DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.4.5
مقاله پژوهشی، صفحات: ۷۷-۶۳

مقایسه *In silico* پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از آنزیم روبیسکو سه ریزجلبک با پروتئین‌های متداول مصرفی

لیلا زرندی میاندوآب*، سیده فهیمه رضوی، فرشاد پوریوسف و نادر چاپارزاده

ایران، تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۸

چکیده

امروزه پپتیدهای زیست فعال یکی از ابزارهای مهم در بهبود سلامت انسان هستند. پروتئین‌های ریزجلبکی شاید بتوانند جایگزین خوبی به جای منابع گران‌قیمت مانند گوشت و شیر به‌عنوان پیش‌ساز تولید پپتیدهای زیست فعال باشند. RuBisCO یک آنزیم هگزادکامریک است که از هشت زیر واحد بزرگ و هشت زیر واحد کوچک تشکیل شده است و ۲ تا ۱۰ درصد از کل پروتئین سلولی را تشکیل می‌دهد. **روش:** پروتئین RuBisCO متعلق به سه ریزجلبک (*Spirulina*) *Arthrospira plantensis*، *Dunaliella salina*، *Haematococcus pluvialis*) به‌صورت *in silico* هضم آنزیمی شد. خواص آنتی اکسیدانی، مهار آنزیم مبدل آنژیوتانسین و دیپپتیدیل پپتیداز -۴ و فعال‌سازی پروتئولیز با واسطه یوبیکوتین پپتیدهای حاصله با محصولات پپتیدی پروتئین‌های متداول مانند گوشت و شیر با استفاده از پایگاه های اطلاعاتی بیوانفورماتیکی مختلف مانند BIOPEP، ProtParam، PeptiDeranker، Pepcalc و ToxinPred مقایسه شد. طیف وسیعی از پپتیدهای فعال زیستی با قابلیت‌های متعدد طی هضم زیرواحدهای بزرگ و کوچک RuBisCO با آنزیم‌های گوارشی انسانی، گیاهی و میکروبی پیش‌بینی شد. نتایج موید رتبه‌بندی بالا و سمیت پایین پپتیدهای مشتق از RuBisCO در مقایسه با پپتیدهای مشتق از پروتئین‌های گوشت و شیر است. به‌نظر می‌رسد که پپتیدهای فعال مشتق از RuBisCO از ریزجلبک‌ها عملکرد خوبی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان، ضد سرطان، ضدحساسیت و ضد آترواسکلروتیک دارند. این برتری به ترکیب اسیدآمینه‌های آن مربوط است. احتمالاً تهیه یک محصول، متشکل از پپتیدهای حاصل از آنزیم RuBisCO سه ریزجلبک، مکمل غذایی مناسبی برای پیشگیری و درمان برخی بیماری‌ها باشد.

واژه های کلیدی: پپتیدهای فعال‌زیستی، آنزیم روبیسکو، ریزجلبک، ارتقاء سلامت.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱۳۳۸۱۶۸۵۶ ، پست الکترونیکی: zarandi@azaruniv.ac.ir

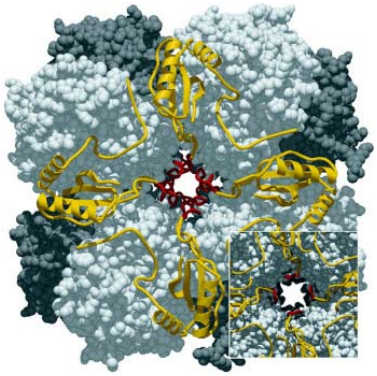
مقدمه

به گواهی اولین سند پزشکی موجود از تمدن بشری، *کتاب سینوهه پزشک مصری*، از ابتدای شکل‌گیری تاریخ تاکنون انسان به ارتباط مستقیم بین سلامتی و تغذیه پی‌برده است. منابع تغذیه انسان از مجموعه بزرگی شامل موجودات گیاهی و جانوری تشکیل شده است. از آنجا که به فرمایش امام صادق (ع) «غذای تو، دوای تو باید باشد» همیشه بشر سعی در استفاده از غذاهای مفیدتر و موثرتر در امر بهبود سلامت و درمان داشته است. گیاهان و جلبک‌ها به‌عنوان موجودات فتوسنتز کننده که قادر به بیوسنتز طیف وسیعی از ترکیبات و متابولیت‌های ثانویه، علاوه بر متابولیت‌های اولیه، هستند در این امر که نقش دارو داشته باشند، پیش-قدم هستند. اخیراً علاوه بر اثرات مفید ترکیبات مذکور موجود در زیست توده‌های گیاهی و جانوری، که به روش‌های مختلف مورد استفاده انسان قرار می‌گیرند، ترکیبات نوظهوری به نام "زیست فعال" مورد توجه قرارگرفته‌اند.

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.4.5
مقاله پژوهشی، صفحات: ۷۷-۶۳

تاکنون ترکیبات زیست فعال زیادی از ماکروبیومولکول‌ها مثل انواع پروتئین و لیپیدها گزارش شده است، با این وجود ترکیبات مشتق شده از پروتئین‌ها جزء مهم‌ترین و متداول‌ترین انواع مورد مطالعه هستند (۳۶). همچنین در سال‌های اخیر، چندین مطالعه بر روی تولید و تشخیص عملکرد پپتیدهای حاصل از پروتئین‌های رژیم غذایی و استفاده از این پپتیدها به‌عنوان عوامل عملکردی و فعالیت-های مشابه دارو متمرکز شده است (۳۹). پپتیدها در توالی اسیدآمینه پروتئین والد غیرفعال هستند ولی می‌توانند پس از آزادسازی توسط پروتئازها و پپتیدازهای درون‌زا و برون‌زا در طی هضم فیزیولوژیکی یا فرآوری موادغذایی مانند تخمیر و فرآوری گوشت فعال شوند (۴۰). بسته به توالی اسیدهای‌آمینه، اندازه مولکولی، بار خالص و شکل فضایی، پپتیدهای زیست فعال می‌توانند فرآیندهای متابولیکی متنوع را در سیستم ایمنی، قلبی عروقی، دستگاه گوارش و عصبی تنظیم کنند (۲۰).

ریبولوز ۱و۵ بیس فسفات کربوکسیلاز / اکسیژناز (RuBisCO) آنزیم اصلی در فتوسنتز و تنفس نوری در گیاهان و ارگانیسم‌های فتوسنتزی دیگر شامل باکتری‌ها و جلبک‌ها است (۳۹). این آنزیم به‌عنوان فراوان‌ترین پروتئین زمین، با تخمین سهم بیش از نیمی از کل پروتئین-های محلول در برگ گیاهان، معرفی شده است. ساختار پروتئینی روبیسکو متشکل از هترو هگزادکامر (شکل ۱) با وزن ۵۴۰ کیلودالتون است که ۸ زیر واحد بزرگ با وزن (هر زنجیره ۵۰ تا ۵۵ کیلودالتون) و ۸ زیر واحد کوچک با وزن (هر زنجیره ۱۲ تا ۱۸ کیلودالتون) دارد (۴). بنابراین، روبیسکو می‌تواند یک منبع جذاب و پایدار از پپتیدهای زیست‌فعال باشد (۴۱). این آنزیم گیاهی در مرحله محدود کننده چرخه کالوین، دی‌اکسیدکربن بیوسفر را به کربن آلی تبدیل می‌کند. این واکنش به طور خاص کربوکسیلاسیون دی ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات را کاتالیز می‌کند تا یک ماده ۶ کربن ناپایدار ایجاد کند (۳۳).



