



مقاله علمی - پژوهشی:

مطالعه فعالیت ضد ویروسی پتیدهای زیست فعال مستخرج از خیار دریایی سیاه (*Holothuria leucospilota*) علیه ویروس های *Herpes simplex* (نوع ۱ و ۲)، *Dengue* و *Chikungunya*

رضا صفری*^۱، زهرا یعقوب زاده^۱، هادی غفاری^۲، سهیل ریحانی پول^۳

*safari1351@gmail.com

۱- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج

کشاورزی، ساری، ایران

۲- مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۳- گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۱

چکیده

با توجه به وجود نگرانی‌ها در زمینه استفاده از ترکیبات ضد ویروسی صناعی یا شیمیایی در صنایع داروسازی، توجه به منابعی با منشأ طبیعی دارای فعالیت ضد ویروسی، ضروری به نظر می‌رسد. خیارهای دریایی یکی از این منابع هستند که خواص فیزیولوژیک متعدد آنها در جوامع علمی مورد بحث است. هدف تحقیق حاضر نیز تولید پتیدهای زیست فعال از *Holothuria leucospilota* با استفاده از دو آنزیم میکروبی آلکالاز و فلاورزایم و ارزیابی فعالیت ضد ویروسی آنها علیه ویروس های *Herpes simplex* (نوع ۱ و ۲)، *Dengue* و *Chikungunya* بود. نتایج نشان داد، بافت خیار دریایی دارای حدود ۱۳ درصد پروتئین است که این رقم در پودرهای آبکافتی حاصل به بیش از ۶۷ درصد رسید. میزان پروتئین و درجه آبکافت در پودر آبکافتی تولیدی با استفاده از آنزیم آلکالاز (به ترتیب ۷۱/۵۸±۰/۱۶ و ۴۸/۳۷±۰/۳ درصد) بیشتر از پودر تولیدی با فلاورزایم (به ترتیب ۶۷/۸۸±۰/۲۶ و ۴۱/۴۲±۰/۶ درصد) بود ($p < 0.05$). در ادامه مشخص شد، هر دو نوع پتید تولیدی در هر دو غلظت ۴ و ۵ میلی گرم بر میلی لیتر دارای خواص ضد ویروسی هستند. در این تحقیق، نوع آنزیم مصرفی جهت تولید پتیدهای زیست فعال و غلظت پتیدها بر فعالیت ضد ویروسی آنها اثر معنی داری داشت. پتیدهای تولیدی با استفاده از آنزیم آلکالاز به صورت معنی داری فعالیت ضد ویروسی بیشتری علیه ویروس های مورد مطالعه داشتند، ضمن این که افزایش غلظت پتیدها از ۴ به ۵ میلی گرم بر میلی لیتر منجر به افزایش معنی دار فعالیت ضد ویروسی آنها نیز گردید ($p < 0.05$). در بین ویروس های مورد بررسی، *Herpes simplex* (نوع ۱) و ویروس *Dengue* به ترتیب مقاوم ترین و حساس ترین ویروس ها بودند ($p < 0.05$). بنابر نتایج تحقیق حاضر، پتیدهای زیست فعال استخراجی از خیار دریایی دارای پتانسیل استفاده در صنایع داروسازی به عنوان یک ترکیب ضد ویروس با منشأ طبیعی هستند، ولی با وجود این انجام آزمایش های تکمیلی به منظور ارزیابی اثرات سمیت احتمالی آنها ضروری است.

لغات کلیدی: خیار دریایی، آلکالاز، فلاورزایم، پتیدهای زیست فعال، فعالیت ضد ویروسی، ویروس های *Herpes*

*نویسنده مسئول

مقدمه

در دهه‌های اخیر، تولیدات طبیعی دریایی دارای جذابیت جهانی برای توسعه محصولات دارویی مختلف در سراسر جهان شده‌اند. این تولیدات طبیعی تحت عنوان ترکیبات فعال، غالباً با استفاده از روش‌های خاصی از بافت آبزیان یا ضایعات حاصل از فراوری و بسته‌بندی آنها ایجاد می‌شوند و برای اهداف غذایی و دارویی در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. اگر هدف، تولید ماده‌ای فعال یا محصولی جهت استفاده در صنایع غذایی انسان، دام، طیور و آبزیان باشد، معمولاً از ضایعات آبزیان به عنوان ماده اولیه استفاده می‌شود. پروتئین‌های آبکافتی حاوی پپتیدهای زیست‌فعال (Reyhani Poul et al., 2017)، سیلوی بیولوژیک¹ (Safari et al., 2021)، ژلاتین (Abuei et al., 2016)، روغن (Reyhani Poul et al., 2018)، و آنزیم (Anoushe et al., 2014) هستند. علت استفاده از ماده اولیه ضایعات جهت تولید مواد مذکور، قیمت پائین آنها و تولید محصولی با ارزش افزوده بالاست، اما اگر هدف تولید موادی با خواص دارویی خاص باشد، می‌توان مستقیماً از بافت آبزیان (نه ضایعات آنها) نیز استفاده کرد، البته تا جایی‌که این کار توجیه اقتصادی داشته باشد.

یکی از آبزیانی که خواص دارویی و درمانی آنها از گذشته بسیار دور تأیید و در برخی از کشورها بدین منظور از آنها استفاده می‌شود، خیار دریایی است. خیارهای دریایی گروه بزرگی از آبزیان را تشکیل می‌دهند و از نظر رده‌بندی جزو راسته خارپوستان محسوب می‌شوند. این جاندار بدنی چرم مانند دارد و بیشتر در کف دریاها یا در مناطق بین جزر و مدی دریاها زندگی می‌کند. خیارهای دریایی تازه یا خشک شده، قرن‌هاست که یک غذای آسیایی لذیذ است و در فرمولاسیون داروهای سنتی در شرق آسیا برای درمان آسم، فشارخون بالا، رماتیسم و کم‌خونی در انسان نیز استفاده می‌شوند (Zhang et al., 2007). استفاده درمانی از خیار دریایی یک سنت قدیمی مردم چین است و به ۵۰۰ سال قبل بر می‌گردد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که ترکیبات (عصاره‌ها) استخراجی از خیار دریایی دارای خواص سمیت سلولی، ضد اکسیدانی، ضد ویروسی، ضد تومور، ضد سرطان و

