مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هفدهم، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۱، صفحات ۵۶-۴۵

بررسی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و بازدارندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسین اجزاء پپتیدی پروتئین آبکافت شده‌ی دانه کدو

علیرضا صادقی ماهونک[1]، شیما کاوه[2]

۱- نویسنده مسئول: استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
پست الکترونیکی: sadeghiaz@yahoo.com
۲- دانشجوی دکتری شیمی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۹

چکیده

سابقه و هدف: پپتیدهای زیست‌فعال خواص بیولوژیکی متعددی (ضد فشار خون، ضداکسایشی و ضدسرطان) متأثر از ترکیب آمینواسیدی و وزن مولکولی دارند. هدف از این پژوهش تعیین ترکیب آمینو اسیدی پروتئین آبکافت شده دانه کدو و بررسی تأثیر وزن مولکولی بر مهار رادیکال ABTS، نیتریک اکسید و بازدارندگی آنزیم ACE اجزاء پروتئین آن بود.

مواد و روش‌ها: پروتئین آبکافت شده دانه کدو در شرایط بهینه بر مبنای پژوهش قبلی تهیه و پس از تعیین ترکیب آمینو اسیدی آن، تأثیر توزیع وزن مولکولی بر خصوصیات زیست فعالی (مهار رادیکال ABTS، نیتریک اکسید و بازدارندگی آنزیم ACE) فراکسیون‌های حاصل پس از جداسازی و خالص‌سازی توسط کرماتوگرافی طرد اندازه (SEC) و کروماتوگرافی مایع با فشار بالا- فاز معکوس (RP-HPLC) ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج SEC نشان دادند که عمده وزن مولکولی پپتیدها در محدوده ۱۳-۶/۵ کیلودالتون بود. فراکسیون‌های شماره ۶۳-۳۷، ۵۲-۴۶ و ۵۹-۴۷، به‌ترتیب، بیشترین قابلیت بازدارندگی آنزیم ACE، مهار رادیکال نیتریک اکسید و ABTS داشتند. خالص‌سازی بیشتر فراکسیون‌ها توسط RP-HPC نشان داد که پپتیدهای آبگریزتر قابلیت بیشتری در مهار آنزیم ACE و رادیکال ABTS داشتند.

نتیجه‌گیری: اجزاء پپتیدی پروتئین آبکافت شده دانه کدو با خواص آنتی‌اکسیدانی و بازدارندگی ACE قابلیت کاربرد به‌عنوان نگهدارنده‌ی طبیعی در فرمولاسیون مواد غذایی، تولید محصولات فراسودمند و همچنین داروی کنترل فشار خون را دارند.

واژگان کلیدی: پپتیدهای زیست فعال، کروماتوگرافی، فشار خون، آنتی‌اکسیدان، دانه کدو

• مقدمه

مطالعات اخیر حاکی از آن است که یک رژیم غذایی مناسب، فراتر از نیازهای تغذیه‌ای، بر تنظیم و تعدیل فعالیت‌های فیزیولوژیکی بدن اثر گذار است و در پیشگیری از بروز بیماری‌ها نقش مؤثری را ایفا می‌کند. بطور کلی مواد غذایی عملگرا (Functional food) ترکیباتی هستند که علاوه بر جلب رضایت مصرف کنندگان و تأمین مواد مغذی مورد نیاز بدن، بافت‌های مختلف بدن را مورد هدف قرار داده و خطر بروز بسیاری از بیماری‌ها را کاهش می‌دهند. تمامیِ ترکیبات غذایی، اعم از پروتئین، چربی، کربوهیدرات، مواد معدنی و عناصر کمیاب درگروه ترکیبات زیست‌فعال جای دارند. در این میان، پروتئین‌های غذایی به عنوان پیش‌ساز و منابع اصلی ترکیبات سلامتی‌بخش در فرمولاسیون‌های غذایی بطور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند. در سال‌های اخیر نقش پروتئین‌ها و پپتیدهای زیست‌فعال به عنوان مؤلفه‌های کلیدی سلامتی‌بخش در پژوهش‌های مختلف مورد بحث و بررسی قرار گرفته است. پروتئین‌های هیدرولیز شده دارای ویژگی‌های بیولوژیک متعددی از جمله خاصیت ضداکسایشی (۱)، مهارکنندگی نیتریک‌اکسید (۲)، ضدمیکروبی (۳)، ضد فشار خون (۴)، ضدسرطان (۵) و کنترل کننده‌ی فعالیت سیستم ایمنی بدن (۶) می‌باشند. پپتیدهای زیست فعال، توالی‌های

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-12-16]
[DOR: 20.1001.1.17357756.1401.17.3.3.7]

پروتئینی کمتر از ۲۰ اسیدآمینه با وزن مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ دالتون می‌باشند. این پپتیدها درون پروتئین اولیه غیر فعال هستند و به‌وسیله آبکافت آنزیمی یا میکروارگانیسم‌های پروتئولیتیک طی فرآیند تخمیر، از توالی پروتئینی اولیه تولید می‌گردند. در میان روش های ذکر شده، آبکافت آنزیمی، مرسوم‌ترین شیوه تولید این ترکیبات ارزشمند می‌باشد (۷). فشار خون، یک بیماری چند متغیره است و در حال حاضر یکی از علل عمده مرگ و میر در کشورهای پیشرفته به شمار می‌رود. آنزیم مبدل آنژیوتنسین (ACE-I)، یک متالوپپتیداز است که علاوه بر خون در سایر مایعات بدن نیز حضور دارد. بطور کلی این آنزیم انقباض عروق و در نتیجه افزایش فشار خون را به وسیله دو سیستم تنظیم کننده به نام سیستم رنین – آنژیوتنسین-آلدوسترون RAAS (renin–angiotensin–aldosterone system) و سیستم کینین-کالیکرئین (kinin–kallikrein system) کنترل می‌کند. به دلیل نقش آنزیم ACE، داروهای سنتزی بازدارنده آنزیم ACE نظیر کاپتوپریل (Captopril) و انالاپریل (Enalapril) جهت درمان بیماران مبتلا به فشار خون مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ هرچند که عوارض جانبی ناشی از مصرف این داروها (خشکی و اِدم پوست، سرفه، اختلال در حس چشایی، آکنه و غیره) سبب شده است که طراحی داروهایی با اثر مشابه و منشأ طبیعی در دستور کار بسیاری از شرکت‌ها و مؤسسات تحقیقاتی قرار گیرد (۸). در میان ترکیبات طبیعی دارای خاصیت کاهندگی فشار خون، پروتئین هیدرولیز شده گزینه‌ی مناسبی است که در پژوهش‌های گوناگونی مورد بررسی قرار گرفته است از جمله: Li و همکاران (۲۰۰۷) و Maqsoudlou و همکاران (۲۰۱۹) که به‌ترتیب خاصیت ضد فشار خون قابل توجه پروتئین‌های هیدرولیز شده سبوس برنج و گرده گل را گزارش دادند (۱۰، ۹). از سوی دیگر اکسیداسیون و تشکیل رادیکال‌های آزاد در بدن انسان آثار جبران ناپذیری همچون سرطان، آلزایمر و بیماری های قلب عروقی می‌گردند. در محصولات غذایی نیز اکسیداسیون لیپیدها و تشکیل رادیکال‌های آزاد منجر به فساد شیمیایی، کاهش بازارپسندی، ضررهای سنگین اقتصادی به تولیدکنندگان و بیماری‌های خطرناک در مصرف‌کنندگان می‌گردد (۱۱). استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند BHA (Butylated hydroxyanisole)، BHT (Butylated hydroxytoluene)، PG (Butylated hydroxypropyl gallate) و TBHQ (Tertiary butylhydroquinone) به‌دلیل عوارض نامطلوب آن‌ها بر سلامتی انسان تحت کنترل می‌باشد.

بنابراین شناسایی ترکیبات زیست فعال جهت جلوگیری از اکسیداسیون در محصولات غذایی و بدن انسان از نیازهای مهم در حوزه‌ی غذایی و سلامت جامعه می‌باشد. در تحقیقات مختلفی خاصیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال اثبات و ارتباط بین ترکیب اسید آمینه این پپتیدها با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی آنها مورد بررسی قرار گرفته است (۱۴-۱۲).

