بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی، ممانعت کنندگی آسیب DNA و بازدارندگی فعالیت آنزیم های آلفا–گلوکوسیداز و آلفا–آمیلاز پپتید های زیست فعال فرآورده تخمیری سس ماهی ساردین

یاور بوستانی ماوی[۱]، مهدی نیکو[۲*]، بهروز آتشبار[۳]، حسن احمدی گاولیقی[۴]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، آذربایجان غربی

۲- استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، آذربایجان غربی، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، آذربایجان غربی

۳- استادیار پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، آذربایجان غربی

٤- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

(تاریخ دریافت: ۹٦/۰۲/۰٤ تاریخ پذیرش: ۹٦/۰۳/۱٤)

چکیده

در این مطالعه فعالیت آنتی اکسیدانی، ممانعت از آسیب اکسیداتیو DNA اسپرم های موش توسط رادیکال های هیدروکسیل و بازدارندگی فعالیت آنزیم های تجزیه کننده کربوهیدرات (آلفا–گلوکوسیداز و آلفا–آمیلاز) سس مهیاوه بررسی گردید. سس مهیاوه دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالا در مهار رادیکال های ABTS و هیدروکسیل با IC_{50} به ترتیب ۱۷۹ و ۱٤۷ میکروگرم در میلی لیتر و قدرت احیاء آهن (FRAP) داشته است. فرآورده سنتی تخمیری مهیاوه بطور معنی داری از آسیب DNA اسپرم های موش توسط رادیکال های هیدروکسیل از طریق جلوگیری از تشکیل DNA های تک‌رشته‌ای در سلول های اسپرمی موش به همراه درصد بالاتر زنده مانی اسپرم ها داشتند. پپتیدهای سس مهیاوه بنحو موثری از فعالیت آنزیم های آلفا–گلوکوسیداز و آلفا–آمیلاز در مقایسه با داروی آکاربوز با IC_{50} به ترتیب ۲۳/۷٦ و ۲۰/۳۹ میکروگرم در میلی لیتر جلوگیری نمودند. این مطالعه نشان داد که فرآورده سنتی مهیاوه غنی از پپتید های زیست فعال با فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد دیابت بوده که طی فرآیند تخمیر تولید گردیده و می تواند به عنوان فرآورده فراسودمند مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژگان: فعالیت آنتی اکسیدانی، فعالیت ضد دیابت، بازدارندگی آسیب DNA، پپتیدهای زیست فعال، مهیاوه

*مسئول مکاتبات: m.nikoo@urmia.ac.ir

۱- مقدمه

گونه های واکنشگر اکسیژن[1] طی واکنش های نرمال متابولیکی در بدن تولید می شوند. تعادل بین سیستم آنتی اکسیدانی بدن و رادیکال های آزاد جهت حفظ عملکرد فیزیولوژیک نرمال بدن ضروریست در غیر اینصورت با بروز استرس اکسیداتیو، اجزاء سلولی مانند DNA در معرض آسیب قرار می گیرند. زمانیکه اجزاء سلولی برای مدت طولانی در معرض آسیب اکسیداتیو قرار گیرند، بیماریهای مزمن بروز می کنند [۱]. در این رابطه رادیکال هیدروکسیل مهمترین رادیکال واکنش گر اکسیژنی می باشد که بلافاصله پس از تشکیل با اجزاء سلولی مانند پروتئین، DNA، فسفولیپید، اسیدهای آمینه و قند واکنش می دهد [۲]. افزایش تقاضا توسط مصرف کنندگان که به مقوله سلامتی اهمیت می دهند منجر به رشد سریع صنعت غذاهای فراسودمند گردید. غذاهای فراسودمند فرآورده هایی هستند که حاوی ترکیبات مختلفی بوده که سبب حفظ یا ارتقاء سلامتی در مصرف کننده می شوند [۳]. در این رابطه، شناسایی ترکیبات زیست فعال جدید منجر به خلق فرصت توسعه بیشتر محصولات فراسودمند گردیده و شانس انتخاب بیشتری به مصرف کنندگان با اثرات سلامت بخش می دهد [٤].

در قرن حاضر دیابت نوع دوم بطور نگران کننده ای رو به افزایش است. به دلیل اثرات جانبی داروهای مصنوعی همچون آکاربوز که در درمان دیابت استفاده می شوند، یک راه جایگزین برای درمان دیابت، محصولاتی هستند که در آنها جذب کربوهیدراتها از طریق بازدارندگی از فعالیت آنزیم های دخیل در هضم نشاسته کاهش می یابد. در حقیقت این محصولات حاوی بازدارنده های آلفا آمیلاز و گلوکوسیداز هستند [٥]. برخی مطالعات نشان دادند که پپتید های مواد غذایی می توانند سبب جلوگیری از بروز دیابت از طریق مکانیسم های مختلف همچون کاهش فعالیت آنزیم های تجزیه کننده کربوهیدرات گردند [٦]. استفاده از غذاهای فراسودمند و ترکیبات غذا-دارویی می تواند به صورت مکمل در کنار سایر روش ها در کنترل قند خون نقش مهم ایفا نماید [۷].

