

Extraction of tripeptide-inhibitor angiotensin converting enzyme (Ile- Gln-Pro) from spirulina and investigate the relationship between the structure and activity of ACE inhibitor tripeptides use of BIOPEP database

Gholamreza Mahdihyeh Najafabadi^{1*}, Mohammad
Fazilati², Aliasghar Pilehvarian³, Habib-olah Nazem²

1. Ph. D. Candidate of Biochemistry, Isfahan Payam-e Noor
University, Isfahan, Iran
2. Professor, Isfahan Payam-e Noor University, Isfahan, Iran
3. Associate Professor, Isfahan Payam-e Noor University,
Isfahan, Iran

(Received: Jun. 18, 2018 - Accepted: Jul. 02, 2019)

Abstract

High blood pressure doubles the risk of cardiovascular disease. In addition to chemical drugs, biodegradable peptides have antihypertensive properties and the Ile-Gln-Pro peptide is one of these peptides. Spirulina is a green-blue algae of the cyanobacteria branch, which is now used as a supplement to the pharmaceutical industry. The Ile-Gln-Pro peptide was extracted from Spirulina platensis algae using an alkalase enzyme and was analyzed by filtration gel chromatography and RP-HPLC and its inhibitory effect on the ACE enzyme was investigated. ACE enzyme was inhibited by Ile-Gln-Pro peptide by non-competitive inhibition method with $K_i = 5.8 \mu M$ and $IC_{50} = 0.65 \mu M$. According to the available information from the ACE inhibitor peptide in the BIOPEP database, a comparative study was performed on the location of amino acids in the ACE inhibitor peptide and its effect on the potency of tri-peptide inhibition. Based on SPSS software, on the 196 ACE inhibitor peptide, the presence of Lys, Gly, Thr and Pro amino acids at the end of C and His, Ala, and Met amino acids at the end of N, as well as Phe, Ala, His And His in the middle of peptide have relationship with EC_{50} and peptide-inhibiting potency.

Keywords: Angiotensin converting enzyme (ACE), hypertension, Ile-Gln-Pro, Spirulina.

استخراج تری پپتید مهار کننده آنزیم مبدل آنژیوتانسین (Ile-Gln-Pro) از اسپیرولینا و بررسی ارتباط ساختار - فعالیت تری پپتیدهای مهار کننده ACE با استفاده از داده‌های BIOPEP database

غلامرضا مهدیه نجف‌آبادی^{۱*}، محمد فضیلتی^۲،
علی اصغر پیله وریان^۳، حبیب‌اله ناظم^۲

۱. دانشجوی دکتری بیوشیمی، مرکز تحصیلات تکمیلی دانشگاه پیام نور
اصفهان، اصفهان، ایران
 ۲. استاد، گروه بیوشیمی، مرکز تحصیلات تکمیلی دانشگاه پیام نور اصفهان،
اصفهان، ایران
 ۳. دانشیار، گروه زیست‌شناسی، مرکز تحصیلات تکمیلی دانشگاه پیام نور
اصفهان، اصفهان، ایران
- (تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۱۱)

چکیده

فشار خون بالا (Hypertension) خطر بیماری‌های قلبی عروقی را دو برابر می‌کند. علاوه بر داروهای شیمیایی، پپتیدهایی با منشأ بیولوژیک به دست آمده‌اند که خاصیت ضد فشار خون بالا دارند و پپتید Ile-Gln-Pro از جمله این پپتیدها است. اسپیرولینا (Spirulina) نوعی جلبک سبز-آبی از شاخه سیانوباکترها است که امروزه بیش‌تر به عنوان مکمل غذایی در صنعت داروسازی استفاده می‌شود. پپتید Ile-Gln-Pro از جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس با استفاده از آنزیم آکالاز و طی مراحل کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و RP-HPLC استخراج شده و تأثیر مهار کنندگی آن روی آنزیم ACE بررسی شد. آنزیم ACE توسط پپتید Ile-Gln-Pro به روش مهار غیر رقابتی با $K_i = 5.8 \mu M$ و $IC_{50} = 0.65 \mu M$ مهار شد. با توجه به اطلاعات موجود از تری پپتیدهای مهارکننده ACE در BIOPEP database بررسی مقایسه‌ای در مورد محل قرار گیری اسیدهای آمینه در تری پپتیدهای مهارکننده ACE و تأثیر آن در قدرت مهار کنندگی تری پپتید انجام شد. بر اساس بررسی‌های آماری با نرم‌افزار SPSS بر روی ۱۹۶ تری پپتید مهارکننده ACE، قرار گرفتن اسیدهای آمینه Lys، Gly، Thr و Pro در انتهای C و اسیدهای آمینه His، Ala و Met در انتهای N و همچنین اسیدهای آمینه Phe، Ala و His در وسط پپتید با مقدار EC_{50} و قدرت مهار کنندگی تری پپتید ارتباط دارند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم مبدل آنژیوتانسین، اسپیرولینا، تری پپتید Ile-Gln-Pro، فشار خون بالا.

مقدمه

اسپیرولینا یک جلبک تک‌سلولی سرشار از فیتوکمیکال و دارای غلظت قابل توجهی از مواد مغذی عملکردی (functional nutrients) می‌باشد. مقدار پروتئین اسپیرولینا از هر غذای طبیعی دیگری بیش‌تر است «۶۵٪». اسپیرولینا با ۴۰٪ پروتئین قابل استفاده (usable protein) پس از تخم مرغ خشک شده «۴۴٪» بالاترین درصد پروتئین قابل استفاده را دارد (Robert Henrikson, 2009).

فشار خون بالا یکی از دلایل مهم بیماری‌های قلبی عروقی است. آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE) در سیستم رنین- آنژیوتانسین فشار خون را تنظیم می‌کند. در برخی مطالعات پپتیدهایی با فعالیت مهارکنندگی آنزیم مبدل آنژیوتانسین به‌وسیله هیدرولیز آنزیمی از عصاره اسپیرولینا پلاتنسیس به‌دست آمده است. در مطالعه‌ای که توسط Suetsuna & Chen (2001) انجام شد پپتیدهای مشتق شده از اسپیرولینا پلاتنسیس در موش‌های دارای فشار خون بالای خودبه‌خودی (spontaneously hypertensive rats) به‌صورت خوراکی مصرف شد و فعالیت ضد فشار خون نشان دادند (Aysun Yüce et al., 2016). هرچند درمان ضد پر فشاری خون به‌وضوح، خطر بیماری‌های قلبی عروقی و کلیوی را کاهش می‌دهد، ولی درصد قابل‌ملاحظه‌ای از جمعیت مبتلا به هیپرتانسیون درمان نمی‌شوند یا درمان آن‌ها ناکافی است (Dan et al., 2010). مهارکننده‌های ACE سنتتیک مانند کاپتوپریل و انالاپریل اغلب برای درمان فشار خون بالا استفاده می‌شوند ولی می‌توانند دارای اثرات جانبی منفی باشند. از آنجایی‌که عوامل تغذیه‌ای شناخته شده نقش قابل توجهی در پیشگیری و درمان فشار خون بالا دارند تلاش می‌شود تا غذاهایی با فعالیت ضد فشار خون بالا تولید شود. اخیراً پپتیدهای مهارکننده ACE از منابع غذایی متنوعی شامل پروتئین‌های حیوانی و پروتئین‌های گیاهی مانند سویا، گندم و ذرت

