

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهار آنزیم مبدل آنزیم‌ها پروتئین‌های هیدرولیز شده جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس *Spirulina platensis* با آنزیم‌های گوارشی

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی اثر هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های ریز جلبک اسپیرولینا بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهار آنزیم مبدل آنزیم‌ها انجام شد. این پژوهش در سال‌های ۱۳۹۷ و ۱۳۹۸ در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران انجام شد. ریز جلبک اسپیرولینا در محیط کشت استاندارد زاروک کشت داده شد. بعد از شکستن دیواره سلولی با روش ترکیبی انجماد-ذوب، برای غیرفعال کردن آنزیم‌های اسپیرولینا، نمونه حاصل در ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شد. بعد از سانتریفیوژ (g ۹۰۰۰، ۱۵ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد)، مایع رویی حاصل در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های اسپیرولینا با ترکیب‌های دوگانه و سه‌گانه آنزیم‌های پپسین، تریپسین و آلفا-کیموتریپسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH بهینه انجام گرفت. فعالیت آنزیم‌ها با جوشاندن در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه متوقف شد. پروتئین‌های هیدرولیز شده سانتریفیوژ و مایع رویی حاصل فراکشنه (جزء-ب) شد. میزان پروتئین نمونه‌ها با تست لوری، میزان پیشرفت درجه هیدرولیز با استفاده از اورتو-فتال‌دی‌آلدئید (OPA)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی با پاک‌سازی رادیکال‌های ۲ و ۲-دی فنیل-۱-پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) و ۲ و ۲-آزینوبیس (۳) اتیل-بنزوتیازولین-۶-سولفونات (ABTS) و فعالیت مهار آنزیم مبدل آنزیم‌ها (ACE) با سوبسترای فوریل‌آکریل‌تیل-ال-فیل‌آلانیل-گلاسیل-گلاسیل-FAPGG (- phenylalanyl - L - Furilacrilolil glycyl - glycine) مورد سنجش قرار گرفت. آزمایشات سه بار تکرار و معنی‌داری با روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد بررسی قرار گرفت. درجه هیدرولیز پروتئین‌های آبکافت شده اسپیرولینا با ترکیب سه‌گانه آنزیم‌های پپسین+تریپسین+کیموتریپسین $15/294 \pm 0/260$ ، پپسین+کیموتریپسین $15/725 \pm 1/260$ میکرومولار لوسین بر میلی‌گرم پروتئین و ترکیب‌های دوگانه آنزیم‌های پپسین+تریپسین $15/191 \pm 0/653$ و تریپسین+کیموتریپسین $11/31 \pm 11/212$ میکرومولار لوسین بر میلی‌گرم پروتئین به دست آمد. فراکشن پپتیدی کمتر از ۳ کیلو دالتون محصول هیدرولیز پروتئین با پپسین+تریپسین بیشترین فعالیت مهار رادیکال‌های ABTS و DPPH را به ترتیب به میزان $11/53 \pm 498/21$ و $48/650 \pm 0/100$ میکرومولار ترولوکس بر میلی‌گرم پروتئین نشان داد که با سایر فراکشن‌ها اختلاف معنی‌دار داشت ($P < 0/05$). غلظت مهار میانه (IC50) فعالیت مهار آنزیم مبدل آنزیم‌ها (ACE) هیدرولیزات حاصل از اثر آنزیم‌های تریپسین استفاده+کیموتریپسین، پپسین+تریپسین و پپسین+کیموتریپسین اختلاف معنی‌دار نداشتند ($P > 0/05$). با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی مشاهده‌شده، پپتیدهای مشتق از هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های اسپیرولینا را می‌توان به‌عنوان افزودنی‌های فراسودمند در غذاها کرد.

واژگان کلیدی: اسپیرولینا، *Spirulina*، درجه هیدرولیز، مهار ACE، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، رادیکال‌های ABTS و DPPH.

مقدمه

گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد در طی فعالیت‌های فیزیولوژیکی به‌ویژه تنفس سلولی در انسان و ارگانیسم‌های هوازی تولید می‌شوند و در بسیاری از بیماری‌ها مانند تصلب شرایین، فشارخون بالا، سرطان، دیابت و آلزایمر نقش دارند. زیان‌بار؛ بنابراین ارتباط بین رادیکال‌های آزاد و

مینا مهدی شیشوان^۱

حمیده افقی^{۲*}

سعید میردامادی^۳

۱. دانشجوی دکتری میکروبیولوژی پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران.
۲. دانشیار پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران.
۳. استاد پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران.

*مسئول مکاتبات:

ofoghi@irost.ir

کد مقاله: ۱۴۰۰۳۰۸۹۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۳۰

این مقاله پژوهشی و برگرفته از رساله دکتری است.

پیری و بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته است. گروهی از آنتی‌اکسیدان‌های مورد توجه، پپتیدهای حاصل از منابع طبیعی می‌باشد. این پپتیدها با وزن مولکولی کم به آسانی جذب شده و پاسخ ایمنی ایجاد نمی‌کنند (Dong et al., 2017).

پپتیدهای فعال زیستی با توجه به اثرات سلامت بخشی و دارویی و توانایی در ارتقاء سطح سلامتی انسان و کاهش خطر برخی بیماری‌ها، به‌عنوان مهم‌ترین غذا در نظر گرفته می‌شوند. پپتیدهای فعال زیستی معمول ۳ تا ۲۰ آمینواسید دارند و فعالیت‌های زیستی‌شان بر اساس ترکیب و توالی آمینواسیدها در پپتیدها است. در واقع این زنجیره‌های کوتاه آمینواسیدی فعالیت‌های زیستی را درون توالی پروتئین والد و اولیه نشان نمی‌دهند و بعد از آبکافت آنزیمی در اثر هضم روده‌ای، پردازش غذا یا تخمیر آزاد می‌شوند.

پروتئین‌ها در سلامتی و پیشگیری از سوء‌تغذیه نقش مهمی ایفا می‌کنند (Ramírez-Rodrigues et al., 2021). منبع پروتئین مورد استفاده از نظر ارزش تغذیه‌ای و زیست‌محیطی اهمیت دارد (Ramírez-Rodrigues et al., 2021). فیکوبیلی‌پروتئین‌هایی مانند فیکوسیاینین و آلفیکوسیاینین کاربردهای متعدد مانند رنگ دهنده طبیعی غذا و مواد آرایشی و عامل درمانی بیماری‌های حاصل از استرس اکسیداتیو دارند (Liestianty et al., 2019). در منابع نیست؟

اسپیرولینا جلبک سبز-آبی فتوسنتز کننده خوراکی با میزان پروتئین بالا (۵۰ تا ۷۰٪) (Zhang and Zhang, 2013) و متعلق به خانواده اوسیلاتوریاسه می‌باشد که در دریا و آب‌های شیرین زندگی می‌کند (Heo et al., 2017). اسپیرولینا به‌عنوان غذای فراسودمند در نظر گرفته شده است (Darwish et al., 2020) و دارای آمینواسیدهای ضروری، ویتامین‌ها، بتا-کاروتن، مواد فعال بیولوژیکی (کلروفیل و فیکوسیاینین) و سایر ترکیبات مغذی است (Mikryukov et al., 2021; Ratha et al., 2020). ریز جلبک اسپیرولینا فعالیت ضدویروسی، تحریک‌کننده سیستم ایمنی (Hassan et al., 2021)، ضدالتهابی، تقویت‌کننده سیستم ایمنی و آنتی‌اکسیدانی دارد (Ratha et al., 2020). اسپیرولینا از سازمان غذا و دارو آمریکا (FDA) به‌عنوان ارگانسیم ایمن (GRAS) در نظر گرفته شده است؛ بنابراین پروتئین اسپیرولینا می‌تواند به‌عنوان منبع مناسبی برای ایجاد پپتیدهای فعال زیستی در نظر گرفته شود (Lisboa et al., 2014; Safitri et al., 2017).

یکی از روش‌های تولید پپتیدهای فعال زیستی از مواد غذایی هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها با آنزیم‌های مختلف با منشأ میکروبی، گیاهی یا جانوری است (Benedé and Molina, 2020). در طی فرایند هیدرولیز به دلیل تشکیل پپتیدهای فعال زیستی، ویژگی‌های عملکردی و تغذیه‌ای غذاها افزایش می‌یابد که می‌توان به‌عنوان مکمل غذایی در رژیم غذایی استفاده کرد. در مقایسه با پروتئین‌های دست‌نخورده، این پپتیدها با فعالیت عمل‌گرا در بدن انسان به‌آسانی هضم و جذب می‌شوند (Cristiane et al., 2016).

