

# خواص ضد فشارخون و ضد اکسیدان پنج نوع پروتئین آبکافت حاصل از ضایعات میگوی سفید هندی (*Penaeus indicus*)

علی طاهری<sup>1\*</sup>، سمیرا جلالی نژاد<sup>2</sup>، سیدامیرعلی انوار<sup>3</sup>

## چکیده

خون در جهان در سال 2000 میلادی 972 میلیون نفر بوده است و تخمین زده می‌شود در سال 2025 به 1/56 بلیون نفر برسد (10). در حال حاضر 15 تا 20٪ جمعیت بالغین جهان از این بیماری رنج می‌برند (18). آنزیم تبدیل کننده آنژیوتنسین I نقش مهمی در تنظیم و افزایش فشار خون ایفا می‌کند. این آنزیم عامل کاتالیز کننده آنژیوتنسین I غیر فعال به آنژیوتنسین II فعال می‌باشد که منقبض کننده قوی عروق است (8) و غیر فعال کننده برادی کینین می‌باشد که یک متسع کننده قوی عروق است (35). مهارکننده‌های ACE سنتزی مثل کاپتوپریل و آنالاپریل برای بیماری فشار خون استفاده می‌شود اما اثرات جانبی متفاوت زیادی دارد که شامل سرفه، تغییر حس چشایی، جوش و ادم پوستی می‌شود (22) و بنابراین علاقه زیادی به مهارکننده‌های طبیعی وجود دارد.

از سوی دیگر امروزه بیماری‌های مرتبط با رادیکال‌های آزاد باعث آسیب‌های جدی به بدن می‌شوند که می‌تواند منجر به سرطان و یا رنج گسترده‌ای از بیماری‌های دیگر گردد (2). همچنین اکسیداسیون اسیدهای چرب با رادیکال‌های آزاد منجر به تغییر کیفیت غذا می‌گردد و روی سلامت انسان تاثیر منفی دارد. بنابراین یافتن آنتی اکسیدان‌های طبیعی برای جایگزینی با آنتی اکسیدان‌های صنعتی در صنایع غذایی بسیار مورد توجه است (31). بسیاری از آنتی اکسیدان‌های سنتزی می‌توانند برای جلوگیری از فعالیت پراکسیدان‌ها به شیوه‌های مختلف به کار روند. اما مسائل سلامت و نگرانی مصرف‌کنندگان از مصرف محصولات سنتزی مصنوعی

امروزه بیماری فشار خون و بیماری‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد از اصلی‌ترین مشکلات کشورهای صنعتی می‌باشند و داروهای با خواص ضد فشار خون و ضد اکسیدانی در درمان این بیماری‌ها بسیار مؤثرند. لذا در تحقیق حاضر خاصیت ضد اکسیدانی، ضد فشار خون، بازیافت نیترژن، درجه آبکافت و پروفیل اسید آمینه 5 نوع مختلف (با آنزیم آلکالاز، پپسین، آلفا - کیموتریپسین، نئوتراز و فلاووروزایم) پروتئین آبکافت ضایعات فرآوری میگوی سفید هندی بررسی شد. برای سنجش خاصیت ضد فشار خون از سنجش مهار آنزیم تبدیل کننده آنژیوتنسین I و برای سنجش خاصیت ضد اکسیدان از سنجش مهار رادیکال آزاد DPPH استفاده شد. آلکالاز بیشترین بازیافت نیترژن و درجه آبکافت را به ترتیب با مقادیر  $1/6 \pm 75\%$  و  $1/4 \pm 64/2\%$  نشان داد. بیشترین فعالیت ضد اکسیدانی برای آلکالاز و آلفا - کیموتریپسین به ترتیب  $1/2 \pm 47/1$  و  $0/3 \pm 45/1\%$  بود. بیشترین فعالیت مهار آنزیم تبدیل کننده آنژیوتنسین I نیز برای آلکالاز و آلفا - کیموتریپسین با  $0/02 \pm 0/85$  میلی گرم بر میلی لیتر و  $0/04 \pm 0/9$  میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد. تمامی پروتئین‌های تولیدی نسبت به هضم با آنزیم‌های گوارشی مقاوم بودند و ترکیب اسیدهای آمینه میزان بالای اسیدهای آمینه آبریز را نشان داد. مطابق با نتایج این تحقیق پروتئین آبکافت ضایعات میگوی سفید هندی که با آلکالاز و آلفا - کیموتریپسین تولید شده فعالیت ضد فشار خون و ضد اکسیدانی بالایی دارد و می‌تواند به عنوان پپتیدهای زیست فعال در تغذیه انسانی جهت بهبود بیماری‌های ناشی از فشار خون و عوامل اکسیدانی به کار رود.

واژگان کلیدی: میگوی سفید هندی، آلکالاز، آلفا - کیموتریپسین، آنژیوتنسین، ضد اکسیدان، پروتئین آبکافت

تاریخ دریافت: 90/10/10 تاریخ پذیرش: 91/3/2

## مقدمه

بیماری فشار خون یک فرآیند چند فاکتوره است و دلیل اصلی بیماری در کشورهای صنعتی می‌باشد. جمعیت مبتلا به فشار

1- استاندار فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار،

ایران taheri@cmu.ac.ir

2- دانشجوی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، واحد چابهار (سینا)، چابهار، ایران

3- دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

اقتصادی بسیاری خواهند داشت. لذا در این تحقیق به بررسی اثرات ضد اکسیدانی و مهار کنندگی آنزیم آنژیو تنسین I پروتئین آبکافت ضایعات میگوی سفید هندی پرداخته شده است.