در میان منابع مناسب برای تولید پروتئین آبکافت شده دانه کدو (*pepo cucurbita*) حاوی بیش از ۳۵٪ پروتئین و ۵۰٪ چربی بوده و یک منبع غنی از اسیدهای آمینه نظیر آرژنین، آسپارتیک اسید و گلوتامیک به شمار می‌رود. پس از روغن‌کشی از دانه‌های کدو یک محصول جانبی سرشار از پروتئین (۶۵-۶۰ درصد) به نام کنجاله دانه کدو باقی خواهد ماند. حجم بالای فرآورده‌های جانبی منجر به ایجاد منابع عظیمی می‌شود که دفع آن نیازمند صرف زمان و هزینه‌های فراوان است. تاکنون مصرف اصلی این کنجاله برای مصارف خوراک دام بوده است. یکی از راه‌های ارزش افزایی به این محصول جانبی که دارای ارزش اقتصادی بالایی می‌باشد آبکافت آنزیمی این ترکیب است (۱۵). بنابراین با توجه به ترکیب اسید آمینه مناسب پروتئین دانه کدو، در پژوهش قبلی بهینه‌سازی آبکافت آنزیمی کنجاله دانه کدو جهت دستیابی به حداکثر قابلیت آنتی‌اکسیدانی بررسی گردید (۱۶). در این پژوهش ابتدا پروتئین آبکافت شده دانه کدو در شرایط بهینه بر مبنای یافته‌های تحقیق قبلی تهیه و سپس تأثیر توزیع وزن ملکولی بر خصوصیات زیست فعالی فراکسیون‌های حاصله (شامل بازدارندگی آنزیم ACE و مهار رادیکال نیتریک اکسید و فعالیت مهار رادیکال DPPH و ABTS) و همچنین ارتباط بین ترکیب اسید آمینه این پپتیدها با ویژگی‌های زیست فعالی پس از جداسازی و خالص‌سازی توسط کرماتوگرافی طرد اندازه (SEC) و همچنین کروماتوگرافی مایع با فشار بالا- فاز معکوس (RP-HPLC) مورد بررسی قرار گرفت.

• مواد و روش‌ها

مواد اولیه: کنجاله دانه کدو (*Cucurbita pepo con var. pepo var. styriaca*) از شرکت سویابین گرگان تهیه شد. آنزیم آلکالاز از شرکت نووزایم دانمارک، آنزیم ACE از شرکت مرک، اسیدکلریدریک، اتانول، نیتریک اکسید، ABTS، استونیتریل، سولفانید آمین، اسید فسفریک، تری فلوئورو استیک اسید و نفتیل اتیل دی آمین از شرکت سیگما و با درجهٔ خلوص آزمایشگاهی تهیه شدند.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.17357756.1401.17.3.3.7]

تهیه ایزوله پروتئین دانه کدو: کنجاله چربی‌گیری شده دانه کدو به نسبت ۱:۱۰ در آب پراکنده شد. سپس pH محلول تو سط سود ۱ نرمال به ۱۰ ر سیده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق مخلوط شد. مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با دور g× ۶۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در سانتریفوژ یخچال دار (مدل Combi514R، کره جنوبی) قرار گرفت. به منظور ر سوب پروتئین‌های دانه کدو، pH سوپرناتانت حا صل توسط اسید کلریدریک ۱ نرال به ۵ رسیده و تحت شرایط م شابه سانتریفوژ شد. ر سوب بد ست آمده (ایزوله پروتئینی) توسط خشک کن انجمادی خشک گردید و مستقیماً برای آبکافت مورد استفاده قرار گرفت (۱۵).

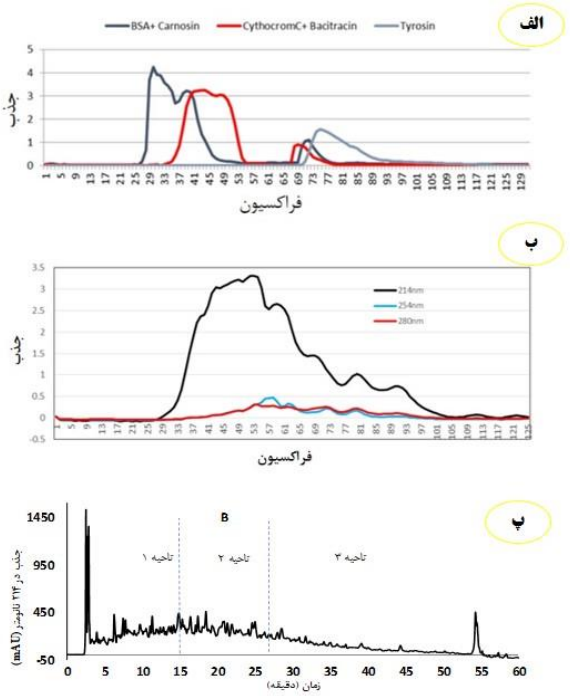
هیدرولیز ایزوله پروتئین دانه کدو: آبکافت آنزیمی توسط آنزیم آلکالاز و بر اساس شرایط بهینه جهت دستیابی به حداکثر خصوصیات آنتی اکسیدانی که در مطالعه قبلی بدست آمده بود (۱۶)، صورت گرفت. به این منظور ایزوله‌ی پروتئینی به نسبت ۵٪ (وزنی/حجمی) در بافر فسفات با pH برابر با ۹ پراکنده و آنزیم آلکالاز در غلظت ۲٪ (حجمی/ وزنی نسبت به سوبسترای پروتئینی) افزوده شد. سپس هیدرولیز در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳/۵ ساعت در انکوباتور شیکردار با دور ۲۰۰ دور بر دقیقه به انجام ر سید. در انتها واکنش آنزیمی در ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه متوقف و سانتریفوژ کردن برای حذف ترکیبات اضافه در ۵۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت. در نهایت سوپرناتانت توسط خشک کن انجمادی به پودر تبدیل گردید.

آماده سازی پروتئین آبکافت شده جهت خالص سازی: مشابه با روش Escudero و همکاران (۲۰۱۲)، ۴ گرم نمونه آبکافت‌شده پروتئینی در ۲۰ میلی لیتر اسید هیدروکلریک ۰/۰۱ نرمال حل شد و به مدت ۸ دقیقه در استوماکر هموژن گردید. سپس نمونه هموژن شده، سانتریفوژ (g ×۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه) شد و به‌منظور پروتئین زدایی، سوپرناتانت با سه برابر حجم خود با اتانول مطلق مخلوط شد و به مدت ۲۰ ساعت در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس نمونه مجددا سانتریفوژ شد و پس از تبخیر اتانول، به روش انجمادی خ شک شد. در نهایت ع صاره پروتئین زدایی شده خشک شده در ۱۵ میلی لیتر اسید هیدروکلریک ۰/۰۱ نرمال حل و پس از صاف شدن با فیلتر غشایی ۰/۴۵ میکرومتر در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۷).