تولید پپتیدهای زیست فعال با هیدرولیز پروتئین‌های منابع طبیعی مانند شیر (Ibrahim et al., 2017)، گیاهان (Arise et al., 2019) و جلبک‌ها مانند (Cao et al., 2017; Ko et al., 2012) گزارش شده است. فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و بازدارندگی آنزیم مبدل آنژیوتانسین در پپتیدهای جدا شده از اسپیرولینا را نشان داده‌اند (Carrizzo et al., 2018; Ratha et al., 2020). در دستگاه گوارش انسان نیز با هیدرولیز غذا توسط آنزیم‌های گوارشی پپتیدهای زیست فعال ایجاد می‌شوند؛ بنابراین یکی از روش‌های تولید پپتیدها آبکافت آنزیمی پروتئین‌ها با آنزیم‌های گوارشی می‌باشد. هدف از این مطالعه هیدرولیز پروتئین‌های اسپیرولینا با ترکیب آنزیم‌های گوارشی پپسین، تریپسین و کیموتریپسین و بررسی فعالیت مهار ACE و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در سال ۱۳۹۷ در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، ریز جلبک اسپیرولینا در ارنن مایرهای با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر، ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت استاندارد زاروک با ۱۰ درصد حجم مایع تلقیح (جذب اولیه حدود ۰/۲ در ۶۲۰ نانومتر) با شدت نور ۲ تا ۲/۵ کیلو لوکس کشت داده شد

(Dineshkumar *et al.*, 2016) و در مرحله رشد لگاریتمی زیست‌توده جمع‌آوری شد (Safi *et al.*, 2014). بعد از شکستن دیواره سلولی و پاره شدن غشا سلولی با روش ترکیبی انجماد-ذوب (۴ سیکل) و سونیکاسیون، سانتریفیوژ (۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و ۱۲۰۰ گرم) انجام شد (Chen *et al.*, 2016). برای غیرفعال کردن آنزیم‌های اسپیرولینا مایع رویی در ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شد و بعد از سانتریفیوژ مجدد، مایع رویی حاصل یا همان عصاره سلولی اسپیرولینا در ۲۰- نگهداری شد (Ma *et al.*, 2015).

در این تحقیق، پروتئین‌های ریز جلبک اسپیرولینا مشابه با الگوی دستگاه گوارش با ترکیب سه‌گانه آنزیم‌های پپسین + تریپسین + کیموتریپسین و ترکیب دوگانه آنزیم‌ها هیدرولیز شد (Heo *et al.*, 2017). برای هیدرولیز پروتئین‌های اسپیرولینا با آنزیم‌های گوارشی، عصاره سلولی اسپیرولینا با غلظت پروتئین ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، و چرخش ۱۲۰ دور در دقیقه گرمخانه گذاری شد. مشابه دستگاه گوارش پروتئین‌های اسپیرولینا ابتدا تحت اثر آنزیم پپسین قرار گرفت و بعد از تغییر pH به ۸ هیدرولیزات پپسین به سه بخش تقسیم شد و هر بخش به ترتیب تحت اثر آنزیم‌های تریپسین + کیموتریپسین (ترکیب سه‌گانه آنزیم‌ها)، آنزیم کیموتریپسین (ترکیب دوگانه) و آنزیم تریپسین (ترکیب دوگانه) قرار گرفت. نسبت آنزیم به سوبسترا ۱ به ۱۰ بود.

به‌منظور هیدرولیز با ترکیب دوگانه آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین، عصاره سلولی اسپیرولینا با غلظت پروتئین ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH ۸، تحت اثر آنزیم‌های تریپسین (EC 3.4.21.4) و کیموتریپسین (EC 3.4.21.1) (نسبت آنزیم به سوبسترا ۱ به ۱۰) قرار گرفت.

برای غیرفعال کردن آنزیم‌ها و توقف واکنش‌های آنزیمی، نمونه‌ها در ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شدند. بعد از سانتریفیوژ، مایع رویی لیوفیلیزه و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Famuwagun *et al.*, 2020). میزان پروتئین نمونه‌ها با روش لوری (Lowry *et al.*, 1951) و پیشرفت درجه هیدرولیز با اورتو-فتال‌دی‌آلدئید ارزیابی شد (Chan *et al.*, 2020).

برای بررسی میزان پیشرفت درجه هیدرولیز از واکنش نیتروژن آلفا-آمینو آزاد با اورتو-فتال‌دی‌آلدئید طبق متد Jayaprakash and Perera استفاده شد (Jayaprakash and Perera, 2020).

پروتئین‌های هیدرولیز شده اسپیرولینا با غشای اولترافیلتراسیون بر اساس وزن مولکولی ۱۰، ۵ و ۳ کیلودالتون به ۴ جزء بیشتر از ۱۰، ۵-۳ و کمتر از ۳ کیلودالتون تقسیم شد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اجزاء با رادیکال‌های DPPH و ABTS ارزیابی شد.

توانایی پروتئین‌های هیدرولیز شده اسپیرولینا برای مهار رادیکال‌های آزاد DPPH بررسی شد؛ به این منظور، محلول ۰/۰۰۴ درصد DPPH در متانول تهیه شد و جذب اولیه آن در ۵۱۷ نانومتر 0.02 ± 0.07 به دست آمد. ۲۰ میکرو لیتر نمونه (پروتئین‌های هیدرولیز شده یا اجزاء) به ۱۸۰ میکرو لیتر محلول متانولی DPPH درون میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد. میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و جای تاریک نگهداری شد (Hashim and Fry, 2020). بعد میزان جذب با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Biotek, USA) در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد (Suryaningsih *et al.*, 2021). نتایج به‌صورت میکرومولار ترولوکس بر میلی‌گرم پروتئین ($\mu\text{M TE/mg protein}$) بیان شد (Joaquín-Ramos *et al.*, 2020).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش رنگ‌زدایی کاتیون رادیکال آزاد ABTS با استفاده از روش Joaquín-Ramos و همکاران انجام شد. معرف رادیکال ABTS، با مخلوط کردن ۷ میلی‌متر محلول ABTS در آب و ۲/۴۵ میلی‌مولار پتاسیم پرسولفات در آب تهیه شد (Joaquín-Ramos *et al.*, 2020). مخلوط سبزرنگ حاصل ۱۶-۱۲ ساعت در تاریکی انکوبه شد. قبل از آزمایش با استفاده از بافر فسفات ۵ میلی‌مولار pH ۷/۴ جذب محلول در ۷۳۴ نانومتر حدود 0.02 ± 0.07 تنظیم شد. ۲۵ میکرو لیتر نمونه (آب مقطر برای کنترل) با ۱ میلی‌لیتر محلول (ABTS + $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) مخلوط شد و بعد از ۶ دقیقه، با استفاده از اسپکتروفوتومتر (Biotek, USA) جذب در ۷۳۴ نانومتر خوانده شد (Avanza *et al.*, 2021). نتایج به‌صورت میکرومولار ترولوکس بر میلی‌گرم پروتئین ($\mu\text{M TE/mg protein}$) بیان شد.

برای سنجش فعالیت مهار آنزیم میدل آنژیوتانسین-۱ (ACE)، این آنزیم با استفاده از روش Lossow و همکاران از ریه خرگوش استخراج شد (Lossow *et al.*, 1964).

برای تهیه آنزیم ACE به منظور سنجش فعالیت مهار ACE، ۱ گرم پودر استونی ریه خرگوش در ۱۰ میلی‌لیتر tris-HCl ۰/۰۵ مولار با pH ۸/۲ و گلیسرین ۵ درصد (حجمی/حجمی) حل شد. بعد از ۲۴ ساعت نگهداری در ۴ درجه سانتی‌گراد، مخلوط حاصل در ۲۹۰۰۰g، ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی با رنگ قرمز-قهوه‌ای به عنوان آنزیم ACE استفاده شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Cushman and Cheung 1971; Minervini *et al.*, 2003).

فعالیت آنزیم ACE با هیدرولیز FAPGG و تشکیل FAP به صورت اسپکتروفوتومتریک اندازه‌گیری شد (Holmquist *et al.*, 1979). ۱۰ میکرو لیتر نمونه (هیدرولیزات آنزیمی) با ۱۵۰ میکرو لیتر محلول FAPGG (۰/۸۷ میلی‌مولار در ۵۰ میلی‌مولار tris-HCl، pH=8.2 حاوی NaCl ۴۰۰ میلی‌متر) مخلوط شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه گرمخانه گذاری شد. ۱۰ میکرو لیتر محلول ACE تازه تهیه شده در کمتر از یک دقیقه به هر چاهک اضافه شد بعد از ۲۰ ثانیه شیک، بلافاصله میکروپلیت به دستگاه اسپکتروفوتومتر (Biotek, USA) منتقل شد و به مدت ۳۰ دقیقه هر یک دقیقه جذب به صورت سینتیک در ۳۴۰ نانومتر خوانده شد. درصد مهار آنزیم ACE با استفاده از معادله زیر محاسبه شد.

$$\text{رابطه ۱: } ۱۰۰ \times [(\text{شیب بلانک/شیب نمونه بازدارنده}) - ۱] = (\%) \text{ مهار ACE}$$

شیب نمونه بازدارنده، شیب منحنی تجزیه FAPGG در زمان است و شیب بلانک شیب این منحنی در غیاب نمونه (در حضور آب مقطر به جای نمونه) است. نتایج با IC50 برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (mg/mL) بیان شد. IC50 غلظتی از بازدارنده است که بتواند شیب منحنی را ۵۰ درصد کاهش دهد (Amado *et al.*, 2014; Henda *et al.*, 2013; Shalaby *et al.*, 2006).