## مواد و روش کار

### مواد اولیه

ضایعات میگوی سفید هندی شامل سر از بازار آذربایجان شهرستان چابهار به صورت تازه تهیه شد و تا زمان مصرف در 20- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

### آبکافت

1500 گرم ضایعات میگوی سفید هندی در یک چرخ گوشت چرخ شد و سپس به ارلن مایرهای 250 میلی لیتری اضافه شد. ارلن ها برای 20 دقیقه در 85 درجه سانتی گراد گرمای دهی شدند تا آنزیم های داخلی آن غیر فعال گردد و چربی گوشت آزاد شود (32). نمونه ها در دمای اتاق خنک شدند. هر نمونه حاوی نسبت 1:1 از 100 گرم ضایعات با آب مقطر بود که پس از اضافه کردن مقدار مورد نیاز آنزیم های آلکالاز، پیپسین، آلفا کیموتریپسین، نئوتراز، فلاووروزایم در دما و زمان مشخص انکوباسیون شد. پس از زمان مورد نیاز تیمار مخلوط در حمام آبی 90 درجه سانتی گراد قرار گرفت و آنزیم ها غیرفعال گردیدند. پروتئین آبکافت ماهی پس از سانتریفوژ جدا گردید.

### تعیین درجه آبکافت و بازیافت نیتروژن

به 0/5 میلی لیتر از سوپرناتانت حاصله بعد از هیدرولیزاسیون 0/44 مول در لیتر تری کلرواستیک اسید اضافه شد. مخلوط برای سی دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سپس در 4500 دور در دقیقه (5 دقیقه) سانتریفوژ گردید. محلول 0/22 مول در لیتر تری کلرو استیک اسید حاصله برای تعیین محتوای پروتئین با روش بیوره سنجیده شد و از آلبومین سرم گوساله به عنوان استاندارد پروتئین استفاده گردید. بر این اساس 4/5 میلی گرم سدیم پتاسیم تارتارات، 1/5 میلی گرم سولفات مس 5 آبه، 2/5

محدودیت هایی را برای استفاده از این مواد بوجود آورده است. امروزه علاقه زیادی برای شناسایی منابع جدید و طبیعی آنتی اکسیدان از صنایع لبنی، گیاهان و جانوران بوجود آمده که تحقیقات گسترده ای را در سال های اخیر به خود اختصاص داده است (31).

علوم تغذیه جدید به سمت "تغذیه برای سلامت بهینه" گام برمی دارد و به سوی درمان بیماری ها یا پیشگیری از آنها سوق دارد. بر این اساس پپتیدهای زیست فعال بیولوژیک فراوانی از بسیاری غذاهای طبیعی و فرآوری شده استخراج شده است (14). عموماً این پپتیدها علاوه بر عملکردشان به عنوان غذا می توانند تاثیر فیزیولوژیک داشته باشند. تمامی این پپتیدهای زیست فعال در ساختار پروتئین مادری خود غیرفعالند و می توانند توسط هضم روده ای یا آبکافت توسط پروتئازها به شکل فعال درآیند. پپتیدهای مهارکننده آنزیم تبدیل کننده آنژیو تنسین I از این پپتیدها می باشند. بنابراین تمامی پپتیدهایی که این توانایی را داشته باشند می توانند در نهایت فشار خون را کاهش دهند. پپتیدهای با خواص آنتی اکسیدان از دیگر پپتیدهایی هستند که با حذف رادیکال های آزاد عامل اکسایش از بیماری های بسیاری جلوگیری می کنند.

مطالعات متعدد نشان از فعالیت مهار آنزیم ACE پروتئین های آبکافت آذربایجان، گوشت کوسه (37)، کپور علفخوار (5)، گوشت شانک (12)، ژلاتین اسکوئید (19)، ژله ماهی (16) و... می باشد همچنین مطالعات بسیاری بر خواص آنتی اکسیدان پروتئین آبکافت آذربایجان مثل سرخوی قرمز پهلوی قهوه ای (12)، مارماهی شنی (16) و... تاکید دارد و اثبات شده که هردو این اثرات با هم می توانند اثر ضد فشار خون در محیط زنده داشته باشند (9).

میگو یکی از سخت پوستان اصلی پرورشی در ایران است که ضایعات مشخصی را پس از فرآوری میگوی بدون سر و پوسته به جا می گذارد. این ضایعات غنی از پروتئین و پلی ساکاریدهایی چون کیتین است که در صورت بازیابی مزایای

هیپوریک اسید حاصله با 0/5 میلی لیتر استیل استات استخراج شد. بعد از سانتریفوژ در 3000 دور در دقیقه به مدت 15 دقیقه 0/2 میلی لیتر از لایه بالایی به لوله آزمایش منتقل شد و در 80 درجه سانتی گراد برای 1 ساعت خشک شد. هیپوریک اسید در 0/5 میلی لیتر آب مقطر حل شد و جذب در 228 نانومتر توسط اسپکتروفتومتر ماورای بنفش قرائت شد. 50 Lc به عنوان غلظتی که برای مهار 50٪ فعالیت ACE نیاز است گزارش شد (15).