ضد بارداری هستند و در صنعت داروسازی کاربرد گسترده‌ای دارند (Zhang et al., 2010; Bondaroff, 2021). دلیل وجود این خواص در خیار دریایی را می‌توان به حضور موادی با ساختار شیمیایی گلیگوترپنوئید²، کندروکتین سولفات³، گلوکز آمینوگلیکان، پلی ساکارید سولفاته، گلیکوپروتئین، گلیکواسفنگولیپید و اسیدهای چرب ضروری نسبت داد (Bordbar et al., 2011). یکی از ترکیبات فعالی که می‌توان از خیار دریایی استخراج کرد، پپتیدهای زیست‌فعال هستند. این پپتیدها دارای ۲۰-۲ اسید آمینه و حاصل آبکافت شیمیایی یا بیوشیمیایی این جانداران هستند. در فرایند آبکافت بیوشیمیایی، تولید این پپتیدها با استفاده از آنزیم‌های گیاهی (برومولین)، حیوانی (پپسین، تریپسین، کیموتریپسین) و میکروبی (آلکالاز، فلاورزایم، نئوتراز، پروتئامکس) انجام می‌شود (Reyhani Poul et al., 2017). پپتیدهای زیست‌فعال علاوه بر کارایی در صنایع غذایی، به عنوان امولسیون کننده، کف‌زا و آنتی‌اکسیدان (Reyhani Poul et al., 2018)، با مصرف انسان از آنها اثرات فیزیولوژیک خاصی (مانند تنظیم‌کنندگی فشار خون، تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی، کاهندگی کلسترول و اثرات ضد میکروبی) بر بدن اعمال می‌کنند (Sun et al., 2004; Jia et al., 2010).

تب Dengue عفونتی است که *Dengue virus* آن را ایجاد می‌کند. پشه‌ها عوامل منتقل‌کننده (یا پخش‌کننده) این ویروس هستند. تب Dengue به عنوان «تب استخوان شکن» نیز شناخته می‌شود، زیرا به دلیل درد شدید حاصل از آن، بیمار تصور می‌کند که استخوان‌هایش در حال شکستن هستند. برخی نشانه‌های تب Dengue شامل تب، سردرد، حساسیت‌های پوستی مشابه سرخک و درد در ماهیچه‌ها و مفاصل است. ممکن است تب Dengue در تعداد کمی از بیماران به یکی از دو گونه خطرناک و کشنده تبدیل شود. گونه اول تب هموراژیک دنگی است که باعث خونریزی، ترشح مایعات به بیرون از عروق خونی (رگ‌های حامل خون) و کاهش پلاکت‌های خون (عامل لخته شدن خون) می‌شود. گونه دوم سندروم شوک دنگی است که باعث افت فشار

² Glycoterpenoide³ Chondroitin sulfate¹ Biologic Sylage

روش‌ها

تجزیه و تحلیل شیمیایی بافت خیار دریایی قبل از

شروع آزمایش‌ها و بعد از آبکافت آنزیمی

آنالیز بافت شامل اندازه‌گیری رطوبت، خاکستر، پروتئین و چربی بر اساس روش استاندارد صورت گرفت (AOAC, 2005). جهت تعیین میزان رطوبت، ۵ گرم از نمونه تا زمانی که وزن آن ثابت شود، در آون ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای اندازه‌گیری خاکستر، ۰/۵ گرم از نمونه به مدت ۴۸ ساعت در آون ۶۵ درجه سانتی‌گراد و سپس درون بوتله چینی در کوره الکتریکی و در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۵ ساعت قرار گرفت تا سوزانده شود و خاکستر باقی بماند. اندازه‌گیری پروتئین کل به شیوه کج‌دال با استفاده از ضریب تبدیل ۶/۲۵ صورت گرفت. چربی کل به شیوه استخراج با کلروفرم/متانول اندازه‌گیری شد (Liu et al., 2021).

آبکافت آنزیمی

از دو آنزیم آلکالاز و فلاورزایم به طور مجزا جهت انجام فرایند آبکافت استفاده گردید (Ovissipour et al., 2010). نسبت ماده اولیه به بافر فسفات جهت آبکافت ۲ به ۱، pH برای دو آنزیم به ترتیب ۸/۵ و ۷/۵ و دما و زمان برای هر دو آنزیم نیز ۵۵ درجه سانتی‌گراد و ۳ ساعت در نظر گرفته شد بر اساس مطالعات Safari و همکاران (۲۰۱۱) بر ضایعات ماهی، آنزیم آلکالاز در pH ۸/۵، دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۳ ساعت و برای آنزیم فلاورزایم در pH ۷/۵، دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۳ ساعت دارای بیشترین بازده بوده است (Safari et al., 2011). حاصل فرایند آبکافت، دو نوع پودر آبکافتی بود که جهت سنجش درجه آبکافت آنها از روش Hoyle و Merritt (۱۹۹۴) استفاده شد. بدین صورت که بعد از پایان فرایند آبکافت (۱۸۰ دقیقه)، محلول تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) ۲۰ درصد با نسبت برابر به مایع رویی (سوپرناتانت) افزوده شد و محلول حاصل با دور ۶۷۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس نیتروژن موجود در سوپرناتانت جدید به روش بیورت (Doyle, 2023) سنجیده شد. درجه

شدید می‌شود. ویروس *Dengue virus* چهار ژنوتایپ متفاوت دارد.

Chikungunya بیماری عفونت ناشی از *virus* *Chikungunya* است که از طریق پشه به افراد منتقل می‌شود. علائم شامل تب و درد در مفاصل است.

پپتیدهای زیست فعال بر اساس وزن مولکولی، دارای عملکردهای متفاوت بوده و مطالعات نشان داده است که پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضدسرطانی بالاتری هستند (Yaghoubzadeh et al., 2020).

از آنجایی که استفاده از ترکیبات ضد ویروسی شیمیایی یا صنایع همواره نگرانی و عوارضی در بیماران ایجاد می‌کند (این گروه از داروها باعث بروز عوارض گوارشی، عصبی، پوستی، عضلانی و استخوانی، کبدی، خونی و ایمنی در انسان می‌شوند و جزو داروهای جهش‌زا هستند و باعث بروز سرطان در درازمدت می‌شوند). لذا، در تحقیق حاضر فعالیت ضدویروسی پپتیدهای زیست فعال استخراجی از خیار دریایی با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم مورد ارزیابی قرار گرفت تا به این طریق ترکیبات طبیعی ضد ویروس شناسایی شوند.

مواد و روش کار

مواد

کارشناسان پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، خیار دریایی *Holothuria leucospilota* را تهیه کرده (به تعداد ۱۰ عدد و با میانگین وزنی 12 ± 300 گرم) و در ۴۰- درجه سانتی‌گراد منجمد کرده و سپس در مجاورت یخ خشک (نسبت ۱ خیار دریایی ۲ یخ خشک) به آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی دریای خزر انتقال دادند. پس از انجمادزدایی، نمونه‌ها به طور کامل چرخ شدند و برای مراحل بعدی آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. آنزیم‌های مورد استفاده در تحقیق حاضر، آنزیم‌های میکروبی آلکالاز و فلاورزایم بوده که از نمایندگی شرکت Novosim (دانمارک) تهیه شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آبکافت فرایند از رابطه ذیل محاسبه گردید:

$$100 \times (\text{نیتروژن کل نمونه} / \text{نیتروژن موجود در محلول } 10 \text{ درصد تری کلرواستیک اسید}) = \text{درجه آبکافت (درصد)}$$

FBS، ۱۰۰ واحد در میلی لیتر آنتی بیوتیک استرپتومایسین^۱ و پنی سیلین^۲ رشد و تکثیر داده شدند (Huang et al., 2013; Farshadpour et al., 2014).