در بررسی آماری مقایسه داده‌های به دست آمده از نتایج بر اساس میانگین با محاسبه میزان خطای استاندارد (انحراف معیار \pm میانگین) ارائه شد. جهت بررسی معنی دار بودن از روش آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA در سطح معنی دار ۰/۰۵ استفاده شد از نرم افزار ۱۸ Minitab استفاده شد.

نتایج

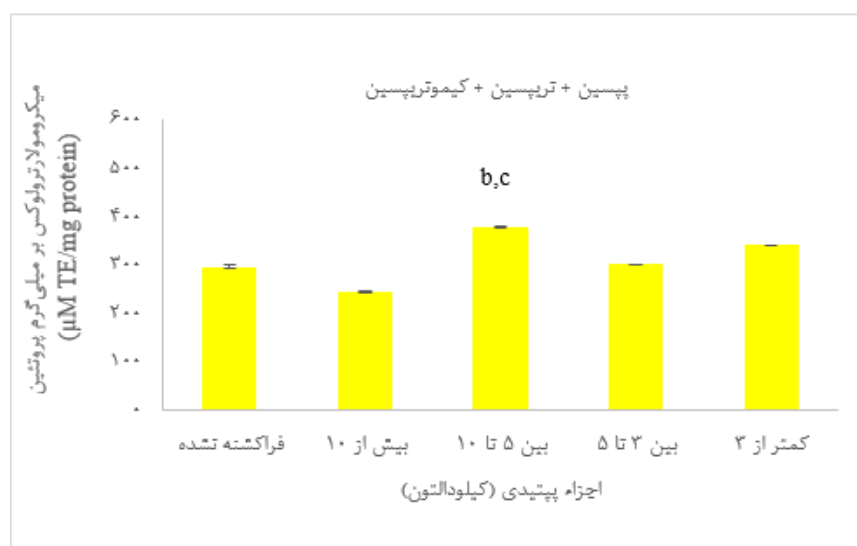
در این تحقیق، نمونه پروتئین ریز جلبک اسپیرولینا مشابه با الگوی دستگاه گوارش با ترکیب آنزیم‌های پپسین، تریپسین و کیموتریپسین هیدرولیز شد. درجه هیدرولیز پروتئین‌های آبکافت شده اسپیرولینا با ترکیب سه‌گانه آنزیم‌های پپسین + تریپسین + کیموتریپسین و ترکیب‌های دوگانه آنزیم‌های پپسین + تریپسین، پپسین + کیموتریپسین و تریپسین + کیموتریپسین به ترتیب $۱/۲۶۰ \pm ۱۵/۷۲۵$ ، $۰/۲۹۰ \pm ۱۵/۲۹۴$ ، $۰/۶۵۳ \pm ۱۵/۱۹۱$ و $۱/۰۳۱ \pm ۱۱/۲۱۲$ میکرومولار لوسین/ میلی‌گرم پروتئین به دست آمد.

بعد از هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های اسپیرولینا با ترکیب سه‌گانه آنزیم‌های پپسین + تریپسین + کیموتریپسین و ترکیب دوگانه پپسین + تریپسین، پپسین + کیموتریپسین و تریپسین + کیموتریپسین، پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدهای حاصل بر اساس وزن مولکولی با غشاء اولترافیلتراسیون ۱۰، ۵ و ۳ کیلو دالتون جدا شدند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اجزاء به دست آمده با روش حذف رادیکال‌های آزاد ۲ و ۲'-آزینویس (۳ اتیل-بزنوتیازولین-۶-سولفونات) ABTS ارزیابی شد.

شکل ۱، بررسی میزان مهار رادیکال آزاد ABTS را در حضور پپتیدها با وزن مولکولی بیشتر از ۱۰، ۵-۱۰، ۳-۵ و کمتر از ۳ کیلو دالتون حاصل از اثر ترکیب سه‌گانه آنزیم‌های پپسین + تریپسین + کیموتریپسین نشان می‌دهد. جزء ۵-۱۰ کیلو دالتون ($1/94 \pm 376/87$ میکرومولار ترولوکس بر میلی‌گرم پروتئین) بیشترین فعالیت مهار رادیکال ABTS را نسبت به سایر اجزاء نشان داد. بیشترین فعالیت مهار رادیکال ABTS بعد از جزء ۵-۱۰ کیلو دالتون، جزء کمتر از ۳ کیلو دالتون به میزان $1/25 \pm 340/13$ و میکرومولار ترولوکس بر میلی‌گرم پروتئین بود. کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را جزء بیش از ۱۰ کیلو دالتون ($0/56 \pm 234/96$ میکرومولار ترولوکس بر میلی‌گرم پروتئین) نشان داد.

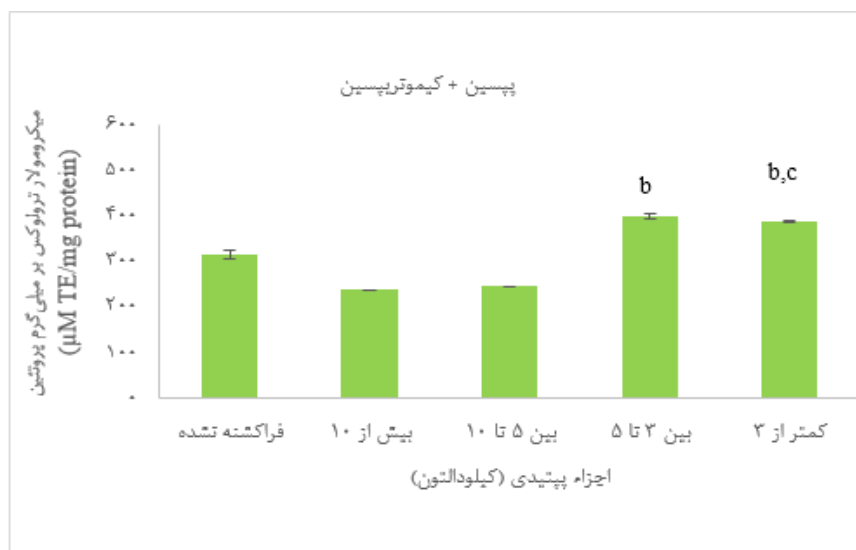
شکل ۲، میزان بازدارندگی رادیکال آزاد ABTS توسط پپتیدها با وزن مولکولی بیشتر از ۱۰، ۵-۱۰، ۳-۵ و کمتر از ۳ کیلو دالتون تولیدشده با ترکیب دوگانه آنزیم‌های پپسین + کیموتریپسین را نشان می‌دهد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اجزاء ۳-۵ و $3 < \text{کیلو دالتون}$ به ترتیب به میزان $6/42 \pm 400/32$ و $2/60 \pm 388/67$ میکرومولار ترولوکس بر میلی‌گرم پروتئین فعالیت بیشتری نسبت به سایر اجزاء داشتند. اجزاء بیش از ۱۰ و ۵-۱۰ کیلو دالتون ظرفیت حذف رادیکال ABTS کمتری داشتند.

اجزاء ۳-۵ و $3 < \text{کیلو دالتون}$ حاصل هیدرولیز با ترکیب دوگانه آنزیم‌های پپسین + تریپسین به میزان $8/04 \pm 399/70$ و $11/53 \pm 498/21$ میکرومولار ترولوکس بر میلی‌گرم پروتئین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی حذف رادیکال ABTS نشان دادند که فعالیت بیشتری نسبت به سایر اجزاء داشتند (شکل ۳).



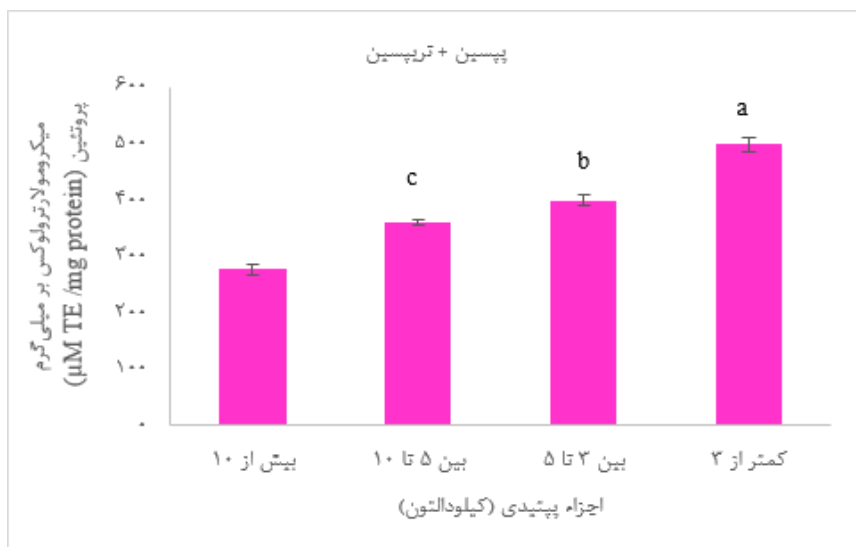
شکل ۱: بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال ABTS توسط اجزاء حاصل از هیدرولیز پروتئین اسپیرولینا در حضور ترکیب سه‌گانه آنزیم‌های پپسین + تریپسین + کیموتریپسین و اجزاء حاصل از آن‌ها بر اساس وزن مولکولی بیشتر از ۱۰، ۵-۱۰، ۳-۵ و کمتر از ۳ کیلو دالتون.

