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

علی طاهری*[۱]، سمیرا جلالی‌نژاد[۲]، سیدامیرعلی انوار[۳]

چکیده

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 ضداکسیدانی، ضد فشار خون، بازیافت نیتروژن، درجه آبکافت و پروفیل اسید آمینه ۵ نوع مختلف (با آنزیم آلکالاز، پپسین، آلفا ـ کیموتریپسین، نئوتراز و فلاوروزایم) 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 نیتروژن و درجه آبکافت را به ترتیب با مقادیر ۱/۶ ±۷۵ ٪ و ۱/٤ ± ٦٤/۲ ٪ نشان داد. بیشترین فعالیت ضد اکسیدانی برای آلکالاز و آلفا- کیموتریپسین به ترتیب ۱/۲ ± ٤۷/۱ و ۰/۳ ± ٤٥/۱ ٪ بود. بیشترین فعالیت مهار آنزیم تبدیل کننده آنژیوتنسین I نیز برای آلکالاز و آلفا- کیموتریپسین با LC_{50} ۰/۰۲ ± ۰/۸۵ میلی گرم بر میلی لیتر و ۰/۰٤ ± ۰/۹ 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 آبگریز را نشان داد. مطابق با نتایج این تحقیق پروتئین آبکافت ضایعات میگوی سفید هندی که با آلکالاز و آلفا ـ 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 ـ کیموتریپسین، آنژیوتنسین، ضد اکسیدان، پروتئین آبکافت*

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲

مقدمه

بیماری فشار خون یک فرآیند چند فاکتوره است و دلیل اصلی بیماری در کشورهای صنعتی می‌باشد. جمعیت مبتلا به فشار خون در جهان در سال ۲۰۰۰ میلادی ۹۷۲ میلیون نفر بوده است و تخمین زده می‌شود در سال ۲۰۲۵ به ۱/٥٦ بیلیون نفر برسد(۱۰). در حال حاضر ۱۵ تا ۲۰٪ جمعیت بالغین جهان از این بیماری رنج می‌برند(۱۸). 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 آنژیو تنسین II فعال می‌باشد که منقبض کننده قوی عروق است(۸) و غیر فعال کننده برادی کینین می‌باشد که یک متسع کننده قوی عروق است(۳۵). 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 (۲۲) و بنابراین علاقه زیادی به مهارکننده‌های طبیعی وجود دارد.

از سوی دیگر امروزه بیماری‌های مرتبط با رادیکال‌های آزاد باعث آسیب‌های جدی به بدن می شوند که می‌تواند منجر به سرطان و یا رنج گسترده‌ای از بیماری‌های دیگر گردد(۲). 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 صناعی در صنایع غذایی بسیار مورد توجه است (۳۱). 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

۱- استادیار فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران taheri@cmu.ac.ir

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

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

محدودیت‌هایی 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 گسترده‌ای را در سال‌های اخیر به خود اختصاص داده است(۳۱).

علوم تغذیه جدید به سمت "تغذیه برای سلامت بهینه" گام برمی‌دارد و به سوی درمان بیماری‌ها یا پیشگیری از آنها سوق دارد. بر این اساس پپتیدهای زیست فعال بیولوژیک فراوانی از بسیاری غذاهای طبیعی و فرآوری شده استخراج شده است(۱٤). عموماً این پپتیدها علاوه بر عملکردشان به عنوان غذا می‌توانند تاثیر فیزیولوژیک داشته باشند. تمامی این پپتیدهای زیست فعال در ساختار پروتئین مادری خود غیرفعالند و می‌توانند توسط هضم روده‌ای یا آبکافت توسط پروتئازها به شکل فعال درآیند. پپتیدهای مهارکننده آنزیم تبدیل کننده آنژیو تنسین I از این پپتیدها می‌باشند. بنابراین تمامی پپتیدهایی که این توانایی را داشته باشند می‌توانند در نهایت فشار خون را کاهش دهند. پپتیدهای با خواص آنتی اکسیدان از دیگر پپتیدهایی هستند که با حذف رادیکال‌های آزاد عامل اکسایش از بیماری‌های بسیاری جلو گیری می‌کنند.