شمارش و آماده سازی سلول ها

پس از رشد مناسب سلول های ویروسی مورد مطالعه و فراهم آمدن تعداد مناسبی از آن برای انجام تست، ابتدا سلول ها پاساژ داده شده، سپس با استفاده از لام نتوبار زیر میکروسکوپ شمارش شدند. برای انجام آزمایش ها، تعداد سلول مورد نظر ۱۰۰۰۰۰ سلول در میلی لیتر در نظر گرفته شد. برای تخمین تعداد سلول های زنده، ۱ میلی لیتر از سلول ها بر روی لام نتوبار قرار داده شده و با استفاده از تریپان بلو رنگ آمیزی شدند. سلول های مرده با این روش به رنگ آبی و تیره درآمدند و قابل تشخیص از سلول های زنده بودند. برای انجام صحیح آزمایش بایستی تعداد سلول های زنده بالای ۹۰ درصد تعداد کل سلول ها را تشکیل دهند که در آزمایش تحقیق حاضر این رقم بالای ۹۸ درصد بود (Huang et al., 2013; Farshadpour et al., 2014).

ارزیابی خواص ضد ویروسی دو غلظت از پروتئین آبکافت شده (کمتر از ۳۰ کیلو دالتون) خیار دریایی با استفاده از خوانشگر ELISA

برای انجام آزمایش ELISA که به روش ساندویچ صورت گرفت، تعداد ۱۰۰۰ سلول در هر یک از چاهک های پلیت ۹۶ تایی کشت داده و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر محیط کشت کامل درون هر چاهک ریخته شد و به مدت ۱ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت تا سلول ها به کف پلیت چسبیده و پایدار شوند. سپس سوسپانسیون حل شده در محیط کشت با رقت های ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به چاهک اول اضافه شد. در مرحله بعد، رقت دهی

برای رسم منحنی استاندارد و به دست آوردن معادله دستگاه اسپکتروفتومتر از سرم آلبومین گاوی به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد.

تهیه پپتیدهای زیست فعال با وزن مولکولی کمتر از ۳۰ کیلو دالتون

جهت دستیابی به پروتئین محلول شفاف، نمونه در ۷۰۰۰g به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفوژ و پس از آن لایه مربوط به پروتئین محلول از سایرین جدا و جهت انجام آزمایش های تکمیلی شامل وزن مولکولی و خواص ضد ویروسی در دمای انجماد نگهداری شد. نمونه های آبکافتی پس از فیلتراسیون با آمیکون ۳۰ و جدا نمودن فراکشن صاف شده، از نظر وزن مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفتند. از ویژگی های این صافی، عبور دادن اجزای پروتئینی کمتر از ۳۰ دالتون است و با این روش می توان به حجم بیشتری از پپتیدهای زیر ۳۰ کیلو دالتون دست یافت. پس از سانتریفوژ نمونه ها در دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد، دو جزء از پروتئین وجود خواهند داشت. بدین ترتیب، نمونه های جمع شده در زیر فیلتر، حاوی پروتئین های کمتر از ۳۰ کیلو دالتون و نمونه های جمع شده در بالای فیلتر، حاوی پروتئین های بالای ۳۰ کیلو دالتون هستند (Wang et al., 2017).

بررسی اثرات ضد ویروسی

تهیه رده های ویروسی: جهت ارزیابی خواص ضد ویروسی پپتیدهای استخراجی، نمونه ها به آزمایشگاه ویروس شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه UM (مالزی) ارسال شد. غلظت های مورد نظر برای آزمایش های ویروس شناسی ۴ و ۵ میلی گرم در میلی لیتر بود. ویروس های مورد بررسی شامل *Herpes*، *Chikungunya virus*، *Dengue virus*، *simplex* (HSV-1, HSV-2) بودند. رده های سلولی مورد مطالعه در محیط کشت RPMI 1640 به همراه ۱۰٪ سرم

¹ Streptomycin

² Penicillin

روس تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

کلیه داده‌ها در نرم افزار Excel (ویرایش ۲۰۱۰) ثبت و محاسبه با IC₅₀ با سنجش رگرسیون انجام شد. میانگین و انحراف از معیار به کمک نرم افزار SPSS₁₉ و نیز تفاوت میانگین بین گروه‌های تیماری از طریق آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) انجام شد. به منظور مقایسه واریانس‌ها و ارزیابی معنی‌دار بودن داده‌ها، از آزمون دانکن استفاده گردید.

نتایج

ترکیب شیمیایی ماده اولیه و پودرهای آبکافتی حاصل
در جدول ۱ ترکیب شیمیایی خیار دریایی و پروتئین‌های (پودرهای آبکافتی) استخراجی از آنها ارائه شده است. با توجه به جدول، بافت خیار دریایی حاوی ۱۳/۱۲ درصد پروتئین بود. با انجام عملیات آبکافت و جداسازی پروتئین‌ها، پودرهای حاصل بیشتر از ۶۷ درصد پروتئین داشتند، ضمن این‌که میزان پروتئین در پودر آبکافتی با آنزیم آلکالاز به صورت معنی‌داری بیشتر از پودر آبکافتی با فلاورزایم بود ($p < 0.05$). پودرهای تولیدی از نظر میزان چربی و خاکستر مقادیر تقریباً برابری ارائه کردند ($p > 0.05$). اما میزان خاکستر در پودر آبکافتی با فلاورزایم بیشتر از پودر آبکافتی با آلکالاز بود ($p < 0.05$). پودرهای تولیدی با دو آنزیم از نظر درجه آبکافت اختلاف معنی‌داری داشتند و این مقدار برای پروتئین آبکافتی تولیدی با آلکالاز بیشتر بود ($p < 0.05$).

جدول ۱: ترکیب شیمیایی سوبسترا و پروتئین‌های آبکافتی استخراجی از خیار دریایی و درجات آبکافت آنها

Table 1: Chemical composition of substrate and hydrolyzed proteins extracted from sea cucumber and their degree of hydrolysis (% of dry weight)

Substrate and hydrolysed proteins	protein	fat	moisture	ash	digested grade
Substrate	13.12±0.2 ^c	0.17±0.01 ^b	83.3±0.4 ^a	0.83±0.01 ^c	
Protein hydrolysed with Alcalase	71.58±0.16 ^a	0.028±0.001 ^a	7.38±0.2 ^b	20.18±0.5 ^b	48.37±0.3 ^a
Protein hydrolysed with flavourzyme	67.88±0.26 ^b	0.027±0.001 ^a	6.94±0.18 ^b	23.07±1.0 ^a	41.42±0.6 ^b

Different letters in each column indicate significant differences between the data ($p < 0.05$)

به‌دست آمده، اثرات مهارکنندگی پپتیدهای استخراجی با آنزیم آلکالاز بالاتر از پپتیدهای تولیدی با استفاده از فلاورزایم است. ضمن این‌که با افزایش غلظت پپتیدهای مورد بررسی، اثرات مهارکنندگی آنها بر *Herpes simplex* (نوع ۱) نیز بیشتر شد ($p < 0.05$).

