



مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی خواص ضددیابتی، ضدفشارخون و ضداکسیدانی پپتیدهای زیست فعال استخراج شده از ضایعات میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*)

محیا دمالی امیری^{۱*}، رضا حسن ساجدی^۲

۱- کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه تربیت مدرس، جلال آل احمد، کارگر شمالی

۲- دکتری بیوشیمی، استاد، دانشگاه تربیت مدرس، جلال آل احمد، کارگر شمالی

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۱۳

تاریخ داوری: ۱۴۰۴/۰۷/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۲۴

کلمات کلیدی:

پپتید دریایی،

هیدرولیز آنزیمی،

پپتید زیست فعال،

میگوی ببری سبز،

خاصیت ضد دیابت

DOI: 10.48311/fsct.2026.83919.0

* مسئول مکاتبات:

mahya.amirii76@gmail.com

در صنایع عمل آوری میگو حدود ۴۵-۴۰٪ از ماده اولیه به صورت مواد زائد شامل سر، امعا و احشا و پوسته دور ریز می شوند. هدف از این مطالعه، استخراج و ارزیابی فعالیت زیستی پپتیدهای حاصل از ضایعات فرآوری میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) بود. ضایعات حاصل از عمل آوری میگو تهیه و بافت های هدف جهت تیمار آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج مربوط به تعیین ترکیب تقریبی ماده خام اولیه بر اساس وزن خشک نمونه با رطوبت ۷۴/۵٪، بیش ترین ترکیب بدن میگوی ببری سبز و سپس پروتئین ۴۴٪ و خاکستر ۲/۲٪ محتوای بافت میگوی سبز را تشکیل می دادند. در ادامه، از سه نوع آنزیم آلکالین پروتئاز، آلکالاز و اوتاز جهت هیدرولیز و تولید پپتیدها از ضایعات میگو استفاده شد. سپس آنزیم های درونی میگو بوسیله دمای ۸۵ درجه غیرفعال شده و در محدوده pH ۸/۰ تنظیم گردید. هیدرولیز در ۸ و ۱۶ ساعت انجام شد و میزان پروتئین کلی بخش رویی توسط تکنیک کج دال، جهت آنالیز و بررسی نمونه های تولید شده و انتخاب بهترین نمونه، سنجیده شد و ساعت ۱۶ هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز با ۳۵،۵٪ پروتئین به عنوان نمونه بهینه انتخاب شد. پروتئین های استخراج شده با استفاده از آنزیم آلکالاز هیدرولیز شده و در سه بازه وزنی کمتر از ۳، ۱۰ و ۳۰ کیلو دالتون با روش اولترافیلتراسیون جداسازی شدند. نتایج نشان دادند که فراکسیون پپتیدی با وزن مولکولی کمتر از ۳ kDa بیشترین فعالیت زیستی را داراست؛ به طوری که مهار آنزیم DPP-IV تا ۷۳،۳۵٪، مهار ACE تا ۵۵٪ و فعالیت مهار رادیکال آزاد در آزمون DPPH برابر با ۶۹،۶۱٪ بود.

۱-مقدمه

امروزه مشکلات ناشی از فشار خون، بیماری دیابت، سرطان و سایر بیماری های متابولیک مرتبط با سبک زندگی تبدیل به مهمترین نگرانی در خصوص سلامتی در سراسر جهان شده است [۱]. افزایش جمعیت، پیری، رژیم های نادرست، چاقی و شیوه زندگی بی تحرک، میزان شیوع این بیماری ها را افزایش میدهد. در بیماری دیابت تغذیه درمانی نقش کلیدی در مدیریت متابولیسم این بیماری دارد که می تواند منجر به کاهش سطح گلوکز خون و افزایش حساسیت به انسولین شود. یکی از راهکارهای دارویی برای کنترل بیماری متابولیک دیابت، مهار آنزیم دی پپتیدیل پپتیداز^۱ است، اما مصرف مداوم داروهای مهارکننده این آنزیم با عوارض جانبی از جمله ناراحتی های گوارشی و کلیوی همراه بوده و نیاز به جایگزین های طبیعی را افزایش داده است [۱].

پپتیدهای زیست فعال حاصل از منابع غذایی، به ویژه پروتئین های آبی، به عنوان ترکیبات طبیعی با اثرات چندگانه زیستی، مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته اند. این پپتیدها اغلب از طریق هیدرولیز آنزیمی به دست می آیند و بسته به وزن مولکولی، توالی اسیدهای آمینه و ساختار فضایی، فعالیت هایی چون مهار آنزیم های دی پپتیدیل پپتیداز و آنزیم مبدل آنژیوتانسین^۲، خاصیت ضداکسیدانی، ضد فشار خون، ضدالتهاب و حتی ضدسرطان دارند [۲، ۳].

مطالعات بسیاری فعالیت زیستی این پپتیدها را از منابع مختلف بررسی کرده اند. Nongonierma و FitzGerald در سال ۲۰۱۷ گزارش دادند که پروتئین های زیست فعال استخراج شده از منابع غذایی، پتانسیل بالایی در تنظیم شاخص گلاسمیک دارند [۳].

Wang و همکاران شرایط بهینه هیدرولیز پروتئین جلبک *Chlorella pyrenoidosa* را بررسی کردند و موفق به جداسازی پپتیدی با خاصیت مهار ACE شدند [۴]. Chalamaiah و همکاران (۲۰۱۲) در مرور جامع خود بر

هیدرولیز پروتئین ماهی، تأکید کردند که این ترکیبات به دلیل دارا بودن طیف وسیعی از پپتیدهای زیست فعال با خواص آنتی اکسیدانی قوی، پتانسیل بالایی برای استفاده در تولید غذاهای فراسودمند دارند [۵]. Ramazani در مطالعه ای سال ۲۰۱۸ نشان داد که پپتیدهای حاصل از ضایعات ماهی پنجزاری دارای خاصیت ضداکسیدانی و ضد فشار خون قابل توجهی هستند [۶]. Ko و همکاران نیز در مطالعه ای فعالیت مهار ACE در هیدرولیز پروتئین گونه های مختلف جلبک را ارزیابی کردند [۷]. Ishak و همکاران در مطالعه ای نشان دادند که پپتیدهای حاصل از ضایعات ماهی باله سیاه دارای خاصیت ضداکسیدانی و ضد فشار خون قابل توجهی هستند [۸]. در مطالعه ای دیگر Shahidi و همکاران در یک مرور ساختاریافته تأکید کردند که پپتیدهای مشتق از نوعی ماهی گرمسیری می توانند در مهار رادیکال های آزاد نقش کلیدی ایفا کنند [۹].

در ایران، Nahvi و همکاران، استخراج پپتیدهای زیست فعال از ماهی کیلکا را گزارش کردند که خاصیت مهار رادیکال آزاد ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل^۳ و ۲،۲-آزینو-بیس (۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید)^۴ در آن ها مشاهده شد [۱۰].

با وجود گسترش مطالعات مشابه در مورد گونه های ماهی، هنوز پژوهش های محدودی بر روی ضایعات میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) انجام شده است؛ در حالی که این گونه یکی از آبزیان اقتصادی و بومی سواحل جنوبی ایران بوده و ضایعات فرآوری آن شامل پوست، سر و دم، سرشار از پروتئین قابل استفاده است.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- تهیه ماده ی اولیه

مواد اولیه

3- DPPH

4 -ABTS

1-(DPP-IV)

2 -ACE

شده با اواتاز و ۰/۲۵۳ گرم پودر رویی خشک شده میگوی ۱۶ ساعت هیدرولیز شده با آلكالاز و کنترل ۱۶ ساعت جهت تست کج‌لداً انتقال داده شد [۱۱ و ۱۲].

در بررسی درصد ماده‌ی خشک، اندازه‌گیری نمونه قبل و بعد از خشک شدن در آون مورد نیاز می‌باشد [۱۳]. بدین منظور، ۱ سی سی نمونه در سانتریفیوژ (دور ۱۲۰۰۰، به مدت ۱۵ الی ۲۵ دقیقه) قرار داده شده و وزن بخش رویی و زیری به صورت جداگانه سنجش گردید.