شکل ۱- ساختار کلی روبیسکو از *Chlamydomonas reinhardtii*، نما از سمت پایین است. ۴ تا از زیر واحدهای بزرگ (L) با رنگ خاکستری تیره و ۴ تای دیگر با رنگ خاکستری روشن نشان داده شده است. زیر واحدهای کوچک (S) به رنگ زرد نشان داده شده‌اند. حلقه‌های βA-βB زیر واحد کوچک به رنگ قرمز نشان داده شده‌اند. قسمت نمای نزدیک سمت راست پایین شکل، محل حلقه‌های زیر واحد کوچک اسفناج را نشان می‌دهد (۳۷).

جلبک‌های تک‌سلولی و چندسلولی برای تولید پپتیدهای فعال زیستی به دلیل مقدار قابل توجه پروتئین (تقریباً ۱۵٪ تا ۴۷٪ وزن خشک) گزینه‌های بسیار باارزشی هستند (۱۶). لازم به ذکر است که زیست توده جلبک دارای تعداد زیادی اسیدآمینه ضروری و بقایای اسیدآمینه‌هایی است که در پروتئین‌ها دیده نمی‌شوند (۶). با این وجود، اکثر جلبک‌ها دارای دیواره سلولی سفت و سختی هستند که جداسازی پروتئین‌های درون سلولی را با مشکل مواجه می کند. بنابراین، محققان روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی را در این جهت بررسی می‌کنند. با این حال، هنوز چالش‌های زیادی در مورد استفاده از پپتیدهای فعال قبل از ورود به آزمایشات بالینی وجود دارد. مدل‌سازی محاسباتی مفصلی برای کشف ساختار و روابط عملکردی قطعات پپتیدی از ریزجلبک‌ها مورد نیاز است (۳۵).

ابزارها و پایگاه‌های بیوانفورماتیکی به‌عنوان یک استراتژی قدرتمند برای صرفه‌جویی در هزینه و وقت، همچنین توانمند در استخراج گسترده پپتیدهای فعال زیستی از پیش‌سازهای انواع پروتئین و کشف سیستم‌های پروتئولیتیک کارآمد برای آزادسازی آن‌ها در چند سال اخیر

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.4.5 مقاله پژوهشی، صفحات: ۷۷-۶۳

بسیار مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۲۱). هدف از این مطالعه تجزیه و تحلیل توالی اسیدآمینه‌های زیرواحد بزرگ و کوچک پروتئین روبیسکو موجود در ریزجلبک‌های *Dunaliella salina*، *Spirulina*، *Haematococcus pluvialis* و مقایسه میزان و تنوع عملکرد پپتیدهای زیست‌فعال موجود در آن‌ها با پپتیدهای زیست‌فعال موجود در پروتئین‌های مصرفی روزانه سبد غذایی انسان شامل: گلوبولین سویا، آلبومین تخم‌مرغ، بتاکازئین شیر، بتالاکتوگوبولین و میوزین گوشت گاو توسط ابزارهای بیوانفورماتیکی بود.

مواد و روشها

توالی زیرواحدهای بزرگ و کوچک پروتئین روبیسکو در ریزجلبک‌ها و توالی پروتئین‌های مصرفی روزانه: توالی زیرواحدهای بزرگ و کوچک پروتئین روبیسکو در ریزجلبک‌های *Dunaliella salina* به ترتیب با کدهای دسترسی (D0FXZ7 و Q5XR40) و *Spirulina* (D4ZVW7 و D4ZVW5) و *Haematococcus pluvialis* (B7U6F7 و A0A699Y6H1) و همچنین توالی پروتئین‌های مصرفی روزانه شامل Soy Globulin، Egg Albumin، Bovine Beta Casein، Bovine Lactoglobulin، Bovine Myosin Heavy Chain به ترتیب با کدهای دسترسی P13917، P01012، P02666، P0275، Q9BE40 از پایگاه داده UniProtKB/Swiss-Prot به آدرس (www.uniprot.org) به دست آمد.

فراوانی وقوع پپتید های زیست فعال در زیر واحد های روبیسکو ریزجلبک‌ها و پروتئین‌های مصرفی روزانه: اگر متصور شویم "N" تعداد کل باقی‌مانده اسیدهای آمینه در پروتئین و "a" نشان دهنده تعداد پپتیدهای فعال زیستی پنهان در یک توالی پروتئینی باشد، آنگاه فراوانی وقوع قطعات پپتیدی زیست فعال در توالی اولیه (A) در هر زیر واحد روبیسکو و همچنین پروتئین های سبد غذایی روزانه را از طریق پایگاه BIOPEP می‌توانیم به‌عنوان $A = a / N$ گزارش کنیم (۱۱). در این مطالعه فعالیت‌های زیستی مرتبط با سلامت انسان شامل توانایی مهار Angiotensin-converting enzyme (ACE)، Dipeptidyl peptidase 4 و همچنین فعالیت Antioxidative و Activating ubiquitin-mediated proteolysis، مورد بررسی قرار گرفت. برای هر فعالیت زیستی، مقادیر A برای زیر واحدهای روبیسکو در ریزجلبک‌ها و پروتئین‌های مصرفی روزانه مقایسه و نتایج در جدول ۱ ارائه شد.

فعالیت های زیستی و تجزیه پروتئین به وسیله انواع آنزیم: آنزیم‌های پروتئازی گوارشی مانند کیموتریپسین، تریپسین و پپسین و همچنین آنزیم‌های میکروبی و گیاهی برای هیدرولیز روبیسکو انتخاب شد. فراوانی وقوع قطعات با فعالیت معین توسط آنزیم‌ها (A_E) و فراوانی نسبی وقوع قطعات با فعالیت داده شده توسط آنزیم‌ها (W) به صورت $W = A_E/A$ محاسبه و نتایج در جدول های ۲و۳ ارائه شد.

تجزیه و تحلیل in silico ترکیب اسید آمینه پروتئین‌های مورد آزمایش: ترکیبات اسیدآمینه توالی پروتئین روبیسکو ریزجلبک‌ها و پروتئین‌های مصرفی روزانه انتخاب شده با استفاده از ابزار ProtParam به آدرس (http://web.expasy.org/protparam) تعیین شد. ابزار ProtParam یک برنامه تجزیه و تحلیل in silico است که خواص فیزیکو شیمیایی یک پروتئین یا پپتید را از توالی اسیدآمینه‌های آن محاسبه می‌کند (۳۴). مجموع اسیدهای-آمینه، وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک (pI) از پروتئین-های انتخابی نیز مورد بررسی قرار گرفت و نتایج در جدول ۴ ارائه شد.

درخت فیلوژنتیک: درخت فیلوژنتیک رابطه ژنتیکی از UniProt بین زیر واحد بزرگ و کوچک RuBisCO موجود در ریزجلبک‌ها به ترتیب با کدهای دسترسی *Dunaliella salina* (D0FXZ7 و Q5XR40) و *Spirulina* (D4ZVW7 و D4ZVW5) و *Haematococcus pluvialis* (B7U6F7 و A0A699Y6H1) از طریق پایگاه UniProt دریافت شد.