#### پایداری پپتیدها در هضم توسط آنزیم های دستگاه گوارش

محلول 1٪ پپسین در بافر 0/1 میلی مولار HCl-KCl در pH=2 تهیه شد و محلول 1٪ کیموتریپسین در بافر 0/1 میلی مولار NaOH-KCl در pH=7 تهیه شد. پپتیدها در 0/02 میلی گرم در میلی لیتر محلول ها حل شد و برای 4 ساعت در 37 درجه سانتی گراد واکنش یافت. واکنش با 15 دقیقه جوشاندن خاتمه یافت. بعد از 25 دقیقه سانتریفوژ در 12000 g سوپرناتانت خنثی شد و برای سنجش مهار ACE به کار رفت (15).

#### سنجش پروفیل اسیدهای آمینه

آنالیز ترکیب اسید آمینه کل با استفاده از دستگاه کرماتوگرافی مایع با نفوذ بالا (HPLC) و شناساگر فلئورسنت (Agilent) انجام گرفت. نمونه ها توسط اسید کلریدریک 6 نرمال در 110 درجه سانتی گراد هیدرولیز و توسط ستون فاز معکوس (C18) کرماتوگراف شدند. محتوای تریپتوفان بعد از هیدرولیز نمونه ها در محلول هیدروکسید سدیم 4/2 نرمال و سیستمین پس از تیمار با محلول پرفورمیک اسید سنجش شد. برای سنجش اسیدهای آمینه آزاد نمونه ها در اسید کلریدریک هموزن و سپس با اسید حاوی استاندارد داخل نورلوسین 160 میکرومول در لیتر مخلوط شد. نمونه ها در  $12000 \times g$  (4 درجه سانتی گراد برای 15 دقیقه) سانتریفوژ و سوپرناتانت توسط فیلتر 10 کیلو دالتونی فیلتر شد. سوپرناتانت توسط دستگاه کرماتوگرافی مایع با نفوذ بالا سنجش گردید (32).

#### آنالیز آماری

میلی گرم یدید پتاسیم در 200 میلی لیتر محلول 0/2 مولار سود حل شد و به حجم 500 سی سی رسانده شد. به 500 میکرولیتر از محلول پروتئینی 4/5 میلی لیتر محلول سنجش افزوده شد و پس از 20 دقیقه در 550 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Jenway, 6305, UK) قرائت شد. درجه آبکافت با فرمول زیر سنجیده شد (34).

$$\text{پروتئین موجود در محلول } 22/0 \text{ مول در لیتر تری کلرواستیک اسید} \\ = \frac{\text{درجه هیدرولیزاسیون}}{\text{پروتئین موجود در هیدرولیزات}}$$

باز یافت نیتروژن بر اساس روش (18) طبق فرمول زیر سنجش شد:

$$\text{گرم هیدرولیزات} \times \text{نیتروژن موجود در هیدرولیزات} \\ = \text{باز یافت نیتروژن} \times \text{گرم ماده خام} \\ \text{گرم ماده خام} \times \text{نیتروژن موجود در ماده خام مصرفی}$$

#### فعالیت حذف رادیکال آزاد دیفنیل پیکریل هیدرازیل $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH)

جهت بررسی فعالیت حذف رادیکال آزاد محلول حاوی رادیکال آزاد DPPH (1/5 میلی لیتر، 0/1 میلی مولار در اتانول 95٪) با نمونه مخلوط گردید (1/5 میلی لیتر در غلظت های متفاوت نمونه در اتانول 50٪). مخلوط تکان داده شد و پس از 30 دقیقه در دمای اتاق جذب در 517 نانومتر سنجیده گردید. برای کنترل محلول اتانول به جای نمونه به کار رفت. بوتیل هیدروکسی تولوئن در غلظت 0/02 میلی گرم بر میلی لیتر برای مقایسه استفاده شد (29). فعالیت حذف رادیکال آزاد بر اساس فرمول 1 سنجیده شد:

$$DPPH \text{ radical scavenging capacity } (\%) = 1 - \frac{A_{517} \text{ sample}}{A_{517} \text{ control}} \times 100 \quad (1)$$

سنجش فعالیت مهار کنندگی آنزیم تبدیل کننده آنژیوتنسن I 50 میکرولیتر محلول هیدرولیزات با 50 میکرولیتر محلول ACE (25 واحد/میلی لیتر) مخلوط شد و 5 دقیقه در 37 درجه انکوبه شد و سپس با 150 میکرولیتر سوبسترا (His-Leu 8/3 میلی مولار در بافر سدیم بورات 50 میلی مولار) برای 60 دقیقه در دمای مشابه انکوبه شد. واکنش با افزودن 250 میکرولیتر محلول 1 مولار اسید کلریدریک متوقف شد.