تخمیر یکی از قدیمی‌ترین روش‌هایی است که برای نگهداری مواد غذایی بکار می‌رود. در کشورهای شرق آسیا محصولات تخمیر شده ماهی، سخت پوستان و نرمتنان به عنوان اقلام خوراکی اصلی یا چاشنی غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۸] . محصولات تخمیر شده حاوی اسیدهای آمینه و پپتیدهایی هستند که طعم و بوی مخصوصی به محصول می‌دهند. طی فرایند تخمیر تجزیه پروتئین‌ها بوسیله آنزیم‌های پروتئولیتیک میکروارگانیزم های نمک دوست و دستگاه گوارش آبزی سبب آزاد شدن پپتید های زیست فعال (زنجیره های کوچک اسید آمینه ای با اثرات زیستی خاص) و نهایتا سبب افزایش ارزش غذا-دارویی[2] و ماندگاری فرآورده می‌گردد [۹]. مطالعات نشان داده که فراورده‌های تخمیری همانند سس تخمیر شده ماسل [۱۰] و فرآورده تخمیری میگو و کریل [۱۱] حاوی مقادیر بالایی از پپتیدهای زیست فعال می‌باشند. مهیاوه نوعی فرآورده تخمیری می باشد که از ساردین ماهیان در جنوب کشور تهیه می شود و توسط جوامع بومی مورد استفاده قرار می گیرد. ویژگی های مرتبط با سلامتی این فرآورده[3] تا کنون مورد بررسی قرار نگرفته است. همچنین اطلاعات کمی در رابطه با فعالیت ضد دیابت سس ماهی وجود دارد. این مطالعه برای اولین بار فعالیت آنتی اکسیدانی، ممانعت کنندگی آسیب DNA و بازدارندگی فعالیت آنزیم های آلفا-گلوکوسیداز و آلفا-آمیلاز سس مهیاوه را مورد بررسی قرار داد.

۲- مواد و روشها

۲-۱- مواد شیمیایی

۲،٤،٦-تریس (۲-پیریدیل)-اس-تری یازین (TPTZ)، ۲،۲-آزینوبیوس-(۳-اتیل بنزوتیازولین-٦-سولفونیک اسید)

1. Reactive oxygen species (ROS)

2. Nutraceutical

3. Health promoting properties

(ABTS)، آلبومین سرم گاوی (BSA)، آلفا-گلوکوسیداز مخمری، p-نیتروفنول α-گلیکوزیداز، ۳،۵-دی نیتروسالسیلیک اسید (DNS) و آلفا-آمیلاز از شرکت سیگما (آمریکا) خریداری شدند. سایر مواد از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. ماده ۱۰،۱-فنانترولین از شرکت سینوفارم (شانگهای، چین) تهیه گردید.

۲-۲- تهیه نمونه سس مهیاوه و محلول پپتیدی

نمونه های فرآورده تخمیری سس مهیاوه از فروشگاه های محلی بندر عباس (هرمزگان، ایران) خریداری گردیدند. در آزمایشگاه نمونه های مهیاوه با استفاده از خشک کن انجمادی خشک گردیدند. نمونه های خشک شده فرآورده تخمیری تا زمان انجام آنالیز بعدی در فریزر در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند. قبل از آنالیز، محلول پپتیدی از طریق حل نمودن ۱ قسمت پودر خشک شده مهیاوه با ۵ قسمت آب مقطر تهیه و مخلوط حاصل در حمام آبی با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱/۵ ساعت بهم زده شد. در انتها، مخلوط بهم زده شده در دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. سوپرناتانت های حاصل سپس با یکدیگر جمع و توسط کاغذ واتمن فیلتر گردیده تا محلول پپتیدی شفافی حاصل گردد. محلول پپتیدی سپس با استفاده از خشک کن انجمادی خشک گردیده و در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند. مقدار پروتئین محلول به روش بیورت [۱۲] با استفاده از آلبومین سرم گاوی[4] تعیین گردید.

۲-۳- تعیین رنج وزن مولکولی پپتید ها

رنج وزن مولکولی پپتید ها در مهیاوه توسط ستون TSKgel 2500 PWXL (7.8 × 300 mm, Tosoh, Tokyo, Japan) متصل به دستگاه HPLC (Agilent 1100, USA) اندازه گیری شد. فاز متحرک شامل آب/ استونیتریل/ تری فلورواستیک اسید با نسبت ۷۰/۳۰/۰/۱ بود. جذب در طول موج ۲۲۵ نانومتر قرائت شد و شدت جریان ۰/۵ میلی لیتر در دقیقه بوده است. آلبومین سرم گاوی (وزن مولکولی ٦٦۰۰۰ دالتون)، سیتوکروم C (وزن مولکولی ۱۲۳۸٤ دالتون)، باسیتراسین (وزن مولکولی ۱٤۲۳ دالتون) و گلوتاتیون احیاء (وزن مولکولی ۳۰۷ دالتون) به عنوان استانداردهای وزن مولکولی مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-٤- تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی

۲-٤-۱- فعالیت حذف کنندگی رادیکال های ABTS

فعالیت آنتی اکسیدانی مهار رادیکال های ABTS فرآورده تخمیری مهیاوه به روش Senphan و Benjakul [۱۳] اندازه گیری شد. رادیکال های ABTS از طریق مخلوط نمودن محلول ۷/٤ میلی مول ABTS با محلول ۲/٦ میلی مول پرسولفات پتاسیم به نسبت ۱ به ۱ تهیه گردید. مخلوط حاصل سپس برای مدت ۱۲ ساعت در تاریکی در دمای اتاق انکوباسیون و قبل از استفاده با مقدار لازم متانول مخلوط تا جذب آن در طول موج ۷۳٤ نانومتر به ۱/۱ برسد. برای انجام آزمایش، ۱۵۰ میکرولیتر نمونه با ۲۸۵۰ میکرولیتر محلول رادیکالی مخلوط و پس از ورتکس به مدت ۱۰ ثانیه، به مدت ۲ ساعت در تاریکی انکوبه گردیدند. برای تهیه نمونه کنترل بجای محلول پپتیدی از آب مقطر استفاده گردید. جذب نمونه ها در طول موج ۷۳٤ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت گردید. فعالیت آنتی اکسیدانی از طریق فرمول زیر محاسبه گردید:

فعالیت حذف کنندگی رادیکال های ABTS = جذب کنترل – جذب نمونه/جذب کنترل × ۱۰۰

۲-٤-۲- فعالیت حذف کنندگی رادیکال های هیدروکسیل

فعالیت آنتی اکسیدانی مهار رادیکال های هیدروکسیل به روش Wang و همکاران [۱٤] اندازه گیری شد. یک میلی لیتر محلول ۱/۸٦۵ میلی مول ۱۰،۱-فنانترولین با ۲ میلی لیتر نمونه در لوله آزمایش با یکدیگر مخلوط گردیدند. به مخلوط فوق ۱ میلی لیتر سولفات آهن (۱/۸٦۵ میلی مول) اضافه و بهم زده شد. پس از افزودن ۱ میلی لیتر محلول ۰/۰۳ درصد پراکسید هیدروژن نمونه

4. BSA

ها برای مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری و جذب نمونه ها (As) در طول موج ۵۳۶ نانومتر خوانده شد. محلول واکنشی بدون پپتید به عنوان نمونه کنترل منفی (An) و محلول فاقد پراکسید هیدروژن به عنوان نمونه بلانک (Ab) نیز تهیه گردیدند. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره پپتیدی از طریق فرمول زیر بر حسب درصد محاسبه گردید:

فعالیت حذف کنندگی رادیکال های هیدروکسیل = $An - As$/ $100 \times An - Ab$

۲-٤-۳- تعیین قدرت آنتی اکسیدانی احیاء آهن (FRAP)

قدرت آنتی اکسیدانی احیاء آهن به روش Benzie و Strain [۱۵] تعیین شد. محلول استوک شامل ۳۰۰ میلی مول بافر استات (پی اچ ۳/٦)، ۱۰ میلی مول محلول TPTZ در اسید کلریدریک ٤۰ میلی مول و ۲۰ میلی مول کلرید آهن ($FeCl_3$) بوده است. محلول کاری بصورت تازه و از طریق مخلوط نمودن ۲۵ میلی لیتر بافر استات، ۲/۵ میلی لیتر محلول TPTZ و ۲/۵ میلی لیتر محلول کلرید آهن تهیه گردید. مخلوط فوق برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید و سپس محلول FRAP بدست آمد. مقدار ۱۵۰ میکرولیتر نمونه با ۲۸۵۰ میکرولیتر محلول FRAP مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه گردیدند. جذب کمپلکس رنگی فروس تری پیریل تری یازین نمونه ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر قرائت گردید. نتایج بر حسب میکرومول معادل ترولوکس با رسم منحنی استاندارد ترولوکس (۲۰ تا ۱۵۰ میکرومول) بیان گردید.

۲-۵- تاثیر سس مهیاوه بر جلوگیری از آسیب DNA اسپرم های موش در سامانه اکسیداسیونی رادیکال های هیدروکسیل[5]

جهت بررسی توانایی پپتید های مهیاوه بر جلوگیری از آسیب DNA اسپرم های موش تحت تاثیر رادیکال های هیدروکسیل، ابتدا بافت بیضه از ناحیه اسکروتوم خارج و قسمت دم (اپیدیدیم) که محل تجمع اسپرم هاست از سایر قسمت‌ها جدا و در داخل ۱ میلی‌لیتر محیط کشت Ham's F10 قرار داده شد و درون انکوباتور دی اکسید کربن ٦ درصد با دمای ۳٦ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. بعد از سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه مایع رویی برداشته شد و پلیت اسپرم با محیط کشت جدید آمیخته شد. جهت انجام آزمایش، مقدار ۲۰ میکرولیتر محلول اسپرم موش، ۲۰ میکرولیتر پپتید، ۲۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (۱ میلی مول) و ۲۰ میکرولیتر سولفات آهن (۰/۵ میلی مول) به ترتیب ریخته شده به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ گردیدند. سپس نمونه ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند. نمونه های کنترل (شامل فقط سلول های اسپرم) و بلانک (شامل سلول های اسپرم + پراکسید هیدروژن و سولفات آهن) نیز تهیه گردیدند. جهت بررسی DNA شکسته و یا تک‌رشته‌ای از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنژ استفاده گردید. در این روش، DNA های سالم به رنگ سبز، DNA های دو رشته‌ای ناپیوسته به رنگ زرد و DNA های تک‌رشته‌ای (SSD) با رنگ قرمز مشخص می باشند. برای تشخیص و ارزیابی اسپرم‌های زنده از اسپرم های مرده، رنگ‌آمیزی ائوزین-نکروزین مورداستفاده قرار گرفت. در این روش در اثر آسیب به غشا پلاسمایی، اسپرم‌ها نسبت به رنگ مذکور نفوذپذیر می‌شوند. لذا آن دسته از اسپرم‌هایی که هرکدام از قطعات سر، گردن و یا دم آن‌ها رنگ گرفت به عنوان اسپرم‌های مرده می باشند [۱٦].

۲-٦- تعیین فعالیت ضد دیابت سس مهیاوه

۲-٦-۱- تعیین فعالیت بازدارندگی آلفا-گلوکوسیداز

فعالیت ممانعت کنندگی آنزیم آلفا-گلوکوسیدازی عصاره پپتیدی با استفاده از روش Yu و همکاران [۱۷] انجام شد. آلفا-گلوکوسیداز مخمر در بافر فسفات ۰/۱ میل مول (پی اچ ٦/۸) بعنوان منبع آنزیم استفاده گردید. سوبسترا p-نیتروفنول α-گلیکوزیداز در غلظت ۱۰ میلی مول در بافر فسفات ۰/۱ مول (پی

5. Hydroxyl radical oxidizing system (HROS)

اچ ٦/۸) حل گردید. ۲۵۰ میکرولیتر نمونه با ۱۵۰ میکرولیتر محلول آنزیمی به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. بعد از آن، ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا اضافه و مخلوط برای ۵ دقیقه دیگر در دمای اتاق نگهداری شد. با افزودن ۱ میلی لیتر محلول کربنات سدیم ۰/۲ مول واکنش متوقف گردید و جذب نمونه ها در طول موج ٤۰۵ نانومتر قرائت شد. درصد بازدارندگی فعالیت آنزیم توسط فرمول زیر محاسبه گردید:

بازدارندگی فعالیت آلفا-گلوکوسیداز = جذب کنترل – جذب نمونه/جذب کنترل × ۱۰۰.