جزء به جزء سازی و خالص سازی با استفاده از کروماتوگرافی طرد اندازه (Tertiary butylhydroquinone): جهت جزء به جزء سازی اولیه اجزاء پپتیدی موجود در آبکافت شده‌های پروتئینی سیستم کروماتوگرافی طرد اندازه (SEC) بر اساس جرم مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور، محلول پروتئین هیدرولیز شده با غلظت (mg/mL) ۲۵ در آب مقطر تهیه و پس از انحلال کامل به مدت ۱۰ دقیقه با دور g× ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. مقدار ۵ میلی‌لیتر از محلول پروتئین آبکافت شده پروتئین‌زدایی شده حاصل از مرحله قبل به ستون G-25 Sephadex (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden، ۶۵ cm ×۲/۵) که قبلا با اسید هیدروکلریک ۰/۰۱ نرمال م شروط شده بود، منتقل گردید. عمل جدا سازی اجزاء پپتیدی در ۴ درجه سانتی گراد با استفاده از اسید هیدروکلریک ۰/۰۱ نرمال با سرعت جریان ۱۵ میلی لیتر در ساعت انجام گرفت. با استفاده از کالکتور اتوماتیک، اجزاء (فرکسیون‌ها) ۵ میلی لیتری حاصله در لوله‌های مخصوص جمع‌آوری شد و جذب آن‌ها در طول موج‌های ۲۱۴ (برای اسیدهای آمینه غیر آروماتیک و گروه‌های کربونیل) و ۲۵۴ (ماگزیمم جذب فنیل آلانین) و ۲۸۰ نانومتر(برای اسیدهای آمینه آروماتیک) قرائت شد. سپس لوله‌های جمع‌آوری نمونه‌ها که در برر سی ا سپکتروفتومتری دارای جذب (شاخص ح ضور پپتید) بودند توسط خشک‌کن انجمادی خشک شده و سپس با افزودن آب مقطر با حجم م شخص نمونه‌ها رقیق سازی شده و آزمون های مختلف (م هار آنزیم م بدل آنژیوتنسین، م هار رادیکال نیتریک اکسید و ABTS)، در مورد تمام فراکسیون‌های به دست آمده به صورت جداگانه انجام گرفت و فعال‌ترین اجزاء پپتیدی شنا سایی شدند (۱۳). مجموعه اجزاء پپتیدی شماره ۵۶-۴۹ که بیشترین فعالیت را آزمون‌های فوق نشان دادند، جمع‌آوری و مخلوط شدند و پس از لیوفیلیز شدن به منظور انجام خالص‌سازی بیشتر در مراحل بعد در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. همچنین جهت تخمین توزیع جرم مولکولی اجزاء پپتیدی موجود در آبکافت شده از سیستم SEC ا ستفاده گردید.کالیبرا سیون ستون با بارگذاری ترکیبات استاندارد با وزن مولکولی مشخص به شرح زیر انجام گرفت: سرم آلبومین گاوی (۷۰ کیلو دالتون)، سیتوکروم C (۱۳ کیلودالتون)، باسیتراسین (۱/۴۲ کیلودالتون)، کارنوزین (۰/۲۲

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-12-16]
[DOR: 20.1001.1.17357756.1401.17.3.3.7]

کیلودالتون)، و تیروزین (۰/۲ کیلودالتون). شکل ۱-الف پروفایل SCE نمونه‌های استاندارد را نشان می‌دهد.



شکل۱. الف) پروفایل پروتئینی حاصل از کروماتوگرافی طرد اندازه (SEC) بر اساس جرم مولکولی نمونه‌های استاندارد، ب) پروفایل پروتئینی حاصل از کروماتوگرافی طرد اندازه فراکسیون‌های پروتئین آبکافت شده دانه کدو، پ) پروفایل RP-HPLC نمونه کنترل

خالص سازی و جزء به جزء سازی مخلوط پپتیدها با دستگاه HPLC فاز معکوس (RP-HPLC): با استفاده از دستگاه HPLC فاز معکوس (Agilent 1100, Agilent Tech., California, USA)، اجزاء پپتیدی بر مبنای میزان آبگریزی نسبی تفکیک و تخلیص شدند. ستون مورد استفاده برای این کار، ستون Symmetry C18 (250×4.6 mm, 5µm) از کمپانی Waters بود. فاز متحرک متشکل از حلال A (تری فلوئورو استیک اسید (TFA) ۰/۱٪ در آب دو بار تقطیر) و حلال B (حاوی TFA ۰/۰۸۵٪ در مخلوط استونیتریل با آب دیونیزه (۶۰:۴۰)) بود. فاز متحرک با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر و گاز زدایی شد. شویش به صورت گرادیانت انجام شد. به این صورت که در ابتدا شویش به صورت ۱۰۰٪ با حلال A به مدت ۲ دقیقه انجام و سپس حلال B به صورت گرادیانی ۰ تا ۵۰٪ در طول ۵۰ دقیقه و با سرعت ۱ میلی لیتر در دقیقه جریان یافت. حجم تزریق ۳۰۰ میکرولیتر بود که به صورت دستی تزریق گردید. کیفیت جداسازی با اندازه‌گیری شدت جذب در طول موج ۲۱۴ و ۲۸۰ نانومتر بررسی گردید. اجزاء پپتیدی حاصله با استفاده از کالکتور اتوماتیک در فواصل زمانی یک دقیقه به میزان ۱ میلی لیتر جمع آوری شد و به روش انجمادی خشک و در ۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۳). سپس محتویات هر فراکسیون مجددا در آب دیونیزه حل شد. بازدارندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسین، مهار رادیکال نیتریک اکسید و ABTS بر روی تمام فرکسیون‌های حاصله انجام و در نهایت فعال‌ترین فراکسیون‌ها شناسایی شدند.

آزمون‌های انجام گرفته روی فراکسیون‌ها

تعیین فعالیت بازدارندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسین (ACE): بازدارندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسین آبکافت شده‌ها و اجزاء پپتیدی بر اساس روش Sentandreu و Toldrá (۲۰۰۶) تعیین شد (۱۸). این روش بر مبنای توانایی آنزیم ACE جهت آبکافت سوبسترای اورتوآمینو بنزوئیل گلایسیل-نیترو فنیل آلانین پرولین (Abz-Gly-p-nitro-phe-pro-OH) و تولید یک محصول فلوئورسنت است. ۵۰ میکرولیتر محلول نمونه با ۵۰ میکرولیتر بافر تریس ۱۵۰ میلی مولار (pH= ۸/۳) حاوی آنزیم ACE (۳ میلی واحد بر میلی لیتر) مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد پیش گرمخانه گذاری شد. واکنش آنزیمی با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر بافر تریس-اسید کلریدریک ۱۵۰ میلی مولار (pH= ۸/۳) حاوی کلرید سدیم (۱/۱۲۵ مولار) و سوبسترای Abz-Gly-p-nitro-phe-pro-OH (۱۰ میلی مولار) آغاز شد. میکرو پلیت حاوی مخلوط فوق به مدت ۶۰ دقیقه درون فلوئورومتر قرار داده شد. شدت فلوئورنس ناشی از عمل آبکافتی ACE به صورت خودکار هر ۱۵ دقیقه یک بار با طول موج‌های تحریک و باز نشر ۳۵۵ و ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری شد. میزان فعالیت مهار کنندگی ACE به صورت درصد بازدارندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسین گزارش گردید.

فعالیت مهار رادیکال نیتریک‌اکسید: به‌طور خلاصه ۶۰ میکرولیتر سدیم‌نیترو پروسید در بافر فسفات‌سالین با ۶۰ میکرولیتر نمونه مورد نظر مخلوط و سپس در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس حجم برابر از معرف گریس (Griess reagent) به آن اضافه شد (جهت تهیه معرف گریس حجم های مساوی از محلول ۱٪ سولفانیدآمیل در ۲/۵٪ فسفریک اسید و محلول ۰/۱ درصد نفتیل اتیلن دی آمین در ۲/۵٪ اسید فسفریک با هم مخلوط شدند). جذب محلول در طول موج ۵۴۶ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۹). درصد مهار رادیکال نیتریک اکسید از فرمول ۱ محاسبه گردید:

فرمول ۱)

$$\text{درصد مهار رادیکال نیتریک اکسید} = \left(\frac{A_b - A_s}{A_b}\right) \times 100$$

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.17357756.1401.17.3.3.7]

A_{blank} (جذب نمونه شاهد) و A_{sample} (جذب نمونه آبکافت شده) هستند.

فعالیت مهار رادیکال ABTS: فعالیت مهار رادیکال ABTS پروتئین‌های آبکافت شده با استفاده از روش تشریح شده توسط You و همکاران (۲۰۱۰) با کمی اصلاحات تعیین گردید (۲۰). محلول رادیکال $ABTS^+$ با ترکیب نسبت حجمی یکسانی از ABTS در غلظت ۷ میلی مولار و ۲/۴۵ میلی مولار پتاسیم پرسولفات تهیه گردید. مخلوط در تاریکی و در دمای محیط به مدت ۱۶-۱۲ ساعت قبل از مصرف قرار داده شد. در این مدت، اکسیداسیون و تولید رادیکال $ABTS^+$ به وسیله پتاسیم پرسولفات انجام می‌گیرد. قبل از آزمون، محلول $ABTS^+$ با استفاده از PBS (۰/۲, pH 7.4 مولار) تا جذب ۰/۰۲ ± ۰/۷ در ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. سپس ۴۰ میکرولیتر از هر نمونه (حاوی۴ میلی گرم پروتئین/ میلی لیتر) به ۴ میلی لیتر محلول رقیق شده $ABTS^+$ افزوده شد. مخلوط برای ۳۰ ثانیه به شدت ورتکس و به مدت ۶ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. جذب محلول نهایی در ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد مهار رادیکال $ABTS^+$ نمونه‌ها بر اساس معادله (۲) محاسبه گردید.