نتایج به صورت انحراف معیار \pm میانگین ارائه شده است. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) در مهار رادیکال ABTS می‌باشد. آزمایشات به صورت سه تکرار انجام شد. فراکشنه تشده پروتئین‌های هیدرولیز شده اسپیرولینا است که بر اساس وزن مولکولی جدا نشده است.



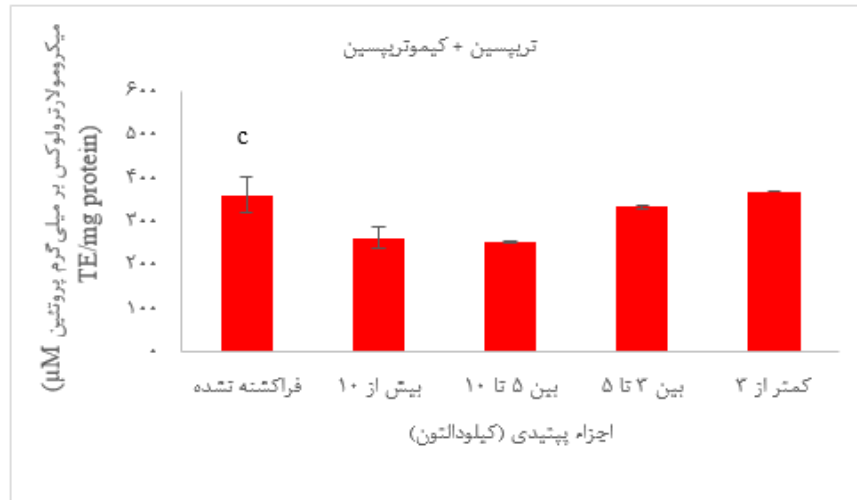
شکل ۲: بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال ABTS توسط اجزاء حاصل از هیدرولیز پروتئین اسپیرولینا در حضور ترکیب دوگانه آنزیم‌های پپسین + کیموتریپسین و اجزاء حاصل از آن‌ها بر اساس وزن مولکولی بیشتر از ۱۰، ۵-۱۰، ۳-۵ و کمتر از ۳ کیلودالتون.

نتایج به صورت انحراف معیار \pm میانگین ارائه شده است. آزمایش‌ها به صورت سه تکرار انجام شد. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) در مهار رادیکال ABTS می‌باشد. فراکشته نشده پروتئین‌های هیدرولیز شده اسپیرولینا است که بر اساس وزن مولکولی جدا نشده است.



شکل ۳: بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال ABTS توسط اجزاء حاصل از هیدرولیز پروتئین اسپیرولینا در حضور ترکیب دوگانه آنزیم‌های پپسین + تریپسین و اجزاء حاصل از آن‌ها بر اساس وزن مولکولی بیشتر از ۱۰، ۵-۱۰، ۳-۵ و کمتر از ۳ کیلودالتون.

نتایج به صورت انحراف معیار \pm میانگین ارائه شده است. آزمایش‌ها به صورت سه تکرار انجام شد. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) در مهار رادیکال ABTS می‌باشد.



شکل ۴: بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال ABTS توسط اجزاء حاصل از هیدرولیز پروتئین اسپیرولینا در حضور ترکیب دوگانه آنزیم‌های تریپسین + کیموتریپسین و اجزاء حاصل از آن‌ها بر اساس وزن مولکولی بیشتر از ۱۰، ۵-۳، ۱۰+ (کیلو دالتون). نتایج به صورت انحراف معیار \pm میانگین ارائه شده است.

آزمایش‌ها به صورت سه تکرار انجام شد. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) در مهار رادیکال ABTS می‌باشد. فراکشنه تشده پروتئین‌های هیدرولیز شده اسپیرولینا است که بر اساس وزن مولکولی جدا شده است.

شکل ۴ بررسی میزان مهار رادیکال‌های آزاد ABTS در اجزاء حاصل از هیدرولیز توسط ترکیب دوگانه آنزیم‌های تریپسین + کیموتریپسین، پروتئین هیدرولیز شده $42/11 \pm 362/75$ میکرومولار ترولوکس بر میلی‌گرم پروتئین ظرفیت مهار رادیکال ABTS را نشان داد. اجزاء ۳-۵ و < 3 کیلو دالتون به ترتیب $3/50 \pm 334/79$ و $1/07 \pm 370/32$ میکرومولار ترولوکس بر میلی‌گرم پروتئین فعالیت مهار رادیکال ABTS را نشان دادند که بیش از سایر اجزاء بود. ظرفیت مهار رادیکال ABTS در اجزاء بیشتر از ۱۰ و ۵-۱۰ کیلو دالتون کمتر بود.

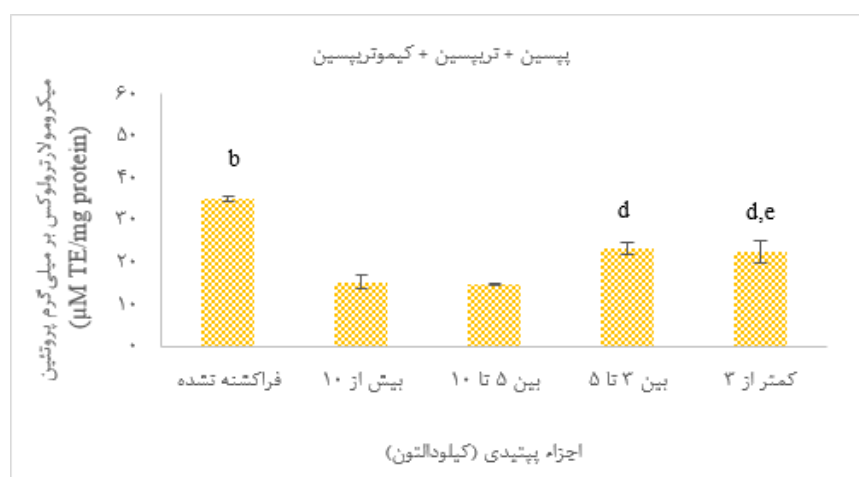
پروتئین‌های هیدرولیز شده اسپیرولینا با ترکیب سه‌گانه آنزیم‌های پپسین + تریپسین + کیموتریپسین و ترکیب‌های دوگانه آنزیم‌های پپسین + کیموتریپسین، پپسین + تریپسین و تریپسین + کیموتریپسین با استفاده از غشاء اولترافیلتراسیون ۱۰، ۵، ۳ کیلو دالتون بر اساس وزن مولکولی جدا شدند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اجزاء پپتیدی حاصل (بیشتر از ۱۰، ۵-۱۰، ۳-۵ و کمتر از ۳ کیلو دالتون) با روش مهار رادیکال آزاد DPPH مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین‌های هیدرولیز شده اسپیرولینا فعالیت حذف رادیکال DPPH را بین $2/06 \pm 13/16$ و $0/68 \pm 35/13$ میکرومولار ترولوکس بر میلی‌گرم پروتئین نشان دادند.

شکل ۵ میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH را در حضور اجزاء پپتیدی تولیدشده در اثر آبکافت با ترکیب سه‌گانه آنزیم‌های پپسین + تریپسین + کیموتریپسین نشان می‌دهد. در این نمودار میزان پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد DPPH اجزاء ۳-۵ و < 3 کیلو دالتون به ترتیب $1/41 \pm 23/59$ و $2/70 \pm 22/62$ میکرومولار ترولوکس بر میلی‌گرم پروتئین به دست آمد که بیش از سایر اجزاء بود. اجزاء بیشتر از ۱۰ و ۵-۱۰ کیلو دالتون کمترین فعالیت پاک‌سازی رادیکال DPPH را نشان دادند.

شکل ۶ ظرفیت حذف رادیکال DPPH اجزاء به‌دست‌آمده از هیدرولیز پروتئین‌های اسپیرولینا را در حضور ترکیب دوگانه آنزیم‌های پپسین + کیموتریپسین نمایش می‌دهد. اجزاء ۳-۵ و < 3 کیلو دالتون فعالیت مهار رادیکال DPPH را به ترتیب $1/02 \pm 31/00$ و $0/97 \pm 36/73$ میکرومولار ترولوکس بر میلی‌گرم پروتئین نشان دادند. در این گروه جزء بیش از ۱۰ کیلو دالتون کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان داد.