به‌دست آمده‌اند (Yajun Zheng et al., 2017). پپتیدهای بیواکتیو غذایی، درون توالی پروتئین‌های غذایی نهفته هستند اما می‌توانند در طی هضم غذا در دستگاه گوارش آزاد شوند. در بین پپتیدهای بیواکتیو غذایی، آن‌هایی که فعالیت ضد فشار خون بالا دارند توجه خاصی را به خودشان جلب کرده‌اند (BlancaHernández et al., 2011). ACE یک گلیکوپروتئین مسوول فشار خون بالا می‌باشد. این آنزیم متالوپروتئازی وابسته به روی (zinc) است. آنزیم مبدل آنژیوتانسین I (ACE) بدلیل کاتالیز تبدیل آنژیوتانسین I غیرفعال به آنژیوتانسین II که یک منقبض‌کننده بالقوه عروقی است و همچنین غیر فعال کردن برادی کینین که یک گشادکننده بالقوه عروقی می‌باشد نقش مهمی را در تنظیم فشار خون بازی می‌کند. بنابراین بهترین مکانیسم برای کاهش فشار خون تأثیر داروهای مهارکننده ACE می‌باشد (Anna et al., 2014). پپتیدهای مهار کننده ACE، پپتیدهای غذایی هستند که بیش‌ترین مطالعه روی آن‌ها انجام شده و عملکردهای بیولوژیکی متفاوتی را نشان می‌دهند. طبق سایت BIOPEP تاکنون ۹۰۳ پپتید با فعالیت مهارکنندگی ACE شناخته شده است (۱۳۹۶/۸/۲۵، ۲۰۱۶/۱۱/۱۶). با توجه به نتایج آزمایشات تحلیلی و شیمیایی، برخی از ویژگی‌های ساختاری مهارکننده‌های ACE معلوم شده است. نوع اسیدهای آمینه در انتهای C و N در مهارکنندگی ACE تأثیر بسیار دارد. اسیدهای آمینه هیدروفوبیک به‌ویژه آن‌هایی که زنجیره جانبی آلفاتیک دارند از قبیل *Gly, Ile, Leu* و *Val* مشخصه انتهای N پپتید بوده و اسیدهای آمینه حلقوی یا آروماتیک مانند *Tyr, Pro* و *Trp* در انتهای C مهارکننده‌های ACE یافت می‌شوند. تعداد زیادی از پپتیدهای مشتق از پروتئین‌های غذایی در انتهای C خود دارای *Pro* هستند. این قانون عمده‌تاً مربوط به پپتیدهای با طول کوتاه است. وقوع پرولین در انتهای C پپتید، همراه با وقوع اسیدهای آمینه آلفاتیک با زنجیره جانبی

آب حل کرده و سپس ۵ چرخه به‌طور مکرر منجمد و ذوب کردیم. در مرحله بعد برای ۵ دقیقه سونیکاسیون انجام شده و سپس سوسپانسیون سلولی به‌مدت ۱۲ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و برای به‌دست آوردن عصاره آبی اسپیرولینا پلاتنسیس، ۳۰ دقیقه در ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کردیم. سپس سوپرناتانت را با غشای سلولزی با منافذ $0.45 \mu\text{m}$ و با استفاده از پمپ خلا یک بار فیلتر کردیم. برای تهیه هیدرولیزات آنزیمی اسپیرولینا پلاتنسیس نیز همانگونه که در بالا برای تهیه سوسپانسیون شرح داده شد (فریز- ذوب کردن و سونیکاسیون) عمل شد.

بعد از سونیکاسیون، سوسپانسیون سلولی سانتریفیوژ شده و محتوای پروتئینی با استفاده از روش بیوره و با استفاده از سرم آلبومین گاوی به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد.

محلول با غلظت پروتئین ۲٪ (w/w) به $\text{pH}=8.5$ رسانده و به‌وسیله stiree و مگنت همزده شد. سپس به‌وسیله آلکالاز $2/4 \text{ unit/ml}$ با نسبت آنزیم به سوبسترای پروتئین ۰.۴٪ (v/v) در ۵۰ درجه سانتی‌گراد تا هضم کامل به‌مدت ۱۰ ساعت هضم کردیم.

سپس مخلوط را روی یخ گذاشته و همزمان با اسیدکلریدریک، pH را جهت توقف واکنش به ۴ رسانده و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کردیم.

سنجش پروتئین

محتوای پروتئینی هیدرولیزات به‌دست‌آمده با استفاده از روش بیوره و با استفاده از سرم آلبومین گاوی به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. میزان پروتئین هیدرولیزات $15/6 \text{ mg/dl}$ به‌دست آمد.

خالص سازی پپتید

نمونه‌های حاصل از فیلتراسیون در یک ستون ژل

شاخه‌دار در انتهای N ، در فعالیت مهارکنندگی ACE تأثیر دارد.

مشاهدات مربوط به تأثیر خصوصیات فیزیکوشیمیایی اسیدهای آمینه انتهای C و N پپتید روی بیواکتیویتی پپتیدها با تحقیقات قبلی Hellberg (1991) و Pripp (2005) سازگار بود. Pripp بر اساس داده‌های مقاله در مورد طراحی QSAR پپتیدهای مهارکننده ACE ، گزارش داد که به‌طور کلی پپتیدهای خیلی فعال باید از یک اسید آمینه آروماتیک هیدروفوب بزرگ با یک گروه فانکشنال قطبی در انتهای C تشکیل شوند. تحقیق Wu et al. (2006) منجر به مشخص شدن برخی ویژگی‌های ساختاری برای دی و تری پپتیدهای مهارکننده ACE شد. در مورد تری پپتیدها، اولین باقیمانده معمولاً آروماتیک، دومین باقیمانده اسید آمینه‌ای با شارژ مثبت و سومین اسید آمینه (انتهای C) یک اسید آمینه هیدروفوبیک است (Anna et al., 2014).