مطالعات متعدد نشان از فعالیت مهار آنزیم ACE پروتئین‌های آبکافت آبزیان، گوشت کوسه (۳۷)، کپور علفخوار (۵)، گوشت شانک (۱۲)، ژلاتین اسکوئید (۱۹)، ژله ماهی (۱٦) و... می‌باشد همچنین مطالعات بسیاری بر خواص آنتی اکسیدان پروتئین آبکافت آبزیان مثل سرخوی قرمز پهلو قهوه‌ای (۱۲)، مارماهی شنی (۱٦) و... تاکید دارد و اثبات شده که هردو این اثرات با هم می‌توانند اثر ضد فشار خون در محیط زنده داشته باشند(۹).

میگو یکی از سخت پوستان اصلی پرورشی در ایران است که ضایعات مشخصی را پس از فرآوری میگوی بدون سر و پوسته به‌جا می‌گذارد. این ضایعات غنی از پروتئین و پلی ساکاریدهایی چون کیتین است که در صورت بازیابی مزایای 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 آبزیان شهرستان چابهار به صورت تازه تهیه شد و تا زمان مصرف در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

آبکافت

۱۵۰۰ گرم ضایعات میگوی سفید هندی در یک چرخ گوشت چرخ شد و سپس به ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری اضافه شد. ارلن‌ها برای ۲۰ دقیقه در ۸۵ درجه سانتی گراد گرما دهی شدند تا آنزیم‌های داخلی آن غیر فعال گردد و چربی گوشت آزاد شود(۳۲). نمونه‌ها در دمای اتاق خنک شدند. هر نمونه حاوی نسبت ۱:۱ از ۱۰۰ گرم ضایعات با آب مقطر بود که پس از اضافه کردن مقدار مورد نیاز آنزیم‌های آلکالاز، پپسین، آلفا کیموتریپسین، نئوتراز، فلاوورزایم در دما و زمان مشخص انکوباسیون شد. پس از زمان مورد نیاز تیمار مخلوط در حمام آبی ۹۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت و آنزیم‌ها غیرفعال گردیدند. پروتئین آبکافت ماهی پس از سانتریفوژ جدا گردید.

تعیین درجه آبکافت و بازیافت نیتروژن

به ۰/۵ میلی‌لیتر از سوپرناتانت حاصله بعد از هیدرولیزاسیون ۰/٤٤ مول در لیتر تری کلرواستیک اسید اضافه شد. مخلوط برای سی دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سپس در ٤۵۰۰ دور در دقیقه (۵ دقیقه) سانتریفوژ گردید. محلول ۰/۲۲ 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 ٤/۵ میلی گرم سدیم پتاسیم تارتارات، ۱/۵ میلی گرم سولفات مس ۵ آبه، ۲/۵ میلی گرم یدید پتاسیم در ۲۰۰ میلی لیتر محلول ۰/۲ مولار سود

حل شد و به حجم ۵۰۰ سی سی رسانده شد. به ۵۰۰ میکرولیتر از محلول پروتئینی ٤/٥ میلی لیتر محلول سنجش افزوده شد و پس از ۲۰ دقیقه در ۵۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Jenway, 6305, UK) قرائت شد. درجه آبکافت با فرمول زیر سنجیده شد (۳٤).

$$\text{درجه هیدرولیزاسیون} = \frac{\text{پروتئین موجود در محلول ۰/۲۲ مول در لیتر تری کلرواستیک اسید}}{\text{پروتئین موجود در هیدرولیزات}}$$

بازیافت نیتروژن بر اساس روش (۱۸) طبق فرمول زیر سنجش شد:

$$\text{بازیافت نیتروژن} = \frac{\text{گرم هیدرولیزات} \times \text{نیتروژن موجود در هیدرولیزات}}{\text{گرم ماده خام} \times \text{نیتروژن موجود در ماده خام مصرفی}}$$

فعالیت حذف رادیکال آزاد دیفنیل پیکریل هیدرازیل -α,α diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH)