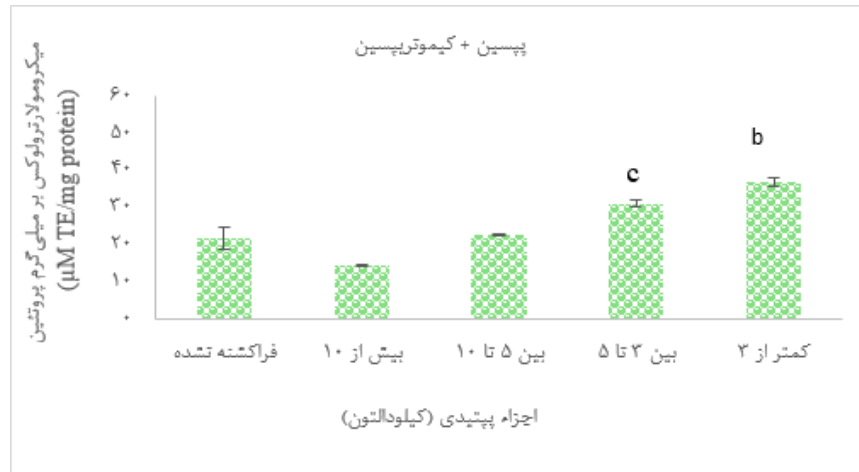
شکل ۷، میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH را توسط اجزاء به‌دست‌آمده از هیدرولیز پروتئین‌های اسپیرولینا با ترکیب دوگانه آنزیم‌های پپسین + تریپسین نمایش می‌دهد. در این نمودار نیز اجزاء ۳-۵ و ۳ < کیلو دالتون میزان بالایی از پاک‌سازی رادیکال DPPH را نشان دادند که به ترتیب $35/79 \pm 0/40$ و $48/650 \pm 0/00$ میکرومولار ترولوکس بر میلی‌گرم پروتئین به دست آمد. در این گروه اجزاء بیشتر از ۱۰ و ۵-۱۰ کیلو دالتون کمترین ظرفیت حذف رادیکال DPPH را نشان دادند.

شکل ۸، میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH را در حضور اجزاء پپتیدی تولیدشده در اثر آبکافت با ترکیب دوگانه آنزیم‌های تریپسین + کیموتریپسین نشان می‌دهد. فعالیت پاک‌سازی رادیکال DPPH پروتئین‌های هیدرولیز شده اسپیرولینا $23/17 \pm 0/29$ میکرومولار ترولوکس بر میلی‌گرم پروتئین به دست آمد. اجزاء ۳-۵ و ۳ < کیلو دالتون به ترتیب $20/23 \pm 0/91$ و $19/55 \pm 0/99$ میکرومولار ترولوکس بر میلی‌گرم پروتئین فعالیت حذف رادیکال DPPH را نشان دادند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی‌شان نسبت به سایر اجزاء بیشتر بود. اجزاء بیش از ۱۰ و ۵-۱۰ کیلو دالتون فعالیت مهار رادیکال DPPH کمتری نشان دادند.



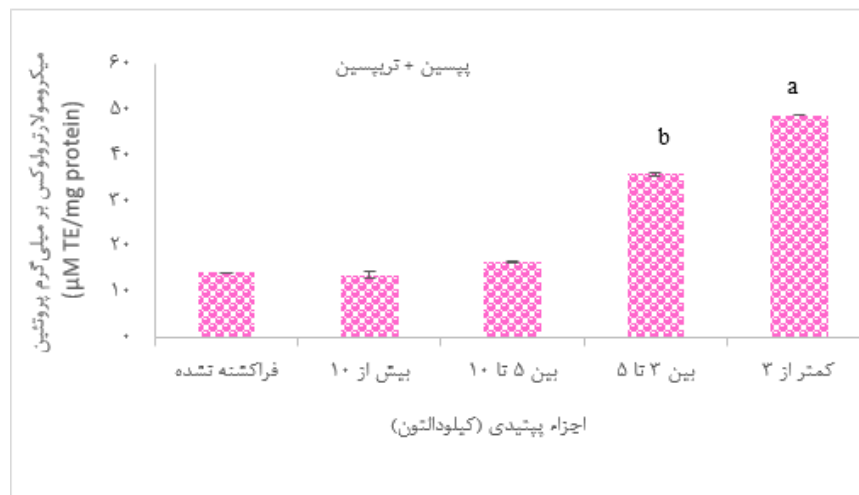
شکل ۵: بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال DPPH توسط اجزاء حاصل از هیدرولیز پروتئین‌های اسپیرولینا در حضور ترکیب سه‌گانه آنزیم‌های گوارشی پپسین + تریپسین + کیموتریپسین و اجزاء حاصل از آن‌ها بر اساس وزن مولکولی بیشتر از ۱۰، ۵-۱۰، ۳-۵ و کمتر از ۳ کیلو دالتون.

نتایج به‌صورت انحراف معیار \pm میانگین ارائه شده است. آزمایش‌ها به‌صورت سه تکرار انجام شد. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) در مهار رادیکال DPPH می‌باشد. فراکشنه نشده پروتئین‌های هیدرولیز شده اسپیرولینا است که بر اساس وزن مولکولی جدا نشده است.



شکل ۶: بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال DPPH توسط اجزاء حاصل از هیدرولیز پروتئین اسپیرولینا در حضور ترکیب دوگانه آنزیم‌های پپسین + کیموتریپسین و اجزاء حاصل از آن‌ها بر اساس وزن مولکولی بیشتر از ۱۰، ۵-۳، ۱۰+، ۵-۳ و کمتر از ۳ کیلو دالتون. نتایج به صورت انحراف معیار \pm میانگین ارائه شده است.

آزمایش‌ها به صورت سه تکرار انجام شد. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) در مهار رادیکال DPPH می‌باشد. فراکشته نشده پروتئین‌های هیدرولیز شده اسپیرولینا است که بر اساس وزن مولکولی جدا نشده است.



شکل ۷: بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال DPPH توسط اجزاء حاصل از هیدرولیز پروتئین اسپیرولینا در حضور ترکیب دوگانه آنزیم‌های پپسین + تریپسین و اجزاء حاصل از آن‌ها بر اساس وزن مولکولی بیشتر از ۱۰، ۵-۱۰، ۵-۳ و کمتر از ۳ کیلو دالتون. نتایج به صورت انحراف معیار \pm میانگین ارائه شده است.

آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) در مهار رادیکال DPPH می‌باشد. فراکشته نشده پروتئین‌های هیدرولیز شده اسپیرولینا است که بر اساس وزن مولکولی جدا نشده است.



شکل ۸: بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال DPPH توسط اجزاء حاصل از هیدرولیز پروتئین اسپیرولینا در حضور ترکیب دوگانه آنزیم‌های تریپسین + کیموتریپسین و اجزاء حاصل از آن‌ها بر اساس وزن مولکولی بیشتر از ۱۰، ۵-۳، ۱۰-۵، و کمتر از ۲ کیلو دالتون. نتایج به صورت انحراف معیار \pm میانگین ارائه شده است.

آزمایش‌ها سه تکرار انجام شد. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) در مهار رادیکال DPPH می‌باشد. فراکشنه نشده پروتئین‌های هیدرولیز شده اسپیرولینا است که بر اساس وزن مولکولی جدا نشده است.

اندازه‌گیری فعالیت مهار آنزیم مبدل آنژیوتانسین ۱ با استفاده از سوپسترای FAPGG را جدول ۱ با غلظت مهار میانه IC_{50} برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان می‌دهد. IC_{50} غلظتی از نمونه هیدرولیز شده که شیب منحنی را ۵۰ درصد کاهش داد در هیدرولیزات حاصل از آبکافت با ترکیب دوگانه آنزیم‌های تریپسین + کیموتریپسین، پپسین + تریپسین و پپسین + کیموتریپسین به ترتیب $0.4 \pm 0.3/61$ ، $0.45 \pm 0.3/79$ و $0.35 \pm 0.4/1$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

جدول ۱: فعالیت مهار آنزیم مبدل آنژیوتانسین ۱ (ACE) پروتئین‌های هیدرولیز شده اسپیرولینا با ترکیب دوگانه آنزیم‌های گوارشی پپسین + تریپسین، پپسین + کیموتریپسین و تریپسین + کیموتریپسین. نتایج به صورت انحراف معیار \pm میانگین برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ارائه شده است.

هیدرولیزات حاصل از اثر آنزیم‌های... بر پروتئین‌های اسپیرولینا IC_{50} ، انحراف معیار \pm میانگین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	
$0.45 \pm 0.3/79$	پپسین + تریپسین
$0.35 \pm 0.4/1$	پپسین + کیموتریپسین
$0.4 \pm 0.3/61$	تریپسین + کیموتریپسین

بحث و نتیجه‌گیری

به‌منظور هیدرولیز پروتئین‌های اسپیرولینا مشابه با الگوی دستگاه گوارش از آنزیم پپسین، شروع‌کننده هیدرولیز پروتئین‌های غذا در معده و آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین ادامه‌دهنده هیدرولیز پروتئین‌ها در روده باریک استفاده شد.

مقایسه میزان فعالیت مهار رادیکال ABTS نشان داد اجزاء پیتیدی کمتر از ۵ کیلو دالتون فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی داشتند. مطابق با شکل ۳ فراکشن پیتیدی کمتر از ۳ کیلو دالتون حاصل آبکافت آنزیم‌های پیپسین + تریپسین بیشترین فعالیت مهار رادیکال ABTS را داشت و با دیگر اجزاء پیتیدی حاصل از هیدرولیز با ترکیب‌های سه‌گانه و دوگانه آنزیم‌های گوارشی اختلاف معنی‌دار نشان داد ($P < 0.05$).