۲-۳- تولید پروتئین هیدرولیز شده

جهت بدست آوردن بالاترین بازده، بهینه سازی شرایط هیدرولیز انجام گرفت. به این منظور غلظت آنزیم ۲ درصد، زمان هیدرولیز (۱ الی ۸ ساعت و ۱۶ ساعت) و آنزیم‌های آلكالین پروتئاز تجاری با منبع میکروبی شامل آلكالاز، اواتاز و آلكالین پروتئاز روبوزایم به عنوان سطوح متغیرهای مستقل انتخاب شدند. مقدار ۲۰ گرم میگوی پودری با نسبت ۵:۱ (نمونه: آب مقطر) ترکیب شده و با استفاده از HCl-NaOH، pH مخلوط به ۸/۰ که فعالیت بهینه آنزیم آلكالاز می‌باشد، رسانده شد. بعد از آن، نمونه‌ها در انکوباتور (دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. آنزیم آلكالاز به نسبت ۲٪ وزن (۲۰ میلی‌لیتر آلكالاز، ۲۰ میلی‌گرم اواتاز و ۲۰ میلی‌گرم آلكالین پروتئاز روبوزایم) مخلوط به نمونه اضافه شده و نمونه‌ها به مدت های مشخص شده هم‌زده شدند؛ هر یک ساعت به منظور توقف واکنش آنزیمی، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. نمونه‌ها بعد از خنک‌شدن، سانتریفیوژ شده و مایع رومانند جمع‌آوری و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۹ و ۱۴].

۲-۴- جداسازی پپتیدها

آنزیم آلكالاز (Alcalase® 2.4L FG) از شرکت Novozymes دانمارک، آلكالین پروتئاز (Alkaline Sigma- protease Cat. No. P4860) از شرکت Aldrich آمریکا و اواتاز (Ovozyme®) از شرکت DSM Food Specialties هلند تهیه شد. کیت سنجش فعالیت DPP-IV (Cat. No. MAK203) و سایر مواد شیمیایی از جمله DPPH، ABTS و کیت سنجش فعالیت ACE (Cat. No. CS0002) از شرکت Sigma-Aldrich آمریکا خریداری شدند. سایر مواد شیمیایی و حلال‌ها از شرکت Merck آلمان تهیه شدند. ضایعات میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) شامل پوست، سر و دم از آب‌های خلیج فارس در استان هرمزگان با طول تقریبی ۵ سانتی‌متر خریداری شده و در جعبه‌های حاوی یخ با نسبت یخ به میگو ۱:۲ به آزمایشگاه دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شد. ۱۰۰ گرم نمونه‌ی منجمد شده در دستگاه خشک‌کن انجمادی قرار گرفته و به صورت پودر، مخلوط و ناخالصی آن خارج شد. نمونه الک شد و پس از الک در جای خشک و دور از تابش مستقیم خورشید قرار گرفت.

۲-۲- تعیین ترکیب ماده اولیه از طریق آنالیزهای تقریبی مقادیر رطوبت، پروتئین کل، درصد ماده خشک و خاکستر بر طبق پروتکل پیشنهاد شده توسط AOAC^۵ آزمون شد. برای اندازه‌گیری رطوبت از آون (۱۰۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲۴ ساعت جهت ثابت شدن وزن نمونه استفاده شد. برای تعیین خاکستر، ۰/۵ گرم نمونه (که از قبل در آون با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار خشک شده بود) در بوته‌چینی ریخته شده و در کوره با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت سوزانده شد. میزان پروتئین با روش کج‌لداً محاسبه شد. بدین منظور، قبل از هیدرولیز ۱ گرم نمونه‌ی پودری و بعد از هیدرولیز ۰/۵۵۳ گرم پودر خشک شده‌ی رویی میگوی ۱۶ ساعت هیدرولیز

5-AOAC Association of Official Agricultural Chemists

طبق داده‌های موجود نمونه هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز بهینه‌ترین نتایج را داشت و جداسازی پپتیدها توسط اولترا فیلتراسیون با سه فیلتر آمیکون با وزن مولکولی مختلف (۳۰، ۱۰، ۳ کیلودالتون) توسط نمونه ذکر شده انجام شد و چندین فرکشن جدا گردید. با استفاده از فیلترهای آمیکون، پپتیدهای هیدرولیز شده با آلکالاز را بر اساس وزن مولکولی جدا کردیم [۱۶ و ۱۵].

۲-۵- آنالیز پپتیدها

پروپایل توزیع اندازه مولکولی پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز همراه با اجزای پپتیدی توسط الکتروفورز ژل (SDS-PAGE) تعیین شد. با توجه به کم رنگ بودن ژل حاصل از رنگ آمیزی کوماسی بلو، رنگ آمیزی نقره نترات جهت مشاهده دقیق‌تر باندها انجام شد [۱۵].

۲-۶- سنجش جذب و غلظت پپتیدها

جهت ارزیابی خواص مختلف نمونه‌ها ابتدا غلظت پروتئین رویی و همچنین OD نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه الایزایدر سنجیده گردید تا از یکسان بودن شرایط ارزیابی اطمینان حاصل گردد.

۲-۷- سنجش فعالیت ضد اکسیدانی

این سنجش با دو روش ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی رادیکال آزاد DPPH و ABTS انجام شد.

۲-۷-۱- قدرت حذف‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH

قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید [۱۶ و ۱۷].

$$\text{Free radical scavenging (\%)} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) \times 100 / A_{\text{blank}}$$

جذب نمونه همراه محلول DPPH = A_{sample}

جذب اتانول همراه با محلول DPPH = A_{blank}

۲-۷-۲- ارزیابی ظرفیت مهار رادیکال آزاد ABTS
ظرفیت مهار رادیکال آزاد ABTS نمونه‌های سنتز شده با فرمول زیر محاسبه شد [۱۶ و ۱۷].

$$\text{Free radical scavenging (\%)} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) \times 100 / A_{\text{blank}}$$

جذب نمونه به همراه محلول ABTS = A_{sample}

جذب کنترل فاقد ترکیب فعال = A_{blank}

۲-۸- سنجش فعالیت ضد دیابتی از طریق ممانعت‌کنندگی دی‌پپتیدیل پپتیداز DPP-IV

فعالیت مهار کنندگی DPP-IV با استفاده از کیت سنجش مهار DPP-IV اندازه‌گیری شد که بر اساس شکافت سوبسترای غیرفلورسنت عمل می‌کند. این آزمایش با مخلوط کردن ۲۵ میکرولیتر نمونه با غلظت‌های مختلف و ۵۰ میکرولیتر محلول آنزیمی در هر چاهک انجام شد. سپس میکروپلیت در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. ۲۵ میکرولیتر سوبسترای DPP-IV به هر واکنش نمونه‌های آزمایش، شاهد و کنترل آنزیمی اضافه شد. آزمایشات در میکروپلیت ۹۶ خانه تیره انجام و توسط میکروپلیت ریدر خوانده شد. بافر به جای محلول آنزیمی به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت. پس از ۱۵-۳۰ دقیقه انتظار جهت مخلوط شدن همه‌ی معرف‌ها، فلورسانس ($\lambda_{\text{ex}}=360/\lambda_{\text{em}}=460 \text{ nm FLU}$) طول موج تحریک ۳۵۵ نانومتر و طول موج انتشار ۴۶۰ نانومتر توسط میکروپلیت ریدر در حالت متحرک یک بار در دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد اندازه‌گیری شد. سپس شیب بین دو زمان T1 و T2 در محدوده خطی نمودار DFLU/minute به دست آمد. شیب تمام ترکیبات آزمایش از نمونه شاهد مربوطه کم شد تا اندازه‌گیری صحیح به دست آید [۳].

۹-۲- سنجش فعالیت ضد فشارخون از طریق ممانعت‌کنندگی آنزیم مبدل آنژیوتانسین ACE1

برای تعیین فعالیت مهار ACE از کیت فشارخون شرکت سیگما استفاده شد. این آزمایش با اضافه کردن ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه با ۴۰ میکرولیتر آنزیم (رقیق شده در بافر سنجش) انجام شد و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر سوبسترای رقیق شده بلافاصله اضافه و سپس در طول موج تحریک ۳۲۰ نانومتر و طول موج انتشار ۴۰۵ نانومتر در ۵ چرخه به مدت ۵ دقیقه خوانش شد [۱۸].

