۰۰، ٪٤۷/۳۳ و ٪٦۵/٦۷، ٪۲۳/۳۳ و ٪۷۵/۳۳ بود(۲٦). در تحقیق، پپتید RQ-8 جداشده از کازئین شیر شتر نشان داد که دارای فعایت آنتی‌اکسیدانتی مشابه با پپتیدهای جداشده از منابع مختلف است.

توسعه‌ی ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی از منابع طبیعی در علوم زیستی و غذایی مهم است. دراین تحقیق، یک پپتید آنتی‌اکسیدانتی از پروتئینβ-کازوئین شیر شتر با هضم آنزیم‌های پپسین و پانکراتین شناسایی‌کردیم. پپتید آنتی‌اکسیدانتی RQ-8 با قدرت بالای جذب رادیکال‌های آزاد، توانست اکسیداسیون لیپیدها را نیز مهارکند. با این نتایج، پیشنهادمی‌شود که این پپتید ممکن است نویددهنده‌ی آنتی‌اکسیدانت برای مکمل‌های غذایی باشد. هرچند مطالعات بیشتر در سیستم in vivo ضروری است.

تشکر و قدر دانی

این مقاله، حاصل طرح تحت عنوان " استخراج و خالص‌سازی پپتیدهای فعال زیستی از شیرشتر با استفاده از آنزیم‌های پروتئاز و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی آنها" ست که درسال ۱۳۹۲به تصویب‌رسیده و با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد اجراشده‌است. بدین-وسیله نویسندگان مقاله از معاون محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد که در جهت فراهم‌آوردن امکانات این مطالعه همکاری لازم را مبذول داشتند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Zhong S, Ma C, Lin YC, Luo Y. Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (Hypophthalmichthys molitrix) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry. Food Chem. 2011;126(4):1636-42.
2. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. Free Radic Res. 2006;40(12):1250-8.

3. Li Y-W, Li B. Characterization of structure–antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using QSAR models: Key sequence positions and their amino acid properties. J Theor Biol. 2013;318:29-43.
4. Taheri A, Sabeena Farvin KH, Jacobsen C, Baron CP. Antioxidant activities and functional properties of protein and peptide fractions isolated from salted herring brine. Food Chem. 2014;142:318-26.
5. De Gobba C, Espejo-Carpio FJ, Skibsted LH, Otte J. Antioxidant peptides from goat milk protein fractions hydrolysed by two commercial proteases.Int Dairy J.2013l; 96(7):4242-51.
6. Li Z, Jiang A, Yue T, Wang J, Wang Y, Su J. Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates. J dairy Sci. 2013;96(7):4242-51.
7. Hernández-Ledesma B, Quirós A, Amigo L, Recio I. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. Int Dairy J. 2007;17(1):42-9.
8. Puchalska P, Marina ML, Garcia MC. Isolation and identification of antioxidant peptides from commercial soybean-based infant formulas. Food Chem. 2014;148:147-54.
9. Peng X, Xiong YL, Kong B. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. Food Chem. 2009;113(1):196-201.
10. Hernandez-Ledesma B, Amigo L, Recio I, Bartolome B. ACE-inhibitory and radical-scavenging activity of peptides derived from beta-lactoglobulin f(19-25). Interactions with ascorbic acid. J Agric Food Chem. 2007;55(9):3392-7.
11. Hernandez-Ledesma B, Davalos A, Bartolome B, Amigo L. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. J Agric Food Chem. 2005;53(3):588-93.
12. Castro MM, Fandiño RLA, Sanchez MIR, Gonzalez MMR, De Artiñano AA. Bioactive peptides derived from the proteins of egg white by means of enzymatic hydrolysis. 2012;Patent US8227207 B2.
13. Saiga A, Tanabe S, Nishimura T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. J Agric Food Chem. 2003;51(12):3661-7.
14. Liu Q, Kong B, Xiong YL, Xia X. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. Food Chem. 2010;118(2):403-10.
15. Sila A, Sayari N, Balti R, Martinez-Alvarez O, Nedjar-Arroume N, Moncef N, et al. Biochemical and antioxidant properties of peptidic fraction of carotenoproteins generated from shrimp by-products by enzymatic hydrolysis. Food Chem. 2014;148:445-52.
16. Byun H-G, Lee JK, Park HG, Jeon J-K, Kim S-K. Antioxidant peptides isolated from the marine rotifer, Brachionus rotundiformis. Process Biochem. 2009;44(8):842-6.
17. Rival SG, Boeriu CG, Wichers HJ. Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. J Agric Food Chem. 2001;49(1):295-302.
18. Yousef MI. Aluminium-induced changes in hemato-biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: protective role of ascorbic acid. Toxicology. 2004;199(1):47-57.
19. Salami M, Yousefi R, Ehsani MR, Razavi SH, Chobert J-M, Haertlé T, et al. Enzymatic digestion and antioxidant activity of the native and molten globule states of camel α-lactalbumin: Possible significance for use in infant formula. Int Dairy J. 2009;19(9):518-23.
20. Quiros A, del Mar Contreras M, Ramos M, Amigo L, Recio I. Stability to gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of beta-casein-peptides with antihypertensive properties. Peptides. 2009;30(10):1848-53.
21. Haenen HEMG, Bleijlevens E, Elzerman H, Temmink JHM, Koeman JH, Van Bladeren PJ. Cytotoxicity of 2-tert-butyl hydroquinone glutathione conjugates after apical and basolateral exposure of rat renal proximal tubular cell monolayers. Toxicol in Vitro. 1996;10(2):141-8.
22. Bougatef A, Nedjar-Arroume N, Manni L, Ravallec R, Barkia A, Guillochon D, et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (Sardinella aurita) by-products proteins. Food Chem.2010; 118(3): 559-65.
23. Sun J, Yu J, Zhang P-C, Tang F, Yue Y-D, Yang Y-N, et al. Isolation and Identification of Lignans from Caulis Bambusae in Taenia with Antioxidant Properties. J Agric Food Chem. 2013;61(19):4556-62.
24. Li B, Chen F, Wang X, Ji B, Wu Y. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry.Food Chem. 2007;102(4):1135-43.
25. Mendis E, Rajapakse N, Byun HG, Kim SK. Investigation of jumbo squid (Dosidicus gigas) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. Life Sci. 2005;77(17):2166-78.