فرمول ۲)

$$\text{درصد مهار رادیکال ABTS} = (\frac{A_b - A_s}{A_b}) \times 100$$

A_{blank} (جذب نمونه شاهد) و A_{sample} (جذب نمونه آبکافت شده) هستند.

آنالیز اسیدهای آمینه: ۲ تا ۴ میلی گرم پروتئین با ۴ سی سی اسید کلریدریک ۶ نرمال به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه آبکافت گردید. استانداردهای داخلی به مخلوط افزوده شد و پس از مشتق سازی با فنیل ایزوتیوسیانات ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه به ستون کروماتوگرافی_فاز معکوس (Technochrom-RP-C18) با قطر داخلی ۵ µm و طول ۱۵ cm تزریق گردید. متیونین و سیستئین به دلیل فرآیند اکسیداسیون قابل شناسایی نبودند. نتایج بر اساس میلی‌گرم اسید آمینه در ۱۰۰ گرم پروتئین گزارش گردید.

روش آنالیز: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver.16 انجام گرفت، هر یک از آزمون‌ها در سه تکرار انجام گرفت. میانگین تیمارها با آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۹۵ ٪ ($p<۰/۰۵$) مورد مقایسه قرار گرفت. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel ترسیم و گزارش شدند.

• یافته‌ها

محتوای اسید آمینه: ترکیب اسید آمینه پپتیدها یکی از فاکتورهای مهم که در قابلیت بازدارندگی ACE آن‌ها است. در جدول۱ ترکیب اسید آمینه پروتئین آبکافت شده دانه کدو آورده شده است. با توجه به جدول ۱ می‌توان دریافت که گلوتامیک ا سید، آ سپارتیک ا سید و آرژنین ا سیدهای آمینه اصلی در پروتئین آبکافت شده کدو به شمار می‌روند. بیشترین و کمترین میزان اسید آمینه به‌ترتیب مربوط به گلوتامیک اسید و ترئونین به میزان (mg/۱۰۰g) ۱۷۱۹۴/۳۵ و ۲۰۰۷/۱۷ بود.

توزیع وزن مولکولی با SEC : در شکل ۱-ب پروفایل کروماتوگرافی طرد اندازه نمونه پروتئین آبکافت شده دانه کدو نمایش داده شده است. همانطور که در شکل مشخص است نمونه های حاوی پپتیدها و آمینواسیدها در طول موج‌های مربوطه از خود جذب نشان می‌دهند. با مقایسه الگوی SEC پروتئین‌های آبکافت شده با الگوی SEC پروتئین‌های استاندارد (شکل ۱) مشخص شد که عمده وزن ملکولی پپتیدهای فراکسیون‌های پروتئین‌های آبکافت شده در محدوده وزن مولکولی ۱۳ کیلودالتون و به میزان کمتری در محدوده بین ۲۰۰ دالتون تا ۱۳ کیلودالتون می‌باشند.

به منظور بررسی فعالیت زیستی فراکسیون‌های مختلف به دست آمده از جداسازی با SEC، از نقطه ابتدایی شروع جذب در کروماتوگرام (از نمونه شماره ۲۵) فراکسیون جمع‌آوری و به‌روش انجمادی خشک شدند و آزمون‌های مختلف بر روی آن‌ها صورت گرفت.

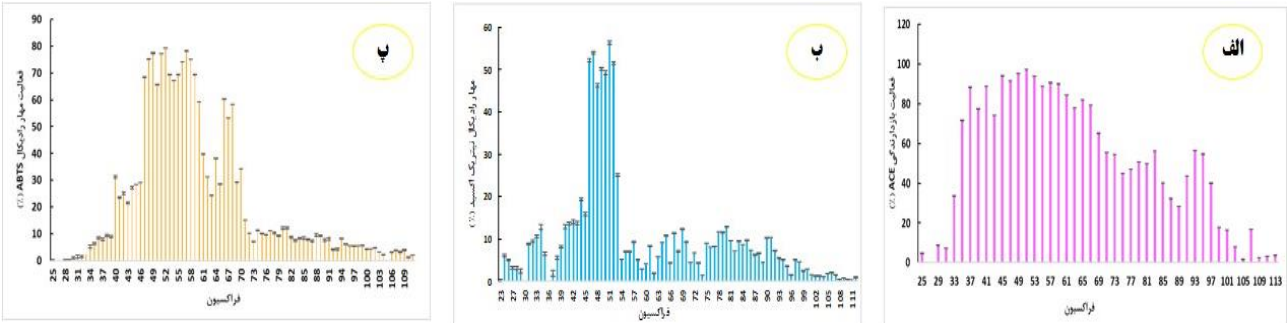
فعالیت بازدارندگی ACE و ارتباط با وزن مولکولی و محتوای اسید آمینه: فعالیت مهار کنندگی ACE فراکسیون‌های مختلف پروتئین‌های آبکافت شده مورد بررسی در شکل ۲-الف نشان داده شده است. فراکسیون‌های ۶۳-۳۷ پروتئین آبکافت شده بیشترین فعالیت مهار کنندگی ACE (بین ۹۷/۲۵-۷۷/۹٪) را از خود نشان دادند، که معادل محدوده وزن مولکولی ۶/۵ الی ۱۳ کیلودالتون بود.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.17357756.1401.17.3.3.7]

جدول ۱. محتوای اسید آمینه پروتئین آبکافت شده کدو

اسیدهای آمینه	مقدار (گرم۱۰۰/ میلی گرم)	میزان پیشنهادی توسط FAO (گرم۱۰۰/ میلی گرم)	درصد
آلانین	۳۴۶۶/۹۴		
سرین	۴۰۴۳/۳۴		
آسپارتیک اسید	۷۵۵۵/۴۲		
گلوتامیک اسید	۱۷۱۹۴/۳۵		
*هیستیدین	۱۶۷۴/۱۸	۱۹۰۰	٪۸۸/۱۱
*تیروزین	۲۵۷۹/۲۴	۶۳۰۰	>۱۰۰
آرژنین	۱۳۵۹۷/۱۸		
گلایسین	۳۹۵۳/۱۹		
*ترئونین	۲۰۰۷/۱۷	۳۴۰۰	٪۵۹/۰۳
*متیونین	۲۱۲۲/۹۷	۲۵۰۰	٪۸۴/۹۱
*والین	۳۴۴۵/۹۷	۳۵۰۰	٪۹۸/۴۵
*لوسین	۵۶۴۱/۶۲	۶۶۰۰	۸۵/۴۷
*ایزولوسین	۳۱۰۰/۲۰	۲۸۰۰	>۱۰۰
*لایزین	۳۰۰۲/۷۴	۵۸۰۰	۵۱/۷۷
*فنیل‌آلانین	۴۲۸۵/۰۳		
جمع	۷۷۶۶۹/۵۴		
میزان کل اسیدهای آمینه آبگریز	۲۶۰۱۵/۹۲		



شکل ۲. الف) فعالیت بازدارندگی آنزیم ACE ، ب) قابلیت بازدارندگی رادیکال نیتریک اکسید، پ) قابلیت مهار رادیکال ABTS فراکسیون‌های مختلف پروتئین آبکافت شده کدو

فعالیت بازدارندگی رادیکال نیتریک اکسید فراکسیون‌ها: نیتریک اکسید، یک رادیکال آزاد است که از طریق اکسیداسیون آرژنین به سیترولین به‌وسیله‌ی NO-سنتتاز تولید می‌شود. نتایج قابلیت بازدارندگی رادیکال نیتریک اکسید توسط فراکسیون‌های مختلف پروتئین های آبکافت شده دانه کدو در شکل ۲-ب نشان داده شده است. نتایج نشان داد که فراکسیون‌های ۴۶ الی ۵۲ پروتئین آبکافت شده کدو دارای بیشترین فعالیت به دام اندازی رادیکال نیتریک اکسید به‌میزان ۵۱/۵۵-۵۲/۱۸ درصد بودند.