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تری پپتید $Ile-Gln-Pro$ را از جلبک اسپیرولینا استخراج کرده و تأثیر مهارکنندگی آن را روی آنزیم ACE در *invitro* بررسی کردیم.

با توجه به مطالعات قبلی، هیدرولیزات آلکالاز اسپیرولینا بیش‌ترین فعالیت مهارکنندگی ACE را در بین هیدرولیزات‌های آلکالاز، پپسین و تریپسین داشته است. به همین دلیل آلکالاز جهت تهیه هیدرولیزات استفاده شد (Jun Lu et al., 2010).

در این مطالعه از پودر خشک اسپیرولینا پلاتنسیس استفاده شد. آنزیم آلکالاز به‌دست‌آمده از *Bacillus licheniformis* از شرکت (سیگما آلدریج) خریداری شد. پودر آنزیم ACE به‌دست‌آمده از ربه خرگوش و آلبومین سرم گاوی نیز از شرکت سیگما خریداری شد. همه مواد مورد استفاده دیگر از گرید *analytical* بودند.

سوسپانسیون ۲۰ گرم از پودر خشک (*spray-powder*) اسپیرولینا پلاتنسیس را در ۱۶۰ میلی لیتر

۴۰۰-۴۰۰۰ انجام گرفت. طیف IR نشان‌دهنده حضور C=O گروه‌های آمیدکنزوگه و N-H گروه‌های آمین (پروتئین) در پپتید بود. از نمونه استاندارد تری پپتید خریداری شده از شرکت دنا زیست آسیا (DENA ZIST ASIA) با خلوص ۹۵٪ به‌عنوان شاهد استفاده کردیم (شکل‌های ۲، ۳ و ۴).

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا فاز معکوس (RP-HPLC)

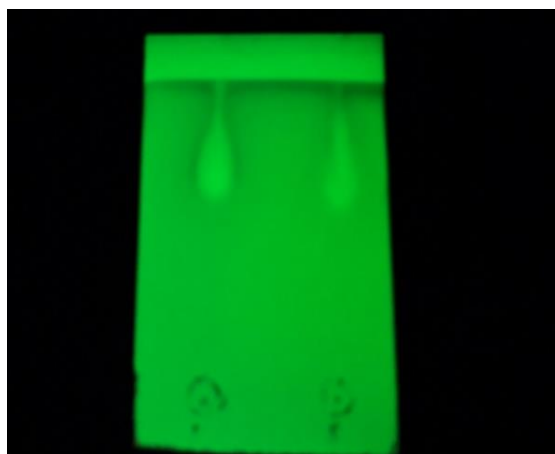
فراکشن‌های فعال به‌دست‌آمده از مرحله قبل به صورت محلول برای انجام کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا فاز معکوس (روی یک ستون C18 Venusil Mp, 4.6mm×250mm) با سرعت جریان ۱ ml/min قرارگرفت. ستون با trifluoroacetic acid ۰/۱٪ در محلول آبی acetonitrile ۹۹٪ (v/v) متعادل شده و شست‌وشو با یک شیب خطی ۱-۴۵٪ انجام شد و سپس با استفاده از دتکتور UV در طول موج ۲۱۴ nm بررسی شد.

از نمونه استاندارد تری پپتید خریداری‌شده از شرکت دنا زیست آسیا (DENA ZIST ASIA) با خلوص ۹۵٪ به‌عنوان شاهد و تعیین زمان خارج‌شدن نمونه استفاده کردیم (شکل‌های ۵، ۶ و ۷).

فیلتراسیون با استفاده از سیلیکاژل مرک و اندازه ستون ۲×۱۰ قرار گرفتند و با استفاده از آب water for chromatography (Lc-Ms Grade) شسته شد. سپس فراکشن‌های حاصل در طول موج ۲۱۴nm بررسی شد و توسط کروماتوگرافی لایه نازک یا TLC مورد بررسی قرار گرفتند و سپس آنهایی که فعالیت مهارکنندگی داشتند مشخص شدند. TLC با استفاده از کاغذ سیلیکاژل (merck) و حلال متانول و هگزان به نسبت ۷ به ۳ انجام شد. همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده شده فاصله حرکت هر دو نمونه استاندارد و استخراج‌شده تری پپتید تقریباً به یک اندازه است.

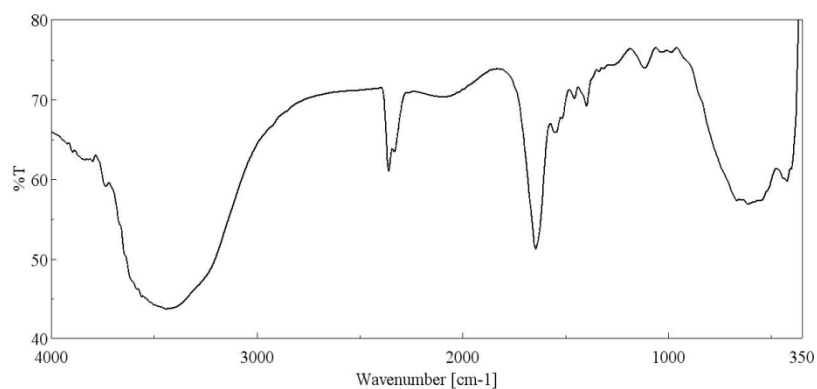
آنالیز نمونه به‌وسیله طیف‌سنجی مادون قرمز یا FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

نمونه به‌دست‌آمده از هر دو روش برای طیف‌سنجی مادون قرمز به‌کار گرفته شد. جهت این سنجش از ماده KBr استفاده کردیم. به این صورت که آن را ساییدیم تا نرم شد، سپس آن را همراه با نمونه پپتید به نسبت ۱ به ۱۲ تحت فشار، به‌صورت قرص درآوردیم. قرص حاصل در دستگاه FTIR جهت مشاهده ساختار مولکولی قرار گرفت. در مطالعه حاضر طیف‌سنجی FTIR در ناحیه مادون قرمز بین ۱-۴۰۰۰ cm⁻¹