۲-٦-۲- تعیین فعالیت بازدارندگی آلفا-آمیلاز

فعالیت ممانعت کنندگی آنزیم آلفا-آمیلازی پپتیدهای فرآورده تخمیری مهیاوه با استفاده از روش Yu و همکاران [۱۷] تعیین شد. مخلوط شامل ۸۰ میکرولیتر پپتید با ۲۰ میکرولیتر بافر فسفات ۲۰ میلی مول (٦/۷ میلی مول کلرید سدیم، پی اچ ٦/۹) حاوی آلفا-آمیلاز (0.4 U/ml) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. بعد از آن، ۱۰۰ میکرولیتر نشاسته محلول ۱ درصد تهیه شده در بافر فسفات ۲۰ میلی مول (٦/۷ میلی مول کلرید سدیم، پی اچ ٦/۹) به مخلوط فوق اضافه شد. سپس مخلوط برای مدت ۳ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباسیون شده و بعد ۲۰۰ میکرولیتر محلول رنگی ۳،۵-دی نیتروسالسیلیک اسید اضافه شد. جهت توقف واکنش، لوله ها در آب جوش در حمام آبی برای مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند و سپس توسط آب و یخ سرد شده و جذب نمونه ها در ۵٤۰ نانومتر خوانده شد. درصد بازدارندگی فعالیت آنزیمی توسط فرمول زیر محاسبه گردید:

بازدارندگی فعالیت آلفا-آمیلاز = جذب کنترل – جذب نمونه/جذب کنترل × ۱۰۰.

۲-۷- آنالیز آماری

آنالیز آماری داده ها با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه (two-way ANOVA) انجام و مقایسه بین میانگین ها توسط آزمون چند دامنه ای دانکن انجام شد. از نرم افزار SPSS شماره ۱٦ جهت آنالیز آماری استفاده گردید. معنی داری داده ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < ۰/۰۵$) بررسی گردید.

۳- نتایج

۳-۱- رنج وزن مولکولی پپتید ها در سس مهیاوه

رنج وزن مولکولی پپتید ها در سس مهیاوه به روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون مورد بررسی قرار گرفت. سس مهیاوه حاوی پپتید های با اندازه مختلف و عمدتا کوچک زنجیره بوده است. بیشترین درصد پپتید ها از نوع دی- و تری-پپتید شامل ۲ تا ۳ اسید آمینه و با وزن مولکولی کمتر از ۵۰۰ دالتون بوده اند. اسیدهای آمینه آزاد با وزن مولکولی کمتر از ۱۸۰ دالتون و همچنین درصد پایینی از پپتید هایی با وزن بالاتر از ۵۰۰ تا ۲۰۰۰ دالتون وجود داشتند.

۳-۲- تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی

فعالیت آنتی اکسیدانی مهار رادیکال های آزاد سس مهیاوه و اسید آسکوربیک در شکل ۱ نشان داده شده است. در غلظت ۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر فعالیت آنتی اکسیدانی سس مهیاوه بالاتر از ۷۰ درصد بوده است. قدرت حذف کنندگی اسید اسکوربیک در تمامی غلظت ها حدود ۹۰ درصد بوده است و تفاوتی بین غلظت های مختلف مشاهده نگردید. با این وجود، در غلظت های ۰/٤ تا ۱ میلی گرم در میلی لیتر تفاوتی بین قدرت آنتی اکسیدانی پپتید ها و اسید اسکوربیک مشاهده نشد ($P<۰/۰۵$). غلظتی از پپتید که توانست ۵۰ درصد رادیکال ها را مهار نماید (IC_{50}) معادل ۱۷۹ میکروگرم در میلی لیتر تعیین شد. پپتید ها توانایی بالایی در مهار رادیکال های هیدروکسیل نشان دادند به طوریکه در غلظت ۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر حدود ۷۵ درصد رادیکال ها مهار شدند در حالیکه قدرت آنتی اکسیدانی اسید اسکوربیک به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد تنها حدود ۳۰ درصد بود. حداکثر فعالیت آنتی اکسیدانی (۱۰۰ درصد مهار کنندگی رادیکال ها) در غلظت ۰/٦ میلی گرم در میلی لیتر مشاهده گردید

(P<۰/۰۵). غلظتی از پپتید که توانست ۵۰ درصد رادیکال ها را مهار نماید معادل ۱٤۷ میکروگرم در میلی لیتر تعیین شد.

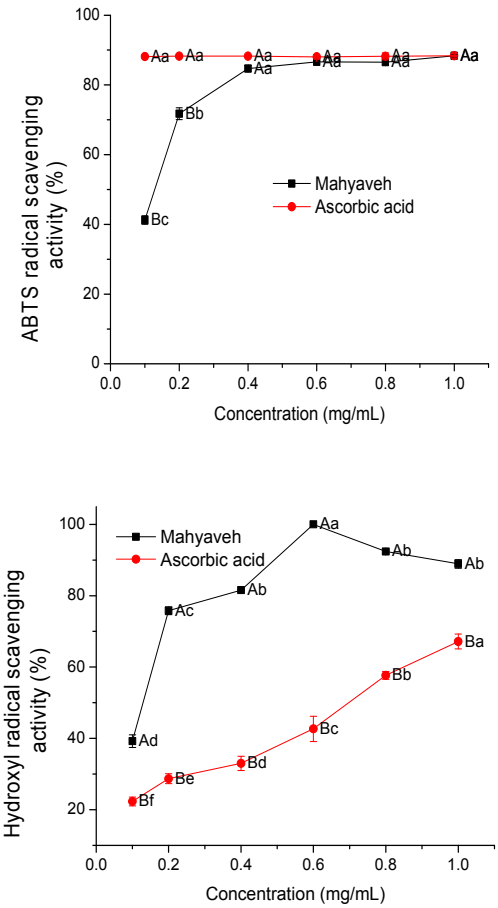


Fig 1 ABTS and hydroxyl radical scavenging activities of aqueous extract from fish sauce (Mahyaveh) and ascorbic acid at different concentrations. The results are Mean ± SD (n = 3). Different superscript small letters on each row indicate the significant differences (P < 0.05).