قابلیت مهار رادیکال ABTS: به‌طور گسترده از آزمون مهار رادیکال کاتیونی ABTS برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات آب دوست و چربی دوست استفاده می‌گردد. قابلیت مهار رادیکال ABTS فراکسیون‌های مختلف پروتئین آبکافت شده دانه‌ی کدو در شکل ۲-پ نشان داده شده است. میزان این شاخص در فراکسیون‌های ۵۹-۴۷ نسبت به سایر فراکسیون‌ها بیشتر و در محدوده‌ی ۷۹/۲۱-۶۵/۶۴ درصد بود. بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال ABTS مربوط به فراکسیون‌های ۵۲ و ۵۷، به میزان ۷۹/۲۱ و ۷۸/۲۱ درصد بود.

خالص سازی با RP-HPLC و بررسی پتانسیل زیست فعالی فراکسیون ها: Lassoued و همکاران (۲۰۱۵) در شرایط کاملاً مشابه با شرایط به کارگرفته شده در پژوهش حاضر، به منظور تقسیم بندی کروماتوگرام به نواحی آب

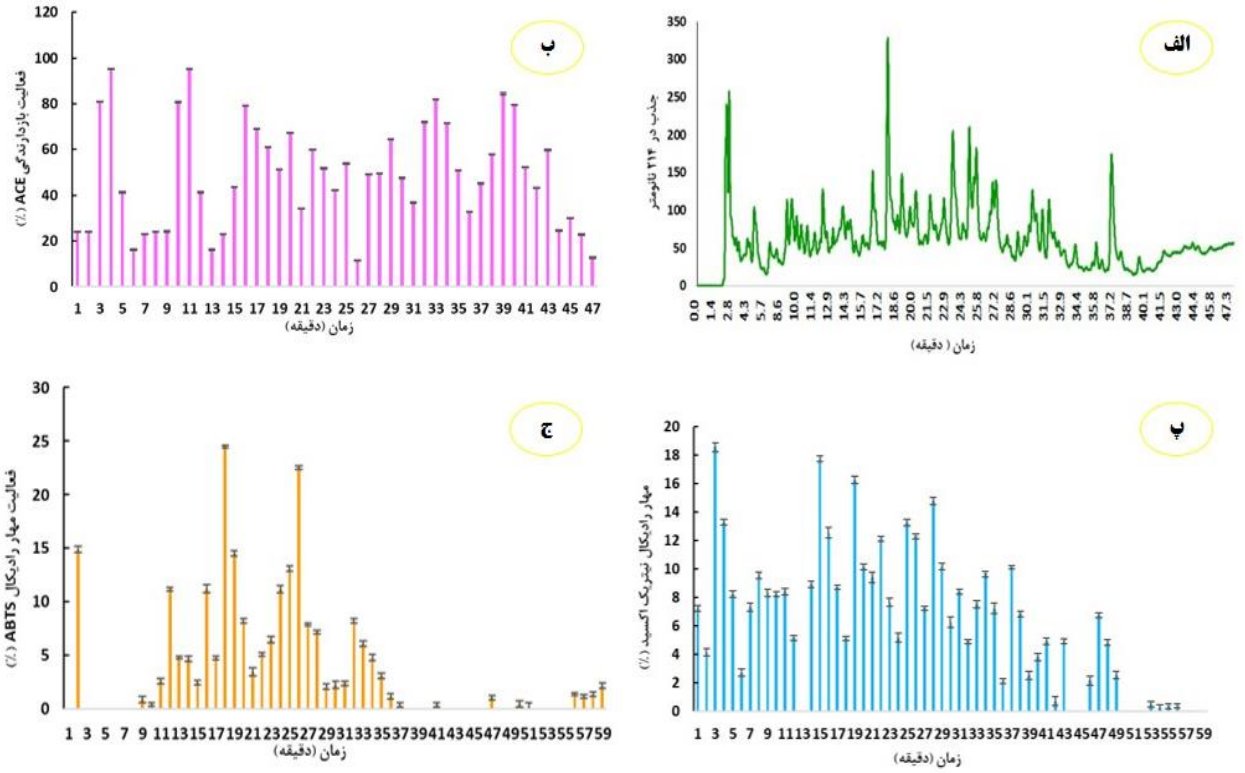
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-12-16]
[DOR: 20.1001.1.17357756.1401.17.3.3.7]

دوست و آب گریز، دو اسیدآمینه تیروزین و تریپتوفان را به صورت جداگانه به HPLC تزریق نمودند و با توجه به زمان بازداری آنها (۱۳/۳ دقیقه درمورد تیروزین و ۲۶/۰۳ دقیقه در مورد تریپتوفان) کروماتوگرام را به سه ناحیه تقسیم نمودند: ناحیه ۱، پپتیدهای قبل از تیروزین (پپتیدهای آب دوست)، ناحیه ۲، بین تیروزین و تریپتوفان (پپتیدهای اندکی آب گریزآب گریز) و ناحیه ۳، پس از تریپتوفان (پپتیدهای بسیار آب گریزآب دوست) (۲۱). نشان داده شده است که ترتیب آمینواسیدی در پپتید، الگوی جریان پپتید را تحت تأثیر قرار می‌دهد (شکل ۱-پ).

مخلوطی از اجزاء پپتیدی فعال بدست آمده از جداسازی کروماتوگرافیک با SEC (مجموعه اجزاء پپتیدی فراکسیون‌های شماره ۶۱-۴۷ با بالاترین فعالیت بازدارندگی ACE و مهار رادیکال نیتریک اکسید و ABTS) پس از حل شدن در آب دیونیزه با استفاده از RP-HPLC آنالیز گردید و فراکسیون های پپتیدی بر اساس میزان قطبیت جدا سازی شدند (شکل ۳-الف).

در طی خالص‌سازی با RP-HPLC فراکسیون‌های یک میلی لیتری (مجموعا ۵۰ فرکسیون) جمع‌آوری گردید و پس از خشک شدن مجدداً در آب دیونیزه حل گردید. فعالیت بازدارندگی ACE، مهار رادیکال نیتریک اکسید و ABTS فراکسیون‌های به دست آمده مورد ارزیابی قرار گرفت.

فعالیت بازدارندگی آنزیم ACE فراکسیون‌های پروتئین آبکافت شده دانه کدو بعد از جداسازی توسط RP-HPLC: فعالیت بازدارندگی آنزیم ACE فراکسیون های پروتئین آبکافت شده کدو پس از جدا سازی با RP-HPLC در شکل ۳-ب نشان داده شده است. بیشترین فعالیت مربوط به فرکسیون‌های جریان یافته در زمان های ۴ و ۱۱ دقیقه به میزان ۹۵/۰۸ درصد بود. از سوی دیگر فراکسیون جریان یافته در زمان ۲۶ دقیقه کمترین میزان قابلیت مهار ACE (۱۱/۴۵ درصد) را از خود نشان داد. به‌طور کلی از زمان بازداری ۱۵ دقیقه به بعد پپتیدها خاصیت بازدارندگی آنزیم ACE مناسبی از خود نشان دادند که می‌توان این نتیجه را به آبگریز بودن آنها نسبت داد.



شکل ۳. الف) پروفایل RP-HPLC مخلوط فراکسیون های فعال پروتئین آبکافت شده دانه کدو پس از جداسازی با SEC ، ب) قابلیت بازدارندگی ACE، پ) فعالیت مهار رادیکال نیتریک، ج) فعالیت مهار رادیکال ABTS فراکسیون‌های پروتئین آبکافت شده دانه کدو بعد از جداسازی توسط RP-HPLC

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-12-16]
[DOR: 20.1001.1.17357756.1401.17.3.3.7]

فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید فراکسیون‌های پروتئین آبکافت شده دانه کدو بعد از جدا سازی تو سط RP-HPLC: فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید فراکسیون‌های پروتئین آبکافت شده پس از RP-HPLC در محدوده‌ی ۱۸/۵۴-۰/۲۴ درصد بود (شکل ۳-پ). بیشترین فعالیت به ترتیب مربوط به فراکسیون‌های جریان یافته در زمان های ۳، ۱۵ و ۱۹ دقیقه به‌میزان ۷۲/۵۴،۱۷/۱۸و۱۶/۲۴ درصد بود. افزایش زمان بازداری منجر به کاهش قابلیت مهار رادیکال نیتریک اکسید نمونه‌ها شد، در نتیجه می‌توان گفت که پپتیدهای آب دو ست‌تر پتانسیل بیشتری در مهار رادیکال نیتریک اکسید داشته‌اند.