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.4.5 مقاله پژوهشی، صفحات: ۷۷-۶۳

جدول ۱ – میزان وقوع پپتیدهای فعال پنهان در زیر واحدهای روبیسکو را برای فعالیت‌های زیستی انتخاب شده

FOOD PROTEINS	Uniprotkb Swiss-Prot	ACE inhibitor	Activating ubiquitin-mediated proteolysis	Anti inflammatory	Antiamnestic	Antioxidative	Dipeptidyl peptidase iv inhibitor	Hypotensive	Dipeptidyl peptidase iii inhibitor	Hmg-coa reductase inhibitor	Alpha-glucosidase inhibitor
Soy globulin	P13917	0.4239	0.0187	0.0047	0.0094	0.0515	0.6628	*	0.0749	0.0023	0.0094
Egg albumin	P01012	0.0207	0.0078	0.0026	0.0026	0.0959	0.6192	0.0052	0.0803	*	0.0492 2
Bovine beta casein	P02666	0.7354	0.0135	0.0135	0.0493	0.1390	0.8430	*	0.0942	*	0.0538 1
Bovine beta lactoglobulin	P02754	0.5225	0.0225	*	*	0.2697	0.6573	*	0.0955	*	0.0281 5
Bovine myosin heavy chain	Q9BE40	0.4035	0.0144	0.0046	0.0015	0.0697	0.5872	*	0.0717	*	0.0279 6
Microalgae/large subunit											
Dunaliella salina	D0FXZ7	0.4989	0.0189	0.0063	0.0105	0.0842	0.6295	0.0021	0.1116	0.0021	0.0274 7
Spirulina	D4ZVW7	0.4979	0.0168	0.0042	0.0105	0.0924	0.6303	0.0021	0.1092	0.0021	0.0315 4
Haematococcus pluvialis	B7U6F7	0.4958	0.0210	0.0063	0.0105	0.0903	0.6450	*	0.1134	0.0021	0.0273 8
Microalgae/small subunit											
Dunaliella salina	Q5XR40	0.4316	0.0053	0.0053	0.0053	0.0684	0.7000	*	0.0421	0.0053	0.0263 9
Spirulina	D4ZVW5	0.4685	*	0.0180	*	0.0541	0.6577	*	0.0901	*	0.0360 3
Haematococcus pluvialis	A0A699Y6H1	0.4545	0.0160	0.0053	*	0.0856	0.7059	*	0.0642	*	0.0160

*: اطلاعاتی در پایگاه BIOPEP در این خصوص موجود نبود.

جدول ۲ – مقادیر پارامترهای توصیف کننده میزان پیش‌بینی شده اثر مهارکننده ACE قطعات آزاد شده از روبیسکو در *Dunaliella salina*، *Spirulina* و *Haematococcus pluvialis*

Microalgae/large subunit	Uniprotkb swiss-prot	Bromelain	Thermolysin	Papain	Chymotrypsin	Trypsin	Pepsin
Dunaliella salina	D0FXZ7	0.4808	0.4806	0.4806	0.4806	0.4823	0.4804
Spirulina	D4ZVW7	0.4756	0.4753	0.4755	0.4753	0.4767	0.4744
Haematococcus pluvialis	B7U6F7	0.4776	0.4777	0.4777	0.0223	0.4767	0.4766
Microalgae/small subunit							
Dunaliella salina	Q5XR40	0.4185	0.4180	0.4182	0.4184	*	0.4180
Spirulina	D4ZVW5	0.4513	0.4538	0.4512	0.4511	0.4512	0.4514
Haematococcus pluvialis	A0A699Y6H1	0.4351	0.4349	0.4351	0.4351	0.4369	0.4351

*: اطلاعاتی در پایگاه BIOPEP در این خصوص موجود نبود.

جدول ۳ – مقادیر پارامترهای توصیف کننده میزان پیش‌بینی شده اثر مهارکننده DPP4 قطعات آزاد شده از روبیسکو در *Dunaliella salina*، *Spirulina* و *Haematococcus pluvialis*

Microalgae/large subunit	Uniprotkb swiss-prot	Bromelain	Thermolysin	Papain	Chymotrypsin	Trypsin	Pepsin
Dunaliella salina	D0FXZ7	0.6011	0.6014	0.6009	0.6014	0.6000	0.6000
Spirulina	D4ZVW7	0.6019	0.6020	0.6018	0.6016	0.6035	0.6039
Haematococcus pluvialis	B7U6F7	0.6163	0.6162	0.6163	0.6163	0.6165	0.6144
Microalgae/small subunit							
Dunaliella salina	Q5XR40	0.6685	0.6681	0.6684	0.6681	0.6710	0.6710
Spirulina	D4ZVW5	0.6466	0.6461	0.6460	0.6241	*	0.6463
Haematococcus pluvialis	A0A699Y6H1	0.6735	0.6737	0.6734	0.6737	*	0.6753

*: اطلاعاتی در پایگاه BIOPEP در این خصوص موجود نبود.

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.4.5 مقاله پژوهشی، صفحات: ۷۷-۶۳

جدول ۴ – ترکیب اسیدآمینه، وزن مولکولی و پیش بینی تئوری pI پروتئین های انتخاب شده.

	MICROALGAE/LARGE SUBUNIT			MICROALGAE/SMALL SUBUNIT		
Amino acid composition	*Dunaliella salina*	*Spirulina*	*Haematococcus pluvialis*	*Dunaliella salina*	*Spirulina*	*Haematococcus pluvialis*
ALA (A)	43	39	44	20	5	26
ARG (R)	29	29	31	11	7	13
ASN (N)	15	16	13	11	2	8
ASP (D)	26	27	28	7	3	7
CYS (C)	11	11	11	5	3	5
GLN (Q)	12	13	11	13	9	11
GLU (E)	31	34	29	6	10	4
GLY (G)	50	45	49	7	4	6
HIS (H)	15	15	15	0	2	0
ILE (I)	19	23	20	8	5	7
LEU (L)	40	38	38	9	11	9
LYS (K)	23	24	21	10	5	6
MET (M)	11	15	13	6	3	6
PHE (F)	20	25	19	8	6	7
PRO (P)	21	23	23	16	7	11
SER (S)	17	17	18	11	6	20
THR (T)	31	32	30	12	8	10
TRP (W)	8	9	8	4	2	4
TYR (Y)	18	14	18	10	6	9
VAL (V)	35	27	37	16	7	18
Total number of aa	475	476	476	190	111	187
Molecular weight (kda)	52.45	53.27	52.51	21.43	13.08	20.61
Theoretical PI	6.33	6.04	6.32	9.34	6.1	9.45

رتبه‌بندی پپتید: پتانسیل پپتیدهای مهارکننده ACE و DPP4 توسط ابزار PeptideRanker پیش‌بینی و نتایج در جدول‌های ۵ و۶ ارائه شد. این پایگاه یک سرور مبتنی بر وب است که احتمال فعالیت بیولوژیکی یک پپتید را پیش‌بینی می‌کند. این ابزار نمره هر پپتید را در محدوده صفر تا یک ارائه می‌دهد، این اعداد مربوط به احتمال بیشترین و کمترین فعالیت پپتید زیست فعال است (۲۸).

ویژگی های فیزیکو شیمیایی پپتیدها: ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی پپتیدهای مهارکننده ACE و DPP4 مشتق از پروتئین‌های مورد بررسی با استفاده از ابزارهای آنلاین مورد ارزیابی قرار گرفت. وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، بار پپتید در اسیدیته ۷، حلالیت تخمینی این پپتیدها با نرم افزار آنلاین(http://pepcalc.com/) Pepcalc برآورد شد.