نتایج درجه آبکافت و بازیافت نیترژن توسط 5 آنزیم مورد استفاده در جدول 1 آورده شده است. درجه آبکافت پروتئین حاصل از آنزیم آلکالاز با 4 آنزیم دیگر اختلاف معنی داری دارد و بیشتر است ( $p < 0/05$ ) اما درجه آبکافت 4 آنزیم دیگر اختلاف معنی داری نشان نداد ( $p > 0/05$ ). بازیافت نیترژن پروتئین آبکافت حاصل از فعالیت آنزیم آلکالاز و نئوتراز نیز بیشترین بوده و با سه تکرار دیگر اختلاف معنی داری دارد ( $p < 0/05$ ) اما دیگر آنزیم‌ها اختلافی نشان ندادند ( $p > 0/05$ ).

از آنالیز واریانس یک طرفه و معنی داری در سطح 95٪ توسط نرم‌افزار Graphpad prism (version 5/01, 2007)، جهت آنالیز آماری استفاده گردید. از آزمون دانکن جهت شناسایی گروه‌های با اختلاف معنی دار استفاده شد. از آزمون تی جفتی جهت بررسی فعالیت مهار ACE قبل و بعد از هضم با آنزیم‌های گوارشی استفاده شد.

## نتایج

### درجه آبکافت و بازیافت نیترژن

جدول 1- میزان درجه آبکافت و بازیافت نیترژن پروتئین آبکافت ضایعات میگوی سفید هندی با آنزیم‌های مختلف (%)

فلاووروزایم	نئوتراز	آلفا- کیموتریپسین	پپسین	آلکالاز	درجه آبکافت
47/3 ± 2/1 <sup>b</sup>	50/1 ± 0/4 <sup>b</sup>	48/6 ± 0/9 <sup>b</sup>	54/2 ± 1/6 <sup>b</sup>	64/2 ± 1/4 <sup>a</sup>	
59 ± 0/9 <sup>b</sup>	66/6 ± 1 <sup>ab</sup>	61 ± 1/2 <sup>b</sup>	60 ± 2 <sup>b</sup>	75 ± 1/6 <sup>a</sup>	بازیافت نیترژن

نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین است. تیمارهای با حروف هم نام در هر ردیف فاقد اختلاف معنی دار در سطح معنی داری 95٪ می باشند.

فعالیت پپسین کمترین فعالیت حذف رادیکال آزاد را نشان داد و با تمامی تیمارهای دیگر اختلاف معنی داری داشت ( $p < 0/05$ ). نتایج مهار 50٪ فعالیت آنزیم تبدیل کننده آنژیو تانسین I نیز نشان داد که پروتئین آبکافت حاصل از آنزیم آلکالاز و کیموتریپسین بیشترین تاثیر مهار کنندگی را دارا هستند و آنزیم‌های نئوتراز، پپسین و فلاووروزایم در مقام‌های بعدی می باشند که هر سه با هم و با دو آنزیم اولین دارای اختلاف معنی دار می باشند ( $p < 0/05$ ).

### فعالیت آنتی اکسیدانی و مهار کنندگی آنزیم تبدیل کننده

#### آنژیوتانسین I

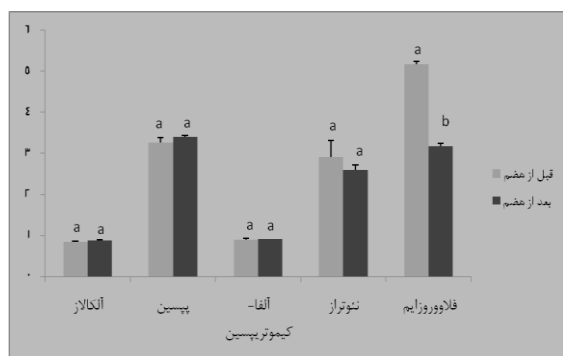
فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH و مهار ACE در جدول 2 آورده شده است. بر طبق نتایج پروتئین آبکافت حاصل از آنزیم آلکالاز و کیموتریپسین بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان داده که با تمامی تیمارهای دیگر اختلاف معنی داری دارد ( $p < 0/05$ ). پروتئین آبکافت حاصل از فعالیت آنزیم‌های نئوتراز و فلاووروزایم با یکدیگر اختلاف معنی داری نشان ندادند ( $p > 0/05$ ) اما پروتئین آبکافت حاصل از

جدول 2- فعالیت آنتی اکسیدان و مهار ACE پروتئین آبکافت ضایعات میگوی سفید هندی با آنزیم‌های مختلف

فلاووروزایم	نئوتراز	آلفا- کیموتریپسین	پپسین	آلکالاز	فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH (%)
36/3 ± 2 <sup>b</sup>	40/2 ± 1/1 <sup>b</sup>	45/1 ± 0/3 <sup>a</sup>	27/2 ± 0/2 <sup>c</sup>	47/1 ± 1/2 <sup>a</sup>	
5/18 ± 0/07 <sup>b</sup>	2/91 ± 0/41 <sup>ab</sup>	0/9 ± 0/04 <sup>b</sup>	3/26 ± 0/12 <sup>b</sup>	0/85 ± 0/02 <sup>a</sup>	Lc50 مهار ACE (میلی گرم در میلی لیتر)

نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین است. تیمارهای با حروف هم نام در هر ردیف فاقد اختلاف معنی دار در سطح معنی داری 95٪ می باشند.