فعالیت مهار رادیکال ABTS فراکسیون های پروتئین آبکافت شده دانه کدو بعد از جداسازی توسط RP-HPLC: با توجه به نتایج به دست آمده محدوده فعالیت فراکسیون های کدو از نظر به دام اندازی رادیکال ABTS از حدود ۰/۳ تا ۲۴/۵ درصد متغیر بود (شکل ۳-ج). بیشترین فعالیت مربوط به فراکسیون‌های جریان یافته در زمان‌های ۱۸و ۲۶ دقیقه به‌میزان ۲۲/۵ و ۲۴/۵ درصد بود. افزایش زمان بازداری در HPLC نشان‌دهنده‌ی خروج فراکسیون‌هایی با خاصیت آبگریزی بیشتر می‌باشد. در این پژوهش پپتیدهایی با زمان بازداری کمتر قابلیت مهار رادیکال ABTS قابل توجهی از خود نشان ندادند اما با افزایش زمان این قابلیت بیشتر شد، که این امر نشان‌دهنده‌ی قابلیت بیشتر فراکسیون‌هایی با خاصیت آبگریزی بیشتر در مهار رادیکال ABTS می‌باشد.

• بحث

آنزیم مبدل آنژیوتنسین (ACE-I)، یک متالوپپتیداز است که علاوه بر خون در سایر مایعات بدن نیز حضور دارد. بطور کلی این آنزیم انقباض عروق و در نتیجه افزایش فشار خون را به وسیله دو سیستم تنظیم کننده به نام سیستم رنین – آنژیوتنسین-آلدوسترون RAAS (renin–angiotensin–aldosterone system) و سیستم کینین-کالیکرئین (kinin–kallikrein system) کنترل می‌کند. در این دوسیستم، رنین، با اثر بر پروتئین آنژیوتنسینوژن (پروتئین تولید شده توسط کبد)، موجب رهاسازی یک دکاپپتید به نام آنژیوتنسین۱ (پیش‌ساز آنژیوتنسین ۲) می‌گردد. آنزیم مبدل آنژیوتنسین با تأثیر بر روی آنژیونسین۱ و جداسازی دی پپتید His-Leu از انتهای C آن باعث تبدیل آن به آنژیونسین ۲ می‌شود. آنژیوتنسین ۲ با اتصال به گیرنده خود (AT1) باعث ترشح اینوزیتول ۱، ۴، ۵-تری فسفات (IP3) و آلدوسترون می‌گردد که این دو ترکیب به ترتیب با انقباض عروق و افزایش حجم مایعات در عروق منجر به افزایش فشار خون می‌گردند. علاوه بر این، آنژیوتنسین ۲ دارای نقش انقباض عروقی بوده به‌طوری که با اتصال به یکسری گیرنده‌های اختصاصی موجود در سطح سلول موجب تحریک تولید پروتئین‌های انقباضی و تسریع درحفظ سدیم و مایعات می‌گردد که این امر موجب افزایش فشارخون می‌شود. فعالیت آنزیم مبدل آنژیوتنسین (ACE) منجر به تولید آنژیوتنسین ۲ و تجزیه برادی کینین (عامل گشادی عروق) می‌شود که این عمل موجب افزایش فشار خون می‌گردد (۱۲).

در این پژوهش فراکسیون‌هایی با وزن مولکولی ۶/۵ تا ۱۳ کیلودالتون قابلیت مهار آنزیم ACE بیشتری داشتند. ثابت شده است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهار آنزیم ACE پپتیدهای زیست‌فعال به وزن مولکولی آنها ارتباط نزدیکی دارد. پپتیدهای زیست‌فعال با وزن مولکولی پایین پتانسیل بیشتری در عبور از غشای روده‌ای و در نتیجه ایفای نقش بیولوژیکی خود دارند. در حقیقت پپتیدهایی با خواص آنتی‌اکسیدانی و مهار آنزیم مبدل آنزژیوتنسین شناخته می شوند که حاوی ۲۰-۲ آمینوا سید در هر مولکول با شند. در رابطه با تأثیر وزن ملکولی بر روی فعالیت مهار کنندگی ACE عموما اعتقاد بر این است که پپتیدهای با وزن کم (کمتر از ۱۵۰۰ دالتون) فعالیت مهار کنندگی بالاتری دارند (۲۱) اما مشخص شده است که پپتیدهای با وزن مولکولی بالاتر نیز می‌توانند فعالیت مهارکنندگی بالایی از خود نشان دهند (۱۳). بر ا ساس نتایج گزارش شده تو سط Maqsoudlou و همکاران (۲۰۱۹) پپتیدهای حاصل از آبکافت پروتئین گرده گل با دام نه وزن ملکولی حدود ۱۳ کیلودالتون دارای بیشترین قابلیت مهار کنندگی ACE بود ند که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد (۱۰). همچنین Mazloomi و همکاران (۲۰۲۰) نیز بالاترین میزان فعالیت بازدار ندگی ACE در پروتئین آبکافت شده ه سته پرتقال را در فراک سیون‌های با دامنه وزن ملکولی بین ۱۴۲۳ الی ۱۳۰۰۰ دالتون گزارش کردند (۱۴). از ستون های کروماتوگرافی SEC جهت بررسی توزیع وزن مولکولی پپتیدهای تشکیل شده از آبکافت پروتئین‌ها در مطالعات زیادی از جمله Chalamaiah و همکاران (۲۰۱۳) و Moayedi و همکاران (۲۰۱۶) استفاده شده‌اند. آن‌ها با استفاده از ستون Sephadex G-200 به‌ترتیب نشان دادند که آبکافت ضایعات ماهی با پپسین و تریپسین و ضایعات فرآوری گوجه فرنگی با *Bacillus subtilis* منجر به تشکیل پپتیدهایی با دامنه وزن مولکولی وسیع از ۶۶۰۰۰ دالتون تا کمتر از ۶۵۰۰ دالتون و ۱۴۲۳ تا ۱۸۰ دالتون شد (۲۲، ۱۳).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.17357756.1401.17.3.3.7]