جهت بررسی فعالیت حذف رادیکال آزاد محلول حاوی رادیکال آزاد DPPH (۱/۵ میلی لیتر، ۰/۱ میلی مولار در اتانول ۹۵٪) با نمونه مخلوط گردید (۱/۵ میلی لیتر در غلظت های متفاوت نمونه در اتانول ۵۰٪). مخلوط تکان داده شد و پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق جذب در ۵۱۷ نانومتر سنجیده گردید. برای کنترل محلول اتانول به جای نمونه به کار رفت. بوتیل هیدروکسی تولوئن در غلظت ۰/۰۲ میلی گرم بر میلی لیتر برای مقایسه استفاده شد (۲۹). فعالیت حذف رادیکال آزاد بر اساس فرمول ۱ سنجیده شد:

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

سنجش فعالیت مهار کنندگی آنزیم تبدیل کننده آنژیوتنسین I

۵۰ میکرولیتر محلول هیدرولیزات با ۵۰ میکرولیتر محلول ACE (۲۵ واحد/میلی لیتر) مخلوط شد و ۵ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه شد و سپس با ۱۵۰ میکرولیتر سوبسترا (Hip-His-Leu ۸/۳ میلی مولار در بافر سدیم بورات ۵۰ میلی مولار) برای ٦۰ دقیقه در دمای مشابه انکوبه شد. واکنش با افزودن ۲۵۰ میکرولیتر محلول ۱ مولار اسید کلریدریک متوقف شد. هیپوریک اسید حاصله با ۰/۵ میلی لیتر استیل استات استخراج شد. بعد از سانتریفوژ در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه ۰/۲ میلی لیتر از لایه بالایی به لوله آزمایش منتقل شد و در ۸۰ درجه سانتی گراد برای ۱ ساعت خشک شد. هیپوریک اسید در ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر حل شد و جذب در ۲۲۸ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر ماورای بنفش قرائت شد. Lc_{50} به عنوان غلظتی که برای مهار ۵۰٪ فعالیت ACE نیاز است گزارش شد (۱۵).

پایداری پپتیدها در هضم توسط آنزیم های دستگاه گوارش

محلول ۱٪ پپسین در بافر ۰/۱ میلی مولار Hcl-Kcl در pH= ۲ تهیه شد و محلول ۱٪ کیموتریپسین در بافر ۰/۱ میلی مولار NaoH-Kcl در pH=۷ تهیه شد. پپتیدها در ۰/۰۲ میلی گرم در میلی لیتر محلول ها حل شد و برای ٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد واکنش یافت. واکنش با ۱۵ دقیقه جوشاندن خاتمه یافت. بعد از ۲۵ دقیقه سانتریفوژدر ۱۲۰۰۰ g سوپرناتانت خنثی شد و برای سنجش مهار ACE به کار رفت (۱۵).

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 ٦ نرمال در ۱۱۰ درجه سانتی گراد هیدرولیز و توسط ستون فاز معکوس (C۱۸) کرماتوگراف شدند. محتوای تریپتوفان بعد از هیدرولیز نمونه ها در محلول هیدروکسید سدیم ٤/۲ نرمال و سیستین پس از تیمار با محلول پرفورمیک اسید سنجش شد. برای سنجش اسیدهای آمینه آزاد نمونه ها در اسید کلریدریک هموژن و سپس با اسید حاوی استاندارد داخل نورلوسین ۱٦۰ میکرومول در لیتر مخلوط شد. نمونه‌ها در g × ۱۲۰۰۰ (٤ درجه سانتی گراد برای ۱۵ دقیقه) سانتریفوژ و سوپرناتانت توسط فیلتر ۱۰ کیلو دالتونی فیلتر شد. سوپرناتانت توسط دستگاه کرماتوگرافی مایع با نفوذ بالا سنجش گردید (۳۲).