پروتئین آبکافت حاصل از آنزیم‌های مختلف دیده نمی‌شود. بیشترین اسیدهای آمینه به ترتیب گلوتامیک اسید، آسپارتیک اسید، لیزین و کمترین اسیدهای آمینه سیستین، تریپتوفان، متیونین و هیستیدین می‌باشد.



نمودار 1- میزان پایداری فعالیت مهار ACE پروتئین آبکافت حاصل از آنزیم‌های مختلف قبل و بعد از هضم با آنزیم‌های گوارشی. اختلافات 2 به 2 بررسی شده است.

**پایداری پپتیدها در هضم توسط آنزیم‌های دستگاه گوارش**  
نمودار 1 میزان اختلاف فعالیت مهار ACE را قبل و بعد از هضم توسط آنزیم‌های پروتئازی دستگاه گوارش نشان می‌دهد. همانطور که از نمودار مشخص است به غیر از پروتئین آبکافت حاصل از فلاووروزایم بقیه پروتئین‌های آبکافت قبل و بعد از هضم توسط آنزیم‌های دستگاه گوارش اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. تنها پروتئین آبکافت حاصل از آنزیم فلاووروزایم پس از هضم افزایش فعالیت معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0/05$ ).

### پروفیل اسید آمینه

پروفیل اسید آمینه پروتئین‌های آبکافت و پروتئین ضایعات میگوی سفید هندی در جدول 3 خلاصه شده است. هر چند از نظر عددی در برخی اسیدهای آمینه بین پروتئین ضایعات میگو و پروتئین‌های آبکافت افزایش دیده می‌شود و در برخی موارد کاهش اما از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین اسیدهای آمینه پروتئین ضایعات میگوی سفید هندی و

جدول 3- ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین ضایعات میگوی سفید هندی و پروتئین‌های آبکافت حاصل از آن با آنزیم‌های مختلف

اسید آمینه	ضایعات	آلاناز	پپسین	آلفا-کیموتریپسین	نئوتراز	فلاووروزایم
<b>الف*</b>						
آرژنین	7/18	7/38	7/28	7/3	7/2	7
هیستیدین	2/6	1/8	2	2/2	1/9	2/3
ایزولوسین	4/27	4/3	4/26	4/28	4/28	4/26
لوسین	6/9	7	7	7/1	6/9	6/8
لیزین	7/27	7/33	7/28	7/27	6/95	7/1
متیونین	2/4	1/8	2/2	2	2	2/1
سیستین	0/7	0/6	0/7	0/6	0/6	0/6
فتیل آلانین	4/34	4/38	4/33	4/39	4/33	4/34
تیروزین	3/9	4	3/8	4	3/9	3/7
ترئونین	3/88	3/89	3/78	3/88	3/8	3/8
تریپتوفان	1/02	1	1	1	1/01	1
والین	5/44	5/48	5/44	5/49	5/44	5/45
<b>ب*</b>						
آلانین	5/47	5/48	5/46	5/47	5/47	5/46
آسپارتیک اسید	8/77	8/87	8/85	8/79	8/85	8/77
گلوتامیک اسید	11/56	11/56	11/49	11/55	11/48	11/49
گلیسین	5/33	5/33	5/33	5/33	5/33	5/33
پرولین	4/77	4/8	4/79	4/77	4/78	4/75
سرین	4/55	4/53	4/56	4/55	4/53	4/54

\*الف- اسیدهای آمینه ضروری و نیمه ضروری (گرم در صد گرم)، ب- اسیدهای آمینه غیر ضروری

## بحث

در تحقیق حاضر به بررسی خواص آنتی اکسیدان و مهار آنزیم تبدیل کننده آنژیو تنسین I پروتئین آبکافت ضایعات میگو با آنزیم های آلکالاز، پپسین، آلفا- کیموتریپسین، نئوتراز و فلاووروزایم پرداخته شد. پروتئین آبکافت آنزیم آلکالاز بالاترین درجه آبکافت و بازیافت نیترژن را نشان داد. همچنین پروتئین آبکافت آلکالاز و آلفا- کیموتریپسین بیشترین فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH و مهار آنزیم تبدیل کننده آنژیوتنسین I را نشان دادند.

حذف رادیکال آزاد مکانیسم اولیه ای است که توسط آن مواد آنتی اکسیدان می توانند از واکنش های اکسیداسیون جلوگیری کنند. DPPH یکی از معدود رادیکال های آزادی است که در دمای اتاق پایدار است (39). وقتی DPPH در حضور یک ماده الکترون دهنده مثل آنتی اکسیدان قرار می گیرد یک الکترون یا هیدروژن می پذیرد تا به یک مولکول دی مگنتیک پایدار تبدیل شود و در نتیجه مهار شده و جذب در 517 نانومتر کم می شود (23).