پیش‌بینی سمیت پپتیدها: در پیش‌بینی سمیت پپتیدهای مهارکننده ACE و DPP4 مشتق شده از پروتئین‌های مورد بررسی با استفاده از ابزار آنلاین ToxinPred (http://www.imtech.res.in/raghava/toxinpred/index.html) مورد بررسی قرار گرفت. روش پیش‌بینی مبتنی بر support vector machine (SVM) با مقدار آستانه ۰/۰ انتخاب شد. مقدار آستانه (۰/۰) برای جداسازی پپتیدهای سمی و غیرسمی استفاده شد.

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.4.5 مقاله پژوهشی، صفحات: ۷۷-۶۳

جدول ۵ – مقایسه قابلیت مهار AEC (الف) و ضد DPP4 (ب) پپتیدهای حاصل از هضم آنزیمی در پروتئین‌های مصرفی روزانه.

الف ACE INHIBITOR	Chymotrypsin	Trypsin	Pepsin	Thermolysin	Papain	Bromelain
BOVINE BETA CASEIN	PL(0.81),IL (0.39),VY(0.09)	GPFPIIV(0.81), EMPFPK(0.76) AVPYPQR (0.56),VK(0.03)	PL(0.81),IL (0.39),HL(0.37) YQEPVL(0.23)	FP(0.99),LGP(0.78),I PP(0.76)YP(0.73) FPPQS(0.70),VPP (0.51),VRGP(0.40) VM(0.32),LN(0.25),V P(0.23),LEE(0.03)	AF(0.97),PP(0.88),PG (0.87) PL(0.81),AVPYP (0.58),AR(0.39) IL(0.39)HL(0.37),QK (0.06)	MF(0.99),MG (0.94),PG(0.87) PL(0.81)IL(0.39) ,HL(0.37)
BOVIN BETA-LACTOGLOBULIN	SF(0.94),RVY(0. 16)	ALPMHIR(0.62) ,FDK(0.58) IPAVFK(0.49),G LDIQK(0.17) IIAEK(0.07)	SF(0.94)	AP(0.62),FDK(0.58),I P(0.58),LR(0.56) IR(0.33),LEK(0.04)	SF(0.94),MKG(0.55), AG(0.54) VR(0.11)	PL(0.81),MKG (0.55),DA(0.13) KA(0.09)
LARGE CHAIN *DUNALIELLA SALINA*	GF(0.99),RW (0.97),DF(0.94) VF(0.81),GL (0.80),VW(0.80) RL(0.62),EF (0.59),GH(0.53) IAY(0.26),DY (0.24),AH(0.21) KY(0.17),VAY (0.10)	GR(0.76),YK (0.14)	GF(0.99),DF (0.94),GL(0.80) RL(0.62),EF (0.59)	FG(0.99),FR(0.98),YP (0.73),LG(0.71) VMP(0.57),LR(0.56), AG(0.54),VP(0.23) AH(0.21),LQ(0.19),Y K(0.14),VE(0.02)	AF(0.97),DF(0.94),EF (0.59),AG(0.54) AR(0.39),DG(0.39)K L(0.23)AIYK(0.22) VG(0.16),EG(0.10),E R(0.07),AV(0.06)	DF(0.94),PG (0.87),EF(0.59) DG(0.39),IR (0.33),KL(0.23) EG(0.10),KA (0.09)YV(0.08) ER(0.07),EA (0.04),EV(0.02)

ب INHIBITOR DPP-4	Chymotrypsin	Trypsin	Pepsin	Thermolysin	Papain	Bromelain
BOVINE BETA CASEIN	PF(0.99),PL(0.81) ,AL(0.43)IL(0.39) SL(0.33),TL(0.14) ,VY(0.09)	MK (0.45),VK (0.33)	PL(0.81),PQ NIPPL(0.80) AL(0.43),IL (0.39),HL (0.37) SL(0.33),TL (0.14)	FP(0.99),LP(0.79), YP(0.73),MK(0.45) LH(0.33),VM(0.32), LN(0.25),VP(0.23) IQ(0.12)	PF(0.99),AF(0.97),P P(0.88),PG(0.87) PL(0.81),AL(0.43),I L(0.39),HL(0.37) SL(0.33),QT(0.05),E S(0.03)	MF(0.99),PF(0.99),M G(0.94) PG(0.87),PL(0.81),P QNIPPL(0.80) MA(0.69),IL(0.39),H L(0.37),PV(0.20) QS(0.08),QT(0.05),N V(0.04) ES(0.03),KV(0.03)
SMALL CHAIN *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*	GW(0.99),PM (0.95),SF(0.94) PPL(0.89),VW (0.80),SY(0.26) DN(0.10)	NO PEPTID	PPL(0.89)	AP(0.62),AG(0.54), AD(0.13),VR(0.11) AT(0.07),VS(0.04), VD(0.04),VQ(0.04) VK(0.03)	AF(0.97),PPL(0.89), AP(0.62),AG(0.54) AL(0.43),NG(0.38) MV(0.31),AD(0.13) QI(0.13),AS(0.12),A T(0.07),SV(0.05) QV(0.04)	PPL(0.89),MA(0.69), YL(0.57),PA(0.53) NG(0.38),MV(0.31), KR(0.21),IA(0.18) QA(0.11),NA(0.11), KA(0.09),YV(0.08) QV(0.04)

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.4.5
مقاله پژوهشی، صفحات: ۷۷-۶۳

جدول ۶ – رتبه‌بندی پپتیدهای با قابلیت مهار AEC حاوی اسیدآمینه های G , F و ضد DPP4 حاوی اسیدامینهP مشتق شده از پروتئین های انتخابی پس از هضم in silico

Proteins	ACE-iNHIBITORY		Proteins	DPPH4-INHIBITORY	
	Peptide sequence	Peptide rank		Peptide sequence	Peptide rank
BOVINE BETA CASEIN	FP	0.99	BOVINE BETA CASEIN	PF	0.99
	AF	0.97		FP	0.99
	MG	0.94		PP	0.88
	PG	0.87		PG	0.87
	GPFPIIV	0.81		PL	0.81
	LGP	0.78		PQNIPPL	0.80
	EMPFPK	0.76		LP	0.79
	FPPQS	0.70		YP	0.73
	VRGP	0.40		VP	0.20
BOVINE BETA LACTOGLOBULIN	SF	0.94		PV	0.20
	FDK	0.58	SMALL SUBUNIT RuBisCO *Haematococcus pluvialis*	PM	0.95
	MKG	0.55		PPL	0.89
	AG	0.55		AP	0.62
	IPAVFK	0.49		PA	0.53
	GLDIQK	0.17			
LARGE SUBUNIT *Dunaliella salina*	GF	0.99			
	FG	0.99			
	FR	0.98			
	AF	0.97			
	DF	0.94			
	PG	0.87			
	VF	0.81			
	GL	0.80			
	GR	0.76			
	LG	0.71			
	EF	0.59			
	AG	0.54			
	GH	0.53			
	DG	0.39			
	VG	0.16			
	EG	0.10			

نتایج و بحث

استخراج، شناسایی و مطالعه بر روی ترکیبات زیست فعال از منابع متعدد گیاهی (۱) و جانوری (۲) موضوع نسبتا جدیدی در زیست شناسی کاربردی و استفاده از موجودات زنده برای دستیابی به ترکیبات مفید در پیشگیری و درمان بیماری‌ها، تولید مکمل‌های غذایی و مواد آرایشی بهداشتی می‌باشد.