آنالیز آماری

از آنالیز واریانس یک طرفه و معنی داری در سطح ۹۵٪ توسط نرم‌افزار Graphpad prism (version ۵/۰۱، ۲۰۰۷،

Graphpad software Inc) جهت آنالیز آماری استفاده گردید. از آزمون دانکن جهت شناسایی گروه های با اختلاف معنی‌دار 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 نیتروژن

نتایج درجه آبکافت و بازیافت نیتروژن توسط ۵ آنزیم مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. درجه آبکافت پروتئین حاصل از آنزیم آلکالاز با ٤ آنزیم دیگر اختلاف معنی داری دارد و بیشتر است ($p<۰/۰۵$) اما درجه آبکافت ٤ آنزیم دیگر اختلاف معنی داری نشان نداد ($p>۰/۰۵$). بازیافت نیتروژن پروتئین آبکافت حاصل از فعالیت آنزیم آلکالاز و نئوتراز نیز بیشترین بوده و با سه تکرار دیگر اختلاف معنی‌داری دارد ($p<۰/۰۵$) اما دیگر آنزیم‌ها اختلافی نشان ندادند($p>۰/۰۵$).

جدول ۱- میزان درجه آبکافت و بازیافت نیتروژن پروتئین آبکافت ضایعات میگوی سفید هندی با آنزیم های مختلف (٪)

	آلکالاز	پپسین	آلفا- کیموتریپسین	نئوتراز	فلاوروزایم
درجه آبکافت	٦٤/٢ ± ١/٤ ^{a}	٥٤/٢ ± ١/٦ ^{b}	٤٨/٦ ±٠/٩ ^{b}	٥٠/١ ± ٠/٤ ^{b}	٤٧/٣ ± ٢/١ ^{b}
بازیافت نیتروژن	٧٥ ± ١/٦ ^{a}	٦٠ ±٢ ^{b}	٦١ ± ١/٢ ^{b}	٦٦/٦ ± ١ ^{ab}	٥٩ ± ٠/٩ ^{b}

نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین است. تیمارهای با حروف هم نام در هر ردیف فاقد اختلاف معنی دار در سطح معنی داری ۹۵٪ می باشند.

فعالیت آنتی اکسیدانی و مهار کنندگی آنزیم تبدیل کننده آنژیوتنسین I

فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH و مهار ACE در جدول ۲ 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 معنی‌داری دارد ($p<۰/۰۵$). پروتئین آبکافت حاصل از فعالیت آنزیم‌های نئوتراز و فلاوروزایم با یکدیگر اختلاف معنی داری نشان ندادند ($p>۰/۰۵$) اما پروتئین آبکافت حاصل از فعالیت پپسین کمترین فعالیت حذف رادیکال ازاد را نشان داد و با تمامی تیمارهای دیگر اختلاف معنی داری داشت ($p<۰/۰۵$). نتایج مهار ۵۰٪ فعالیت آنزیم تبدیل کننده آنژیو تنسین I نیز نشان داد که پروتئین آبکافت حاصل از آنزیم آلکالاز و کیموتریپسین بیشترین تاثیر مهار کنندگی را دارا هستند و آنزیم های نئوتراز، پپسین و فلاوروزایم در مقام‌های بعدی می باشند که هر سه با هم و با دو آنزیم اولین دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($p<۰/۰۵$).

جدول ۲- فعالیت آنتی اکسیدان و مهار ACE پروتئین آبکافت ضایعات میگوی سفید هندی با آنزیم های مختلف

	آلکالاز	پپسین	آلفا- کیموتریپسین	نئوتراز	فلاوروزایم
فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH (٪)	٤٧/١ ± ١/٢^{a}	٢٧/٢ ± ٠/٢ ^{c}	٤٥/١ ±٠/٣ ^{a}	٤٠/٢ ± ١/١ ^{b}	٣٦/٣ ± ٢ ^{b}
Lc_{50} مهار ACE (میلی گرم در میلی لیتر)	٠/٨٥ ± ٠/٠٢ ^{a}	٣/٢٦ ±٠/١٢ ^{b}	٠/٩ ± ٠/٠٤ ^{b}	٢/٩١ ± ٠/٤١ ^{ab}	٥/١٨ ± ٠/٠٧ ^{b}

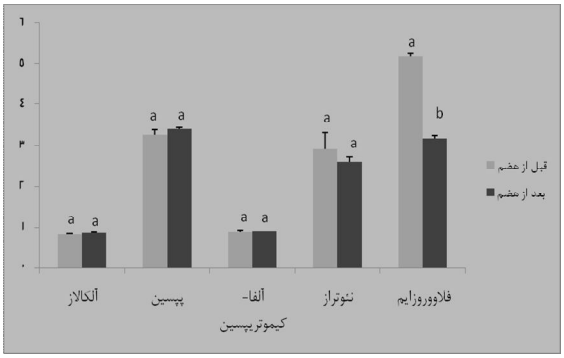
نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین است. تیمارهای با حروف هم نام در هر ردیف فاقد اختلاف معنی دار در سطح معنی داری ۹۵٪ می باشند