جزء کمتر از ۳ کیلو دالتون حاصل هیدرولیز با آنزیم‌های پیپسین + تریپسین (شکل ۷) و جزء < 3 کیلو دالتون به‌دست‌آمده از هیدرولیز آنزیم‌های پیپسین + کیموتریپسین بیشترین فعالیت حذف رادیکال DPPH را نشان دادند و طبق متد Tukey با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند ($P < 0.05$).

مقایسه فعالیت پاک‌سازی رادیکال DPPH اجزاء پیتیدی بر اساس وزن مولکولی نشان داد اجزاء پیتیدی با وزن مولکولی کمتر از ۳ و ۳-۵ کیلو دالتون فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به سایر اجزاء پیتیدی با وزن مولکولی بالا داشتند. این یافته‌ها مشابه نتایج زانگ و همکاران (که فعالیت آنتی‌اکسیدانی اجزاء پیتیدی هیدرولیزات سویا را بررسی کردند) (Zhang *et al.*, 2018)، Zhao، Zhao and همکاران (Zhao, Zhao and Lu, 2020) و آریس و همکاران (که پروتئین بامبارا را مطالعه نمودند) (Arise *et al.*, 2016) می‌باشد.

DPPH رادیکال آزاد پایدار با حداکثر جذب در ۵۱۷ نانومتر است که با پذیرش الکترون و کاهش جذب آن، منجر به تغییر رنگ آن از بنفش به زرد می‌شود. فعالیت پاک‌سازی رادیکال DPPH توسط پیتیدها احتمالاً به طبیعت فیتوشیمیایی و توانایی دهندگی هیدروژن به رادیکال‌های آزاد واکنشی و تبدیل آن‌ها به گونه‌های غیر واکنشی پایدار مربوط است (Mercurieff *et al.*, 2014).

میزان پاک‌سازی رادیکال‌های DPPH و ABTS در اجزاء < 3 و ۳-۵ کیلو دالتون بیشتر از سایر اجزاء با وزن مولکولی بالای ۵ کیلو دالتون مشاهده شد؛ که با توجه به نتایج ارائه‌شده در سایر پژوهش‌های پیتیدی با وزن مولکولی کمتر (< 5 کیلو دالتون) اثر آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند. پیتیدها با وزن مولکولی کمتر دارای گروه‌های فعال تری با ویژگی دهنده هیدروژن یا الکترون هستند که قادر به واکنش با رادیکال‌های آزاد و تبدیل آن‌ها به محصولات با ضرر کمتر یا بی‌ضرر می‌باشند و واکنش زنجیره‌ای رادیکال را خاتمه می‌دهند (Zhang *et al.*, 2011).

وزن مولکولی پیتیدهای حاصل از هیدرولیز بسته به درجه هیدرولیز متفاوت است (Gonzalez-Tello *et al.*, 1994). افزایش درجه هیدرولیز پروتئین سبب تولید بیشتر پیتیدهای با اندازه متوسط و اسیدهای آمینه می‌شود (Silvestre *et al.*, 2013). فعالیت آنتی‌اکسیدانی پیتیدهای زیست فعال به نوع آنزیم هیدرولیز کننده بستگی دارد آنزیم‌ها با الگوهای متفاوت پیوندهای پیتیدی را برش می‌دهند (Tadesse and Emire, 2020). در طی هضم مواد پروتئینی طیف گسترده‌ای از پیتیدها تولید می‌شود. پیتیدهای زیست فعال توالی‌هایی کوتاه از اسیدهای آمینه می‌باشند که در ساختار پروتئین اولیه غیرفعال بوده و با هضم آنزیمی ایجاد می‌شوند. عامل مهم در فرایند هیدرولیز انتخاب نوع آنزیم می‌باشد زیرا برخی آنزیم‌ها الگوی خاصی برای هیدرولیز پیوندهای پیتیدی دارند. عملکرد اختصاصی پروتئازها بر ترکیب اسیدآمینه‌ای، اندازه و فعالیت زیستی پیتیدها مؤثرند (Harnedy and FitzGerald, 2012).

ترکیب آمینواسیدی، اندازه پیتیدها، توالی آمینواسیدها و شکل فضایی پیتیدها در فعالیت آنتی‌اکسیدانی پیتیدها مؤثر است (Thaha *et al.*, 2021). فعالیت آنتی‌اکسیدانی پیتیدها تحت تأثیر وزن مولکولی جزء پیتیدی است. اجزاء پیتیدی با وزن مولکولی ۲۰۰ تا ۳۰۰۰ دالتون فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند. پیتیدهایی با ۲۰-۲۰۰ آمینواسید به‌آسانی از سد روده‌ای عبور می‌کنند و اثرات بیولوژیکی‌شان را اعمال می‌کنند. علاوه بر وزن مولکولی، ترکیب و توالی آمینواسیدی، فاکتورهای مهمی در فعالیت پیتیدهای فعال زیستی هستند، آمینواسیدهای هیدروفوب مانند پرولین، هیستیدین، متیونین، سیستئین، تیروزین و تریپتوفان ممکن است فعالیت آنتی‌اکسیدانی پیتیدها را افزایش دهند (Yu *et al.*, 2016). آمینواسیدهای حاوی گوگرد مانند سیستئین و متیونین به دلیل داشتن گروه‌های S مستعد اکسیداسیون هستند و در واکنش با گونه‌های فعال، محصولات اکسیداسیون پایدار تشکیل می‌دهند. فعالیت بالا در مهار رادیکال DPPH می‌تواند به علت وجود آمینواسید سیستئین در انتهای آمین و کربوکسیل پیتید باشد و به گروه سولفیدریل سیستئین نسبت داده می‌شود (Sonklin *et al.*, 2021). آمینواسیدهای آروماتیک تیروزین و فنیل آلانین به‌طور مستقیم رادیکال‌های آزاد را حذف می‌کنند و گروه‌های فنلی دهنده هیدروژن هستند. سیستئین دهنده هیدروژن گوگرد و گروه ایمیدازول هیستیدین دهنده

پروتون است (Thaha et al., 2021). آمینواسیدهای اسیدی مانند گلوتامیک اسید و آسپارتیک اسید و اسیدهای آمینه هیدروفوب اثر مثبت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند (Benedé and Molina, 2020). فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا به مقادیر بالای هیستیدین و لوسین نسبت داده می‌شود. ویژگی عمومی پپتیدهای آنتی‌اکسیدان و مهارکننده ACE طبیعت هیدروفوبی آن‌ها است (El-Salam and El-Shibiny, 2013). در این مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی مشاهده شده در جزء پپتیدی < 3 کیلو دالتون حاصل هیدرولیز با ترکیب دوگانه آنزیم‌های پپسین + تریپسین می‌تواند به علت حضور آمینواسیدهای هیدروفوب و آروماتیک در پپتیدها باشد. از آنجایی که آنزیم پپسین پیوندهای پپتیدی را بعد از آمینواسیدهای فنیل‌آلانین، لوسین و متیونین هیدرولیز می‌کند. همچنین پیوندهای بین اسیدهای آمینه آروماتیک مانند تیروزین، تریپتوفان و فنیل‌آلانین را با سایر اسیدهای آمینه می‌شکند (Luo et al., 2018). گروه فنیل انتهایی در زنجیره پپتیدی دارای فعالیت پاک‌سازی رادیکال آزاد است (Mazloomi et al., 2019). علاوه بر این، تریپسین سرین اندوپپتیدازی است که بعد از آمینواسیدهای آرژینین و لیزین (از طرف کربوکسیل) پیوند پپتیدی را می‌شکند (Hernandez and Mejia, 2019). آمینواسید آرژینین فعالیت پاک‌سازی رادیکال آزاد و لیزین فعالیت کلاته کردن فلزات را دارد (Xu et al., 2018).

مقایسه فعالیت مهار ACE نشان داد هیدرولیزات گروه‌ها با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشتند ($P > 0.05$). نتایج غلظت مهار میانه IC50 حاصل از این آزمایش‌ها بیشتر از نتایج ساماراکون و همکاران است که در سال ۲۰۱۳ پروتئین‌های نانوکلوپسیس اوکولاتا را با آنزیم‌های پپسین، تریپسین و کیموترپسین به‌طور جداگانه هیدرولیز کردند (Samarakoon et al., 2013). همچنین نتایج غلظت مهار میانه IC50، بیش از نتایج سونگ یئونگ هو و همکاران (۲۰۱۷) می‌باشد آن‌ها پروتئین‌های ریز جلبک دریایی گونه‌ای از اسپیرولینا را با آنزیم‌های پپسین + تریپسین + کیموترپسین هیدرولیز کردند (Heo et al., 2017).