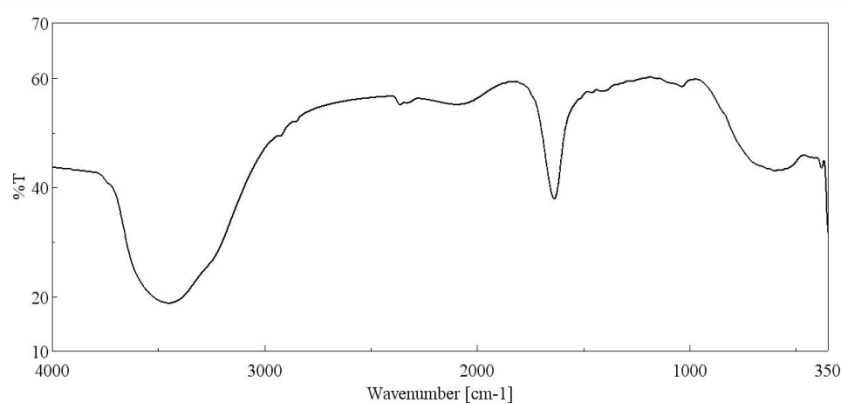


شکل ۱. کروماتوگرافی لایه نازک

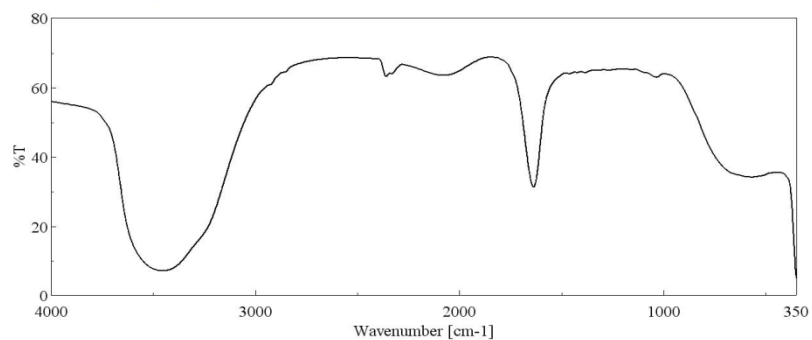
نمونه سمت راست استاندارد تری پپتید، نمونه سمت چپ تری پپتید استخراج شده



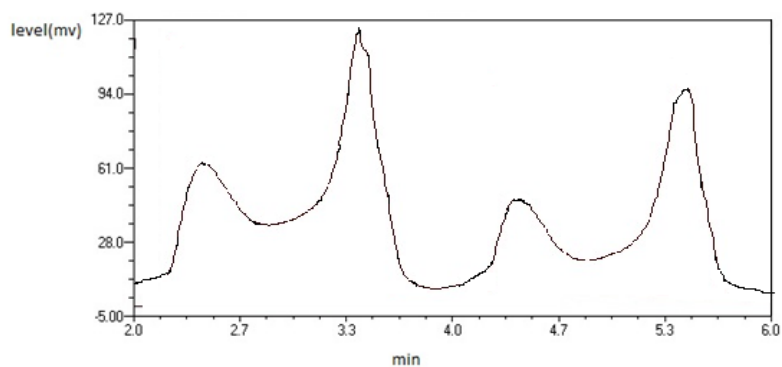
شکل ۲. نمودار *FTIR* حاصل از نمونه تری پپتید حاصل از استخراج از اسپیرولینا (مرحله اول قبل از فیلتراسیون)



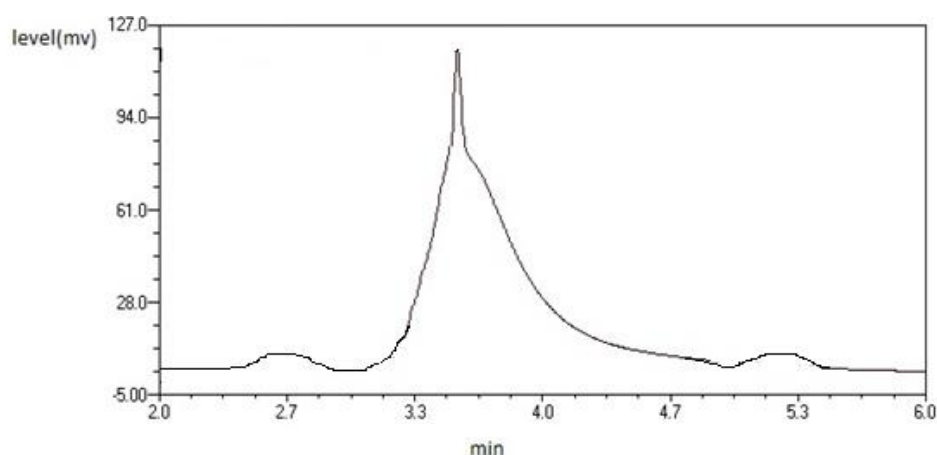
شکل ۳. نمودار *FTIR* حاصل از نمونه تری پپتید حاصل از استخراج از اسپیرولینا (مرحله نهایی)



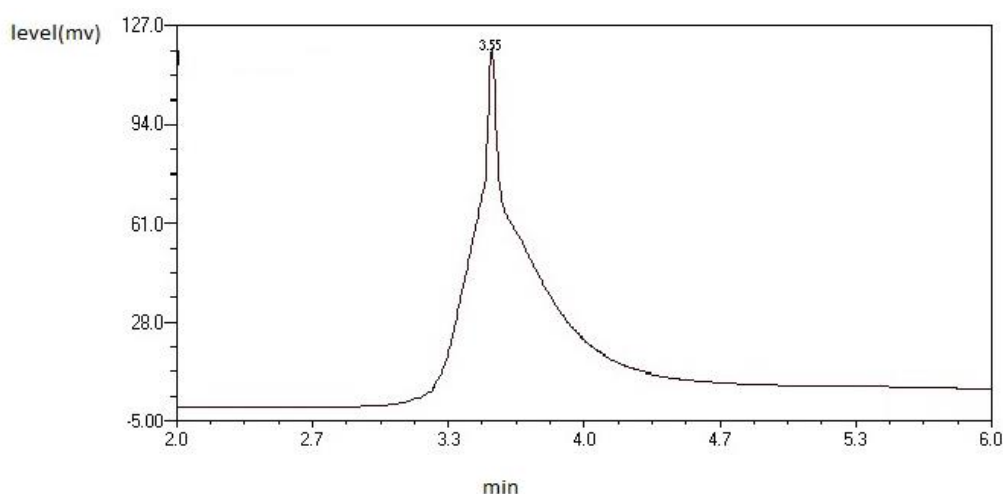
شکل ۴. نمودار *FTIR* حاصل از استاندارد تری پپتید *Ile-Gln-Pro*



شکل ۵. نمودار *HPLC* حاصل از نمونه تری پپتید حاصل از استخراج از اسپیرولینا (مرحله اول قبل از فیلتراسیون)



شکل ۶. نمودار HPLC حاصل از نمونه تری پتید حاصل از استخراج از اسپرولینا (مرحله نهایی)



شکل ۷. نمودار HPLC حاصل از استاندارد تری پتید Ile-Gln-Pro

مقدار $K_i = 5/8 \mu M$ و روش مهار پپتیدهای مهارکننده ACE استخراج شده به وسیله نمودار Dixon و Lineweaver-Burk تعیین شد.