با مخلوط نمودن محتویات چاهک اول و برداشتن ۱۰۰ میکرولیتر از آن و اضافه نمودن به چاهک دوم ادامه داده شد. مجدداً ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک دوم برداشت و به چاهک سوم ریخته شد. این کار تا ۲ چاهک تکرار و ۱۰۰ میکرولیتر آخر دور ریخته شد. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO₂ انکوبه گردید (تا یک هفته هر روز اثر سمیت پروتئین هیدرولیز شده به صورت اثرات سیتوپاتیک یا CPE بررسی گردید). پس از آن، محیط کشت روئی دور ریخته شد و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی MTT اضافه گردید و برای ۲-۴ ساعت در انکوباتور دی‌اکسیدکربن‌دار قرار داده شد. در نهایت جذب نوری محلول به‌دست‌آمده در طول موج ۵۴۰ نانومتر و طول موج رفرانس ۶۳۰ نانومتر قرائت شد و به کمک منحنی استاندارد، تعداد سلول‌ها بر حسب درجه غلظت نوری محاسبه گردید (Huang *et al.*, 2013; Farshadpour *et al.*, 2014). بر اساس این بررسی CC₅₀ محاسبه شد. CC₅₀ درواقع غلظتی از ترکیب را نشان می‌دهد که برای سلول‌های هدف ۵۰ درصد سمیت داشته است. همچنین بر اساس این بررسی‌ها IC₅₀ برای ترکیبات محاسبه شد. در واقع، IC₅₀ غلظتی از ترکیب را نشان می‌دهد که تا حد ۵۰ درصد اثر بازدارندگی بر ویروس داشته است. شاخص انتخاب (SI) نسبتی است که فاصله بین سمیت سلولی و فعالیت ضد ویروسی را اندازه‌گیری می‌کند.

ارزیابی خواص ضد ویروسی پپتیدهای زیست‌فعال *Herpes simplex* (نوع ۱) خواص ضد ویروسی پپتیدها علیه ویروس

در جدول ۲ فعالیت ضد ویروسی پپتیدهای تولیدی علیه *Herpes simplex* (نوع ۱) ارائه شده است. مطابق نتایج

جدول ۲: خواص ضد ویروسی پپتیدهای زیست فعال مورد مطالعه در دو غلظت علیه ویروس *Herpes simplex* (نوع ۱)Table 2: Antiviral properties of studied bioactive peptides in two concentrations against *Herpes simplex* (type 1)

Concentration n (mg/ml)	bioactive peptides	CC50	IC50	IC50	SI	SI
4	Peptides produced with alcalase	36.5±0.1 ^c	0.23 ± 0.01 ^a	0.33 ± 0.01 ^a	158.63 ± 0.5 ^c	110.56 ± 0.4 ^b
	Peptides produced with flavourzyme	32.5±0.5 ^d	0.21±0.02 ^b	0.30±0.01 ^b	149.42±5.1 ^d	108.8±1.0 ^c
5	Peptides produced with alcalase	41.0±1.1 ^a	0.24±0.01 ^a	0.36±0.01 ^a	167.38±5.1 ^a	115.2 ± 3.5 ^a
	Peptides produced with flavourzyme	38.48±0.5 ^b	0.24±0.01 ^a	0.35±0.01 ^a	163.5±2.3 ^b	109.82±1.6 ^c

Different letters in each column indicate significant differences between the data ($p < 0.05$).

1: Cytotoxic concentration (mg/ml), 2: Absorption inhibitor concentration (mg/ml), 3: Concentration of replication inhibitor (mg/ml), 4: Selection index for absorption inhibitor, 5: Selective index for replication inhibitor

است. مطابق این جدول اثرات مهارکنندگی پپتیدهای زیست فعال استخراجی با آنزیم آلکالاز بالاتر از پپتیدهای حاصل با استفاده از آنزیم فلاورزایم است. همچنین با افزایش غلظت پپتیدهای مورد بررسی، اثرات مهارکنندگی آنها بر ویروس *Herpes simplex* (نوع ۲) نیز بیشتر شد.

خواص ضد ویروسی پپتیدها علیه ویروس *Herpes simplex* (نوع ۲)

در جدول ۳ خواص ضد ویروسی پپتیدهای زیست فعال استخراجی از خیار دریایی با استفاده از دو آنزیم آلکالاز و فلاورزایم علیه ویروس *Herpes simplex* (نوع ۲) ارائه شده

جدول ۳: خواص ضد ویروسی پپتیدهای زیست فعال مورد مطالعه در دو غلظت علیه ویروس *Herpes simplex* (نوع ۲)Table 3: Antiviral properties of studied bioactive peptides in two concentrations against *Herpes simplex* (type 2)

Concentration (mg/ml)	bioactive peptides	CC50	IC50	IC50	SI	SI
4	Peptides produced with alcalase	27.24±0.2 ^b	0.18±0.01 ^c	0.25±0.01 ^a	151.5±1.0 ^a	109.1±0.8 ^b
	Peptides produced with flavourzyme	25.5±0.16 ^c	0.17 ± 0.01 ^c	0.25 ± 0.01 ^a	146.1±2.3 ^b	104.25±1.4 ^c
5	Peptides produced with alcalase	4.32 ± 0.2 ^a	0.21 ± 0.01 ^a	0.27 ± 0.01 ^a	150.92 ± 3.0 ^a	117.97 ± 2.6 ^a
	Peptides produced with flavourzyme	28.4±0.2 ^b	0.19±0.01 ^b	0.26 ± 0.01 ^a	149.38±1/8 ^a	109.15±0.8 ^b

Different letters in each column indicate significant differences between the data ($p < 0.05$).

1: Cytotoxic concentration (mg/ml), 2: Absorption inhibitor concentration (mg/ml), 3: Concentration of replication inhibitor (mg/ml), 4: Selection index for absorption inhibitor, 5: Selective index for replication inhibitor

خواص ضد ویروسی پپتیدها علیه *Dengue virus*
در جدول ۵ فعالیت ضد ویروسی پپتیدهای مستخرج از خیار دریایی علیه *Dengue virus* ارائه شده است. مطابق نتایج جدول، اثرات مهارکنندگی پپتیدهای استخراجی با استفاده از آنزیم آلکالاز بالاتر از پپتیدهای تولیدی با استفاده از آنزیم فلاورزایم است. همچنین با افزایش غلظت پپتیدهای مورد بررسی، اثرات مهارکنندگی آنها بر *Dengue virus* نیز بیشتر شد.