Liu و همکاران (۲۰۲۱) غلظت مهار میانه فعالیت بازدارندگی آنزیم مبدل آنژیوتانسین الیگوپپتیدهای گلوتن گندم را 0.68 ± 0.03 میلی‌گرم/میلی‌لیتر گزارش نمودند. Bougatif و همکاران غلظت مهار میانه هیدرولیزات پروتئین ساردین را $1/2$ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به دست آوردند. He و همکاران غلظت مهار میانه را برای پروتئین‌های دریایی هیدرولیز شده $50.17 - 0.17$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آوردند (Liu et al., 2021). در مقایسه با این پژوهش‌ها هیدرولیزات حاصل از پروتئین‌های اسپیرولینا فعالیت مهار آنزیم مبدل آنژیوتانسین کمتری داشته‌اند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز با ترکیب آنزیم‌ها مشابه با دستگاه گوارش نشان داد فراکشن‌های پپتیدی کمتر از ۵ کیلو دالتون به‌دست آمده از هیدرولیز پروتئین‌های اسپیرولینا با آنزیم‌های پپسین و تریپسین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نشان دادند. به دلیل این‌که نگرانی‌ها در مورد ایمن بودن ترکیبات آنتی‌اکسیدان وجود دارد فراکشن‌های حاصل از هیدرولیزات پروتئین‌های اسپیرولینا می‌تواند منبع طبیعی و ایمن برای تولید پپتیدهای زیست فعال آنتی‌اکسیدان باشد؛ بنابراین با توجه به اثر آنتی‌اکسیدانی مشاهده شده اجزاء پپتیدی با وزن مولکولی کمتر، مشتق از پروتئین اسپیرولینا را می‌توان به‌عنوان افزودنی‌های فراسودمند یا مکمل غذایی استفاده کرد. در ضمن تحقیقات بیشتری جهت شناسایی توالی آمینواسیدی پپتیدها با خواص آنتی‌اکسیدانی به‌منظور مطالعه بیشتر در زمینه‌ی ارتباط ساختار- عملکرد و تأثیر پپتیدها بر سلول‌های مختلف ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

نویسندگان از کمک‌های خانم‌ها عمیدی و جعفری و آقای شیخی نژاد تشکر و قدردانی کرده همچنین از آقای دکتر حجازی برای در اختیار گذاشتن ریز جلبک اسپیرولینا قدردانی می‌کنیم.

منابع

- Abdulazeez Mansurah, A., Amiola, I. A., Annette, R. O. and Abdullahi, S., 2013.** Isolation, Partial Purification and Characterization of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) from Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) Lungs. American Journal of Drug Discovery and Development, 2150-427x.
- Amado, I. R., Vázquez, J. A., González, P., Diego Esteban-Fernández, M. C. and Piñeiro, C. 2014.** Identification of the Major ACE-Inhibitory Peptides Produced by Enzymatic Hydrolysis of a Protein Concentrate from Cuttlefish Wastewater. Marine Drugs, 12(ISSN 1660-3397), 1390-1405.
- Arise, A. K., Alashi, A. M., Nwachukwu, I. D., Ijabadeniyi, O. A., Aluko, R. E. and Amonsou, E. O., 2016.** Antioxidant activities of bambara groundnut (*Vigna subterranea*) protein hydrolysates and their membrane ultrafiltration fractions. Food and Function, 7(5): 2431-2437.
- Arise, R. O., Idi, J. J., Mic-Braimoh, I. M., Korode, E., Ahmed, R. N. and Osemwegie, O. 2019.** In vitro Angiotensin-1-converting enzyme, α -amylase and α -glucosidase inhibitory and antioxidant activities of *Luffa cylindrical* (L.) M. Roem seed protein hydrolysate. Heliyon, 5(5).
- Avanza, M. V., Álvarez-Rivera, G., Cifuentes, A., Mendiola, J. A. and Ibáñez, E. 2021.** Phytochemical and Functional Characterization of Phenolic Compounds from Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Obtained by Green Extraction Technologies. Agronomy, 11(1): 162.
- Benedé, S. and Molina, E. M. 2020.** Chicken Egg Proteins and Derived Peptide with Antioxidant Properties. Foods.
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Ravallec-Plé, R., Leroy, Y., Guillochon, D., Barkia, A. and Nasri, M., 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(2): 350-356.
- Cao, D., Lv, X., Xu, X., Yu, H., Sun, X., & Xu, N. 2017.** Purification and identification of a novel ACE inhibitory peptide from marine alga *Gracilariopsis lemaneiformis* protein hydrolysate. Eur Food Res Technol.
- Carrizzo, A., Conte, G. M., Sommella, E., Damato, A., Ambrosio, M., Sala, M., Scala, M. C., Aquino, R. P., Lucia, M. De, Madonna, M., Sansone, F., Ostacolo, C., Capunzo, M., Migliarino, S., Sciarretta, S., Frati, G., Campiglia, P., Vecchione, C. and Commentary, S. E., 2018.** Novel Potent Decameric Peptide of *Spirulina platensis* Reduces Blood Pressure Levels Through a PI3K/AKT/eNOS-Dependent Mechanism. 449-457.
- Chan, P.-T., Matanjun, P., Budiman, C., Shapawi, R. and Jau-Shya, L., 2020.** ACE-Inhibitory and Antioxidant Activities of Hydrolysates from the By-Products of Hybrid Grouper (*Epinephelus lanceolatus* × *Epinephelus fuscoguttatus*). Sains Malaysiana, 49(2): 261-270.
- Chen, Y.-H., Chang, G.-K., Kuo, S.-M., Huang, S.-Y., Hu, I.-C., Lo, Y.-L. and Shih, S.-R. 2016.** Well-tolerated *Spirulina* extract inhibits influenza virus replication and reduces virus-induced mortality. Scientific Reports. 6: 2453
- Cristiane, R. L., Aline, M. P. and Jorge, A. V. C., 2016.** Biopeptides with antioxidant activity extracted from the biomass of *Spirulina* sp. LEB 18. African Journal of Microbiology Research, 10(3): 79-86.
- Cushman, D. W. and Cheung, H. S. 1971.** Spectrophotometric Assay and Properties of the Angiotensin-Converting Enzyme of Rabbit Lung. Biochemical Pharmacology, 20: 1637-1648.
- Darwish, R., Gedi, M. A., Akepach, P., Assaye, H., Zaky, A. S. and Gray, D. A. 2020.** *Chlamydomonas reinhardtii* is a potential food supplement with the capacity to outperform *Chlorella* and *Spirulina*. Applied Sciences (Switzerland), 10(19): 1-17.
- Dineshkumar, R., Narendran, R. and Sampathkumar, P. 2016.** Cultivation of *Spirulina platensis* in different selective media. Indian Journal of Geo-Marine Sciences, 45(12): 1749-1754.
- Dong, Z., Tian, G., Xu, Z., Li, M., Xu, M., Zhou, Y. and Ren, H. 2017.** Antioxidant activities of peptide fractions derived from freshwater mussel protein using ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis. Czech Journal of Food Sciences, 35(4): 328-338.
- El-Salam, M. H. A. and El-Shibiny, S. 2013.** Bioactive Peptides of Buffalo, Camel, Goat, Sheep, Mare, and Yak Milks and Milk Products. Food Reviews International, 29(1): 1-23.