۱۰-۲- تجزیه و تحلیل آماری

آزمون‌ها در چند تکرار انجام شده و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شد. هم‌چنین به منظور رسم نمودارها، از نرم افزار اکسل استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- آنالیزهای ماده اولیه

نتایج مربوط به تعیین ترکیب تقریبی ماده خام اولیه بر اساس وزن خشک نمونه در جدول ۱ ارائه شده است. رطوبت با میزان ۷۴/۵٪ بیش‌ترین ترکیب بدن میگوی ببری سبز را به خود اختصاص داده بود. به طور کلی بدن میگوی ببری سبز دارای رطوبت ۷۴/۵٪، پروتئین ۴۴٪ و خاکستر ۲/۲ است. تعیین ترکیب تقریبی این گونه، با توجه به ماهیت پروتئینی ماده مورد استفاده در این تحقیق، اطلاعاتی را در مورد محتوای پروتئینی منشاء اولیه آن می‌دهد.

Table 1. Approximate ingredients of oven-dried green tiger shrimp

Sample	Protein (%)	Ash (%)	Dry matter (%)	Moisture (%)
Oven dried sample	44	2/2	99/6	74/5

به دست آمده از طریق درصد ماده خشک و درصد بخش رویی پس از فرآیند هیدرولیز ۱۶ ساعته‌ی آلکالاز به عنوان فرآیندی تکمیلی جهت تایید نتایج قبلی انجام گردید (جدول ۲). هیدرولیز ۱۶ ساعته‌ی آلکالاز به عنوان نمونه‌ی اصلی جهت ادامه‌ی آزمایشات انتخاب شد.

۳-۲- تعیین درصد پروتئین کل نمونه‌ها
میزان پروتئین کلی بخش رویی توسط تکنیک کج‌دال، جهت آنالیز و بررسی نمونه‌های تولیدشده و انتخاب بهترین نمونه، سنجیده شد که در جدول ۲ ارائه شده است. هم‌چنین نتایج

Table 2. Supernatant protein percentage of hydrolyzed samples with Alcalase and Evatase enzymes in the production process

Sample	Protein (%)	The percentage of dry matter	The percentage of the supernatant
Treated with Alcalase	69	8	35/5
Control	44/15	4	15/5

می‌رفت آنزیم آلکالاز نسبت به دیگر نمونه‌های هیدرولیز شده و نمونه کنترل بالاترین درصد پروتئین را داشت. آنزیم آلکالین پروتئاز روبوزایم در اکثر آزمایش‌های انجام شده

۳-۳- سنجش غلظت پروتئین محلول به روش بیورت
نتایج مربوط به تعیین غلظت نمونه‌های هیدرولیز شده‌ی ۱۶ ساعته طبق شکل ۱ می‌باشد. همان‌گونه که انتظار

پایین ترین نتایج را داشت و از ادامه ی آنالیز نمونه ها کنار گذاشته شد.

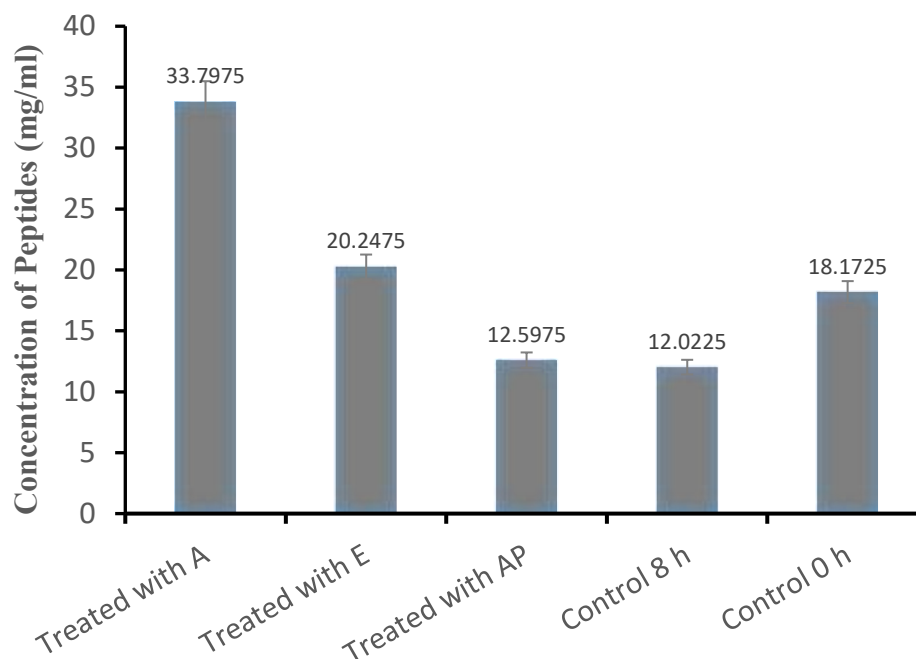


Fig 1. Comparison of the concentration of peptides in the control samples, protein hydrolyzed with A, E and AP by the Biuret method

شده است. با توجه به کم رنگ بودن ژل حاصل از رنگ آمیزی کوماسی بلو، رنگ آمیزی نقره نیترات جهت مشاهده دقیق تر باندها انجام شد. در نمونه های با اندازه کم تر از ۳۰ کیلودالتون، باند قابل توجهی مشاهده نشد و باندهای پپتیدی به صورت کم رنگ ظاهر شدند که مطابق با نتایج Bordbar و همکاران [۱۵] بود.

۳-۴- آنالیز پپتیدها

مطابق با شکل ۲ پروفایل توزیع اندازه مولکولی پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز همراه با اجزای پپتیدی توسط الکتروفورز ژل تعیین شد که از یک مارکر استاندارد برای تشخیص وزن پپتیدها با وزن های مولکولی مختلف استفاده

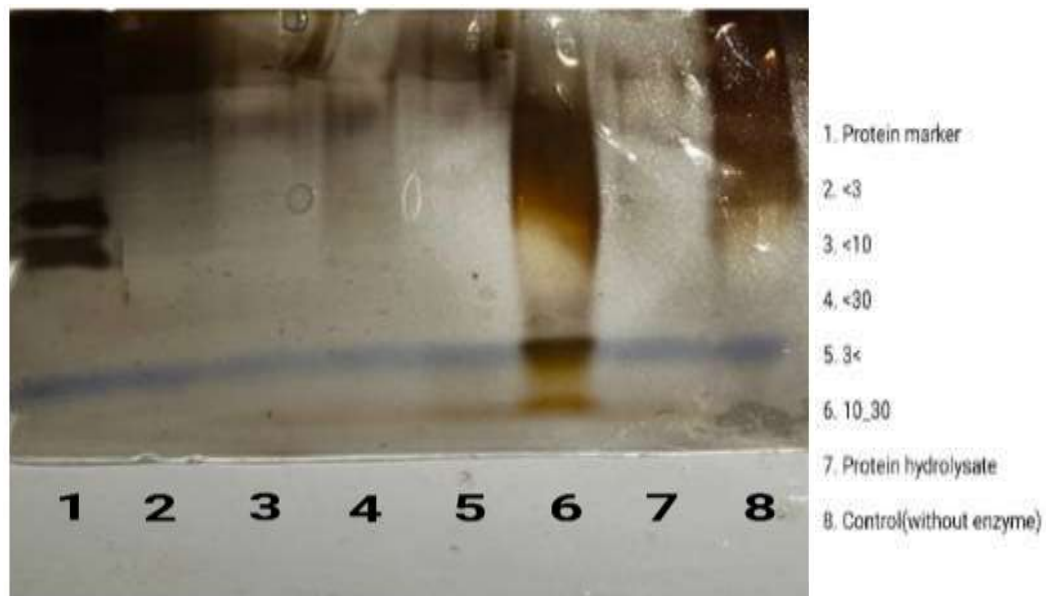


Fig 2. SDS-PAGE patterns of unfractionated and ultrafiltrated fractions

است منجر به تولید پپتیدهایی با خواص زیست فعالی قوی شود.