پایداری پپتیدها در هضم توسط آنزیم‌های دستگاه گوارش

نمودار ۱ میزان اختلاف فعالیت مهار ACE را قبل و بعد از هضم توسط آنزیم‌های پروتئازی دستگاه گوارش نشان می‌دهد. همانطور که از نمودار مشخص است به‌غیر 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($p<۰/۰۵$).

پروفیل اسید آمینه

پروفیل اسید آمینه پروتئین های آبکافت و پروتئین ضایعات میگوی سفید هندی در جدول ۳ 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 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 ۱- میزان پایداری فعالیت مهار ACE پروتئین آبکافت حاصل از آنزیم های مختلف قبل و بعد از هضم با آنزیم‌های گوارشی. اختلافات ۲ به ۲ بررسی شده است.

جدول۳- ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین ضایعات میگوی سفید هندی و پروتئین های آبکافت حاصل از آن با آنزیم های مختلف

اسید آمینه	ضایعات	آلکالاز	پپسین	آلفا- کیموتریپسین	نئوتراز	فلاووروزایم
الف*						
آرژنین	۷/۱۸	۷/۳۸	۷/۲۸	۷/۳	۷/۲	۷
هیستیدین	۲/٦	۱/۸	۲	۲/۲	۱/۹	۲/۳
ایزولوسین	٤/۲۷	٤/۳	٤/۲٦	٤/۲۸	٤/۲۸	٤/۲٦
لوسین	٦/۹	۷	۷	۷/۱	٦/۹	٦/۸
لیزین	۷/۲۷	۷/۳۳	۷/۲۸	۷/۲۷	٦/۹٥	۷/۱
متیونین	۲/٤	۱/۸	۲/۲	۲	۲	۲/۱
سیستین	۰/۷	۰/٦	۰/۷	۰/٦	۰/٦	۰/٦
فنیل آلانین	٤/۳٤	٤/۳۸	٤/۳۳	٤/۳۹	٤/۳۳	٤/۳٤
تیروزین	۳/۹	٤	۳/۸	٤	۳/۹	۳/۷
ترئونین	۳/۸۸	۳/۸۹	۳/۷۸	۳/۸۸	۳/۸	۳/۸
تریپتوفان	۱/۰۲	۱	۱	۱	۱/۰۱	۱
والین	٥/٤٤	٥/٤۸	٥/٤٤	٥/٤۹	٥/٤٤	٥/٤٥
ب*						
آلانین	٥/٤۷	٥/٤۸	٥/٤٦	٥/٤۷	٥/٤۷	٥/٤٦
آسپارتیک اسید	۸/۷۷	۸/۸۷	۸/۸٥	۸/۷۹	۸/۸٥	۸/۷۷
گلوتامیک اسید	۱۱/٥٦	۱۱/٥٦	۱۱/٤۹	۱۱/٥٥	۱۱/٤۸	۱۱/٤۹
گلایسین	٥/۳۳	٥/۳۳	٥/۳۳	٥/۳۳	٥/۳۳	٥/۳۳
پرولین	٤/۷۷	٤/۸	٤/۷۹	٤/۷۷	٤/۷۸	٤/۷٥
سرین	٤/٥٥	٤/٥۳	٤/٥٦	٤/٥٥	٤/٥۳	٤/٥٤

*: الف- اسید های 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 نیتروژن 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 (۳۹). وقتی DPPH در حضور یک ماده الکترون دهنده مثل آنتی اکسیدان قرار می‌گیرد یک الکترون یا هیدروژن می پذیرد تا به یک مولکول دی مگنتیک پایدار تبدیل شود و درنتیجه مهار شده و جذب در ۵۱۷ نانومتر کم می شود (۲۳).