در این مطالعه زیرواحدهای بزرگ و کوچک پروتئین روبیسکو در ریزجلبک‌های *Dunaliella salina*، *Spirulina* و*Haematococcus pluvialis* که بطور معمول به‌عنوان غذای اولیه انسان مورد استفاده قرار نمی‌گیرند، بررسی شده

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.4.5 مقاله پژوهشی، صفحات: ۷۷-۶۳

است. همترازی توالی زیرواحد روبیسکو در ریزجلبک‌ها در پایگاه UniProt نشان داد که زنجیره‌های بزرگ اکثراً یکسان هستند (۷۸٪ همسانی توالی). با این حال، زنجیره-های کوچک دارای نواحی کمتر محافظت شده با ۲۱٪ شباهت هستند. این تفاوت‌ها می‌تواند منجر به ایجاد پپتیدهای متنوع بیشتری شود (شکل ۲).

جدول۱، میزان وقوع پپتیدهای فعال پنهان در زیر واحدهای روبیسکو را برای فعالیت‌های زیستی انتخاب شده نشان می‌دهد. بیشتر پپتیدهای موجود در زیر واحدهای بزرگ و کوچک ریزجلبک‌ها و پروتئین‌های مصرفی روزانه دارای قابلیت مهارکننده‌های ACE و Dipeptidyl peptidase 4 بودند.

شکل ۲ – همترازی زیرواحد بزرگ (الف) و کوچک (ب) روبیسکو در ۳ ریزجلبک *Dunaliella salina*، *Spirulina* و *Haematococcus pluvialis*.

زیرواحدهای بزرگ روبیسکو در ریزجلبک‌ها در مجموع دارای ارزش مهارکننده ACE بیشتر از گلوبولین سویا و آلبومین تخم‌مرغ و میوزین گاو، اما کمتر از کازئین و بتالاکتوگلوبولین هستند، که دارای ارزش بالاتری از A در مقایسه با سایر پروتئین‌های غذایی می‌باشند. علاوه بر این، فرکانس وقوع پپتیدهای مهار کننده ACE در زنجیره بزرگ پروتئین روبیسکو ریزجلبک‌ها عمدتاً مشابه بودند، که انتظار می‌رفت با توجه به ساختارهای اولیه بسیار همولوگ آنها باشد. این در حالی است که زیر واحدهای کوچک روبیسکو تفاوت قابل توجهی در ارزش A خود داشتند و در این خصوص زیر واحد کوچک پروتئین روبیسکو ریزجلبک *Spirulina* بهترین چشم‌انداز و *Dunaliella salina* کمترین مقدار را به‌عنوان منبع پپتیدهای مهار کننده ACE نشان دادند، هر چند ارزش A زیرواحدهای کوچک ریزجلبک‌ها بسیار قابل مقایسه با سایر پروتئین های غذایی ارزیابی شده بجز بتا کازئین و بتا لاکتوگلوبولین هستند. آنزیم ACE فشار خون را در سیستم رنین- آنژیوتانسین تنظیم می‌کند (۴۲). این آنزیم نقش مهمی در آسیب‌شناسی بیماری‌های قلبی عروقی دارد. مهارکننده‌های ACE می-توانند با جلوگیری از تولید آنژیوتانسین II، منقبض‌کننده قدرتمند عروق و افزایش قدرت عمل گشادکنندگی عروق Bradykinin، فشار خون بالا را به طور بالقوه کاهش دهند (۲۴). پپتیدهای دارای فعالیت بازدارنده ACE توسط هیدرولیز آنزیمی از عصاره پروتئینی *Spirulina* در چندین مطالعه استخراج و مورد بررسی قرار گرفتند (۱۴ و ۴۲)، برای مثال نتایج آزمایشاتSuetsuna و همکارانش بر روی مصرف خوراکی پروتئین *Spirulina platensis* توسط موش-هایی که فشار خون خود به خودی بالا داشتند، فعالیت پپتیدهای ضد فشارخون مشتق شده از این پروتئین را نشان داد (۴۲). همچنین نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل in silico مطالعات به فعالیت پپتیدهای ضد فشارخون بالا مشتق شده از پروتئین روبیسکو *Spirulina* و سایر ریزجلبک‌ها اشاره می‌کنند (۳۵). نتایج مطالعه ما نشان داد زیر واحد بزرگ و کوچک هر سه ریزجلبک *Dunaliella salina*، *Spirulina*،

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.4.5 مقاله پژوهشی، صفحات: ۷۷-۶۳

Haematococcus pluvialis دارای پپتیدهای ضد فشار خون بالا هستند، حتی حضور تری پپتید مشهور ضد فشار خون بالاIle-Pro-Pro و Val-Pro-Pro (۲۷ و ۳۹) موجود در زیر واحد بزرگ *Dunaliella salina* (Val-Pro-Pro 48-50) و *Haematococcus pluvialis* (Val-Pro-Pro 48-50) و همچنین (144-146 Ile-Pro-Pro) و *Spirulina* (Val-Pro-Pro 49-51) مشاهده شد. لذا می‌توان نتیجه گرفت، استفاده از پروتئین روبیسکو ریزجلبک‌ها روش دیگری برای تولید پپتیدهای ضد فشار خون بالا ارائه می‌دهد، در نتیجه، تأکید زیاد بر پیش‌سازهای پروتئینی گران قیمت مانند بتا کازئین شیر، که همچنان ماده اولیه محبوب تولید لاکتو تری پپتیدهای ضد فشار خون بالا است را کاهش می‌دهد.

زیر واحد کوچک روبیسکو ریزجلبک‌ها به طور کلی مقدار بالاتری از A نسبت به زیر واحدهای بزرگ برای پپتیدهایی با خاصیت مهارکنندگی DPP-4 نشان دادند (جدول۱). در واقع، فراوانی وقوع پپتیدهای مهار کننده DPP-4 در زیرواحدکوچک روبیسکو *Haematococcus pluvialis* بیشتر از پروتئین‌های گیاهی و حیوانی است که مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند (به جز کازئین). کازئین و گلوبولین سویا در سبد غذایی پروتئین‌های روزمره دارای بیشترین فراوانی پپتیدهای مهار کننده DPP-4 با مقادیر A به ترتیب ۰/۸۴۳۰ و ۰/۶۶۲۸ محاسبه شد و با یک مقایسه طبق جدول۱ مقادیر بدست آمده برای روبیسکو پروتئین‌های ریزجلبک‌ها را می‌توان اعداد بالایی در نظر گرفت. همان طور که برای خاصیت مهار ACE مشاهده شد، تفاوت قابل توجهی در مقادیر A برای زنجیره بزرگ روبیسکو وجود نداشت و آن‌ها پتانسیل بهتری برای پپتیدهای مهار کننده DPP-4 نسبت به پروتئین آلبومین تخم‌مرغ و میوزین دارند. DPP-4 یک سرین پروتئاز است که دی پپتیدهای موجود در انتهایN ترمینال سوبسترا را در بخش‌های دارای Pro و Ala، Xaa-Pro و Xaa-Ala می‌شکافد (۹ و ۲۱). این آنزیم واسطه غیر فعال شدن شبه گلوکاگون پپتید -۱ (GLP-1) و پلی‌پپتید بازدارنده معده (GIP) می‌شود. هر دو این هورمون‌های اینکرتینی، ترشح انسولین را افزایش می‌دهند و تحمل گلوکز را بهبود می‌بخشند (۱۳ و ۲۵). مهار DPP-4 نیمه عمر GLP-1 و GIP را در بدن افزایش می‌دهد، منجر به افزایش ترشح انسولین و بهبود تحمل گلوکز می‌شود (۷ و ۲۶). همچنین غذای حاوی پروتئین با مهارکننده‌های DPP-4 می‌تواند رژیم مناسبی برای بیماران مبتلا به دیابت باشد. بنابراین، پپتیدهای مهارکننده DPP-4 می‌توانند ساختارها و عملکردهای GLP-1 و GIP را حفظ کرده و عوامل عملکردی امیدوار کننده‌ای برای درمان دیابت نوع ۲ در نظر گرفته شوند (۲۵ و ۳۲). باتوجه به جدول۱، فراوانی بالای وقوع پپتیدهای مهار کننده DPP-4 در توالی روبیسکو ریزجلبک‌ها، بستر امیدوارکننده‌ای را برای تولید عوامل ضد دیابت قوی مبتنی بر پپتید فراهم می‌کند.