عصاره پپتیدی مهیاوه همچنین دارای قدرت آنتی اکسیدانی احیاء آهن (FRAP) بود (شکل ۲). قدرت آنتی اکسیدانی FRAP تحت تاثیر غلظت بوده است بطوریکه با افزایش غلظت پپتید ها افزایش یافت و حداکثر قدرت آنتی اکسیدانی در غلظت ۰/۸ میلی گرم در میلی لیتر بوده است و پس از آن افزایش غلظت تاثیری بر فعالیت آنتی اکسیدانی نداشت. فعالیت آنتی اکسیدانی اسید آسکوربیک بالاتر از سس مهیاوه بود.

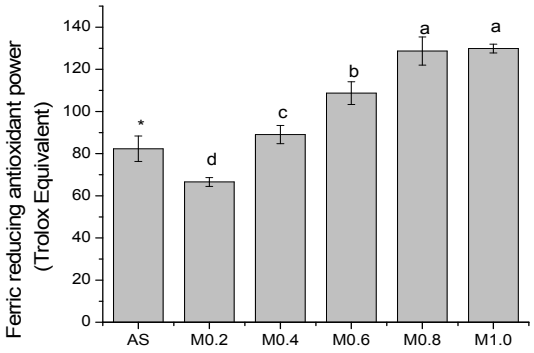
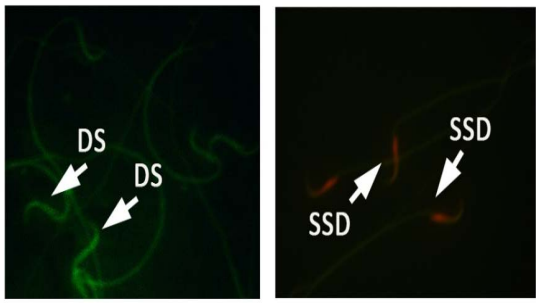


Fig 2 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) of aqueous extract from fish sauce (Mahyaveh) at different concentrations (0.2-1.0 mg/mL) and ascorbic acid (AS, 0.02 mg/mL). The results are Mean ± SD (n = 3). Different superscript small letters indicate the significant differences (P < 0.05).

۳-۳- فعالیت ممانعت کنندگی آسیب DNA

فعالیت آنتی اکسیدانی مهیاوه بر جلوگیری از آسیب DNA اسپرم های موش در محیط اکسید کننده رادیکال های هیدروکسیل مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). بعد از قرار گیری سلول های اسپرمی موش در کنار رادیکال های هیدروکسیل، بالاترین میزان تشکیل DNA های تک‌رشته‌ای (SSD) در حدود ۷۰ درصد مربوط به نمونه بلانک (فاقد مهیاوه) بوده است که نشان دهنده بیشترین آسیب DNA بود. در بین نمونه های دارای رادیکال هیدروکسیل، کمترین آسیب DNA مربوط به غلظت های ٤۰۰ و ٦۰۰ میکروگرم در میلی لیتر پپتید های مهیاوه بوده است. نمونه کنترل (فاقد رادیکال) کمترین آسیب را نشان داد. همچنین توانایی پپتیدها بر زنده مانی اسپرم ها در سامانه اکسیداسیونی تحت تاثیر غلظت پپتید ها قرار گرفت بطوریکه در غلظت ٤۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بالاترین درصد زنده مانی مشاهده شد. کمترین درصد زنده مانی مربوط به نمونه بلانک بوده است.



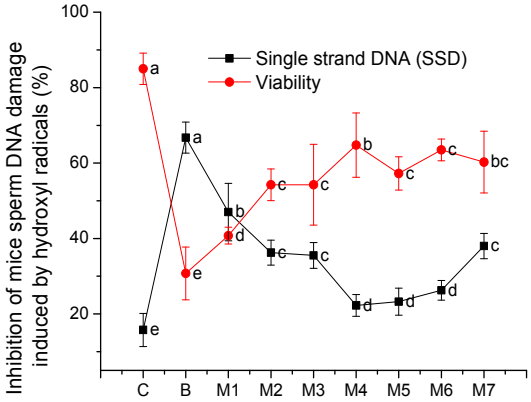


Fig 3 Fluorescent staining for DNA integrity: the normal sperms (double-strand, DS) are presented with light green DNA and the sperms with damaged DNA (single-strand, SSD) are marked with light red stained DNA (1000×). Sperm viability was determined using eosin–nigrosin staining. C: control (Sp); B: blank (Sp + R); M1: (Sp + R + M 20 µg/ mL); M2: (Sp + R + M 50 µg/ mL); M3: (Sp + R + M 100 µg/ mL); M4: (Sp + R + M 200 µg/ mL); M5: (Sp + R + M 400 µg/ mL); M6: (Sp + R + M 600 µg/ mL); M7: (Sp + R + M 1000 µg/ mL). Sp: sperms; R: hydroxyl radicals; M: Mahyaveh. All data are presented in Mean ± SD (n = 4). Different small letters on columns are representing significant differences (P<0.05).

٤-۳- تاثیر بازدارندگی فعالیت آنزیم های آلفا-گلوکوسیداز و آلفا-آمیلاز

تاثیر ضد دیابت سس مهیاوه از طریق بازدارندگی فعالیت آنزیم های تجزیه کننده کربوهیدرات مورد بررسی قرار گرفت (شکل ٤). پپتید های سس مهیاوه فعالیت بالایی در مهار آنزیم آلفا-گلوکوسیداز با IC_{50} حدود ٢٤ میکروگرم در میلی لیتر داشتند در حالیکه IC_{50} برای آکاربوز در حد ٦٩/٤ میکروگرم در میلی لیتر بود. همچنین پپتید های مهیاوه دارای فعالیت بازدارندگی آنزیم آلفا-آمیلاز قابل مقایسه با آکاربوز بوده اند (IC_{50} به ترتیب ٢٠/٣٩ و ٢٠ میکروگرم در میلی لیتر).