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 پروتئین‌های آبکافت تولیدی با آنزیم‌های پروتامکس، تریپسین، نئوتراز، ساوینار، اسپراز و آلکالاز خاصیت مهار ACE را نشان دادند(۲۳). برا ین اساس می‌توان گفت عمل آبکافت ممکن است پپتیدهای مهار کننده ACE را در هیدرولیزات آزاد کند (۱۲). در مطالعه ای پپتیدهای با وزن مولکولی پایین تر فعالیت مهار ACE بهتری داشتند (۲٦). Zhao و همکاران (۳۸) بیشترین ظرفیت مهار ACE را برای ژلاتین آبکافت خیار دریایی در پپتیدهای با وزن مولکولی زیر ۱ کیلو دالتون گزارش نمودند. اما مطالعات دیگری گزارش کردند که پپتیدهای خیلی کوچک نمی‌تواند فعالیت مهار را افزایش دهد و حتی ممکن است آنرا کاهش دهد (۳۳). 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- کیمو تریپسین بالاتر بود. بر این اساس موارد دیگری نیز در میزان فعالیت زیست فعالی این پروتئین ها موثر است. Bougatef و همکاران (۲۷) نیز Lc_{50} را برای پروتئین آبکافت ضایعات ساردین ماهی با پروتئاز های مختلف ۱/۲ تا ۷/٤ میلی گرم در میلی لیتر گزارش کرد اما برای میگوی دریایی با پروتئاز خام ۰/۹۷ میلی گرم در میلی لیتر بود.

خصوصیات آنتی اکسیدانی پپتیدها بیشتر وابسته به ترکیب، ساختار و آبگریزی می‌باشد(٤). در این میان ترکیب اسیدهای آمینه نقش اساسی ایفا می‌کند. مطالعات متعدد نشان می‌دهد که سطح و ترکیب اسیدهای آمینه و پپتیدها، خواص آنتی اکسیدان پروتئین هیدرولیز شده را تعیین می‌کند(۳۷). همچنین توالی اسیدهای آمینه در پپتیدها نیز در این امر مهم است(۱۳).

مطالعات متعدد نشان از تاثیر مستقیم اسیدهای آمینه در خواص زیست فعال پپتیدها و پروتئین‌ها دارد. گزارش شده است که اسیدهای آمینه عطر زا مثل تیروزین، هیستیدین، تریپتوفان و فنیل آلانین(۲۷) و اسیدهای آمینه آبگریز والین، لوسین، آلانین و متیونین نقش حیاتی در فعالیت آنتی اکسیدانی ایفا می کنند (۲۰). Suetsuna و همکاران (۳۱) پیشنهاد کردند که گروه‌های 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

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 پروتئین های 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 می باشد 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(۲۵). همچنین پیشنهاد شده که پرولین، لیزین یا آرژنین اسیدهای آمینه ترجیهی 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(۲٤).

آلکالاز نیزخاصیت 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 می دهد. بعلاوه آلکالاز توالی پپتیدی کوتاه تری تولید می کند که اسیدهای آمینه انتهایی مناسبی برای مهار ACE داراست (۲۸). 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 بالاخص باندهای حاوی اسیدهای آمینه آروماتیک را کافت می‌کند (٦).

در مطالعه حاضر نیز آبکافت مجدد پروتئین های تولیدی با آنزیم های پروتئاز دستگاه گوارش تغییری در فعالیت مهار ACE نشان نداد و حتی در مورد نئوتراز و فلاووروزایم افزایش فعالیت مهار ACE را باعث شد. در مطالعه ای نیز گزارش شد که آبکافت دوباره با آنزیم های تجاری فعالیت مهار ACE را افزایش داده است (۳۱).

مطالعات اپیدمیولوژیک و آزمایشگاهی نشان می‌دهد که مهار کننده‌های ACE تاثیر مثبتی روی مراحل اولیه ارترواسکلروزیس دارد(۷). مطالعات فارماکولوژیک نیز نشان داده است که مهارکننده‌های ACE می‌تواند سطح کلسترول خون را در جانوران مدل کاهش دهد(۳۰). 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(۱۱). 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 ٤٨٪ 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 می تواند 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.

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., Ghlissi, 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^{TM} 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 antioxidantion 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 e□ects 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 fi sh 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 puri fi cation 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.