تعیین الگوی مهار پپتید مهارکننده ACE
مکانیسم مهار پپتید مهارکننده ACE، Ile, Gln, Pro با مطالعات کینتیک بررسی شد. همان گونه که در نمودار Lineweaver-Burk نشان داده شده است تقاطع محور $1/[S]$ نشان می‌دهد که مهارکننده غیر رقابتی *noncompetitive* است (شکل ۸).

مقدار K_i پپتید مهارکننده ACE، Ile, Gln, Pro با استفاده از نمودار Dixon برابر $5/8 \mu M$ تعیین شد (شکل ۹).

تعیین درصد مهارکنندگی تری پتید Ile-Gln-Pro

بر روی فعالیت ACE

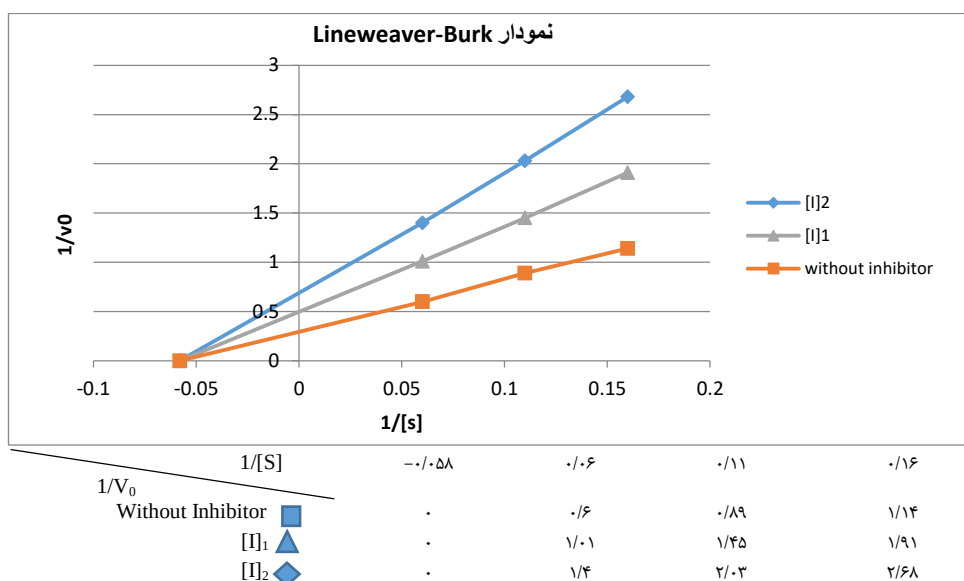
فعالیت مهارکنندگی ACE با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$ACE \text{ inhibition}(\%) = 1 - \Delta ODi / \Delta ODS \times 100$$

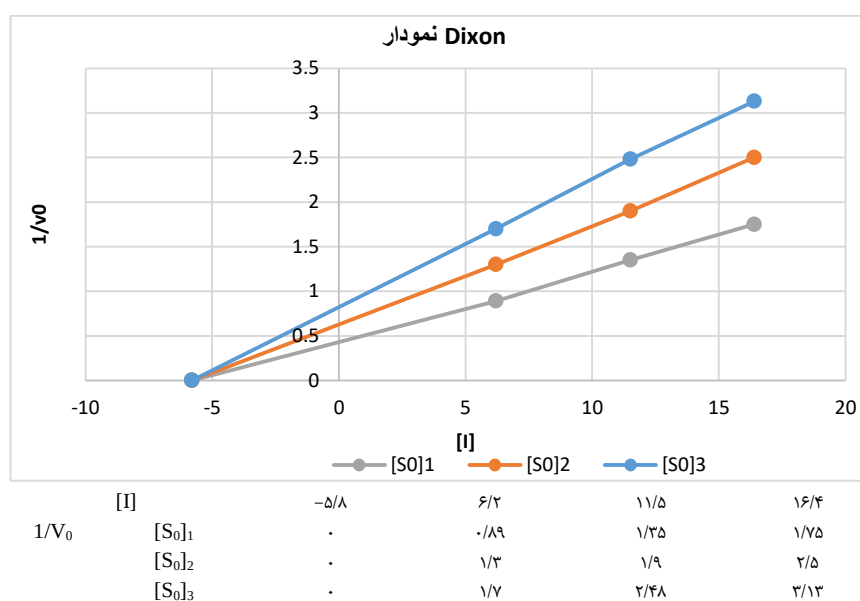
ΔODi = تغییرات جذب مهارکننده

ΔODS = تغییرات جذب شاهد

مقدار IC_{50} به صورت غلظتی از پپتید مهارکننده ACE که برای مهار ۵۰٪ از فعالیت آنزیم ACE لازم است تعریف می‌شود که به وسیله آنالیز رگرسیون مهار ACE (%) در برابر غلظت پپتید تعیین می‌شود. برای تری پتید Ile, Gln, Pro مقدار IC_{50} برابر $5/8 \mu M$ به دست آمد.



شکل ۸. نمودار Lineweaver-Burk نشان‌دهنده مهار غیر رقابتی



شکل ۹. نمودار Dixon برای به‌دست‌آوردن K_i

رقابتی (*noncompetitive*) آنزیم ACE را مهار می‌کند.

با توجه به داده‌های BIOPEP database تعداد ۱۹۶ تری پپتید مهارکننده ACE از نظر آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS بررسی شدند. در این مطالعه نوع اسیدهای آمینه، محل قرارگیری اسید آمینه در موقعیت انتهایی C، وسط و انتهایی N تری پپتید و ارتباط آنها با قدرت مهارکنندگی تری پپتید از طریق بررسی مقدار EC_{50} پپتید انجام شد.

مطالعات آماری و بررسی‌های ساختار- فعالیت تری پپتیدهای موجود در BIOPEP database با استفاده از نرم‌افزار SPSS 20 انجام شد.