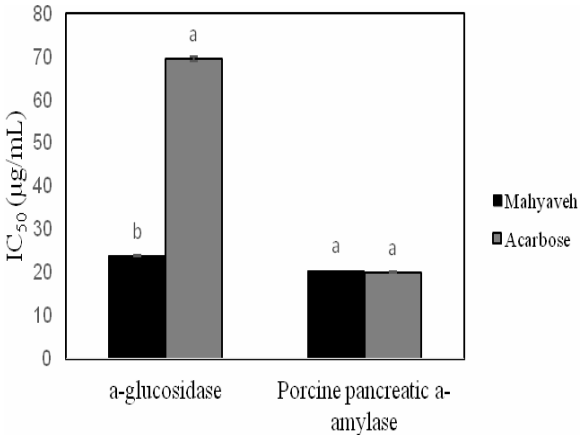


Fig 4 IC_{50} (µg/mL) values for α-glucosidase and porcine pancreatic α-amylase inhibitory activities of Mahyaveh and Acarbose. Data are presented as IC_{50} (µg/mL).

٤- بحث

در این مطالعه عملکرد زیستی سس مهیاوه شامل فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد دیابت مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه بررسی رنج وزن مولکولی پپتید ها در سس مهیاوه نشان داد که پپتید ها عمدتا از نوع دی- و تری-پپتید دارای ۲ یا ۳ اسید آمینه و با وزن مولکولی کمتر از ۵۰۰ دالتون بوده اند. به طور کلی، طی زمان تخمیر تجزیه پروتئین توسط آنزیم های هضمی و آنزیم های میکروارگانیسم های نمک دوست سبب تولید پپتید هایی با اندازه های مختلف و همچنین اسید های آمینه آزاد می شود. این امر به نوبه خود سبب افزایش ویژگی فراسودمندی در فرآورده می شود [۹]. نتایج مشابه توسط Kleekayai و همکاران [۱۸] نیز گزارش شد بطوریکه بیش از ۹۰ درصد پپتید ها در فرآورده تخمیری میگو دارای متشکل از ۲ تا ۳ اسید آمینه و وزن مولکولی کمتر از ۵۰۰ دالتون بودند. نتیجه این مطالعه نشان داد که پپتید های با اندازه عمدتا کوچک طی تخمیر ساردین در مهیاوه تحت عملکرد آنزیمی تولید گردیدند.

فعالیت مهار رادیکال های آزاد سس مهیاوه از طریق مهار رادیکال های آزاد ABTS و هیدروکسیل سنجش گردید. پپتید های سس

مهیاوه فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی در مهار رادیکال های ABTS داشته اند بطوریکه در غلظت ۰/٤ تا ۱ میلی گرم قدرت آنتی اکسیدانی برابر با اسید آسکوربیک بوده است. فعالیت حذف رادیکال های ABTS توسط یک ترکیب آنتی اکسیدانی به توانایی آن ماده در دادن اتم هیدروژن یا یک الکترون به رادیکال آزاد و تبدیل آن به گونه رادیکال غیر واکنشی می باشد [۳]. نتیجه این مطالعه نشان داد که پپتید های کوچک زنجیره با ترکیب خاص در فرآورده مهیاوه طی زمان تخمیر تولید گردیده و توانایی بالا در مهار رادیکال های آزاد از خود نشان دادند. پپتید های تولید شده پس از تخمیر در مهیاوه توانایی بالایی در مهار رادیکال های هیدروکسیل از خود نشان دادند. در مطالعات پیشین نشان داده شده که پپتید های سس میگو [۱۹] و ماسل آبی [۲۰] نیز توانایی آنتی اکسیدانی بالایی در مهار رادیکال های هیدروکسیل داشتند. Ohata و همکاران [۲۱] گزارش نمودند که سس ماهی بادکنکی دارای بالاترین فعالیت مهار رادیکال های هیدروکسیل (۸۸/٦ درصد) در بین هفت نوع سس بررسی شده بوده و بعد از آن سس تخمیری گوشت قرار داشته است (٦۱/۲ درصد). این محققین بیان داشتند که پپتید های آنتی اکسیدانی در هفته ۲٤ تخمیر به میزان زیادی تولید گردیده و در حذف رادیکال های هیدروکسیل شرکت می نمایند. رادیکال های هیدروکسیل یکی از مهم ترین رادیکال های واکنشگر اکسیژنی بوده که در فرآیند استرس اکسیداتیو سیستم های غذایی و زیستی شرکت می نمایند. پپتید های با توانایی مهار رادیکال های هیدروکسیل ممکن است مولکول های بدن انسان را در برابر اثرات مضر ناشی از این رادیکال ها محافظت نمایند [۳]. همچنین پپتید ها در سس مهیاوه فعالیت آنتی اکسیدانی FRAP از خود نشان دادند. در فرآورده تخمیری سفالوتوراکس میگوی سفید (*Litopenaeus vannamei*) با نام مونگ اونگ نیز قدرت آنتی اکسیدانی FRAP گزارش گردید [۲۲]. روش FRAP قدرت کاهندگی کمپلکس TPTZ–Fe(III) را به کمپلکس آبی رنگ آهن فروس TPTZ–Fe(II) را توسط آنتی اکسیدان در یک محیط اسیدی سنجش می نماید [۳]. نتیجه نشان داد که فرآورده مهیاوه دارای پپتید های زیست فعال بوده که می توانند نقش دهندگی الکترون به رادیکال های آزاد را داشته و واکنش زنجیره ای را متوقف نمایند.