در مورد فعالیت آنتی‌اکسیداتیو، زیر واحدهای بزرگ روبیسکو در *Dunaliella salina*، *Spirulina*، *Haematococcus pluvialis* با وجود شباهت توالی زیاد، به ترتیب مقادیر A ۰/۰۸۴۲ ، ۰/۰۹۲۴ و ۰/۰۹۰۳ را نشان می‌دهند، ممکن است این موضوع نشان دهنده ۲۲ درصد مناطق متفاوت اسیدآمینه های کدکننده آنتی‌اکسیدان موجود در زنجیره بزرگ باشد که سبب بروز این تفاوت شده‌اند (جدول۱). به طور کلی، پپتیدهایی با وزن مولکولی کم و دارای اسیدآمینه‌های آبگریز و آروماتیک در ساختار خود دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری هستند، لذا نوع اسیدهای آمینه موجود در توالی پپتیدها تأثیر عمده‌ای بر فعالیت آن‌ها دارد (۴۳). به‌عنوان مثال مشخص شد که اسیدهای آمینه آبگریز با گروه‌های غیرقطبی آلیفاتیک به طور موثر رادیکال‌ها را در غذاهایی با محتوی لیپید بالا از بین می‌برند، لذا سبب افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی پپتید می‌شوند (۲۹). همچنین نتایج یک آزمایش نشان داد حضور پرولین‌ها (هرچه بیشتر، بهتر) به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتید کمک می‌کند (۱۷) و یا بررسی‌های Udenigwe و همکارانش مبین آن بود که وجود باقی‌مانده‌های Pro و Met به شدت در رتبه‌بندی قدرت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای پنهان توالی زیر واحد بزرگ

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.4.5 مقاله پژوهشی، صفحات: ۷۷-۶۳

پروتئین روبیسکو در غلات تاثیرگذار است (۳۹)، در مطالعه ما با مقایسه توالی زنجیره بزرگ پروتئین روبیسکو مشاهده شد باقیمانده‌های Pro۱۴۲ و Met۱۱۶ در *Spirulina* و *Haematococcus pluvialis* جایگزین اسیدآمینه‌های سرین و لوسین در *Dunaliella salina* شدند (شکل۲) و احتمالاً این نتایج مبین اختلاف مقادیر A در *Dunaliella salina* با *Spirulina* و *Haematococcus pluvialis* در خاصیت آنتی-اکسیداتیو باشد. مشابه بررسی فعالیت مهارACE، زیر واحدهای کوچک به طور کلی مقادیر کمتری از A را برای پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی نسبت به زنجیره‌های بزرگ نشان می‌دهند (جدول۱).

پروتئولیز با واسطه یوبی‌کویتین از آنجا که در چندین فرایند سلولی مانند تنظیم چرخه سلولی، پاسخ سلولی به استرس خارجی، تعدیل گیرنده‌های سطح سلول و کانال-های یونی، ترمیم DNA، تنظیم پاسخ‌های ایمنی و التهابی و تشکیل سلول‌های اندامک نقش کلیدی دارد، به یک هدف مهم برای انواع بیماری‌ها تبدیل شده است (۸). در خصوص الگوی ارزشA برای توانایی فعال‌سازی پروتئولیز با واسطه یوبی‌کویتین، زیر واحد بزرگ *Haematococcus pluvialis* مقادیر بیشتری از A را در مقایسه با سایر ریزجلبک‌ها نشان داد و البته در مقایسه با پروتئین-های رومزه نیز بعد از لاکتوگلوبولین، به ترتیب زیر واحد بزرگ *Haematococcus pluvialis* و *Dunaliella salina* چشم انداز بهتری نسبت به سایر پروتئین‌ها داشتند. مقادیر A برای این فعالیت زیستی در *Spirulina* یافت نشد که می-تواند به تعداد محدود پپتیدهای فعال موجود در پایگاه داده نسبت داده شود.

دی‌پپتیدیل‌پپتیداز III (DPP 3) یک آنزیم تجزیه‌کننده مهم انکفالین (یک پنتاپپتید است که در تنظیم درد در بدن نقش دارد) است و مهارکننده‌های آن انتظار می‌رود در مدیریت درد نقش بسزایی ایفا کنند (۱۹). دردهای حاد و مزمن شرایط ناتوان کننده‌ای هستند و بهبود آن‌ها برای بیماران مبتلا به سرطان و اختلالات عصبی از اولویت بالایی برخوردار است (۳۸). اعصاب انتهای سیستم عصبی مرکزی (CNS) و مدولا آدرنال، برخی از مواد شبیه به مورفین مانند لو-انکفالین و مت-انکفالین را آزاد می‌کنند. مانند سایر نورو پپتیدها، انکفالین‌ها مولکول‌هایی با طول عمر کوتاه هستند که پس از آزاد شدن در سیناپس به سرعت هیدرولیز می‌شوند. در CNS، چندین پپتیداز در تخریب انکفالین در مکان‌های مختلف نقش دارند اما Dipeptidyl peptidase-3 (DPP-III) یکی از مهمترین آنزیم-های تجزیه کننده انکفالین است (۳۰). بنابراین، انتظار می-رود که مهارکننده‌های DPP-3 باعث طولانی شدن زمان عمل انکفالین شوند (۱۰). در خصوص توانایی مهار آنزیم DPP-3، زیر واحد بزرگ *Haematococcus pluvialis* بالاترین الگوی ارزش A با فراوانی ۰/۱۱۳۴ را نشان داد. همچنین به‌نظر می‌رسد بهترین انتخاب به‌عنوان پیش‌ساز پپتیدهای زیست فعال مهارکننده آنزیم DPP-3 در این مقایسه، مختص به زیر واحد بزرگ پروتئین روبیسکو ریزجلبک‌ها باشد (جدول۱). در این مطالعه بر اساس یافته‌ها، به طور کلی روبیسکو موجود در*Haematococcus pluvialis* بدون در نظر گرفتن نوع فعالیت زیستی و نوع زیر واحد در مقایسه با سایر ریزجلبک‌ها، به نظر می‌رسد بهترین چشم انداز را به‌عنوان پیش‌ساز پپتیدهای زیست فعال بر اساس فراوانی وقوع آن‌ها برای فعالیت‌های زیستی درنظر گرفته شده نشان می‌دهد. البته شایان ذکر است که وقوع توالی‌های فعال زیستی در روبیسکو در دسترس بودن آنها را تضمین نمی‌کند، زیرا پپتیدهای پنهان در ساختار اولیه غیرفعال هستند و برای اعمال عملکردهای بیولوژیکی خود باید آزاد شوند (۳۹).