اطلاعات و داده‌ها

مقدار IC_{50} تری پپتید با استفاده از نمودار Lineweaver-Burk برابر $0.65 \mu M$ و با استفاده از نمودار Dixon مقدار $K_i = 5.8 \mu M$ به‌دست آمد. تری پپتید *Ile-Gln-Pro* به‌روش مهار غیر

فرض اول

قرار گرفتن نوع اسید آمینه خاص در انتهای C تری پتیدها بر مقدار EC50 تأثیرگذار است.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده وجود نوع خاص اسیدهای آمینه در انتهای C بر مقدار EC50 تأثیر معنی‌دار دارد. زیرا در سطح معنی‌داری، این آزمون کمتر از ۰/۰۵ می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱. تأثیرگذاری نوع اسید آمینه انتهای C بر مقدار

*EC50

میزان تأثیرگذاری نوع اسیدهای آمینه انتهای C بر قدرت EC50	۰/۲۱۵
Sig	۰/۰۰
N	۱۹۶

وجود اسیدهای آمینه *Gly* از گروه R آلفاتیک غیر قطبی، *Lys* از گروه R با بار مثبت و *Thr* از گروه R قطبی بدون بار در انتهای C بر مقدار EC50 تأثیر گذار است (جدول ۲).

جدول ۲. میزان تأثیرگذاری نوع اسید آمینه در انتهای C *

Tyr	Pro	Thr	Gly	Lys
۰/۱۱۸	۰/۱۳۶	۰/۲۶۳	۰/۱۹۵	۰/۲۱
۰/۱۱	۰/۰۵	۰/۰۰	۰/۰۰۶	۰/۰۰۳
۱۹۶	۱۹۶	۱۹۶	۹۶	۱۹۶
میزان تأثیرگذاری				
sig				
N				

همچنین وجود اسید آمینه *Lys* در انتهای C و ترکیب آن با اسیدهای آمینه گروه R الیفاتیک *Ala*، *Pro*، *Val*، *Gly* و *Leu* در انتهای N مقدار EC50 را افزایش می‌دهد و وجود اسید آمینه *Thr* در انتهای C و ترکیب آن با گروه اسیدهای آمینه R با بار مثبت باعث افزایش مقدار EC50 می‌شود.

اما وجود اسید آمینه *Gly* در انتهای C و ترکیب آن با *Pro*، *Leu* و *Met* از گروه R الیفاتیک در انتهای N مقدار EC50 را کاهش می‌دهد، همچنین وجود اسید آمینه *Pro* در انتهای C و ترکیب آن با *Ala* در وسط، در کاهش مقدار EC50 چشم‌گیر است

به‌طوری که می‌توان گفت ترکیب همزمان (AP) در پتید بر مقدار EC50 مؤثر است به‌طوری که این گفته به‌عنوان یک فرضیه مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین ترکیب *Pro* در انتهای C و ترکیب آن با *Leu* در وسط و انتهای N نیز به‌صورت یک فرضیه مورد بررسی قرار گرفته است. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده می‌توان گفت ترکیب L-P مقدار EC50 کاهش و ترکیب LP- مقدار EC50 را افزایش می‌دهد.

وجود اسید آمینه *Tyr* در انتهای C نیز مقدار EC50 را افزایش می‌دهد ولی تأثیر این اسید آمینه در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار نمی‌باشد اما بهتر است گفته شود این اسید آمینه در انتهای C و ترکیب آن با گروه R آلفاتیک در انتهای N باعث کاهش مقدار EC50 شده است. همچنین ترکیب این اسید آمینه با اسید آمینه گروه R قطبی بدون بار (*Thr*، *Ser*) در انتهای N نیز مقدار EC50 را کاهش می‌دهد.

فرض دوم

قرار گرفتن نوع اسید آمینه خاص در انتهای N تری پتیدها بر مقدار EC50 تأثیرگذار است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در سطح آلفا ۰/۱ می‌توان گفت وجود اسیدهای آمینه خاص در انتهای N بر مقدار EC50 تأثیر معنی‌دار دارد. زیرا $\text{Sig} > 0.1$ است (جدول ۳).

جدول ۳. تأثیرگذاری نوع اسید آمینه انتهای N بر مقدار

** EC50

میزان تأثیرگذاری نوع اسیدهای آمینه انتهای N بر مقدار EC50	۰/۱۲۹
Sig	۰/۰۷۲
N	۱۹۶

با در نظر گرفتن سطح معنی‌داری ۰/۱ وجود اسیدهای آمینه را مورد بررسی قرار دادیم.

با توجه به شیوه قرار گرفتن اسیدهای آمینه و مقدار EC50 می‌توان گفت ترکیب *Phe* با گروه R آلیفاتیک غیر قطبی (*Pro*, *Ala*, *Ile*, *Gly* و *Val*) باعث افزایش چشم‌گیر مقدار EC50 می‌شود. اما ترکیب این اسید آمینه با *Leu* باعث کاهش مقدار EC50 می‌شود.

فرض چهارم

هر چه مقدار EC50 کمتر باشد تری پپتید قوی تر است. آیا مقدار EC50 با ترکیب اسیدهای آمینه تری پپتیدها ارتباط دارد؟

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از محل قرار گرفتن اسیدهای آمینه و نوع آنها در آرایش تری پپتیدها می‌توان گفت: اسیدهای آمینه در انتهای N از جنس گروه R آلیفاتیک (*Met*, *Ile*, *Leu*, *Gly*) و اسیدهای آمینه در انتهای C از جنس R آروماتیک (*Tyr*, *Trp*) و R آلیفاتیک (*Pro*) باعث ایجاد تری پپتید قوی‌تر می‌شود. یا به عبارت دیگر مقدار EC50 را کاهش می‌دهد.

اسید آمینه *Pro* نسبت به دیگر اسیدهای آمینه در پپتیدها بیش‌تر حضور دارد (۱۶٪) و در ۳۲/۲٪ از پپتیدها، *Pro* در انتهای C قرار گرفته است. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده حضور *Pro* در این محل و ترکیب آن با *Val*, *Ile*, *Leu* و *Gly* از گروه آلیفاتیک در انتهای N و اسید آمینه *Ala* در وسط بیش‌ترین ارتباط مثبت را دارد که این ترتیب قرار گرفتن بر مقدار EC50 تأثیر معنی‌دار دارد و موجب کاهش مقدار EC50 می‌شود.