ترکیب اسید آمینه پپتیدها یکی دیگر از فاکتورهای مهم در قابلیت بازدارندگی ACE آن‌ها است. با در نظر گرفتن محتوای اسیدهای آمینه پروتئین آبکافت شده دانه کدو، برقرار کردن یک رابطه میان قدرت بازدارندگی ACE و میزان لوسین، ایزولوسین، آلانین و والین پس از آسپارتیک اسید، گلوتامیک اسید و آرژنین در این ترکیب امکان پذیر است. به علاوه میزان اسیدهای آمینه آبگریز پروتئین آبکافت شده دانه کدو که در ارتباط مستقیم با قدرت بازدارندگی ACE این ترکیب است ۳۳/۴۹٪ از کل اسیدهای آمینه آن را به خود اختصاص داد. مطالعات نشان داده است که وجود اسیدهای آمینه آب گریز (آروماتیک یا شاخه‌دار) در سه موقعیت قبل از انتهای کربوکسیل زنجیره پپتیدی تأثیر زیادی بر اتصال به ACE پپتید دارد (۲۳). قرار گرفتن اسیدهای آمینه آب گریز دارای زنجیره جانبی آلیفاتیک نظیر گلیسین، آلانین، والین، لوسین و ایزولوسین در بخش انتهای کروبوکسیلی موجب افزایش قابل توجه در توانایی بازدارندگی ACE در پپتیدها می‌گردد. همچنین گزارش شده است که وجود اسیدهای آمینه ایزولوسین و والین در زنجیره آلیفاتیک اسید آمینه موجب افزایش اثرات بازدارندگی آن می شود (۲۴). پپتیدهای آزاد شده از پروتئین در طول هیدرولیز مسئول ایجاد خواص ضد فشار خون هستند و هیدرولیز یک مرحله اساسی برای آزاد سازی پپتیدهای ضد فشار خون از پروتئین دست نخورده است (۹). در موارد متعدد تیمارهای پروتئولیز کننده به شکل موفقیت آمیزی در تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با خاصیت ضد فشار خون مورد استفاده قرار گرفته‌اند. به عنوان مثال در تحقیقی که توسط Fritz و همکاران (۲۰۱۱) بر روی خواص ضد فشار خون پروتئین هیدرولیز شده تاج خروس انجام گرفت، نشان داده شد که هیدرولیز شده‌های تولید شده توسط آلکالاز با درجه هیدرولیز ۵۴٪ دارای IC_{50} برابر با ۰/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند. به عقیده این محققین در میان پروتئین‌های هیدرولیز شده با منشأ گیاهی، این هیدرولیز شده‌ها دارای کمترین میزان IC_{50} بودند (۲۵). Karamać و همکاران (۲۰۰۵) با مقایسه فعالیت ضد فشار خون ضایعات صنعتی هیدرولیز شده توسط آلکالاز و اسید گزارش دادند که هیدرولیز شده‌های آنزیمی دارای فعالیت ضد فشار خون قوی‌تر (۷۲/۳٪) در مقایسه با نمونه هیدرولیز شده با اسید (۴۹/۶٪) بودند و این موضوع نشان داد که حتی در غلظت اندک، هیدرولیز شده‌های تولیدی توسط آنزیم دارای فعالیت ضد فشار خون قوی‌تری نسبت به انواع اسیدی بودند (۲۶). پروتئین برنج هیدرولیز شده توسط آلکالاز به مدت ۲ ساعت نیز دارای قدرت ضد فشار خون قوی با IC_{50} برابر با ۰/۱۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، در حالی‌که هیچ قدرت ضد فشار خونی در نمونه هیدرولیز نشده گزارش نشد (۹). محققان معتقدند که وجود پرولین، لایزین یا آرژنین در انتهای c زنجیره پپتیدی فاکتور مؤثری در بروز خواص ضد فشار خون است (۲۷)، هرچند سایرین معتقدند وجود یک رابطه میان ساختار و فعالیت پپتیدهای ضد فشار خون غیرمحتمل است، زیرا محدوده گسترده‌ای از پپتیدها با توالی اسید آمینه متفاوت در انتهای c وجود دارند که ممکن است دارای چنین اثری باشند. به همین دلیل پیشنهاد شده است که پپتیدهای حاوی اسیدهای آمینه آبگریز در انتهای c به علت قابلیت اتصالشان به زیر واحدهای موجود در محل فعال آنزیم ACE به عنوان پپتیدهای ضد فشار خون در نظر گرفته شوند (۲۸).

نیتریک اکسید (NO) و گونه‌های فعال نیتروژن (RNS) رادیکال های آزادی هستند که در اثر واکنش نیتروژن با اکسیژن یا گونه‌های فعال اکسیژن بوجود می‌آیند. نیتریک اکسید به‌واسطه دارا بودن یک جفت الکترون غیر اشتراکی قادر به واکنش با انواع خاصی از پروتئین‌ها و سایر رادیکال‌های آزاد نظیر رادیکال‌های سوپر اکسید می‌باشد. نیتریک اکسید توسط برخی سلول‌های بدن از حمله سلول‌های اندوتلیال، برخی سلول‌های عصبی و فاگوستوزها تولید می‌شود و در غلظت‌های پایین نقش‌های فیزیولوژیکی متعددی در بدن از قبیل انتقال عصبی، ضدمیکروبی و ضد سرطانی دارد، اما تماس مزمن با رادیکال نیتریک اکسید منجر به بروز بیماری‌های مزمن از قبیل سرطان، دیابت، پوکی استخوان و بیماری‌های قلبی و عروقی می‌گردد. نشان داده شده که ترکیبات آنتی اکسیدان از جمله ترکیبات فلاونوئیدی دارای توانایی به دام اندازی رادیکال نیتریک اکسید می‌باشند (۲۹). با توجه به نتایج RP-HPLC، پپتیدهای با زمان بازداری کمتر قابلیت مهار رادیکال نیتریک اکسید بیشتری از خود نشان دادند بنابراین می‌توان گفت پپتیدهای با خاصیت آبدوستی بیشتر توانایی بیشتری در مهار رادیکال نیتریک اکسید دارند. Lee و همکاران (۲۰۱۲) اثر به دام اندازی رادیکال نیتریک اکسید در پپتیدهای حاصل از آبکافت آنزیمی *Ruditapes philippinarum* توسط هشت نوع آنزیم پروتئاز را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که آبکافت شده حاصل ازآنزیم آلکالاز، خاصیت به دام اندازی رادیکال نیتریک اکسید مناسبی از خود نشان می دهد (۲). این موضوع تأیید شده است که آسپارتیک و گلوتامیک اسید (۳۰)، به علاوه پرولین، آرژنین، متیونین، هیستیدین، لوسین، ایزولوسین، آلانین،

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-12-16]
[DOR: 20.1001.1.17357756.1401.17.3.3.7]

تیروزین و والین (۳۱) واجد خواص ضداکسایش قوی هستند و قادر به مهار رادیکال‌های آزاد می‌باشند.

قابلیت مهار رادیکال کاتیونی ABTS به نوع آنزیم پروتئاز، درجه آبکافت و ترکیب اسیدآمینه‌ای پپتیدها بستگی دارد. مطالعات نشان داده است که پپتیدهایی با وزن ملکولی پایین و دارای اسید های آمینه آرو ماتیک و آبگریز فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری دارند. همچنین نوع اسید آمینه موجود در توالی پپتیدی تأثیر زیادی بر روی ویژگی آن دارد. به عنوان مثال اسیدهای آمینه آبگریز حاوی گروه‌های آلیفاتیک غیر قطبی (نظیر والین، ایزولوسین، پرولین، لوسین، تریپتوفان و تیروزین) به طور موثری توانایی جذب رادیکال های آزاد در مواد غذایی با چربی بالا دارند (۳۲). با توجه به نتایج RP-HPLC، پپتیدهای مورد بررسی در این پژوهش که خاصیت آبگریزی بیشتری داشتند (زمان بازداری بیشتر) قابلیت مهار رادیکال ABTS بیشتری از خود نشان دادند. مشابه با نتایج این پژوهش Phongthai و Rawdkuen (۲۰۱۹) گزارش دادند که پپتیدهای سبوس برنج با خاصیت آبگریزی بیشتر (زمان بازداری بیشتر) قابلیت بیشتری در مهار رادیکال ABTS از خود نشان دادند (۳۳).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده حاصل از کنجاله کدو حاوی پپتیدهایی با خواص آنتی اکسیدانی و کاهندگی فشار خون است که عمده وزن مولکولی آنها در محدوده ۱۳ کیلودالتون بود. خالص سازی فراکسیون‌ها توسط RP-HPC نشان داد که پپتیدهای آبگریزتر قابلیت بیشتری در مهار آنزیم ACE و رادیکال ABTS داشتند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اجزاء پپتیدی پروتئین آبکافت شده دانه کدو با دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی و بازدارندگی ACE قابل توجه، قابلیت کاربرد به‌عنوان نگهدارنده‌ی طبیعی در فرمولاسیون مواد غذایی، تولید محصولات فراسودمند و همچنین داروی کنترل فشار خون را دارند. که این امر گام مهمی در افزایش سطح سلامت جامعه است.