بیشترین میزان الگوی ارزش A طبق جدول ۱برای فعالیت‌های ACE inhibitor و Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor مشاهده شد. در مرحله بعد، هضم پروتئولیتیک روبیسکو توسط ابزار BIOPEP و آنزیم‌های گیاهی: برومولئین، پاپائین و آنزیم‌های گوارشی کیموتریپسین،

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.4.5 مقاله پژوهشی، صفحات: ۷۷-۶۳

تریپسین، پپسین و آنزیم میکروبی ترمولیزین انجام شد و پارامتر A ($A=A_E/W$) برای هر آنزیم در هر زیر واحد محاسبه و نتایج در جداول ۲ و ۳ ارائه شده است. طبق تعاریف پایگاه BIOPEP، " W " فرکانس نسبی آزادسازی قطعات با فعالیت داده شده توسط آنزیم های انتخاب شده، "A_E " فراوانی انتشار قطعات با فعالیت داده شده توسط آنزیم های انتخاب شده و "A" فراوانی وقوع قطعات زیست فعال در توالی پروتئین است. به طور کلی از میان آنزیم‌های بررسی شده، پروتئازهای گوارشی تریپسین و پروتئاز میکروبی ترمولیزین، بیشترین توانایی را در آزادسازی پپتیدهای فعال ضدفشارخون بالا به ترتیب از زیر واحد بزرگ (*Dunaliella salina*) وکوچک (*Spirulina*) روبیسکو بر اساس فراوانی وقوع A دارند. در خصوص این فعالیت، به صورت کلی آنزیم تریپسین و آنزیم کیموتریپسین به ترتیب بالاترین و کمترین توانایی را بدون در نظر گرفتن نوع زیرواحد در میان سه ریزجلبک، نشان دادند (جدول۲).

یافته‌ها در خصوص آزادسازی انواع پپتید با فعالیت dipeptidyl peptidase 4 inhibitor توسط ۶ آنزیم معرفی شده در جدول۳ نشان دهنده این است که به ترتیب در زیرواحد بزرگ (*Haematococcus pluvialis*) و کوچک (*Haematococcus pluvialis*) آنزیم‌های گوارشی تریپسین و پپسین بیشترین توانایی را از خود نشان دادند. لذا به نظر می‌رسد آنزیم‌های گوارشی تریپسین و پپسین کارآمدترین پروتئازها برای آزادسازی پپتیدهای فعال زیستی ACE inhibitor وdipeptidyl peptidase 4 inhibitor در میان ریزارگانیسم‌های مدنظر هستند. همچنین به نظر می‌رسد قدرت اثر آنزیم‌ها بر زیرواحدهای بزرگ پروتئین روبیسکو و تولید پپتیدهای ضد فشار خون بالا نسبت به زیر واحد کوچک ریزجلبک‌ها بیشتر باشد، این موضوع برای آزادسازی پپتیدهایی با توانایی مهار دی پپتیدیل پپتیداز ۴ کاملاً بالعکس مشاهده شد. بنابراین، پردازش روبیسکو ریزجلبک‌های مذکور با آنزیم‌های تریپسین و پپسین چشم-اندازهای بهتری در انتشار پپتیدهای زیستی نسبت به سایر آنزیم‌ها نشان داد. البته ممکن است الگوهای برش متنوع شش پروتئاز ارزیابی شده به اندازه کافی گسترده نبوده‌اند تا همه توالی‌های پپتیدی فعال موجود در زیر واحدهای روبیسکو را آزاد کنند.

مشخصات اسیدآمینه پپتیدهای کوچک مسئول فعالیت بیولوژیکی آن‌ها است. همچنین میزان فعالیت توالی پپتیدی به دو عامل اصلی موقعیت اسیدآمینه در توالی پپتیدی و ترکیب آن پپتید بستگی دارد (۲۸). برای بررسی رتبه‌بندی پپتیدهای زیست فعال گزارش شده از پایگاه Biopep، از آنجایی که دو فعالیت چشم‌گیر در مقایسه پروتئین روبیسکو ریزجلبک‌ها و پروتئین‌های مصرفی روزانه، فعالیت مهارکنندگی ACE و DPP4 گزارش شد (جدول۱)، پپتیدهای مربوط به پروتئین بتاکازئین، بتالاکتوگلوبولین و زیر واحد بزرگ پروتئین روبیسکو *Dunaliella salina* به سبب بالاترین ارزش A در جهت سنجش رتبه پپتیدی برای فعالیت ACE inhibitor انتخاب شدند. همچنین رتبه پپتیدهای مشتق شده از بتاکازئین شیر و زیر واحد کوچک *Haematococcus pluvialis* بر اساس جدول۱، برای فعالیت dipeptidyl peptidase 4 inhibitor انتخاب شدند. به خوبی مشخص شده است که پپتیدهای کوتاه حاوی فنیل‌آلانین به احتمال زیادی به‌عنوان پپتید زیست فعال مهار کننده ACE پیش‌بینی می‌شوند. با وجود این حقایق، تعداد گلایسین در توالی پپتیدها با نمره PeptideRanker آن نیز ارتباط بالایی دارد (۲۲، ۲۸ و ۳۴). پس از پروتئولیز پروتئین‌های مورد مطالعه در این بخش توسط هر ۶ آنزیم برومولئین، پاپائین، کیموتریپسین، تریپسین، پپسین و ترمولیزین، به طور کلی حداکثر رتبه پپتیدهای مهارکننده ACE مشتق شده از پروتئین‌های مورد بررسی در توالی‌های حاوی فنیل‌آلانین و گلیسین مشاهده شد. حداکثر نمرات PeptideRanker (۰/۹۹) برای پپتیدهای مهارکننده ACE توسط دی‌پپتیدهای FG و GF وFP نشان داده شد. *Dunaliella salina* هر دو پپتید FG وGF مهارکننده ACE را نشان داد، درحالی که

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.4.5 مقاله پژوهشی، صفحات: ۷۷-۶۳