- Famuwagun, A. A., Alashi, A. M., Gbadamosi, S. O., Taiwo, K. A., Oyedele, D. J., Adebooye, O. C. and Aluko, R. E. 2020.** In vitro characterization of fluted pumpkin leaf protein hydrolysates and ultrafiltration of peptide fractions: Antioxidant and enzyme-inhibitory properties. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 70(4), 429–443.
- Gonzalez-Tello, P., Carnacho, F., Jurado, E., Paez, M. P. and Guadix, E. M., 1994.** the Editor. 44, 529–532.
- Harnedy, P. A. and FitzGerald, R. J., 2012.** Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 4, Issue 1, pp. 6–24).
- Hashim, M. J. and Fry, J. R., 2020.** Evaluation of Direct and Indirect Antioxidant Properties of Selected Four Natural Chemical Compounds: Quercetin, Epigallocatechin-3-Gallate, Indole-3-Carbinol and Sulforaphane by DPPH Radical Scavenging Assay. *Journal of Biomedical Research & Environmental Sciences*, 1(8): 389–392.
- Hassan, F., Mobarez, S., Mohamed, M., Attia, Y., Mekawy, A. and Mahrose, K., 2021.** Zinc and/or selenium enriched *Spirulina* as antioxidants in growing rabbit diets to alleviate the deleterious impacts of heat stress during summer season. *Animals*, 11(3): 1–11.
- Henda, Y. Ben, Labidi, A., Arnaudin, I., Bridiau, N., Delatouche, R., Maugard, T., Piot, J.-M., Sannier, F. and Valérie Thiéry, and S. B.-J., 2013.** Measuring Angiotensin- I Converting Enzyme Inhibitory Activity by Micro Plate Assays: Comparison Using Marine Cryptides and Tentative Threshold Determinations with Captopril and Losartan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 10685–10690.
- Heo, S. Y., Ko, S. C., Kim, C. S., Oh, G. W., Ryu, B., Qian, Z. J., Kim, G., Park, W. S., Choi, I. W., Phan, T. T. V., Heo, S. J., Kang, D. H., Yi, M. and Jung, W. K., 2017.** A heptameric peptide purified from *Spirulina* sp. gastrointestinal hydrolysate inhibits angiotensin I-converting enzyme- and angiotensin II-induced vascular dysfunction in human endothelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 39(5):1072–1082.
- Hernandez, L. M. R. and Mejia, E. G. De., 2019.** Enzymatic Production , Bioactivity , and Bitterness of Chickpea (*Cicer arietinum*) Peptides. 18, 1913–1946.
- Holmquist, B., Bünning, P. and Riordan, J. F., 1979.** A continuous spectrophotometric assay for angiotensin converting enzyme. *Analytical Biochemistry*, 95(2): 540–548.
- Liestianty, D., Rodianawati, I., Arfah, R. A., Assa, A., Patimah, Sundari and Muliadi., 2019.** Nutritional analysis of spirulina sp to promote as superfood candidate. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 509(1).
- Lisboa, C. R., Pereira, A. M., Ferreira, S. P. and Costa, J. A. V., 2014.** Utilisation Of Spirulina sp . And *Chlorella pyrenoidosa* Biomass For The Productionof Enzymatic Protein Hydrolysates. *International Journal of Engineering Research and Applications*, 4(5): 29–38.
- Liu, W. Y., Zhang, J. T., Miyakawa, T., Li, G. M., Gu, R. Z. and Tanokura, M., 2021.** Antioxidant properties and inhibition of angiotensin-converting enzyme by highly active peptides from wheat gluten. *Scientific Reports*, 11(1): 1–13.
- Ibrahim, H. R., Ahmed, A. S. and Miyata, T., 2017.** Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. *Journal of Advanced Research*, 8(1): 63–71.
- Jayaprakash, R. and Perera, C. O., 2020.** Partial Purification and Characterization of Bioactive Peptides from Cooked New Zealand Green-Lipped Mussel (*Perna canaliculus*) Protein Hydrolyzates. *Foods*, 9(7).
- Joaquín-Ramos, A. de J., López-Palestina, C. U., Pinedo-Espinoza, J. M., Altamirano-Romo, S. E., Santiago-Saenz, Y. O., Aguirre-Mancilla, C. L. and Gutiérrez-Tlahque, J., 2020.** Phenolic compounds, antioxidant properties and antifungal activity of jarilla (*Barkleyanthus salicifolius* [Kunth] H. Rob & Brettell). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 80(3): 352–360.
- Ko, S. C., Kang, N., Kim, E. A., Kang, M. C., Lee, S. H., Kang, S. M., Lee, J. B., Jeon, B. T., Kim, S. K., Park, S. J., Park, P. J., Jung, W. K., Kim, D. and Jeon, Y. J., 2012.** A novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from a marine *Chlorella ellipsoidea* and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Process Biochemistry*, 47(12): 2005–2011.
- Lisboa, C. R., Pereira, A. M., Ferreira, S. P. and Costa, J. A. V., 2014.** Utilisation Of Spirulina sp . And *Chlorella pyrenoidosa* Biomass For The Productionof Enzymatic Protein Hydrolysates. *International Journal of Engineering Research and Applications*, 4(5): 29–38.

- Liu, B., Jiang, J., Yu, D., Lin, G. and Xiong, Y. L., 2020.** foods Effects of Supplementation of Microalgae (*Aurantiochytrium* sp.) to Laying Hen Diets on Fatty Stability, and Quality Attributes of Meat. 9 (9): 1271
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265–275.
- Luo, Q., Chen, D., Boom, R. M. and Janssen, A. E. M., 2018.** Revisiting the enzymatic kinetics of pepsin using isothermal titration calorimetry. *Food Chemistry*, 268(February), 94–100.
- Ma, N. L., Teh, K. Y., Lam, S. S., Kaben, A. M. and Cha, T. S., 2015.** Optimization of cell disruption methods for efficient recovery of bioactive metabolites via NMR of three freshwater microalgae (chlorophyta). *Bioresource Technology*.
- Mazloomi, S. N., Sadeghi-Mahoonak, A., Ranjbar-Nedamani, E. and Nourmohammadi, E., 2019.** Production of antioxidant peptides through hydrolysis of paper skin pumpkin seed protein using pepsin enzyme and the evaluation of their functional and nutritional properties. *ARYA Atherosclerosis*, 15(5): 218–227.
- Merculieff, Z., Ramnath, S., Sankoli, S. M., Venkataramgowda, S., Murthy, G. S. and Ceballos, R. M., 2014.** Phytochemical, antioxidant and antibacterial potential of *Elaeagnus kologa* (Schlecht.) leaf. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(S1): S599–S602.
- Mikryukov, A., Sablin, V., Martseva, D., Tarasova, N., Travkin, V. and Solyanikova, I., 2021.** *Spirulina*: Growth in continuous and batch bioreactors and response to stress conditions. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 705(1).
- Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C. G., Fox, P. F., Monnet, V. and Gobbetti, M., 2003.** Angiotensin I-Converting-Enzyme-Inhibitory and Antibacterial Peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 Proteinase-Hydrolyzed Caseins of Milk from Six Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5297–5305.
- Nhut, P. T., Quyen, N. T. N., Truc, T. T., Minh, L. V., An, T. N. T. and Anh, N. H. T., 2020.** Preliminary study on phytochemical, phenolic content, flavonoids and antioxidant activity of *Coriandrum Sativum* L. originating in Vietnam. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 991(1).
- Ratha, S. K., Renuka, N., M.Tech, I. R. and Bux, F., 2020.** Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information. *Nutrition*, January.
- Safi, C., Ursu, A. V., Laroche, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y. and Vaca-Garcia, C. 2014.** Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. *Algal Research*, 3(1): 61–65.
- Safitri, N. M., Herawati, E. Y. and Hsu, J. L., 2017.** Antioxidant Activity of Purified Active Peptide Derived from *Spirulina platensis* Enzymatic Hydrolysates. *Research Journal of Life Science*, 4(2): 119–128.
- Samarakoon, K. W., O-Nam, K., Ko, J. Y., Lee, J. H., Kang, M. C., Kim, D., Lee, J. B., Lee, J. S. and Jeon, Y. J., 2013.** Purification and identification of novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cultured marine microalgae (*Nannochloropsis oculata*) protein hydrolysate. *Journal of Applied Phycology*, 25(5): 1595–1606.
- Shalaby, S. M., Zakora, M. Otte, J., 2006.** Performance of two commonly used angiotensin-converting enzyme inhibition assays using FA-PGG and HHL as substrates. *Journal of Dairy Research*, 73(2): 178–186.
- Silvestre, M. P. C., Morais, H. A., Silva, V. D. M. and Silva, M. R., 2013.** Degree of hydrolysis and peptide profile of whey proteins using pancreatin. *Nutrire*, 38(3): 278–290.
- Sonklin, C., Alashi, A. M., Laohakunjit, N. and Aluko, R. E., 2021.** Functional characterization of mung bean meal protein-derived antioxidant peptides. *Molecules*, 26(6), 1–16.
- Suryaningsih, S., Muslim, B. and Djali, M., 2021.** The antioxidant activity of roselle and dragon fruit peel functional drink in free radical inhibition. *Journal of Physics: Conference Series*, 1836(1).
- Tadesse, S. A. and Emire, S. A., 2020.** Production and processing of antioxidant bioactive peptides: A driving force for the functional food market. *Heliyon*, 6(8): e04765.

- Thaha, A., Wang, B. Sen, Chang, Y. W., Hsia, S. M., Huang, T. C., Shiao, C. Y., Hwang, D. F. and Chen, T. Y., 2021.** Food-derived bioactive peptides with antioxidative capacity, xanthine oxidase and tyrosinase inhibitory activity. *Processes*, 9(5): 1–18.
- Xu, P., Zheng, Y., Zhu, X., Li, S. and Zhou, C. (2018).** L-lysine and L-arginine inhibit the oxidation of lipids and proteins of emulsion sausage by chelating iron ion and scavenging radical. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 31(6): 905–913.
- Yu, J., Hu, Y., Xue, M., Dun, Y., Li, S., Peng, N., Liang, Y. and Zhao, S. 2016.** Purification and identification of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of *Spirulina platensis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(7), 1216–1223.
- Zhang, B. and Zhang, X. 2013.** Separation and nanoencapsulation of antitumor polypeptide from *Spirulina platensis*. *Biotechnology Progress*, 29(5): 1230–1238.
- Zhang, Q., Tong, X., Sui, X., Wang, Z. Qi, B. 2018.** Antioxidant activity and protective effects of Alcalase-hydrolyzed soybean hydrolysate in human intestinal epithelial Caco-2 cells Food Research International Antioxidant activity and protective effects of Alcalase-hydrolyzed soybean hydrolysate in huma. *Food Research International*, 111(May), 256–264.
- Zhang, Y., Zhang, H., Wang, L., Guo, X., Qi, X. and Qian, H. 2011.** Influence of the degree of hydrolysis (DH) on antioxidant properties and radical-scavenging activities of peanut peptides prepared from fermented peanut meal. *Eur Food Res Technol*, 232: 941–950.