References

1. Kaveh S, Mahoonak AS, Ghorbani M, Jafari SM. Fenugreek seed (Trigonella foenum graecum) protein hydrolysate loaded in nanosized liposomes: Characteristic, storage stability, controlled release and retention of antioxidant activity. Industrial Crops and Products. 2022 Aug 1;182:114908.
2. Lee SJ, Kim EK, Kim YS, Hwang JW, Lee KH, Choi DK, Kang H, Moon SH, Jeon BT, Park PJ. Purification and characterization of a nitric oxide inhibitory peptide from Ruditapes philippinarum. Food and Chemical Toxicology. 2012 May 1;50(5):1660-6.
3. McCann KB, Shiell BJ, Michalski WP, Lee A, Wan J, Roginski H, Coventry MJ. Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine αS1-casein. International Dairy Journal. 2006 Apr 1;16(4):316-23.
4. Jia J, Ma H, Zhao W, Wang Z, Tian W, Luo L, He R. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. Food Chemistry. 2010 Mar 1;119(1):336-42.
5. Meisel H, FitzGerald RJ. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. Current pharmaceutical design. 2003 Jan 1;9(16):1289-96.
6. Gauthier SF, Pouliot Y, Saint-Sauveur D. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. International dairy journal. 2006 Nov 1;16(11):1315-23.
7. Kaveh S, Sadeghi MA, Ghorbani M, Jafari M, Sarabandi K. Optimization of factors affecting the antioxidant activity of fenugreek seed's protein hydrolysate by response surface methodology. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2019;14(1):77-88.
8. Torruco-Uco J, Chel-Guerrero L, Mart nez-Ayala A. D vila-Ort z G. and Betancur-Ancona D. LWT-Food Sci. Technol. 2009;42(10):1597-604.
9. Li GH, Qu MR, Wan JZ, You JM. Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. 2007 Apr 1;16(S1):275-80.
10. Maqsoudlou A, Mahoonak AS, Mora L, Mohebodini H, Toldrá F, Ghorbani M. Peptide identification in alcalase hydrolysated pollen and comparison of its bioactivity with royal jelly. Food Research International. 2019 Feb 1;116:905-15.
11. Honikel KO. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. Meat science. 2008 Jan 1;78(1-2):68-76.
12. Torruco-Uco J, Chel-Guerrero L, Mart nez-Ayala A. D vila-Ort z G. and Betancur-Ancona D. LWT-Food Sci. Technol. 2009;42(10):1597-604.
13. Moayedi A, Mora L, Aristoy MC, Hashemi M, Safari M, Toldrá F. ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fragments obtained from tomato processing by-products fermented using Bacillus subtilis: effect of amino acid composition and peptides molecular mass distribution. Applied biochemistry and biotechnology. 2017 Jan 1;181(1):48-64.
14. Mazloomi SN, Mora L, Aristoy M, Mahoonak AS, Ghorbani M, Houshmand G, Toldrá F. Impact of Simulated Gastrointestinal Digestion on the Biological Activity of an Alcalase Hydrolysate of Orange Seed (Siavaraze, Citrus sinensis) by-Products. Foods. 2020 Sep;9(9):1217.
15. Živanović I, Vaštag Z, Popović S, Popović L, Peričin D. Hydrolysis of hullless pumpkin oil cake protein isolate by pepsin. International Journal of Biological Life. 2011.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.17357756.1401.17.3.3.7]

16. Noor Mohammadi, A., Sadeghi Mahonak, A.R., Alami, M., Ghorbani, M., Sadeghi, M. Optimization of hydrolysis of pumpkin seed meal protein using alcalase enzyme to achieve maximum antioxidant properties. Journal of Food Processing and Preservation. 2017. 1 (9), 1-12. [in Persian]

17. Escudero E, Aristoy MC, Nishimura H, Arihara K, Toldrá F. Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham. Meat Science. 2012 Jul 1;91(3):306-11.

18. Sentandreu MÁ, Toldrá F. A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. Food chemistry. 2006 Aug 1;97(3):546-54.

19. Tsai PJ, Tsai TH, Yu CH, Ho SC. Comparison of NO-scavenging and NO-suppressing activities of different herbal teas with those of green tea. Food chemistry. 2007 Jan 1;103(1):181-7.

20. You L, Zhao M, Regenstein JM, Ren J. Changes in the antioxidant activity of loach (Misgurnus anguillicaudatus) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. Food Chemistry. 2010 Jun 1;120(3):810-6.

21. Lassoued I, Mora L, Nasri R, Jridi M, Toldrá F, Aristoy MC, Barkia A, Nasri M. Characterization and comparative assessment of antioxidant and ACE inhibitory activities of thornback ray gelatin hydrolysates. Journal of Functional Foods. 2015 Mar 1;13:225-38.

22. Chalamaiah M, Jyothirmayi T, Bhaskarachary K, Vajreswari A, Hemalatha R, Kumar BD. Chemical composition, molecular mass distribution and antioxidant capacity of rohu (Labeo rohita) roe (egg) protein hydrolysates prepared by gastrointestinal proteases. Food research international. 2013 Jun 1;52(1):221-9.

23. Salampessy J, Reddy N, Phillips M, Kailasapathy K. Isolation and characterization of nutraceutically potential ACE-Inhibitory peptides from leatherjacket (Meuchenia sp.) protein hydrolysates. LWT. 2017 Jul 1;80:430-6.

24. Toopcham T, Mes JJ, Wichers HJ, Roytrakul S, Yongsawatdigul J. Bioavailability of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from Virgibacillus halodenitrificans SK1-3-7 proteinases hydrolyzed tilapia muscle proteins. Food chemistry. 2017 Apr 1;220:190-7.

25. Fritz M, Vecchi B, Rinaldi G, Añón MC. Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. Food Chemistry. 2011 Jun 1;126(3):878-84.

26. Karamać M, Flaczyk E, Janitha PK, Wanasundara PD, Amarowicz R. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of hydrolysates obtained from muscle food industry by-products–a short report. Pol J Food Nutr Sci. 2005;14:133-7.

27. Erdmann K, Cheung BW, Schröder H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. The Journal of nutritional biochemistry. 2008 Oct 1;19(10):643-54.

28. Shrikant S, Raghvendar S, Shashank R. Bioactive peptides: a review. Int J Bio Aut. 2011;15(4):223-50.

29. Ahn CB, Je JY, Cho YS. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. Food Research International. 2012 Nov 1;49(1):92-8.

30. Saiga AI, Tanabe S, Nishimura T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. Journal of agricultural and food chemistry. 2003 Jun 4;51(12):3661-7.

31. Zhu L, Chen J, Tang X, Xiong YL. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2008 Apr 23;56(8):2714-21.

32. Liang LL, Cai SY, Gao M, Chu XM, Pan XY, Gong KK, Xiao CW, Chen Y, Zhao YQ, Wang B, Sun KL. Purification of antioxidant peptides of Moringa oleifera seeds and their protective effects on H2O2 oxidative damaged Chang liver cells. Journal of Functional Foods. 2020 Jan 1;64:103698.

33. Phongthai S, Rawdkuen S. Fractionation and characterization of antioxidant peptides from rice bran protein hydrolysates stimulated by in vitro gastrointestinal digestion. Cereal Chemistry. 2020 Mar;97(2):316-25.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.17357756.1401.17.3.3.7]

Assessment of ACE-inhibitory and Antioxidant Activities of the Peptide Fragments from Pumpkin Seeds

Sadeghi Mahoonak AR[1], Kaveh Sh[2]*

*1- *Corresponding author: professor, Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: sadeghiaz@yahoo.com*

2- Ph.D candidate of Food Chemistry, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Received 7 Oct, 2021 **Accepted 9 Jan, 2022**

Background and Objectives: Bioactive peptides include several biological (anti-hypertensive, antioxidant and anti-cancer) characteristics affected by their amino acid composition and molecular weight. The aim of this study was to assess amino acid profile of the pumpkin seed protein hydrolysate and investigation of the effects of molecular weight on radical scavenging of ABTS, nitric oxide and ACE enzyme inhibition of the hydrolysate fragments.

Materials & Methods: Pumpkin seed protein hydrolysate was prepared under optimal conditions based on previous studies. Then, the hydrolysate amino acid profile was assessed and effects of the peptide molecular weight distribution on bioactive characteristics of the fractions were studied after separation and purification steps using size exclusion chromatography (SEC) and high-pressure reverse-phase liquid chromatography (RP-HPLC).

Results: Size exclusion chromatography results showed that the major molecular weight of peptides was in the range of 6.5–13 kDa. The fraction numbers of 47–63, 46–52 and 47–59 showed the highest inhibitory capacity of ACE enzyme, radical scavenging of nitric oxide and ABTS, respectively. Further purification of the fractions using RP-HPC demonstrated that further hydrophobic peptides were further capable of inhibiting ACE and ABTS radicals.

Conclusion: Peptide components of the pumpkin seed protein hydrolysate with antioxidant and ACE inhibitory characteristics can be used as a natural preservative in food formulations, functional products and blood pressure control drugs.

Keywords: Bioactive peptides, Chromatography, Blood pressure, Antioxidant, Pumpkin seeds

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.17357756.1401.17.3.3.7]