از سوی دیگر در مطالعه حاضر تمامی پروتئین های آبکافت تولیدی خاصیت مهار ACE نشان دادند. در مطالعه ای روی پروتئین آبکافت اسکوئید نیز مشاهده شد که بر خلاف پروتئین مادری اسکوئید تمامی پروتئین های آبکافت تولیدی با آنزیم های پروتامکس، تریپسین، نئوتراز، ساویناز، اسپراز و آلکالاز خاصیت مهار ACE را نشان دادند (23). بر این اساس می توان گفت عمل آبکافت ممکن است پپتیدهای مهار کننده ACE را در هیدرولیزات آزاد کند (12). در مطالعه ای پپتیدهای با وزن مولکولی پایین تر فعالیت مهار ACE بهتری داشتند (26). Zhao و همکاران (38) بیشترین ظرفیت مهار ACE را برای ژلاتین آبکافت خیار دریایی در پپتیدهای با وزن مولکولی زیر 1 کیلو دالتون گزارش نمودند. اما مطالعات دیگری گزارش کردند که پپتیدهای خیلی کوچک نمی تواند فعالیت مهار را افزایش دهد و حتی ممکن

است آنرا کاهش دهد (33). در مطالعه حاضر نیز به غیر از آلکالاز پروتئین حاصل از دیگر آنزیم ها از نظر درجه هیدرولیزاسیون اختلاف معنی داری نشان ندادند اما میزان فعالیت آنتی اکسیدان و مهار ACE در بین انواع پروتئین آبکافت کاملاً متفاوت بود. برای مثال در جه آبکافت پروتئین حاصل از آلفا- کیموتریپسین و نئوتراز با هم اختلاف معنی داری نداشت و در مورد نئوتراز از نظر عددی بالاتر بود اما فعالیت آنتی اکسیدان و بالاخص فعالیت مهار ACE در بین آنها اختلاف معنی داری داشت و در مورد آلفا- کیموتریپسین بالاتر بود. بر این اساس موارد دیگری نیز در میزان فعالیت زیست فعالی این پروتئین ها موثر است. Bougatef و همکاران (27) نیز  $LC_{50}$  را برای پروتئین آبکافت ضایعات ساردین ماهی با پروتئاز های مختلف 1/2 تا 7/4 میلی گرم در میلی لیتر گزارش کرد اما برای میگوی دریایی با پروتئاز خام 0/97 میلی گرم در میلی لیتر بود.

خصوصیات آنتی اکسیدانی پپتیدها بیشتر وابسته به ترکیب ساختار و آبگریزی می باشد (4). در این میان ترکیب اسیدهای آمینه نقش اساسی ایفا می کند. مطالعات متعدد نشان می دهد که سطح و ترکیب اسیدهای آمینه و پپتیدها، خواص آنتی اکسیدان پروتئین هیدرولیز شده را تعیین می کند (37). همچنین توالی اسیدهای آمینه در پپتیدها نیز در این امر مهم است (13).

مطالعات متعدد نشان از تاثیر مستقیم اسیدهای آمینه در خواص زیست فعال پپتیدها و پروتئین ها دارد. گزارش شده است که اسیدهای آمینه عطر زا مثل تیروزین، هیستیدین، تریپتوفان و فنیل آلانین (27) و اسیدهای آمینه آبگریز والین، لوسین، آلانین و متیونین نقش حیاتی در فعالیت آنتی اکسیدانی ایفا می کنند (20). Suetsuna و همکاران (31) پیشنهاد کردند که گروه های فنولیک هیدروکسیل در اسیدهای آمینه آروماتیک عامل مهار کردن رادیکال آزاد است که دهنده الکترون اند و اسیدهای آمینه هیستیدین، پرولین، آلانین و لوسین در این امر دخیلند. محققین دیگر نیز گزارش کردند که بین اسیدهای آمینه

بالاخص باندهای حاوی اسیدهای آمینه آروماتیک را کافت می‌کند (6).

در مطالعه حاضر نیز آبکافت مجدد پروتئین‌های تولیدی با آنزیم‌های پروتئاز دستگاه گوارش تغییری در فعالیت مهار ACE نشان نداد و حتی در مورد نوترز و فلاووروزایم افزایش فعالیت مهار ACE را باعث شد. در مطالعه ای نیز گزارش شد که آبکافت دوباره با آنزیم‌های تجاری فعالیت مهار ACE را افزایش داده است (31).

مطالعات اپیدمیولوژیک و آزمایشگاهی نشان می‌دهد که مهار کننده‌های ACE تاثیر مثبتی روی مراحل اولیه ارترواسکلروزیس دارد (7). مطالعات فارماکولوژیک نیز نشان داده است که مهارکننده‌های ACE می‌تواند سطح کلسترول خون را در جانوران مدل کاهش دهد (30). مطالعات مختلف نیز نشان داده که پروتئین آبکافت ساردین و ماهیان دیگر می‌تواند روی سطح پلاسمای خون و متابولیسم اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیره تاثیر داشته باشد (11). بنابراین پپتیدهای حاصل از مواد غذایی می‌توانند به عنوان عوامل دارویی گسترش یابند و به عنوان جایگزینی مطمئن و ایمن برای داروهای سنتزی جهت پیشگیری و درمان فشار خون و چربی خون به کار روند.

در مطالعه حاضر بر اساس پروفیل اسید آمینه کل اسیدهای آمینه ضروری و نیمه ضروری بیش از 48٪ از کل را تشکیل می‌دهند بنابراین این پروتئین آبکافت می‌تواند به عنوان یک منبع غذایی به کار رود.