توانایی پپتید های سس مهیاوه در جلوگیری از آسیب DNA سلول های اسپرم موش تحت اثر رادیکال های هیدروکسیل در مدل زیستی مورد مطالعه قرار گرفت. گونه های واکنشی اکسیژن از جمله رادیکال های هیدروکسیل سبب آسیب DNA از طریق تشکیل DNA های تک رشته ای می شوند. اگرچه طول عمر رادیکال های هیدروکسیل کم می باشد ولی این رادیکال ها بسیار واکنشی می باشند [۲۳]. قرار دادن اسپرم های موش در معرض رادیکال های هیدروکسیل تولی شده طی واکنش فنتون نشان داد که این سلول ها بسیار آسیب پذیر بوده و درصد تشکیل DNA های تک رشته ای در آنها افزایش معنی دار در مقایسه با نمونه های حاوی پپتید یافت ضمن اینکه درصد زنده مانی این اسپرم ها کاهش یافت. پپتید های سس مهیاوه در غلظت های بررسی شده توانستند از آسیب سلول های اسپرم موش جلوگیری نمایند و بهترین نتیجه از غلظت های ٤۰۰ تا ٦۰۰ میکروگرم بدست آمد. این نتیجه نشان داد که در مدل زیستی بررسی شده پپتید ها توانایی آنتی اکسیدانی قابل توجهی در جلوگیری از آسیب DNA داشته اند.

ممانعت از فعالیت آلفا–آمیلاز و آلفا–گلوکوسیداز (دو آنزیم هضم کننده کربوهیدراتها) نقش به سزایی در جلوگیری از افزایش قند خون بعد از مصرف غذا و در نتیجه آن یکی از راهکارهای سازنده در مدیریت قند خون در بیماران مبتلابه دیابت نوع ۲ می باشد [٦]. در این خصوص، اهمیت پروتئین های مواد غذایی به دلیل عملکرد فراسودمندی پپتید های آنها مورد توجه قرار گرفته است. پپتید های زیست فعال از منشاء پروتئین مواد غذایی مختلف توانستند سبب کاهش فعالیت آنزیم های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوسیداز شوند [۱۷]. در این مطالعه نشان داده شد که پپتید های مهیاوه توانستند از فعایت آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوسیداز در غلظت های پایین در مقایسه با آکاربوز جلوگیری نمایند. فعالیت مهار آلفا–گلوکوسیداز بتا–لاکتوگلوبولین و پروتئین هیدرولیز آب پنیر (پروتئین وی) در غلظت ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر به ترتیب ۳۳ و ۳٦ درصد گزارش گردید [۲٤]. از هیدرولیز عضله ساردین پپتید مهار کننده آلفا–گلوکوسیداز با توالی والین–تیروزین و IC_{50} معادل ٦/۹ میلی گرم در میلی لیتر و تترا پپتید تیروزین–تیروزین–پرولین–لوسئین با IC_{50} معادل ۲/۱ میلی گرم در میلی لیتر گزارش شد [۲۵]. مکانیسم دقیق

فعالیت بازدارنگی پپتید ها بر آنزیم آلفا-گلوکوسیداز مشخص نیست ولی پیشنهاد شده که ترکیبات غیر ساکاریدی ممکن است از طریف اتصال با ناحیه فعال آنزیم از طریق برهم کنش های هیدروفوبیک فعالیت بازدارندگی خود را اعمال نمایند.

۵- نتیجه گیری

این مطالعه برای اولین بار فعالیت زیستی پپتید های سس مهیاوه را از طریق سنجش فعالیت های آنتی اکسیدانی و ضد دیابت مورد بررسی قرار داد. سس مهیاوه غنی از پپتید های با وزن مولکولی کمتر از ۵۰۰ دالتون و از نوع دی- و تری-پپتید بوده است. پپتید ها توانایی بالا در مهار رادیکال های آزاد و قدرت احیاء آهن از خود نشان دادند و توانستند در مدل زیستی از آسیب به DNA سلول های اسپرم موش توسط رادیکال های هیدروکسیل جلوگیری نمایند. توانایی ضد دیابت پپتید های سس مهیاوه در ممانعت از فعالیت های آنزیم های آلفا-گلوکوسیداز و آلفا-آمیلاز در مقایسه با داروی مصنوعی آکاربوز قابل توجه بود. نتیجه این مطالعه نشان داد که فرآورده تخمیری سس مهیاوه غنی از پپتید های زیست فعال بوده و می تواند به عنوان فرآورده غذایی فراسودمند مورد استفاده قرار گیرد. مطالعات تکمیلی در رابطه با خالص سازی و شناسایی پپتید ها توسط مولفین در دست انجام است.

٦- منابع

[1] Gabrielsson, B., Andersson, N., and Undeland, I. (2014). Influence of fish consumption and some of its individual constituents on oxidative stress in cells, animals, and humans. In H. G. Kristinsson (Ed.), *Antioxidants and functional components in aquatic foods* (pp. 175–217).West Sussex: JohnWiley & Sons, Ltd.

[2] Kim, S., and Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine derived bioactive peptides: A review. Journal of Functional Foods, 2, 1–9.

[3] Shahidi, F., and Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. Journal of Functional Foods, 18, 757–781.

[4] Li-Chan, E.C.Y. (2015). Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. Current Opinion in Food Science, 1, 28–37.

[5] Zhang, L., Hogan, S., Li, J., Sun, S., Canning, C., Zheng, S. J., and Zhou, K. (2011). Grape skin extract inhibits mammalian intestinal α-glucosidase activity and suppresses postprandial glycemic response in streptozocin-treated mice. Food Chemistry, 126, 466-471.

[6] Patil, P., Mandal, S., Tumar, S., & Anand, S. (2015). Food protein‐derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes. European Journal of Nutrition, doi: 10.1007/s00394-015-0974-2.