۳-۵- آنالیز غلظت پپتیدهای اولترافیلتر شده

نتایج حاصله برای تعیین غلظت نمونه های اولترا فیلتر شده در شکل ۳ نشان داده شده است. تحقیقات زیادی روی هیدرولیز آنزیمی قسمت های مختلف ماهیان با استفاده از آنزیم های تجاری صورت گرفته است. بسیاری از این تحقیقات اثر آنزیم های مختلف را مورد بررسی قرار دادند که از جمله می توان به آنزیم پاپائین با منشا گیاهی، آنزیم تریپسین و کیموتریپسین با منشا جانوری، آنزیم آلکالاز، پروتامکس، فلاورزایم و نئوتراز با منشاء میکروبی اشاره داشت [۱۹و۸]. راندمان بازیافت پروتئینی نشان دهنده توانایی یک آنزیم در جداسازی پروتئین های یک ماده میباشد که به خصوصیات ماده مورد نظر، شرایط هیدرولیز و فعالیت آنزیم بستگی دارد [20]. کارایی بالای آنزیم آلکالاز در برش پروتئین ها و تولید پپتیدهای کوچک با نتایج Bordbar و همکاران [۱۵] مطابقت دارد. تولید پپتیدهای با وزن مولکولی کم تر توسط آلکالاز نشان می دهد که پروتئین میگوی ببری سبز می تواند دارای بخش هایی با قابلیت برش سازگار با آنزیم آلکالاز باشد. به گفته ی Ishak و همکاران [8]، آلکالاز با برش پروتئین منجر به تولید پپتیدهای کوچک می شود؛ از این رو وجود باندهای با وزن مولکولی کم در اجزای پپتید در این مطالعه ممکن

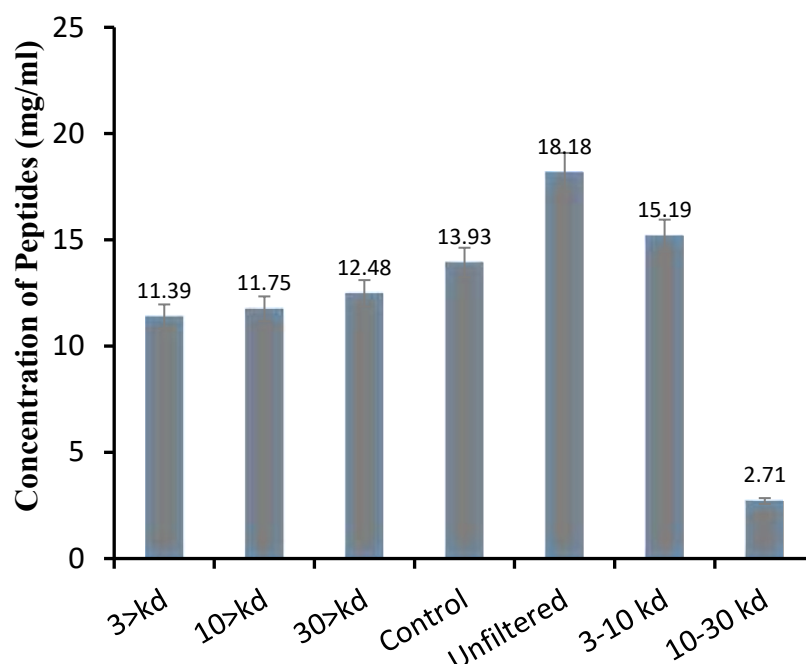


Fig 3. Comparison of ultrafiltrated peptides concentration in different components by biuret

دارای خاصیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH بالاتری بودند ($p \leq 0.05$).

آنزیم مورد استفاده در این مطالعه آلکالاز بود که به عنوان یک پروتئاز قلیایی، توانایی بالایی در هیدرولیز پیوندهای پپتیدی و تولید پپتیدهای با وزن مولکولی پایین دارد. نتایج این پژوهش نشان داد که هیدرولیز پروتئین با آلکالاز منجر به افزایش معنی دار ($p \leq 0.05$) فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها در مقایسه با نمونه کنترل (هیدرولیز نشده) شد. این افزایش احتمالاً به دلیل آزادسازی پپتیدهای زیست فعال با خاصیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH بوده است. مطالعات پیشین نیز نشان داده‌اند که هیدرولیز با آلکالاز می‌تواند منجر به تولید پپتیدهای با ظرفیت آنتی اکسیدانی بالا شود که این موضوع به ماهیت و توالی اسیدهای آمینه آزاد شده وابسته است [21]. به‌ویژه در مطالعه‌ای که بر روی پروتئین ماهی پنجزاری باله نارنجی انجام شد [17]، آلکالاز به‌طور چشمگیری فعالیت آنتی اکسیدانی را بهبود بخشید و درصد مهار رادیکال DPPH در نمونه‌های هیدرولیز شده با این

۶-۳- ارزیابی خاصیت آنتی اکسیدانی

۶-۳-۱- قدرت حذف‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH

یکی از شاخص‌های مهم جهت سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین‌ها، قدرت آنها برای مهار رادیکال آزاد DPPH است. DPPH یک رادیکال آزاد پایدار و محلول در اتانول است که بیشترین جذب را در طول موج ۵۱۷ نانومتر دارد. این رادیکال با مواد الکترون دهنده مانند آنتی اکسیدانها مهار شده و جذبش کاهش می‌یابد. نتایج حاصل از بررسی خاصیت ضد اکسیدانی ترکیبات هیدرولیز شده نشان داد که ترکیب هیدرولیز شده دارای خاصیت ضد اکسیدانی بالایی در تمامی زمان‌ها تا ۳ رقت پس از غلظت ۱۰ میلی گرم بوده است. بالاترین میزان مهارکنندگی برای نمونه‌ی زیر ۳۰ کیلو دالتون طبق شکل ۴ در غلظت ۱۰ mg/mL در حدود $(69/61 \pm 0/15)$ بود. نمونه‌های هیدرولیز شده در مقایسه با نمونه کنترل (هیدرولیز نشده)،

آنزیم به $6 \pm 1 / 59 \pm 75$ رسید [۲۱]. نتایج مربوط به مقایسه درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده و اجزای پپتیدی دارای وزن‌های مولکولی مختلف در شکل ۴ نشان داده شده است. نتایج حاصل از بررسی خاصیت ضد اکسیدانی فرکشن‌های پپتیدی نیز نشان داد که با کاهش غلظت، مهارکنندگی نیز افزایش یافت و همه اجزای پپتیدی (۳)، ۳۰-۱۰ و >30 کیلودالتون)، توانایی مهار رادیکال‌های آزاد DPPH را دارا بودند. از آسکوربیک اسید (ویتامین C) در غلظت‌های $0.01-2$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و فعالیت ضد اکسیدانی آن در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر 70.05% محاسبه شد. این انتخاب به دلیل ویژگی‌های شناخته‌شده‌اش در مهار رادیکال‌های آزاد و خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی است. ویتامین C به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی با توانایی بالای خود در مهار رادیکال‌های آزاد، به طور گسترده‌ای در مطالعات آزمایشگاهی برای مقایسه با سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۲]. در این پژوهش، ویتامین C در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی معادل 70.5% را نشان داد که برای مقایسه با نمونه‌های هیدرولیز شده با آلکالاز در نظر گرفته

شد. این ترکیب به عنوان یک معیار استاندارد در ارزیابی توانایی مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در نمونه‌های مختلف استفاده گردید. همچنین در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بالاترین توانایی مهار رادیکال‌های آزاد DPPH مشاهده شد (69.61%). نتایج مشابهی در مطالعات انجام گرفته بوسیله سایر محققان گزارش شد. رمضان زاده و همکاران [۱۶] بیان کردند بالاترین میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ارزیابی قدرت کاهندگی پروتئین هیدرولیز شده ماهی قزل‌آلا با آنزیم آلکالاز در غلظت ۱۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر 39.8% بوده است. همچنین طبق مطالعه ی رمضان زاده و همکاران [۱۷]، ماهی پنجزاری باله نارنجی در هیدرولیزهای ۱ تا ۴ ساعت، بالای ۷۰ درصد مهارکنندگی DPPH داشت. بنابراین پپتیدهای مشتق شده از پروتئین‌های ماهی توانایی اعمال فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی قوی را در سیستم‌های مختلف اکسیداتیو نشان می‌دهند [۲۲].