خواص ضد ویروسی پپتیدها علیه *Chikungunya virus*

در جدول ۴ فعالیت ضد ویروسی پپتیدهای زیست فعال تولیدی علیه ویروس *Chikungunya* ارائه شده است. همان طوری که در این جدول مشاهده می شود، اثرات مهارکنندگی پپتیدهای استخراجی با استفاده از آنزیم آلکالاز بالاتر از پپتیدهای تولیدی با استفاده از آنزیم فلاورزایم است. در ادامه مشخص شد، غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر پپتیدها، اثرات مهارکنندگی بیشتری بر *Chikungunya virus* داشته است.

جدول ۴: خواص ضد ویروسی پپتیدهای زیست فعال مورد مطالعه در دو غلظت علیه ویروس *Chikungunya*

Table 4: Antiviral properties of studied bioactive peptides in two concentrations against *Chikungunya* virus

Concentration (mg/ml)	bioactive peptides	CC50	IC50	IC50	SI	SI
4	Peptides produced with alcalase	19.5±0.3 ^b	0.16±0.01 ^a	0.22±0.01 ^a	122.1±1.5 ^b	88.5±1.5 ^b
	Peptides produced with flavourzyme	16.3±0.2 ^c	0.14±0.01 ^b	0.19±0.01 ^c	116.5±1.2 ^c	83.7±1.4 ^c
5	Peptides produced with alcalase	21.2±0.2 ^a	0.17±0.01 ^a	0.23±0.01 ^a	124.8±0.8 ^a	92.2±0.8 ^a
	Peptides produced with flavourzyme	18.1±0.2 ^b	0.15±0.01 ^b	0.21±0.01 ^{ab}	121.5±0.8 ^b	86.4±0.5 ^b

Different letters in each column indicate significant differences between the data (p<0.05).

1: Cytotoxic concentration (mg/ml), 2: Absorption inhibitor concentration (mg/ml), 3: Concentration of replication inhibitor (mg/ml), 4: Selection index for absorption inhibitor, 5: Selective index for replication inhibitor

جدول ۵: خواص ضد ویروسی پپتیدهای زیست فعال در دو غلظت علیه ویروس *Dengue*

Table 5: Antiviral properties of studied bioactive peptides in two concentrations against *Dengue* viruses

Concentration (mg/ml)	bioactive peptides	CC50	IC50	IC50	SI	SI
4	Peptides produced with alcalase	8.28±0.21 ^b	0.08±0.01 ^a	0.13±0.01 ^a	103.5±1.4 ^b	63.7±0.9 ^b
	Peptides produced with flavourzyme	5.26±0.151 ^c	0.06±0.01 ^b	0.1±0.01 ^c	87.9±0.8 ^c	52.7±0.8 ^d
5	Peptides produced with alcalase	10.63±0.6 ^a	0.10±0.09 ^a	0.15±0.01 ^a	111.5±2.1 ^a	70.8±1.1 ^a
	Peptides produced with flavourzyme	7.13±0.04 ^b	0.10±0.07 ^b	0.12±0.01 ^{ab}	101.8±0.5 ^b	59.32±0.4 ^c

Different letters in each column indicate significant differences between the data (p<0.05).

1: Cytotoxic concentration (mg/ml), 2: Absorption inhibitor concentration (mg/ml), 3: Concentration of replication inhibitor (mg/ml), 4: Selection index for absorption inhibitor, 5: Selective index for replication inhibitor

بحث

پودر آبکافتی تولیدی با استفاده از آنزیم آلکالاز ممکن است به دلیل فعالیت آنزیمی بیشتر آلکالاز در مقایسه با فلاورزایم باشد (Reyhani Poul et al., 2017). به طور کلی، پودرهای تولیدی در پژوهش حاضر نسبت به سایر مطالعات مشابه حاوی مقادیر برابر یا بیشتری از پروتئین بودند. پودرهای پروتئینی تولیدی در تحقیق Reyhani Poul و همکاران (۲۰۱۷) با استفاده از سه آنزیم (فلاورزایم، پاپائین و پپسین)، ۸۳-۷۱ درصد پروتئین داشتند. Ovissipour و همکاران (۲۰۰۹) طی پژوهشی ضایعات ماهی خاویاری *Acipenser persicus* را با استفاده از پنج آنزیم آلکالاز، پروتامکس، فلاورزایم، نئوتراز و تریپسین آبکافت کردند. همه پودرهای پروتئینی تولیدی محتوی بالای ۶۹ درصد پروتئین بودند. Taheri و همکاران (۲۰۱۳) از آبکافت ضایعات

در تحقیق حاضر بافت خیار دریایی با استفاده از دو آنزیم میکروبی آلکالاز و فلاورزایم آبکافت و خواص ضد ویروسی پپتیدهای حاصل (با وزن کمتر از ۳۰ کیلو دالتون) علیه *Herpes simplex* (نوع ۱ و ۲)، *Chikungunya virus* و *Dengue virus* در دو غلظت ۴ و ۵ میلی گرم بر میلی لیتر مورد بررسی قرار گرفت. میزان پروتئین موجود در بافت خیار دریایی حدود ۱۳ درصد بود که با استفاده از روش آبکافت این مقدار به بیش از ۶۷ درصد در پودرهای پروتئینی (حاوی پپتیدهای زیست فعال) رسید. این امر نشان دهنده موفقیت آمیز بودن فرایند آبکافت جهت تخلیص پروتئین بافت است. بالاتر بودن میزان پروتئین و درجه آبکافت در

افزایش غلظت پپتیدها از ۴ به ۵ میلی لیتر بر گرم، اثرات مهارکنندگی آنها بر *Herpes simplex* (نوع ۱ و ۲)، *Chikungunya* و *Dengue virus* نیز بیشتر شد. بنابراین، در این تحقیق ثابت شد که پپتیدهای مستخرج از بافت خیار دریایی می توانند با ویروس های مورد مطالعه مقابله کنند. تحقیقات گوناگونی اصل ضد ویروس بودن پپتیدهای زیست فعال مشتق از بافت های گیاهی و حیوانی را تأکید و آن را تأیید کرده اند (Giansanti et al., 2005; Torres et al., 2013; Chen et al., 2017). همکاران (۲۰۰۸) اثر ضد ویروسی پپتیدهای مشتق از *Sorghum bicolor* را علیه *Herpes simplex* (HSV-1) بررسی و ثابت کردند. Afify و همکاران (۲۰۱۸) خواص ضد ویروسی پپتیدهای مشتق از جلبک سبز (*Scenedesmus obliquus*) را با استفاده از سه آنزیم پپسین، تریپسین و پاپائین بررسی و گزارش کردند. این پپتیدها از قابلیت مهار ویروس Cocksackie B₃ برخوردارند.