[7] Bhandari, M. R., Jong-Anurakkun, N., Hong, G., and Kawabata, J. (2008). α-Glucosidase and α-amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.). Food Chemistry, 106, 247-252.

[8] Tanasupawat, S., and Visessanguan, W. (2014). Fish fermentation. In Boziaris, I.S. (Ed.), *Seafood Processing: Technology, Quality and Safety* (pp. 177-207). West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd.

[9] Martínez-Álvarez, López-Caballero, Gómez-Guillén, and Montero, P. (2017). Fermented seafood products and health. In J. Frías, C. Martínez-Villaluenge, E. Peñas (Eds.), *Fermented Foods in Health and Disease Prevention* (pp. 177-202). Academic Press, Elsevier Inc.

[10] Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W.K., Je, J.Y., and Kim, S.K. (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. Food Research International, 38, 175–182.

[11] Faithong, N., Benjakul, S., Phatcharat, S., and Binsan, W. (2010). Chemical composition and antioxidative activity of Thai traditional fermented shrimp and krill products. Food Chemistry 119, 133–140.

[12] Gornall, G., Bardawill, C., and David, M. (1949). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. Journal of Biological Chemistry, 177, 751–766.

[13] Senphan, T., and Benjakul, S. (2014). Antioxidative activities of hydrolysates from

seabass skin prepared using protease from hepatopancreas of Pacific white shrimp. Journal of Functional Foods, 6, 147–156.

[14] Wang, B., Gong, Y. D., Li, Z. R., Yu, D., Chi, C. F., and Ma, J. Y. (2014). Isolation and characterisation of five novel antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of spotless smoothhound (*Mustelus griseus*) muscle. Journal of Functional Foods, 6, 176–185.

[15] Benzie, I.F. and Strain, J.J., (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239, 70-76.

[16] Rezazadeh-Reyhani, Z., Razi, M., Malekinejad, H., and Sadrkhanlou, R. (2015). Cytotoxic effect of nanosilver particles on testicular tissue: Evidence for biochemical stress and Hsp70-2 protein expression. Environmental Toxicology and Pharmacology, 40, 626–638.

[17] Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Yu, Y., Liu, B., Liu, J., and Chen, F. (2011). Novel peptides derived from egg white protein inhibiting alpha-glucosidase. Food Chemistry, 129, 1376-1382.

[18] Kleekayai, T., Harnedy, P.A., O'Keeffe, M.B., Poyarkov, A.A., CunhaNeves, A., Suntornsuk, W., & FitzGerald, R.J. (2015). Extraction of antioxidant and ACE inhibitory peptides from Thai traditional fermented shrimp pastes. *Food Chemistry,* 176, 441–447.

[19] Sachindra, N.M., and Bhaskar, N. (2008). In vitro antioxidant activity of liquor from fermented shrimp biowaste. Bioresource Technology, 99, 9013–9016.

[20] Ohata, M., Uchida, S., Zhou, L., and Arihara, K. (2016). Antioxidant activity of fermented meat sauce and isolation of an associated antioxidant peptide. Food Chemistry, 194, 1034–1039.

[21] Jung, W.K., Rajapakse, N., and Kim, S.K. (2005). Antioxidative activity of a low molecular weight peptide derived from the sauce of fermented blue mussel, Mytilus edulis. European Food Research and Technology, 220:535–539.

[22] Benjakul, S., Binsan, W., Visessanguan, W., and Tanaka, M. (2009). Effects of flavourzyme on yield and some biological activities of Mungoong, an extract paste from the cephalothorax of white shrimp. Journal of Food Science, 74, S73-S80.

[23] Chandrasekara, A., & Shahidi, F. (2011). Bioactivities and antiradical properties of millet grains and hulls. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 9563–9571.

[24] Lacroix, I.M.E., & Li-Chan, E.C.Y. (2013). Inhibition of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV and α-glucosidase activities by pepsin-treated whey proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61, 7500−7506.

[25] Matsui, T., Oki, T., and Osajima, Y. (1999). Isolation and identification of peptidic α-Glucosidase inhibitors derived from sardine muscle hydrolysate. Z. Naturforsch, 54, 259-263.

Antioxidant activity, DNA protecting effect, α-glucosidase and α-amylase inhibitory activities of bioactive peptides from traditional fermented sardine sauce

Boostani Mavi, Y. [1], Nikoo, M. [2*], Atashbar, B. [3], Ahmadi Gavlighi, H. [4]

1. MSc, Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia, West Azerbaijan
2. Assistant professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, West 2. Azerbaijan; Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia, West Azerbaijan
3. Assistant professor, Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia, West Azerbaijan
4. Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran

(Received: 2017/04/14 Accepted: 2017/06/04)

In this study antioxidant activity, protection of mice sperm's DNA from oxidative damage resulting from hydroxyl radicals and anti-hyperglycemic capacity of Iranian traditional fermented fish sauce made from sardine (mahyaveh) was determined. The traditional fish sauce exhibited high antioxidant activity in scavenging ABTS and hydroxyl free radical with IC_{50} values of 179 and 147 µg/mL as well as ferric reducing antioxidant power (FRAP). The traditional product effectively inhibited mice sperm's DNA from oxidation induced by hydroxyl radicals as evidenced by lowering the formation of single stranded DNA with the coincidental higher viability in sperm cells ($P<0.05$). The traditional fish sauce inhibited α-glucosidase and α-amylase activities with IC_{50} values of 23.76 and 20.39 µg/mL, respectively which was comparable to that of trapeutic drug, acarbose. This study revealed that traditional fermented mahyaveh sauce was rich in bioactive peptides generated during fermentation and can be used as functional foods with antioxidant and anti-hyperglycemic activities.

Keywords: Antioxidant activity, Anti-diabetic activity, DNA protecting effect, Bioactive peptides, Mahyaveh

* Corresponding Author E-Mail Address: m.nikoo@urmia.ac.ir