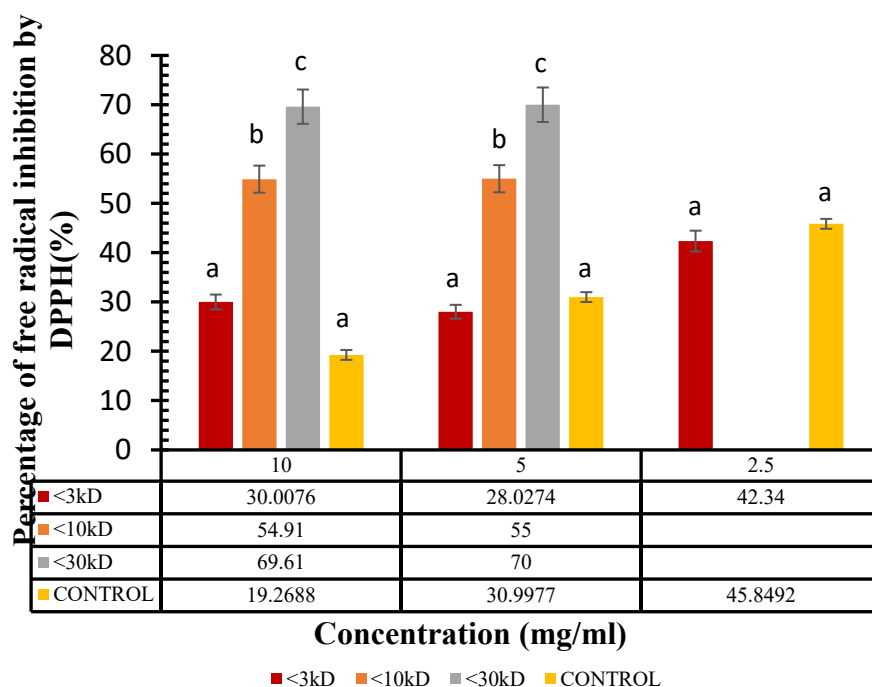


Fig 4. Comparison chart of DPPH free radical inhibition percentage of different samples

آروماتیک خاص می‌توانند فعالیت ضد اکسیدانی پپتیدها را افزایش دهند.

اجزاء پپتیدی و پروتئین هیدرولیز شده، طبق نتایج حاصل از بررسی خاصیت ضد اکسیدانی اجزای مختلف پپتیدی توانایی مهار رادیکال آزاد ABTS را دارا بودند (شکل ۵). نمونه‌های هیدرولیز شده در وزن‌های مختلف، در مقایسه با نمونه کنترل (هیدرولیز نشده)، قادر به مهار رادیکال آزاد ABTS بودند ولی تفاوت فعالیت مهارکنندگی نمونه‌ها در غلظت‌های مختلف از نظر آماری معنی‌دار نبود. ($p > 0.05$).

۳-۶-۲- ظرفیت مهار رادیکال آزاد ABTS

رادیکال آزاد ABTS رادیکالی نسبتاً پایدار است و به آسانی توسط ضد اکسیدان‌ها مهار می‌شود [۲۳]. همچنین ظرفیت مهاري بالاتر در رادیکال آزاد ABTS نسبت به رادیکال آزاد DPPH در نمونه‌های مورد بررسی با نتایج Shahidi و همکاران [۹] مطابقت داشت. رادیکال‌های آزاد، مهم‌ترین مکانیسم ضد اکسیدانی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین است که عامل آن وجود اسید آمینه‌هایی مانند والین، لوسین، پرولین و آلانین در توالی پپتیدی آن‌هاست [۲۴ و ۲۵]. احتمالاً مقادیر بالای اسیدهای آمینه مانند Asp, Pro, Ala, Trp, Tyr, Met, Cys, Leu, Arg و His در ساختار پروتئین طبق یافته‌های ZHONG و همکاران [۲۵] تایید می‌گردد. نتایج ZHONG و همکاران [۲۶] نشان می‌دهد که وجود این اسید آمینه‌های آب‌گریز و

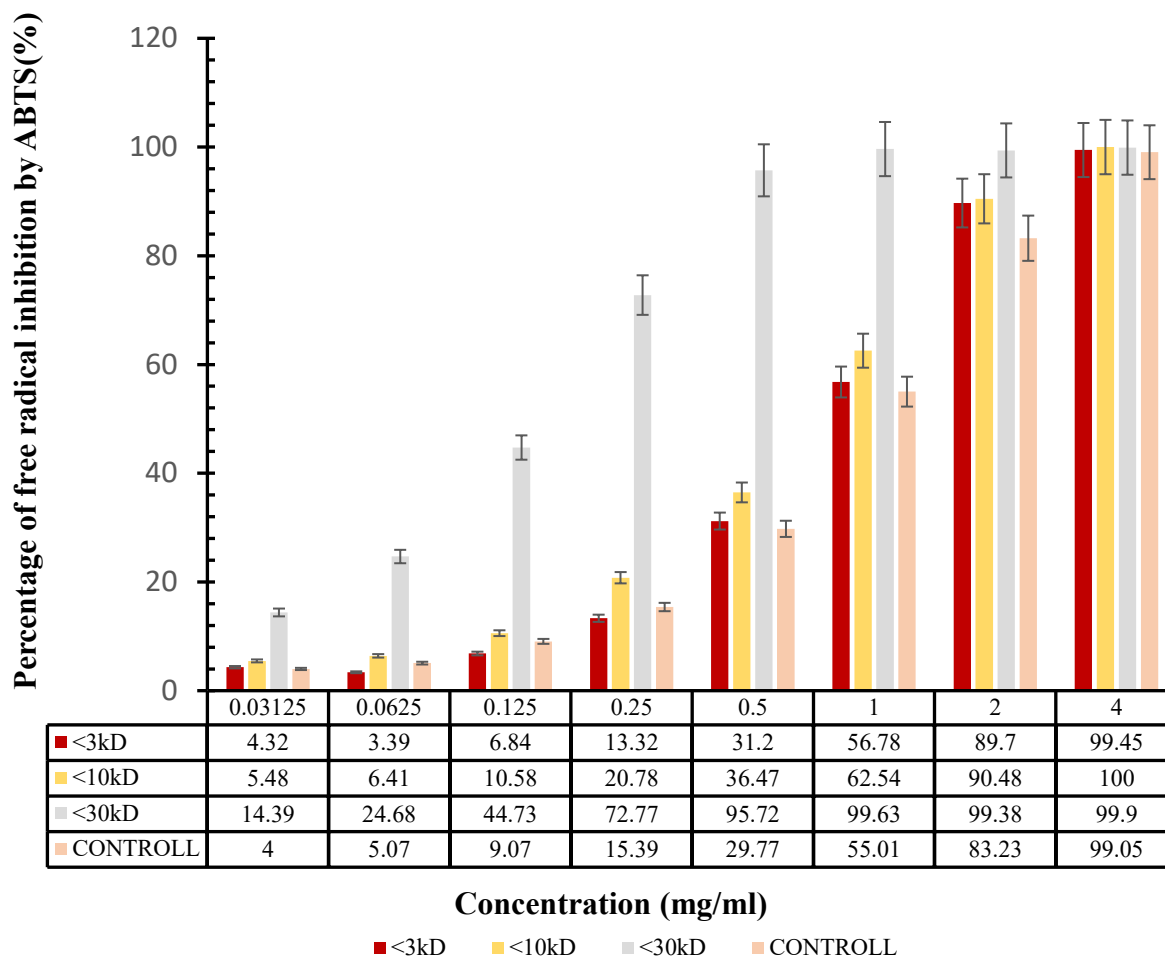


Fig 5. Comparison chart of ABTS free radical inhibition percentage of different samples

زیست‌فعالی را نشان دادند. عوامل زیادی روی خواص زیست‌فعالی پپتیدها موثر می‌باشد که از آن جمله می‌توان به نوع آنزیم پروتئاز، درجه هیدرولیز، وزن مولکولی، ترکیب آمینو اسیدی پپتیدها و شرایط هیدرولیز شامل دما، زمان و pH، اشاره نمود [۲۷]. اما مهمترین عامل موثر، وزن مولکولی می‌باشد. دلیل این امر را می‌توان در تاثیر وزن مولکولی روی ترکیب و تنوع اسیدهای آمینه پپتیدها دانست که تاثیر زیادی در ممانعت از فعالیت آنزیم ACE دارد. مشخص شده است که پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون، دارای ترکیب مناسب آمینواسیدی برای ممانعت از فعالیت آنزیم ACE هستند. Forghani و همکاران [۱۸] ظرفیت مهارکنندگی ACE