علاوه بر ضد ویروس بودن پپتیدهای زیست فعال مشتق از خیارهای دریایی، سایر ترکیبات مستخرج از این آبی نیز چنین خاصیتی دارند. در مطالعه Huang و همکاران (۲۰۱۳) اثر ممانعت کنندگی کندروتین سولفات^۱ فوکوزیله شده حاصل از خیار دریایی بر تکثیر ویروس HIV بررسی شد. نتایج نشان داد که این ماده مانع از نفوذ ویروس به داخل سلول می شود و از تکثیر آن جلوگیری می کند. Farshadpour و همکاران (۲۰۱۴) نیز نشان دادند که عصاره آبی خیار دریایی گونه *Holothuria* sp. دارای اثرات ضد ویروسی قوی علیه ویروس HSV-1 است. بررسی Behroudi و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که عصاره دی اتیل اتری استخراجی از گناد خیار دریایی گونه *H. leucospilota* در غلظت های ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر قادر به ممانعت از تکثیر ویروس HIV-1 است و اثر سمیت سلولی قوی نیز بر سلول های میزبان دارد. در برخی دیگر از تحقیقات به فعالیت ضد باکتریایی ترکیبات مستخرج از خیارهای دریایی اشاره شده است. در تحقیق Farjami و همکاران (۲۰۱۴) اثر ضد باکتریایی عصاره های متانولی، کلروفرومی و هگزانی استخراجی از دیواره، روده و

ضایعات ماهی قزل آلا با آنزیم آلکالاز به پودری با $88/32 \pm 0/07$ درصد پروتئین دست یافتند که مقدار قابل توجهی است و هیچ یک از پودرهای تولیدی در تحقیق حاضر تا این حد حاوی پروتئین نبودند. پروتئین هایی که طی ۹۰ دقیقه آبکافت اندرونه ماهی تن زرد باله (*Thunnus albacares*) با استفاده از آلکالاز، پروتامکس و فلاورزایم تولید شدند، به ترتیب دارای $72/34 \pm 3/2$ ، $67/36 \pm 2/2$ ، $63/68 \pm 1/56$ درصد پروتئین بودند (Ovissipour et al., 2010). پروتئین آبکافتی تولیدی از فریم و سر ماهی کپور معمولی با استفاده از آنزیم نئوتراز ۶۸-۷۶ درصد پروتئین داشت (Reyhani Poul and Jafarpur, 2017; Reyhani Poul et al., 2017). در پژوهش حاضر، پودری که درجه آبکافت بیشتری داشت (پودر تولیدی با آلکالاز)، حاوی مقادیر بالاتری از پروتئین بود (در مقایسه با پروتئین تولیدی با آنزیم فلاورزایم). اما این یک نتیجه مطلق و ثابت نیست. برای مثال، در مطالعه Pacheco-Aguilar و همکاران (۲۰۰۸) از بین سه نوع پروتئین تولیدی از ماهی *Merluccius productus* با درجه آبکافت های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد، بیشترین مقدار پروتئین مربوط به پودر با درجه آبکافت ۱۰ درصد بود. در مطالعه Souissi و همکاران (۲۰۰۷) نیز چنین نتیجه ای ثبت شد. البته در برخی از تحقیقات نیز مانند پژوهش حاضر بیشترین مقدار پروتئین در پودری با بالاترین درجه آبکافت ثبت شد (Reyhani Pol and Jafarpur, 2017). با انجام فرآیند هیدرولیز، به دلیل تجزیه پروتئین و تولید پپتیدهایی با وزن مولکولی پائین، چربی و مشتقات آن آزاد شده و در فرآیند استخراج جدا می شود. بنابراین، در پودر خشک شده پپتون، درصد چربی بسیار کم است.

در خصوص خاکستر، هر چند میزان در این تحقیق نسبتاً بالاست، ولی با وجود این، در هیدرولیز آنزیمی میزان خاکستر کمتر از هیدرولیز شیمیایی بوده که علت آن استفاده از اسید یا باز برای تنظیم pH در هیدرولیز شیمیایی است.

مطابق نتایج به دست آمده، اثرات مهارکنندگی پپتیدهای استخراجی از خیار دریایی با آنزیم آلکالاز بالاتر از پپتیدهای حاصل با استفاده از آنزیم فلاورزایم بیشتر بود. همچنین با

¹ Chondroitin sulfate

بر فعالیت ضد ویروسی پپتیدها موثر بودند، بدین صورت که پپتیدهای تولیدی با آنزیم آلکالاز با یک درجه آبکافت و ترکیب شیمیایی متفاوت از پپتیدهای تولیدی با فلاورزایم، دارای فعالیت ضد ویروسی بیشتری بودند.

پپتیدهای زیست فعال حاصل از آبکافت آنزیمی بافت خیار دریایی دارای فعالیت ضد ویروسی علیه *Herpes simplex* (HSV-1 و HSV-2)، *Chikungunya virus* و *Dengue virus* هستند. ضمن این که این فعالیت در پپتیدهای زیست فعال با توجه به نوع آنزیم مورد استفاده جهت تولید و غلظت محصول، متفاوت است. در پژوهش حاضر، پپتیدهای تولیدی با آنزیم آلکالاز دارای فعالیت ضد ویروسی بیشتری نسبت به پپتیدهای استخراجی از آنزیم فلاورزایم بودند. همچنین با افزایش غلظت پپتیدها از ۴ به ۵ میلی گرم بر میلی لیتر، فعالیت ضد ویروسی آنها افزایش یافت. بنابر یافته های تحقیق حاضر، پپتیدهای زیست فعال استخراجی از خیار دریایی دارای پتانسیل استفاده در صنایع داروسازی جهت تولید ترکیبات طبیعی ضد ویروسی هستند به شرط آن که برای آثار سمیت سلولی بالقوه آنها چاره مناسبی اندیشیده شود که تحقق این امر، مستلزم انجام آزمایش های تکمیلی است.

تشکر و قدردانی

محققین تحقیق حاضر بر خود لازم می دانند از پژوهشکده اکولوژی دریای خزر به جهت در اختیار قراردادن تجهیزات تخصصی و حمایت مالی، تقدیر و تشکر به عمل آورند.

منابع

Abuei, A., Jafarpour, A. and Motamedzadegan, A., 2016. The effect of microbial transglutaminase enzyme on the functional and rheological properties of carp skin gelatin (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Iran Food Science and Industry*, 58(13):106-93. [In Persian]

گناد خیار دریایی صیدشده از خلیج فارس بر باکتری *Escherichia coli* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد عصاره کلروفرومی در غلظت ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر اثر ضد باکتریایی دارد. Adibpour و همکاران (۲۰۱۴) فعالیت ضد باکتریایی خیار دریایی *H. leucospilota* را بر باکتری *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* بررسی کردند. نتایج نشان داد عصاره خیار دریایی رشد *S. aureus* را مهار می کند اما هیچ اثر مهارکنندگی بر باکتری *B. cereus* ندارد.