Isolation and identification of a new antioxidant peptide from casein camelmilk using pepsin and pancreatin

Masoud Homayouni-Tabrizi.,
Department of Biochemistry and Biophysics, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Ahmad Asoodeh.,
Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Hoda Shabestarian.,
Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received:13/08/2014**, Revised:**23/08/2014**, Accepted:**02/11/2014

Corresponding author:
Masoud Homayouni-Tabrizi,
Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
E-mail:
mhomayouni6@gmail.com

Abstract

Background & objective: Due to the side effects of synthetic antioxidants, bioactive agents derived from natural sources are of great importance. The purpose of this study was to identify and characterize an antioxidant peptide derived from enzymatic hydrolysis of β-casein in camel milk, using pepsin and pancreatin.

Materials and Methods: Enzymatic hydrolysis of camel milk had accomplished using pepsin and pancreatin. The hydrolysate was fractioned using RP-HPLC and the peptide of interest was identified with MALD-TOF/TOF technique. Antioxidant activity of isolated peptide was measured by the use of radical scavenging DPPH, ABTS, hydroxyl and superoxide and inhibition of linoleic acid oxidation.

Results: The results of sequencing showed that a purified peptide, called RQ-8, has the sequence of RGLHPVPQ with molecular weight of 903.41 Da. This peptide inhibited oxidation of linoleic acid and also had scavenging activity against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (IC_{50}=0.046 mg/ml), 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazo-line-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) (IC_{50} = 0.085 mg/ml), superoxide ($O_2^{\cdot-}$) (IC_{50} = 0.156 mg/ml) and hydroxyl ($OH^{\cdot-}$) (IC_{50} = 0.021 mg/ml) radicals. In addition, cellular activity assays showed that the RQ-8 peptide had no toxicity on A549 lung cancer cell line.

Conclusion: Results indicated that the peptide RQ-8 isolated from camel milk β-casein protein has a strong antioxidant activity.

Keywords: *Camel milk, Peptide, Antioxidant activity*