۳-۷- سنجش فعالیت مهارکنندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسنین (ACE-I)

فعالیت مهارکنندگی پروتئین هیدرولیز شده و اجزای پپتیدی حاصل از التراپیلتراسیون در غلظت میکروگرم بر میلی‌لیتر، علیه آنزیم ACE در شکل ۶ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد، همه‌ی نمونه‌ها توانایی مهارکنندگی ACE را دارا بودند. فعالیت بازدارندگی بین ۳۳٪ تا ۵۵٪ بود. بیش‌ترین میزان مهارکنندگی متعلق به جزء پپتیدی زیر ۳ کیلودالتون بود (۵۴/۸۸٪) و طبق آنالیز (ANOVA) اختلاف معنی‌داری با نمونه‌های زیر ۳۰ و ۱۰ کیلودالتون داشتند ($p < 0.05$). همچنین طبق نتایج به دست آمده، نمونه‌های پپتیدی کمتر از ۳۰ کیلودالتون کمترین خاصیت

پپتیدهای هیدرولیز شده توسط آنزیم پروتئاز آلکالاز فلاوروزیم تریسین، پایابین بروملین و پروتامکس بررسی قرار دادند که نتایج همسو با نتایج مطالعه حاضر بود و به طور کلی پپتیدهای هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز فعالیت ضد فشارخونی بالاتری داشتند. دادند. بر طبق مطالعه Ishak و همکاران [۸]، اجزای پپتیدی حاصل از الترافیلتراسیون پروتئین هیدرولیز شده به شدت تحت تاثیر توالی پپتیدها و همچنین حضور اسید آمینه‌های خاص در C ترمینال توالی پپتیدهایی مانند Pro, Phe, Tyr, Trp و یک اسید آمینه آب‌گریز که تمایل به تعامل با محل فعال ACE قرار دارد، دارند. خاصیت ضد مهاری می‌تواند تا حدی هم به منبع پروتئین و یا پپتید استخراج شده و نحوه فیلتراسیون با غشاهای اولترافیلتر نسبت داده شود. بطور کلی، جداسازی پپتیدها براساس اندازه، فعالیت زیستی پروتئین هیدرولیز شده را افزایش می‌دهد [۱۹]. همانگونه که در نتایج مشاهده شد با تغییر وزن ملکولی پپتیدها، توانایی بازدارندگی ACE تغییر معنی دار نشان داد. بالاترین توانایی بازدارندگی در فرکشن کمتر از ۳ کیلودالتون و کمترین فعالیت نیز در فرکشن بیش از ۳۰ کیلودالتون مشاهده گردید. این نتایج تایید می‌کنند که پپتیدهای با وزن ملکولی پایین بازدارنده‌های

ACE بهتری نسبت به پپتیدهای با وزن ملکولی بالا می‌باشند [۱۹]. این نتایج در تطبیق با نتایج Wu و همکاران [۲۶] است که بالاترین توانایی بازدارندگی ACE را در فرکشن‌های با وزن ملکولی پایین مشاهده نمودند. به طور کلی در نتایج ما فعالیت بازدارندگی بین ۳۳٪ تا ۵۵٪ بود، که با نتایج Borges-Contreras و همکاران [۲۷] در خصوص اثر ضد فشار خون پپتید حاصل از هیدرولیز پوسته میگو تطابق داشته است. مطالعات قبلی در مورد پپتیدهای بازدارنده ACE نشان دادند که پپتیدهای با وزن مولکولی پایین‌تر، فعالیت مهاری قوی‌تری نسبت به پپتیدهای با وزن مولکولی بالا داشتند [۱۸ و ۱۹] که با نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر مطابقت دارد. پپتیدهایی با وزن مولکولی ۱۰-۵ کیلودالتون حاصل از ژلاتین پوست ماهی کاد اقیانوس اطلس طبق مطالعات Ngo و همکاران [۲۸]، دارای مهارکنندگی حدوداً ۶۰٪ می‌باشند. از آنجایی که فعالیت اولیه ACE بریدن دی‌پپتید C ترمینال سوبسترای الیگوپپتیدی با ویژگی گسترده است، مهارکننده‌های قوی ACE طبق یافته‌های Ngo و همکاران [۲۸] به شدت تحت تاثیر توالی تری‌پپتیدی C ترمینال آن‌ها قرار دارد.

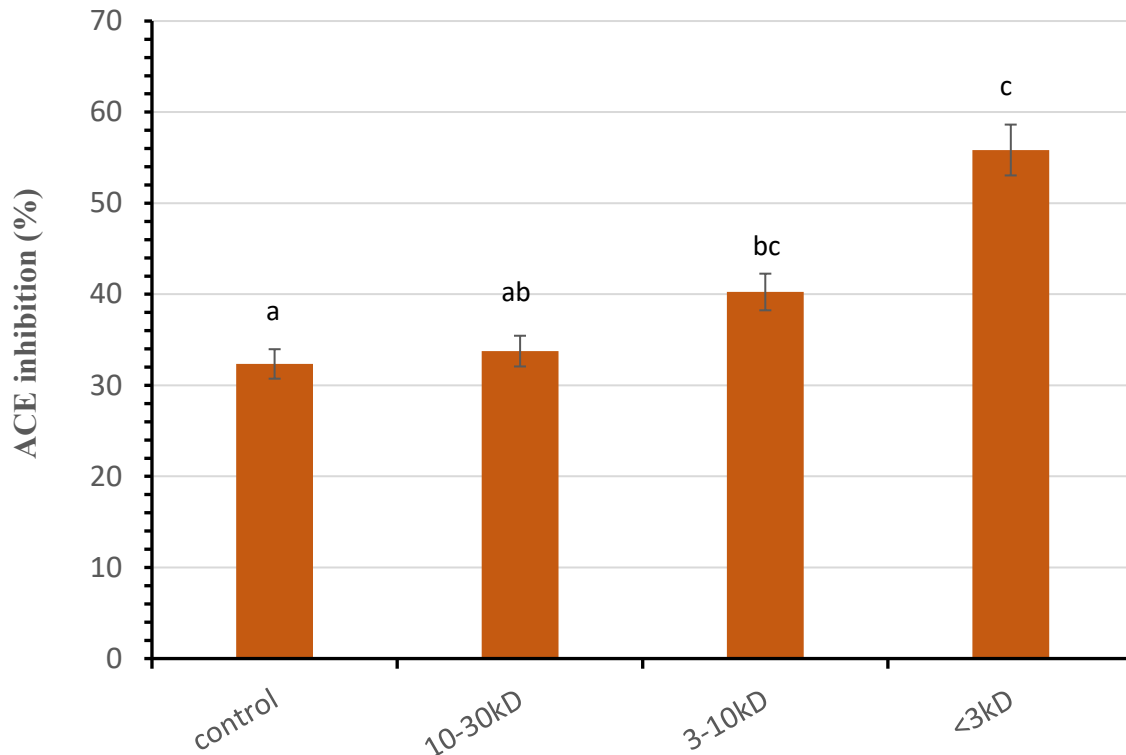


Fig 6. Comparison chart of ACE enzyme inhibition percentage at 12.5 ($\mu\text{g/ml}$) concentration of different hydrolyzed samples