از آن جایی که ساپونین ها ترکیبات محلول در آب هستند، ممکن است ترکیبات فعال اصلی عصاره های آبی خیار دریایی گونه *H. edulis* باشند (Althunibat et al., 2013). سمیت سلولی گلیکوزیدهای تری ترین ساپونین نتیجه توانایی آنها در تشکیل گروه هایی با استرول های غشائی است که به منافذ و کانال های یونی متصل هستند. این وضعیت اسمز سلولی را تخریب می کند و در نتیجه غشاء سلولی را از بین می برد (Chludil et al., 2003). همچنین عصاره های آلی ممکن است حاوی مقادیر اضافی از ساپونین ها باشند که می تواند به وسیله حلال های قطبی آلی (متانول)، به طور موثری عصاره گیری شوند. سمیت سلولی پروتئین آبکافتی حاصل از خیار دریایی در تحقیق حاضر نیز می تواند به دلیل وجود ترکیبات تری ترین ساپونین که سمیت سلولی قوی دارند، باشد. Keshavarz و همکاران (۲۰۲۱) پنج تری ترین ساپونین از گونه های خیار دریایی *H. leucospilota* را جداسازی و فعالیت های ضد ویروسی آنها را گزارش کردند.

اثر پپتیدهای زیست فعال بر ویروس ها و واکنش ویروس ها در برابر این پپتیدها به عوامل مختلفی از جمله ویژگی های پپتید (وزن مولکولی، درجه آبکافت، نسبت و ترکیب اسیدهای آمینه، طول زنجیره و...)، شرایط تولید (دما، زمان، pH، آنزیم، نسبت آنزیم به سوبسترا و ...) و نوع ویروس بستگی دارد. در بین ویروس های مورد بررسی، *Herpes simplex* (HSV-1) و *Dengue virus* به ترتیب مقاوم ترین و حساس ترین ویروس ها در برابر پپتیدها بودند. همچنین در تحقیق حاضر، نوع آنزیم مصرفی جهت تولید پپتیدها، درجه آبکافت و میزان ترکیبات شیمیایی (پروتئین و خاکستر) پپتیدها از جمله عوامل احتمالی بودند که می توان ادعا کرد

- Adibpour, N., Nasr, F., Nematpour, F., Shakouri, A. and Ameri, A., 2014.** Antibacterial and antifungal activity of *Holothuria leucospilota* isolated from Persian Gulf and Oman Sea. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(1):e8708. DOI:10.5812/jjm.8708.
- Afify, A.E.M.M., El Baroty, G.S., El Baz, F.K., Abd El Baky, H.H. and Murad, S.A., 2018.** Scenedesmus obliquus: Antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2):399-408. DOI:10.1016/j.jgeb.2018.01.002
- Althunibat, O., Ridzwan, B., Taher, M., Daud, J., Jauhari Arief Ichwan, S. and Qaralleh, H., 2013.** Antioxidant and cytotoxic properties of two sea cucumbers, *Holothuria edulis* Lesson and *Stichopus horrens* Selenka. *Acta Biologica Hungarica*, 64(1): 10-20. DOI:10.1556/abiol.64.2013.1.2
- Anoushe, N., Madani, R., Hosseini, V., Zamani, A. and Emami, T., 2014.** Purification of lipase enzyme from the anterior intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fisheries*, 67(3):328-319. [In Persian]
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 2005.** Official methods of analysis of association of official analytical chemists. AOAC, Washington, DC.
- Behroudi, S., Nematollahi, M.A., Aghasadeghi, M.R., Nazemi, M. and Behrouz, B., 2014.** In vitro cytotoxic and anti-cancer effects of body wall for sea cucumber (*Holothuria leucospilota*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 3(23):11-20. [In Persian] DOI:10.22092/ISFJ.2014.103537
- Bondaroff, T.P., 2021.** Sea cucumber crime in India and Sri Lanka during the period 2015–2020. *SPC Beche-demer Information Bulletin*, 41:55-65.
- Bordbar, S., Anwar, F. and Saari, N., 2011.** High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods—a review. *Marine Drugs*, 9(10):1761-1805. DOI:10.3390/md9101761
- Camargo Filho, I., Cortez, D.A.G., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C.V. and Dias Filho, B.P., 2008.** Antiviral activity and mode of action of a peptide isolated from *Sorghum bicolor*. *Phytomedicine*, 15(3):202-208. DOI:10.1016/j.phymed.2007.07.059
- Chen, L., Liu, Y., Wang, S., Sun, J., Wang, P., Xin, Q. and Wang, W., 2017.** Antiviral activity of peptide inhibitors derived from the protein E stem against Japanese encephalitis and Zika viruses. *Antiviral Research*, 141, 140-149. DOI:10.1016/j.antiviral.2017.02.009
- Chludil, H.D., Murray, A.P., Seldes, A.M. and Maier, M.S., 2003.** Biologically active triterpene glycosides from sea cucumbers (*Holothuroidea*, *Echinodermata*). In *Studies in Natural Products Chemistry*, 28:587-615. DOI:10.1016/S1572-5995(03)80150-3.
- Doyle, R., 2023.** Analysis of protein and tannin content in vinifera wine using spectrophotometric and turbidimetric methods. Doctoral dissertation, Washington State University, USA.

- Farjani, B., Nematollahi, M., Moradi, Y. and Nazemi, M., 2014.** Derivation of extracts from Persian Gulf sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) and assessment of its antifungal effect. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 13(4):785-795.
http://hdl.handle.net/1834/11785
- Farshadpour, F., Gharibi, S., Taherzadeh, M., Amirinejad, R., Taherkhani, R., Habibian, A. and Zandi, K., 2014.** Antiviral activity of *Holothuria* sp. a sea cucumber against herpes simplex virus type 1 (HSV-1). *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 18:333-337. DOI:10.2174/138161206776361174
- Giansanti, F., Massucci, M. T., Giardi, M. F., Nozza, F., Pulsinelli, E., Nicolini, C. and Antonini, G., 2005.** Antiviral activity of ovotransferrin derived peptides. *Biochemical and biophysical research communications*, 331(1):69-73. DOI:10.1016/j.bbrc.2005.03.125
- Hoyle, N.T. and Merritt, J.H., 1994.** Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of food Science*, 59(1):76-79.
- Huang, N., Wu, M.Y., Zheng, C.B., Zhu, L., Zhao, J.H. and Zheng, Y.T., 2013.** The depolymerized fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber potently inhibits HIV replication via interfering with virus entry. *Carbohydrate Research*, 380:64-69. DOI:10.1016/j.carres.2013.07.010.
- Jia, J., Ma, H., Zhao, W., Wang, Z., Tian, W., Luo, L. and He, R., 2010.** The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chemistry*, 119(1):336-342. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.06.036
- Keshavarz, M., Shamsizadeh, F., Tavakoli, A., Baghban, N., Khoradmehr, A., Kameli, A., Rasekh, P., Daneshi, A., Nabipour, I., Vahdat, K. and Farrokhnia, M., 2021.** Chemical compositions and experimental and computational modeling activity of sea cucumber *Holothuria parva* ethanolic extract against herpes simplex virus type 1. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 141:111936. DOI:10.1016/j.biopha.2021.111936.
- Liu, Y., Dave, D., Trenholm, S., Ramakrishnan, V.V. and Murphy, W., 2021.** Effect of drying on nutritional composition of atlantic sea cucumber (*Cucumaria frondosa*) viscera derived from Newfoundland fisheries. *Processes*, 9(4):703. DOI:10.3390/pr9040703
- 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(1):238-242. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.12.013
- Ovissipour, M., Abedian Kanari, A., Motamedzadegan, A. and Nazari, R., 2010.** Investigating the properties of hydrolyzed proteins of the intestines and viscera of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) using commercial enzymes. *Iranian Food Science*