اسید آمینه لیزین در انتهای C دارای بیش‌ترین ارتباط منفی مؤثر بر مقدار EC50 است که در ترکیب این اسید آمینه با اسیدهای آمینه *Val*, *Pro* و *Leu* از گروه R آلیفاتیک در انتهای N، افزایش مقدار EC50 چشمگیر است.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از نوع ترکیب اسیدهای آمینه در تری پپتیدها می‌توان گفت از بین

جدول ۴. میزان تأثیرگذاری نوع اسید آمینه در انتهای N,*,**

	Met	Ala	His
میزان تأثیرگذاری	-۰/۱۲	۰/۱۳۸	۰/۲۵۹
sig	۰/۰۹	۰/۰۵۴	۰/۰۰
N	۱۹۶	۱۹۶	۱۹۶

وجود اسید آمینه *His* با گروه R با بار مثبت در انتهای N پپتیدها و ترکیب آن با *Leu* از گروه R آلیفاتیک در انتهای C مقدار EC50 را کاهش می‌دهد و این تأثیرگذاری معنی‌دار است زیرا $\text{Sig} < 0.05$ می‌باشد. میزان تأثیر آن $R = 0.259$ است.

وجود اسید آمینه *Met* در انتهای N مقدار EC50 پپتیدها را کاهش می‌دهد که این نتیجه در سطح ۰/۱ معنی‌دار است، زیرا $\text{Sig} < 0.1$ است. میزان تأثیر این اسید آمینه بر EC50 برابر $R = -0.12$ می‌باشد.

همچنین می‌توان گفت در سطح ۰/۱ نیز قرار گرفتن *Ala* در انتهای N مقدار EC50 را کاهش می‌دهد، زیرا $\text{Sig} < 0.1$ است. میزان تأثیر آن $R = 0.138$ است (جدول ۴).

فرض سوم

قرار گرفتن نوع اسید آمینه خاص در وسط تری پپتیدها بر مقدار EC50 تأثیرگذار است.

قرار گرفتن اسید آمینه *Ala* در وسط و ترکیب آن با *Pro* در انتهای C بر کاهش مقدار EC ۵۰ اثرگذار است.

همچنین می‌توان گفت قرار گرفتن اسید آمینه *Phe* از گروه R آروماتیک و *His* از گروه R با بار مثبت در وسط، تأثیر معنی‌داری بر افزایش مقدار EC50 دارد، زیرا $\text{Sig} < 0.05$ است (جدول ۵).

جدول ۵. تأثیرگذاری نوع اسید آمینه در وسط تری پپتید بر مقدار EC50 *

	His	Ala	Phe
میزان تأثیرگذاری	۰/۱۶۶	-۰/۱۷۲	۰/۱۷۸
sig	۰/۰۲	۰/۰۱۶	۰/۰۱۳
N	۱۹۶	۱۹۶	۱۹۶

Gly, Thr و *Pro* در انتهای C و اسیدهای آمینه *Ala, His* و *Met* در انتهای N و همچنین اسیدهای آمینه *Phe, Ala* و *His* در وسط تری پتید با مقدار EC50 و قدرت مهارکنندگی تری پتید ارتباط دارند.

بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر اطلاعات زیادی به‌دست آمده است که ترکیبات طبیعی معینی که در گیاهان و دیگر منابع بیولوژیکی وجود دارد بدون این‌که عوارض جانبی داروهای شیمیایی را داشته باشند از انسان در برابر بیماری‌ها محافظت می‌کنند (Hayashi et al., 1994; Premkumar et al., 2004). در مطالعه حاضر برای به‌دست‌آوردن پتید مهارکننده ACE با فعالیت ضد فشار خون از اسپیرولینا، عصاره‌های آبی و هیدرولیزات آنزیمی را که به‌وسیله آلکالاز از اسپیرولینا پلاتنسیس به‌دست آمد غربال کرده و دریافتیم که هضم آنزیمی به‌دست‌آمده از آلکالاز به‌طور بالقوه فعالیت مهارکنندگی ACE را دارد.

از آنجایی‌که ACE یک دی پتید را از انتهای C-terminal آنژیوتانسین I جدا کرده و آن را به آنژیوتانسین II که یک القاکننده اصلی فشار خون است تبدیل می‌کند (Timmermans et al., 2011)، C-terminal پپتیدهای مهارکننده برای اتصال به ACE و فعالیت مهارکنندگی‌شان مهم است (Suetsuna, 1998; Otte et al., 2007). وجود تریپتوفان، تیروزین، فنیل آلانین و پرولین در انتهای C-terminal بیش‌ترین فعالیت مهارکنندگی را نشان می‌دهند. Cheung et al. (1980)، همچنین گزارش دادند که پپتیدهای دارای اسیدهای آمینه آلیفاتیک شاخه‌دار در N-terminal خود فعالیت مهارکنندگی ACE دارند. *Ile, Gln, Pro* اولین تری پتید مهارکننده ACE است که از اسپیرولینا پلاتنسیس به‌دست آمده است که IC_{50} آن $5.77 \pm 0.09 \mu M$ می‌باشد که در مقایسه با دیگر مهارکننده‌های ACE به‌دست آمده پایین است (Maeno, 1996; Yu et al., 2006).

قرار گرفتن اسیدهای آمینه مختلف، قرار گرفتن ترکیب اسید آمینه پرولین و لوسین (L, P) باعث کاهش مقدار EC50 می‌شود. به عبارت دیگر ترکیب این دو اسید آمینه در سطح معنی‌داری ۰/۱، تأثیر معنی‌داری در افزایش قدرت مهارکنندگی پتید دارد زیرا $Sig < 0.1$ است. میزان تأثیرگذاری همزمان این دو اسید آمینه بر EC50 $R = 0.14$ می‌باشد (جدول ۶).

جدول ۶. میزان تأثیرگذاری ترکیب اسید آمینه ای LP بر مقدار EC50

۰/۱۴ -	میزان تأثیرگذاری ترکیب اسیدهای آمینه LP بر مقدار EC50
۰/۰۹	Sig
۱۹۶	N

قابل ذکر است ترکیب این دو اسید آمینه با *Ala, Pro, Val, Ile* از گروه R آلیفاتیک غیر قطبی باعث افزایش مقدار EC50 می‌شود. گلیسین از گروه R آلیفاتیک غیر قطبی و *Gln, Ser* مقدار EC50 را به صورت چشمگیر افزایش می‌دهد.

اما ترکیب این دو اسید آمینه با اسیدهای آمینه دیگر باعث کاهش معنی‌دار در مقدار EC50 خواهد شد.

همچنین ترکیب اسیدهای آمینه (A-P) در تری پپتیدها مقدار EC50 را افزایش می‌دهد و ترکیب این دو اسید آمینه در تری پتید تأثیر معنی‌دار بر قدرت مهارکنندگی پتید دارد. میزان تأثیر این ترکیب بر EC50 برابر $R = 0.131$ است که در سطح ۰/۱ معنی‌دار است (جدول ۷).