انواع مختلف پروتئین هیدرولیز شده می‌تواند به دلیل تفاوت در ساختار پپتیدها باشد به گونه ای که Huang و همکاران [۲۹] بیان نموده اند که توانایی مهار DPP-IV در یک پروتئین هیدرولیز شده بوسیله ترکیب و توالی امینواسیدی پپتیدها تعیین می‌گردد. تعدادی از محققین گزارش داده اند که وزن مولکولی مطلوب برای پپتیدهای بازدارنده DPP-IV بین ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ دالتون می‌باشد [۳۰]. در مطالعه انجام شده توسط Hsu و همکاران [۳۰] بیان شده است که فرکشن با وزن مولکولی کمتر از ۱/۵ کیلو دالتون از پروتئین هیدرولیز شده ژلاتین پوست خوک بالاترین بازدارندگی DPP-IV را در مقایسه با نمونه‌های با وزن مولکولی بالاتر نشان دادند. همان‌گونه که انتظار می‌رفت فرکشن کمتر از ۳ کیلو دالتون در پژوهش حاضر نیز بالاترین فعالیت را نسبت به پروتئین هیدرولیز شده کل و سایر فرکشن‌ها نشان داد. با این حال، پپتیدهای با وزن مولکولی بالاتر (مانند ۱۰ و ۳۰ کیلودالتون) نیز فعالیت ضد دیابتی قابل توجهی از خود نشان دادند، که این موضوع ممکن است به دلیل ساختار سه‌بعدی خاص یا

۳-۸- سنجش فعالیت ضد دیابتی از طریق ممانعت کنندگی دی‌پپتیدیل پپتیداز (DPP IV-4)

فعالیت بازدارندگی DPP-IV پروتئین هیدرولیز شده و اجزای پپتیدی حاصل از اولترافیلتراسیون آن در غلظت میلی گرم بر میلی لیتر در شکل ۷ نشان داده شده است. بر طبق نتایج، همه‌ی نمونه‌ها توانایی مهار کنندگی DPP-IV را دارا بودند. فعالیت مهار کنندگی بین ۷۳/۳۵٪ (بالاترین میزان مهار کنندگی که متعلق به جزء پپتیدی زیر ۳ کیلودالتون بود) تا ۲۸/۱۲٪ (پایین ترین میزان مهار کنندگی که متعلق به ۱۰ تا ۳ کیلودالتون بود)، بود که این نتیجه تقریباً مطابق با نتایج حاصل از آزمون‌های بررسی خاصیت ضد فشارخون می‌باشد. Nongonierma و FitzGerald [۳] گزارش کردند که پارامترهای ساختاری ممکن است با خواص بازدارندگی DPP-IV مرتبط باشد و احتمالاً طول پپتید مستقیماً بر عملکرد تأثیر نمی‌گذارد. تفاوت در میزان فعالیت

(*Oreochroma niloticus*) ۵۱٪/۹۱ توانایی مهار DPP-IV، در غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر نشان داد که مشابه با فعالیت فرکشن کمتر از ۳ کیلودالتون در مطالعه حاضر می باشد. در مطالعه رمضان زاده [۱۷]، در غلظت ۲ میلی گرم در میلی لیتر، پپتیدهای بین ۳ تا ۱۰ کیلودالتون ماهی پنجزاری باله نارنجی، بالاترین خاصیت مهارکنندگی DPP-IV را با درصد حدود ۵۵٪ از خود نشان دادند که مطابق با یافته های ما از تاثیر پپتیدهای کوچکتر از ۳ کیلودالتون روی کیت دیابت بود.

مکانیسم های عمل متفاوت آن ها باشد. تحلیل آماری (ANOVA) نشان داد که تفاوت بین گروه ها از نظر آماری معنی دار است ($p < 0.05$). این یافته ها نشان می دهند که وزن مولکولی به تنهایی نمی تواند فعالیت ضد دیابتی پپتیدها را تعیین کند و عوامل دیگری مانند ساختار پپتید و مکانیسم عمل نیز نقش مهمی ایفا می کنند. Wang و همکاران [۴] از پوست ماهیان گرمایی و سردایی متعدد برای تولید ژلاتین هیدرولیز شده استفاده نموده و فعالیت بازدارندگی-DPP-IV آن ها را مقایسه کردند. نتایج پژوهش این محققین نشان داد که فرکشن بالاتر از ۱/۵ کیلودالتون ژلاتین پوست تیلپیا

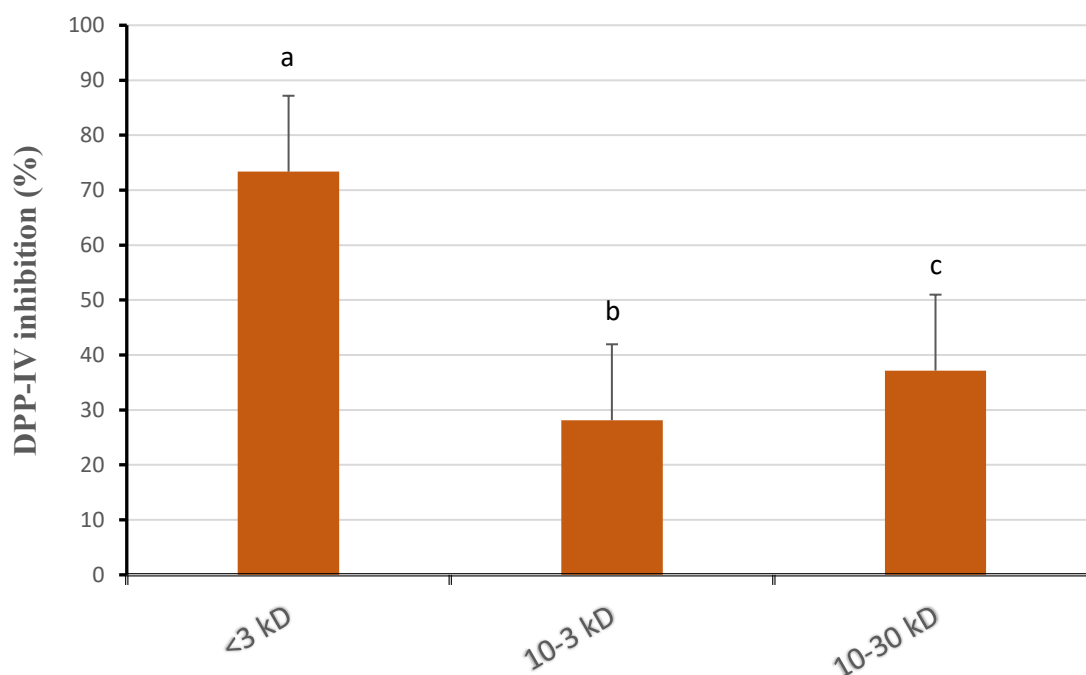


Fig 7. Comparison of DPP-IV inhibitory activity of hydrolyzed protein and peptide components with different molecular weights at a concentration of 2 (mg/ml)

علی رغم تلاش های فراوان برای استخراج ترکیبات زیست فعال از ضایعات آبزیان، این حوزه همچنان مورد توجه محققان و صنایع باقی مانده است. در صنعت فرآوری میگو، ضایعاتی شامل سر و قفسه سینه، پوسته (کاراپاس) و دم (۴۰-۴۵٪) تولید می شود که یا به عنوان خوراک

۴- نتیجه گیری

با توجه به افزایش جمعیت جهانی، نیاز به منابع پروتئینی بیشتر از همیشه احساس می شود. برای رفع این نیازها، استفاده بهینه و هوشمندانه از منابع دریایی ضروری است.

ضدباکتری تبدیل کرد. برخی از ضایعات میگو حاوی روغن‌های با ارزش غذایی در دم خود هستند که می‌توانند به عنوان منبع اسیدهای چرب امگا-۳ و سایر ترکیبات مفید استفاده شوند. پپتیدهای زیست‌فعال با خواص زیستی متنوع، گزینه‌های مناسبی برای تولید این محصولات هستند. در این تحقیق، هیدرولیز ۱۶ ساعته با استفاده از آنزیم آلکالاز برای استخراج پپتیدها از ضایعات میگوی ببری سبز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تمام اجزای پپتیدی توانایی مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و همچنین مهار DPP-IV و ACE را دارند. پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون بالاترین میزان زیست‌فعالی را نشان دادند.