- and *Industry Research*, 6(1):76-68. [In Persian] DOI:10.22067/ifstrj.v6i1.4031
- Pacheco-Aguilar, R., Mazorra-Manzano, M.A. and Ramírez-Suárez, J.C., 2008.** Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. *Food Chemistry*, 109(4):782-789. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.01.047
- Reyhani Poul, S. and Jafarpur, A., 2017.** The effect of the degree of defatting on the functional properties and antioxidant activity of the defatted protein produced from the frame and head of common carp (*Cyprinus carpio*). *Iran Food Science and Industry*, 68(14):113-124. [In Persian]
- Reyhani Poul, S., Jafarpour, A. and Safari, R., 2017.** Functional and antioxidant properties of hydrolyzed protein produced from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using enzyme method. *Fisheries Science and Technology*, 5(4):13-28.[In Persian]
- Reyhani Poul, S., Jafarpour, A. and Safari, R., 2018.** Investigating the fatty acid profile of the oil, the functional and antioxidant properties of the protein obtained from the internal enzymatic digestion of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using Protamax and Neotraz enzymes, *Research Journal Iran Food Science and Industry*, 14(1):176-162. [In Persian] DOI:10.22067/IFSTRJ.V1395I0.53714
- Safari, R., Nasrollahzadeh Saravi, H., Pourgholam, R., Motalebi, A.A. and Ghoroghi, A., 2011.** Use of hydrolysates from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) head as peptone for *Vibrio anguillarum* and optimization using response surface method (RSM). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 20(2):247-257. DOI:10.1080/10498850.2011.562064
- Safari, R., Rihanipol, S., Yaqoubzadeh, Z., Banke-Saz, Z., Tagvi, M. and Safari, A., 2021.** Investigating some biochemical and microbial properties of biosilage produced from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fisheries*, 74(4):586-575. DOI:10.22059/JFISHERIES.2021.326631.1270
- Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M., 2007.** Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology*, 45(2):187.
- Sun, J., He, H. and Xie, B.J., 2004.** Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(21):6646-6652. DOI:10.1021/jf0495136.
- Taheri, A., Anvar, S.A.A., Ahari, H. and Fogliano, V., 2013.** Comparison of the functional properties of protein Hydrolysates from poultry byproducts and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12(1):154-169. <http://hdl.handle.net/1834/37351>
- Torres, N. I., Noll, K. S., Xu, S., Li, J., Huang, Q., Sinko, P. J. and Chikindas, M. L., 2013.** Safety, formulation and in vitro antiviral activity of the antimicrobial peptide

subtilisin against herpes simplex virus type 1. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 5(1):26-35. DOI:10.1007/s12602-012-9123-x

Wang, X., Chen, H., Fu, X., Li, S. and Wei, J., 2017. A novel antioxidant and ACE inhibitory peptide from rice bran protein: Biochemical characterization and molecular docking study. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 75:93-99. DOI:10.1016/j.lwt.2016.08.047

Yaghoubzadeh, Z., Peyravii Ghadikolaii, F., Kaboosi, H., Safari, R. and Fattahi, E., 2020. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptides from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin hydrolysate. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(1): 625-632. DOI: 10.1007/s10989-019-09869-5

Zhang, Y., Khan, M.A. and Shahidi, F., 2007. Compositional characteristics and antioxidant properties of fresh and processed sea cucumber (*Cucumaria frondosa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4):1188-1192. DOI:10.1021/jf063085h

Zhang, Y., Song, S., Song, D., Liang, H., Wang, W. and Ji, A., 2010. Proliferative effects on neural stem/progenitor cells of a sulfated polysaccharide purified from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(1):67-72. DOI:10.1016/j.jbiosc.2009.07.010

Study of the antiviral activity of bioactive peptides extracted from black sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) against *Herpes simplex* (types 1 and 2), *Chikungunya*, and *Dengue* viruses

Safari R.^{1*}; Zahra Yaghoubzadeh Z.¹; Hadi Ghaffaru H.²; Reyhani Poul S.³

*safari1351@gmail.com

1-Caspian Sea Ecology Research Center (CSERC), Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Sari, Postal cod: 4847119877, Iran

2- National Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tshran, Iran

3- Department of Fisheries Products Processing, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Abstract

Given the concerns regarding the use of synthetic antiviral compounds in the pharmaceutical industry, it seems necessary to pay attention to natural sources with antiviral activity. Sea cucumbers are one of these sources that numerous physiological properties are discussed in the scientific community. The present study aimed to produce bioactive peptides from *Holothuria leucospilota* using two microbial enzymes, alcalase and flavourzyme, and to evaluate their antiviral activity against *Herpes simplex* types 1 and 2, *Chikungunya*, and *Dengue* viruses. The results showed that the whole body of the sea cucumber has about 13% protein, which this amount reached more than 67% in the resulting hydrolyzed powders. The amount of protein, as well as the degree of hydrolysis in the hydrolyzed protein using alcalase enzyme (71.58 ± 0.16 and $48.37 \pm 0.3\%$, respectively) was higher than the powder produced with flavourzyme (67.88 ± 0.26 and $41.42 \pm 0.6\%$, respectively) ($p < 0.05$). It was further found that both types of peptides produced at both concentrations of 4 and 5 mg/ml have antiviral properties. In this study, the type of enzyme used to produce bioactive peptides and also the concentration of peptides had a significant effect on their antiviral activity ($p < 0.05$). The peptides produced using alcalase enzyme had significantly more antiviral activity against the studied viruses, while increasing the concentration of peptides from 4 to 5 mg/ml led to a significant increase in the antiviral activity ($p < 0.05$). Among the studied viruses, *Herpes* type 1 and *Dengue virus* were the most resistant and susceptible viruses, respectively ($p < 0.05$). According to the results of the present study, bioactive peptides extracted from the sea cucumber have the potential to be used in the pharmaceutical industry as a natural antiviral compound, however, it is necessary to carry out additional tests to evaluate their possible toxicity effects.

Keywords: Sea cucumber, Alcalase, Flavorzym, Bioactive peptides, Antiviral activity, *Herpes* viruses

*Corresponding author