در جمع‌بندی باید گفت آبکافت آنزیمی یکی از راه‌های آزادسازی پپتیدهای زیست فعال از منابع پروتئینی است که برای بالا بردن ارزش کاربردی و تغذیه ای منابع پروتئینی بسیار کاربرد دارد. روش‌های آبکافت آنزیمی با آلکالاز و آلفا-کیموتریپسین می‌تواند برای بازیابی پروتئین از ضایعات میگو جهت استفاده به عنوان غذاهای کاربردی یا ترکیبات زیست فعال با خواص آنتی اکسیدان و مهار آنزیم تبدیل کننده ACE به کار رود.

تیروزین، تریپتوفان و متیونین بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی دارند و سپس هیستیدین، سیستئین و فنیل آلانین قرار دارد.

در تحقیق حاضر نیز میزان اسیدهای آمینه گلوتامیک اسید، آسپارتیک اسید، لیزین، لوسین و آرژنین در بیشترین میزان بود و اسیدهای آمینه دیگر نیز در میزان قابل قبول از نظر کفایت برای انجام فعالیت آنتی اکسیدان وجود داشت. بنابراین یکی از دلایل اصلی فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین‌های آبکافت تولیدی وجود اسیدهای آمینه نامبرده است. هر چند ترتیب توالی اسیدهای آمینه نیز مهم است و اختلافات موجود بین فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین‌های تولیدی به دلیل تفاوت در توالی اسیدهای آمینه و طول زنجیره پپتیدی تولیدی می‌باشد که نیاز به بررسی دقیقتری دارد.

شناخته شده که اتصال پپتیدهای مهار کننده به ACE قویاً به حضور اسیدهای آمینه آبگریز در انتهای C و اسیدهای آمینه آلیفاتیک چند شاخه در انتهای N پپتید وابسته است (25). همچنین پیشنهاد شده که پرولین، لیزین یا آرژنین اسیدهای آمینه ترجیحی در انتهای C برای افزایش قابلیت مهار ACE می‌باشد (Meisel, 1997).

سوبسترای اصلی کیموتریپسین شامل تریپتوفان، تیروزین، فنیل آلانین، لوسین و متیونین است که در انتهای کربوکسیل پروتئین وجود دارد. این اسیدهای آمینه حاوی زنجیره‌های جانبی آروماتیک یا آبگریز است و این اسیدهای آمینه نقش مهمی در مهار ACE بازی می‌کنند (24).

آلکالاز نیز خاصیت اندوپپتیداز دارد. بعلاوه پپتیدهای زیست فعال که با آلکالاز تولید می‌شوند به هضم آنزیمی مقاومند مثل هضم با پپسین، تریپسین و آلفا کیموتریپسین که اجازه جذب این نوع پپتیدها را در بدن می‌دهد. بعلاوه آلکالاز توالی پپتیدی کوتاه تری تولید می‌کند که اسیدهای آمینه انتهایی مناسبی برای مهار ACE داراست (28). پرولین یا اسیدهای آمینه آروماتیک موجود در انتهای C پروتئین و پپتید جهت اتصال به ACE بسیار کارآمد است و آلکالاز بسیاری از باندهای پپتیدی

## REFERENCES

1. Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudin, I., Gómez-Guillén M.C., Montero, P. (2011): Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*. 44: 1044–1051.
2. Borek, C. (2001): Antioxidant health effects of aged garlic extract. *Journal of Nutrition*. 13:1010–1015.
3. Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Ravallec-Plé, R., Leroy, Y., Guillochon, D., Barkia, A., et al. (2008): Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine-proteases. *Food Chemistry*. 111: 350–356.
4. Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., Nokihara, K. (1998): Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem*. 46:49–53.
5. Chen J., Wang, Y., Zhong, Q., Wu, Y., Xia, W. (2012): Purification and characterization of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysate of grass carp protein. *Peptides*. 33:52–58.
6. Doucet, D., Otter, E.O., Gauthier, S.F., Foegeding, E.A. (2003): Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey protein by Alcalase: Peptides identification and determination of enzyme specificity. *J. Agri. Food Chem*. 51:6300–6308.
7. Fennessy, P.A., Campbell, J.H., Campbell, G.R. (1994): Perindopril inhibits both the development of atherosclerosis in the cholesterol-fed rabbit and lipoprotein binding to smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis*. 106: 29–41.
8. Goodfriend, T. L., Elliott, M. E., Catt, K. J. (1996): Drug therapy – Angiotensin receptors and their antagonists. *The New England Journal of Medicine*. 334(25): 1649–1654.
9. Hou, W. C., Chen, H. J., Lin, Y. H. (2003): Antioxidant peptides with angiotensin converting enzyme inhibitory activities and applications for angiotensin converting enzyme purification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 1706–1709.
10. Kearney, P.M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P.K., He, J. (2005): Global burden of hypertension: Analysis of worldwide data. *Lancet*. 365:217–23.
11. Khaled, H.B., Ghilissi, Z., Chtourou, Y., Hakim, A., Ktari, N., Fatma, M.A., et al. (2012): Effect of protein hydrolysates from sardinelle (*Sardinella aurita*) on the oxidative status and blood lipid profile of cholesterol-fed rats. *Food Research International*. 45: 60–68.
12. Khantaphant, S., Benjakul, S., Kishimura, H. (2011): Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from the muscle of brownstripe red snapper prepared using pyloric caeca and commercial proteases. *Process Biochemistry*. P: 318-327.
13. Kim, S.K., Kim, Y.T., Byun, H.G., Nam, K.S., Joo, D.S., Shahidi, F. (2001): Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *J Agric Food Chem*. 49: 1984–1989.
14. Korhonen, H., Pihlanto, A. (2003): Food-derived bioactive peptides—opportunities for designing future foods. *Curr Pharm Des*. 9: 1297–308.
15. Kwon Lee, J., Hong, S., Jeon, J.K., Kim, S.K., Byun, H.G. (2009): Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from the rotifer, *Brachionus rotundiformis*. *Bioresource Technology*. 100:5255–5259.
16. Lee, W.S., Jeon, J.K., Byun, H.G. (2011): Characterization of a novel antioxidative peptide from the sand eel *Hypoptychus dybowskii*. *Process Biochemistry*. P: 1207-1211.



17. Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E., Espe, M. (2002): Studies on the nitrogen recovery in enzymatic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by protamex<sup>TM</sup> protease. *Process Biochemistry*. 37: 1263-1269.
18. Lin, L., Lv S., Li, B. (2012): Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory and antihypertensive properties of squid skin gelatin hydrolysates. *Food Chemistry*. 131: 225–230.
19. Lin, L., Lv, S., Li, B. F. (2012): Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory and antihypertensive properties of squid skin gelatin hydrolysates. *Food Chemistry*. 131:225–230.
19. Liu, X., Zhang, M., Zhang, C., Liu, C. (2012): Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory, antihypertensive and antihyperlipidaemic activities of protein hydrolysates from *Rhopilema esculentum*. *Food Chemistry*. 134: 2134–2140.
20. Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, S.K. (2005): Antioxidant properties of a radicals scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *J Agric Food Chem*. 53: 581–7.
21. Meisel, H. (1997): Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers*. 43:119–128.
22. Messerli, F. H. (1999): Hypertension and sudden cardiac death. *American Journal of Hypertension*. 12: 181–188.
23. Naqash, S.Y., Nazeer, R. A. (2011): Evaluation of bioactive properties of peptide isolated from *Exocoetus volitans* backbone, *International Journal of Food Science and Technology*. P: 37–43.
24. Pihlanto, L. (2000): Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and A-inhibitory. *Trends in Food Science and Technology*. 11:347–356.
25. Qian, Z.J., Je, J.Y., Kim, S.K. (2007): Antihypertensive effect of angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptide from hydrolysates of big eye tuna dark muscle, *Thunnus obesus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:8398–8403.
26. Raghavan, S., Kristinsson, H.G. (2009): ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. *Food Chemistry*. 117: 582–588.
27. Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W.K., Je, J.Y., Kim, S.K. (2005): Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Res Int*. 38: 175–82.
28. Saito, Y., Wanezaki, K., Kawato, A., Imayasu, S. (1994): Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees. *Biosci. Biotech. Biochem*. 58:1767–1771.
29. Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamura, T. (1992): Antioxidative properties of xanthan on the antioxidant of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J Agric Food Chem*. 40: 945–948.
30. Sugano, M., Makino, N., Yanaga, T. (1996): The effects of renin-angiotensin system inhibition on aortic cholesterol content in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*. P: 123–129.
31. Suetsuna, K., Maekawa, K., Chen, J. (2004): Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. P:15.
32. Taheri, A., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A., Habibi Rezaie, M. (2011): Optimization of goldstripe sardine (*Sardinella gibbosa*) protein hydrolysate using Alcalase 2.4L by response surface methodology. *CyTA – Journal of Food*. 9(2):114–120.
33. Theodore, A. E., Kristinsson, H.G. (2007): Angiotensin converting enzyme inhibition of fish protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87:2353–2357.
34. Tsumura, K., Kugimiya, W., Bando, N., Hiemori, M., Ogawa, T. (1999): Preparation of hypoallergenic soybean protein with processing functionality by selective enzymatic hydrolysis. *Food Science and Technology*. 5: 171–175.

35. Witherow, F. N., Helmy, A., Webb, D. J., Fox, K. A. A., Newby, D. E. (2001): Bradykinin contributes to the vasodilator effects of chronic angiotensin converting enzyme inhibition in patients with heart failure. *Circulation*. 104(18):2177–2181.
36. Wu, H., He, H.L., Chen, X.L., Sun, C.Y., Zhang, Y.Z., Zhou, B.C. (2008): Purification and identification of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from shark meat hydrolysate. *Process Biochemistry*. 43:457–461.
37. Wu, H.C., Chen, H.M., Shiau, C.Y. (2003): Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*. 36:949–957.
38. Zhao, Y., Li, B., Liu, Z., Dong, S., Zhao, X., Zeng, M. (2007): Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate. *Process Biochemistry*. 42:1586–1591.
39. Zhong, s. et al. (2011): Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry, *Food Chemistry*. 126:1636–1642.