۵-منابع

- [1] Ma, W., Li, N., Lin, L., Wen, J., Zhao, C., & Wang, F. (2023). Research progress in lipid metabolic regulation of bioactive peptides. *Food Production, Processing and Nutrition*, 5(1), 10.
- [2] Hu, S., Li-Chan, E. C. Y., Wan, Y., Zhang, Y., & Pan, S. (2019). Identification of anti-diabetes peptides from *Spirulina platensis*. *Journal of Functional Foods*, 56, 333–341.
- [3] Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2019). Features of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from dietary proteins. *Journal of Food Biochemistry*, 43(1), e12451.
- [4] Li, Y., He, F., Liu, S., Wang, J., & Zhu, H. (2021). Investigation of *Chlorella pyrenoidosa* protein as a source of novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) and dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) inhibitory peptides. *Nutrients*, 13(5), 1624.
- [5] Chalamaiah, M., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities, and applications: A review. *Food Chemistry*, 135(4), 3020–3038.
- [6] Ramazani, M. (2018). Effect of hydrolysis intensity on functional properties of hydrolyzed protein from the ponyfish (*Leiognathus bindus*). *Journal of Food Processing and Preservation*, 10(2), 137–149.
- [7] Ko, S.-C., Kim, E.-A., & Jung, W.-K. (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.
- [8] Ishak, N., & Sarbon, N. (2018). Physicochemical characterization of enzymatically prepared fish protein hydrolysate from waste of shortfin scad (*Decapterus macrosoma*). *International Food Research Journal*, 25(6), [pages].
- [9] Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2008). Comparative study on antioxidative activity of yellow stripe trevally protein hydrolysate produced from Alcalase and Flavourzyme. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(6), 1019–1026.
- [10] Nahvi, A. N., Ali, M., & Masoud, R. (2017). Production of hydrolyzed protein from Kilka fish by enzymatic hydrolysis and evaluation of its bioactive properties. *Physiology and Biotechnology of Aquatics*, 5(3), 39–58.
- [11] Zhang, Y., Duan, X., & Zhuang, Y. (2012). Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin. *Peptides*, 38(1), 13–21.
- [12] Ng, K., & Mohd Khan, A. (2012). Enzymatic preparation of palm kernel expeller protein hydrolysate (PKEPH). *International Food Research Journal*, 19(2), [pages].
- [13] Owisi, H. R. (2009). Inhibitory properties of hydrolyzed aquatic proteins on angiotensin I-converting enzyme activity and its effect in reducing the risk of heart attack. In *Proceedings of the First National Congress on Veterinary Laboratory Sciences* (pp. [pages]).
- [14] Nejad, K. (2019). Comparison of separate and combined levels of commercial multi-enzymes on the feeding efficiency and chemical

- composition of common carp (*Cyprinus carpio*) carcasses. *Journal of Veterinary Research*, 74(1), 35–43.
- [15] Bordbar, S., Ebrahimpour, A., Zarei, M., Abdul Hamid, A., & Saari, N. (2018). Alcalase-generated proteolysates of stone fish (*Actinopyga lecanora*) flesh as a new source of antioxidant peptides. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 1541–1559.
- [16] Ramezanzade, L., et al. (2018). Recovery of bioactive peptide fractions from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processing waste hydrolysate. *Ecopersia*, 6(1), 31–40.
- [17] Ramezanzade, L., et al. (2022). Evaluation of bioactive properties of peptide fractions from enzymatic hydrolysis of orange fin ponyfish (*Leiognathus bindus*). *Journal of Fisheries Science and Technology*, 11(2), 106–122.
- [18] Forghani, B., et al. (2012). Enzyme hydrolysates from *Stichopus horrens* as a new source for angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, Article ID 236384.
- [19] Auwal, S. M., et al. (2018). Enhanced physicochemical stability and efficacy of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory biopeptides by chitosan nanoparticles optimized using Box-Behnken design. *Scientific Reports*, 8(1), 10411.
- [20] Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43–81.
- [21] Herawati, E., Akhsanitaqwm, Y., Agnesia, P., Listyawati, S., Pangastuti, A., & Ratriyanto, A. (2022). In Vitro Antioxidant and Antiaging Activities of Collagen and Its Hydrolysate from Mackerel Scad Skin (*Decapterus macarellus*). *Marine Drugs*, 20(8), 516. <https://doi.org/10.3390/md20080516>
- [22] Bashir, K. M. I., Chakniramol, S., Mansoor, S., Jahn, A., Cho, M.-G., & Choi, J.-S. (2024). Antioxidant activity of protein hydrolysates from redlip mullet (*Chelon haematocheilus*) muscle and byproducts. *Foods*, 13(18), 3009.
- [23] Umayaparvathi, S., Meenakshi, S., Vimalraj, V., Arumugam, M., Sivagami, G., & Balasubramanian, T. (2014). Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4(3), 343–353.
- [24] Oh, Y., Ahn, C. B., Nam, K. H., Kim, Y. K., Yoon, N. Y., & Je, J. Y. (2019). Amino acid composition, antioxidant, and cytoprotective effect of blue mussel (*Mytilus edulis*) hydrolysate through the inhibition of caspase-3 activation in oxidative stress-mediated endothelial cell injury. *Marine Drugs*, 17(2), 135. <https://doi.org/10.3390/md17020135>
- [25] Zhong, S., et al. (2011). Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry. *Food Chemistry*, 126(4), 1636–1642.
- [26] Wu, S., et al. (2012). Optimization of hydrolysis conditions for the production of angiotensin-I converting enzyme-inhibitory peptides and isolation of a novel peptide from lizard fish (*Saurida elongata*) muscle protein hydrolysate. *Marine Drugs*, 10(5), 1066–1080.
- [27] Borges-Contreras, B., et al. (2019). Angiotensin-converting enzyme inhibition in vitro by protein hydrolysates and peptide fractions from mojarra of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skeleton. *Journal of Medicinal Food*, 22(3), 286–293.
- [28] Ngo, D.-H., et al. (2016). Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Pacific cod skin gelatin using ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry*, 51(10), 1622–1628.
- [29] Huang, S.-L., et al. (2012). Dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of peptides derived from tuna cooking juice hydrolysates. *Peptides*, 35(1), 114–121.
- [30] Hsu, K. C., Tung, Y. S., Huang, S. L., & Jao, C. L. (2013). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of peptides in porcine skin gelatin hydrolysates. *Bioactive food peptides in health and disease*, (2), 205–218.



Scientific Research

Investigation of Antidiabetic, Antihypertensive, and Antioxidant Properties of Bioactive Peptides Extracted from the Waste of Green Tiger Shrimp (*Penaeus semisulcatus*)Mahya damali amiri^{1*}, Reza hasan sajadi²

1- master of biochemistry, Tarbiat modares university, Jalal al ahmad, Kargar shomali.

2- phd of biochemistry, professor Tarbiat modares university, Jalal al ahmad, Kargar shomali.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received: 2024/11/03 Review: 2025/10/12 Accepted: 2025/10/16 Keywords: marine peptide, enzymatic hydrolysis, bioactive peptide, Green tiger shrimp, antidiabetic properties DOI: 10.48311/fsct.2026.83919.0 *Corresponding Author E- mahya.amirii76@gmail.com	In shrimp processing industries, approximately 40-45% of the raw material is discarded as waste, including heads, viscera and, shells,. The aim of this study was to extract and evaluate the biological activity of peptides derived from the processing waste of the green tiger shrimp (<i>Penaeus semisulcatus</i>). The shrimp processing waste was prepared, and target tissues were used for enzymatic treatment. Results related to the approximate composition of the raw material based on dry weight with 74.5% moisture showed that the highest proportion was shrimp body tissue, followed by protein at 44% and ash at 2.2% in the green tiger shrimp tissue content. Subsequently, three types of enzymes—alkaline protease, Alcalase, and Ovataz—were used for hydrolysis and peptide production from shrimp waste. The endogenous shrimp enzymes were inactivated by heating at 85°C, and the pH was adjusted to 8/0. Hydrolysis was carried out for 8 and 16 hours, and the total protein content of the supernatant was measured using the Kjeldahl technique for analysis and selection of the best sample. The 16-hour hydrolysate treated with Alcalase, containing 35.5% protein, was selected as the optimal sample. The proteins extracted and hydrolyzed using Alcalase were separated by ultrafiltration into three molecular weight fractions: less than 3, 10, and 30 kDa. The results indicated that the peptide fraction with a molecular weight below 3 kDa exhibited the highest biological activity; specifically, inhibition of the DPP-IV enzyme up to 73.35%, ACE inhibition up to 55%, and free radical scavenging activity in the DPPH assay of 69.61%