جدول ۷. میزان تأثیرگذاری ترکیب اسید آمینه ای A-P بر مقدار EC50

۰/۱۳۱	میزان تأثیرگذاری ترکیب اسیدهای آمینه (A-P) بر مقدار EC50
۰/۰۹۷	Sig
۱۹۶	N

نتیجه این‌که، قرار گرفتن اسیدهای آمینه *Lys*

جزئیات مکانیسم مهارکننده‌های غیررقابتی هنوز شناخته نشده است (Jun Lu *et al.*, 2010). در مطالعه حاضر پپتید *Ile, Gln, Pro* به‌دست‌آمده از اسپیرولینا پلاتنسیس فعالیت مهارکنندگی *ACE* را از خود نشان داده و دارای IC_{50} معادل $0.65 \mu M$ می‌باشد. این مقدار IC_{50} بسیار پایین بوده و نشان‌دهنده قدرت بالای مهارکنندگی این پپتید در مقایسه با دیگر تری پپتیدهای مهارکننده آنزیم مبدل آنژیوتانسین می‌باشد. با توجه به تأثیر این پپتید در مهار آنزیم *ACE* و درصد بالای پروتئین در جلبک اسپیرولینا می‌توان از این جلبک در تهیه *Functional Food* برای کنترل فشار خون بالا در افراد در معرض خطر افزایش فشار خون و همچنین در بیماران دارای فشار خون بالا جهت اصلاح سبک زندگی استفاده نمود.

این می‌تواند به‌دلیل اسیدهای آمینه واقع در انتهای N و C پپتید باشد که یک ساختمان ایده‌آل را برای مهار *ACE* به‌وجود می‌آورد. تری پپتید مهارکننده خالص شده از اسپیرولینا پلاتنسیس دارای وزن مولکولی خیلی کم می‌باشد که این امر موجب تسهیل جذب آن در روده می‌گردد (Hyoung Lee *et al.*, 1996; Chun *et al.*, 2004). به‌علاوه پپتید مهارکننده *ACE, Ile, Gln, Pro* فعالیت مهارکنندگی خود را بعد از انکوباسیون با پروتئازهای مختلف دستگاه گوارش حفظ کرد و می‌توان نتیجه گرفت که این پپتید به راحتی در دستگاه گوارش تخریب نخواهد شد (Wu & Ding, 2002). اگرچه بیش‌تر مهارکننده‌های *ACE* گزارش شده، مهار رقابتی را نشان می‌دهند ولی برخی مهارکننده‌های *ACE* مانند *Ile, Gln, Pro* مهار غیر رقابتی را نشان می‌دهند اما

REFERENCES

- Anna, I.; Pieter, M.; Malgorzata, D.; (2014). Food-Originating ACE Inhibitors, Including Antihypertensive Peptides as Preventive Food Components in Blood Pressure Reduction. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety; 13: 114-134
- Aysun, Y.; Beraat, Ö.; (2016) . Bioactive Peptides Isolated from Microalgae *Spirulina platensis* and their Biofunctional Activities. Akademik Gıda ; 14(4) 412-417.
- Blanca, H.; Ledesma, M.; Mar ContrerasIsidra, R.; (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. Advances in Colloid and Interface Science; 165: 23-35
- Cheung, H. S.; Wang, F. L.; Ondetti, M. A.; Sabo, E. F.; Cushman, D. W.; (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin converting enzyme. J. Biol. Chem; 255: 401-407.
- Chun, H.; Sasaki, M.; Fujiyama, Y.; Bamba, T.; (1996) Effect of peptide chain length on absorption and intact transport of hydrolyzed soybean peptide in rat intestinal everted sac. J. Clin. Biochem. Nutr; 21: 131-140.
- Dan, L.; Longo, Anthony S.; Fauci, Dennis L.; Kasper, Stephen L. Hauser.; (2010). Harrison's Principles of Internal Medicine, 18e, McGraw Hill Professional, 2800.
- Hayashi, O.; Katoh, T.; Okuwaki, Y.; (1994). Enhancement of antibody production in mice by dietary *Spirulina platensis*. J. Nutr. Sci. Vitaminol; 40: 431-441.
- Hyoung Lee, D.; Ho Kim, J.; Sik Park, J.; Jun Choi, Y.; Soo Lee, J. (2004) Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. Peptides; 25: 621-627.
- Jun, Lu.; Di-Feng, Ren.; You-Lin, Xue.; Yoriko, Sawano.; Takuya, Miyakawa.; Masaru, Tanokura.; (2010). Isolation of an Antihypertensive Peptide from Alcalase Digest of *Spirulina platensis*. J.

- Agric. Food Chem; 58(12): 7166-7171
- Maeno, M.; Yamamoto, N.; Takano, T.; (1996). Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.*; 79: 1316-1321.
- Otte, J.; Shalaby, M.A.S.; Zakora, M.; Nielsen, M.S.; (2007) Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from a-lactalbumin and b-casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. *Int. Dairy J.*; 17: 1460-1472.
- Premkumar, K.; Abraham, S. K.; Santhiya, S. T.; Ramesh, A.; (2004) Protective effect of *Spirulina fusiformis* on chemical-induced genotoxicity in mice. *Fitoterapia*; 75: 24-31.
- Robert, Henrikson.; (2009). *Earth Food Spirulina*, Sixth Printing, Revised Edition Online www.spirulina-source.com
- Suetsuna, K.; (1998) Isolation and characterization of angiotensin I Converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L. (garlic). *J. Nutr. Biochem*; 9: 415-419.
- Timmermans, P. B.; Benfield, P.; Chiu, A. T.; Herblin, W. F.; Wong, P. C.; Smith, R. D.; (1992) Angiotensin II receptors and functional correlates. *Am. J. Hypertens*; 5: S221-235.
- Wu, J.; Ding, X.; (2002). Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Res. Int.*; 35: 367-375.
- Yajun Zheng.; Yan Li.; Youlin Zhang.; Xiaohui Ruan.; Runguang Zhang.; (2017). Purification, characterization , synthesis, invitro ACE inhibition and invivo antihypertensive activity of bioactive peptides derived from oil palm kernel glutelin-2 hydrolysates . *Journal of Functional Foods*.; 28:48-58
- Yu, Y.; Hu, J.; Miyaguchi, Y.; Bai, X.; Du, Y.; Lin, B.; (2006). Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from porcine hemoglobin. *Peptides*.; 27: 2950-2956.