بتاکازئین تنها پپتیدFP و لاکتوگلوبولین هیچ کدام را نشان نداد. به طور کلی پپتیدهای شامل اسیدآمینه‌های فنیل‌آلانین و گلایسن مشتق شده از پروتئین بتالاکتوگلوبولین در مقایسه با *Dunaliella salina* و بتاکازئین کمتر بودند (جدول های ۵ و ۶). همچنین بیشترین تعداد پپتیدهای زیست فعال در مقایسه با بتاکازئین و بتا لاکتوگلوبولین مربوط به *Dunaliella salina* بود (جدول۵). نتایج Chia-Ling Jao و همکارانش نشان داد که فعالیت مهاری DPP-4 پپتید ها توسط ترکیب و ترتیب اسیدهای آمینه به جای طول آنها تعیین می‌شود (۱۸). همچنین از مقالات چنین استنباط می-شود که پپتیدهای موثر دارای فعالیت dipeptidyl peptidase inhibitor 4 حداقل دارای یک اسیدآمینه پرولین در توالی خود (عمدتاً در انتهای N ترمینال) هستند (۳). در جدول۵ و جدول۶ پپتیدهای پروتئولیز شده با ۶ آنزیم مورد مطالعه از زیر واحد بزرگ روبیسکو *Haematococcus pluvialis* و پروتئین بتاکازئین برای بررسی رتبه‌بندی پپتید جمع آوری شدند. بر این اساس حداکثر نمرات PeptideRanker (۰/۹۹) برای پپتیدهای مهار کننده DPP4 توسط دی پپتیدهای FP وFP نشان داده شد. همچنین در بعضی مقالات مشخص شد که پپتیدهایی با خاصیت مهار DPP4، در توالی خود عمدتاً از بقایای اسیدآمینه‌های آبگریز مانند آلانین، گلیسین و پرولین تشکیل شده بودند (۱۵). با توجه به جداول ۵ و جدول ۶ در این مطالعه نیز مشخص شد حضور سایر اسیدآمینه‌های آبگریز مانند والین، متیونین، لیزین، لوسین و ایزولوسین در توالی یک پپتید می‌تواند قدرت مهارکنندگی DPP4 آن را مانند PM(0.95) PPL(0.89), PG(0.87), AP(0.62) افزایش ببخشد. از آنجا که مطالعات این بخش به طور کامل بر داده‌های موجود در مورد توالی‌های پپتیدی مهاری DPP-4 در زیرواحد کوچک روبیسکو *Haematococcus pluvialis* و پروتئین بتاکازئین وفعالیت ضد ACE در کازئین و لاکتوگلوبولین و زیرواحد بزرگ روبیسکو *Dunaliella salina* متکی بود، ممکن است قطعات دیگر از پروتئین‌های دیگر مورد مطالعه، فعالیت بازدارندگی بهتری را ارائه بدهند. علاوه بر این، توالی‌های پپتیدی احتمالی باید از پروتئین‌های مادر آزاد شوند تا فعال شوند. لذا تجزیه و تحلیلIn silico برای پیشبرد هدف طراحی پپتیدهای فعال مطلوب ضد ACE و یا ضد DPP-4 در فضای آزمایشگاهی از پروتئین های انتخابی با بازدهی بهتر مفید خواهد بود.

همچنین جدول ۴، مشخصات اسیدآمینه‌های تشکیل دهنده زیرواحد بزرگ و کوچک پروتئین روبیسکو ریزجلبک‌های انتخاب شده را با استفاده از ابزار ProtParam مشخص می‌کند و توسط این ابزار آنلاین، ترکیب ۲۲ اسیدآمینه مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه این مطالعه نشان داد که گلایسین فراوان‌ترین اسیدآمینه موجود در زیر واحد بزرگ پروتئین روبیسکو هر سه ریزجلبک مورد مطالعه است و به طور کلی این زیر واحد به ترتیب سرشار از اسیدآمینه‌های گلایسین، آلانین، لوسین، والین، ترئونین، اسیدگلوتامیک، آرژنین و آسپارتیک‌اسید است. با این حال آلانین در *Dunaliella salina* و *Haematococcus pluvialis* و لوسین در *Spirulina*، فراوان‌ترین اسیدآمینه‌های موجود در زیر واحد کوچک بودند. تفاوت چشم‌گیر مقدار اسیدآمینه‌های گوناگون تاییدی بر حضور نواحی کمتر محافظت شده در زیر واحدکوچک نسبت به زیر واحد بزرگ ریز جلبک‌ها است. وزن مولکولی زیرواحد بزرگ در *Dunaliella salina*، *Spirulina* و *Haematococcus pluvialis* به ترتیب تقریباً ۵۲، ۵۳ و۵۲ کیلو دالتون مشاهده شد. زیرواحدهای کوچک با وزن مولکولی کمتر به سبب کمتر بودن طول توالی به ترتیب تقریباً ۱۳، ۲۱ و ۲۰ کیلو دالتون گزارش شدند. مقادیرPi، پروتئین روبیسکو زیر واحد کوچک *Dunaliella salina* و *Haematococcus pluvialis* در pH قلیایی و بقیه موارد در pH اسیدی پیش‌بینی می‌شوند.

برای پیش‌بینی ویژگی‌های مختلف فیزیکوشیمیایی پپتیدهای جدول ۶، از پایگاه pepcalc استفاده شد. وزن مولکولی پپتیدهای مهارکننده ACE از پروتئین‌های

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.4.5 مقاله پژوهشی، صفحات: ۷۷-۶۳

بتاکازئین، بتالاکتوگلوبولین و زیرواحد بزرگ روبیسکو *Dunaliella salina* از ۱۴۶/۱۴g/mol تا۷۴۷/۹ g/mol بود.

به طور کلی پپتیدهای مهارکننده ACE حاوی وزن مولکولی تقریباً۳۰۰ و بیشتر نقطه ایزوالکتریک قلیایی را نشان دادند. با این حال، پپتیدهای با وزن مولکولی تقریباً ۲۰۰ و کمتر نقطه ایزوالکتریک اسیدی را نشان دادند. نتایج این بخش نشان می‌دهد که اکثر پپتیدهای مهارکننده ACE دارای وزن مولکولی پایینی هستند. نقاط ایزوالکتریک پیش‌بینی شده پپتیدهای مهارکننده ACE در محدوده pH (۰/۶۸ تا ۱۰/۹) قرار دارند (جدول۷).

جدول ۷ – پیش بینی ویژگی های فیزیکوشیمیایی، سمیت پپتیدهای با قابلیت مهار AEC (http:// pepcalc.com/)

PROTEINS	Peptides	Molecular weight (g/mol)	Isoelectric point ph	Net charge at ph 7	Estimated solubility	Toxicity prediction
BOVINE BETA CASEIN	FP	262.3	3.57	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	AF	236.27	3.77	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	MG	206.27	3.37	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	PG	172.18	4.06	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	GPFPIIV	741.92	3.65	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	LGP	285.34	3.82	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	EMPFPK	747.9	6.85	0	Good water solubility	Non-Toxin
	FPPQS	574.63	3.48	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	VRGP	427.5	10.81	1	Good water solubility	Non-Toxin
BOVINE BETA LACTO GLOBULIN	SF	252.27	3.43	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	FDK	408.45	6.39	0	Good water solubility	Non-Toxin
	MKG	334.44	9.88	1	Good water solubility	Non-Toxin
	AG	146.14	3.69	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	IPAVFK	673.84	10.14	1	Poor water solubility	Non-Toxin
	GLDIQK	672.77	6.63	0	Good water solubility	Non-Toxin
LARGE SUBUNIT RuBisCO *Dunaliella salina*	GF	222.24	3.37	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	FG	222.24	3.37	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	FR	321.37	10.9	1	Good water solubility	Non-Toxin
	AF	236.27	3.77	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	DF	280.28	0.76	-1	Good water solubility	Non-Toxin
	PG	172.18	4.06	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	VF	264.32	3.67	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	GL	188.22	3.63	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	GR	231.25	10.84	1	Good water solubility	Non-Toxin
	LG	188.22	3.62	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	EF	294.3	0.99	-1	Good water solubility	Non-Toxin
	AG	146.14	3.69	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	GH	212.21	7.81	0.1	Poor water solubility	Non-Toxin
	DG	190.15	0.68	-1	Good water solubility	Non-Toxin
	VG	174.2	3.59	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	EG	204.18	0.9	-1	Good water solubility	Non-Toxin

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.4.5 مقاله پژوهشی، صفحات: ۷۷-۶۳

حلالیت، که عمدتاً به حلالیت آبی برای پپتیدها اشاره دارد، نیز مهم است. لذا هنگام ارزیابی پپتیدها، باید مورد توجه قرار گیرد. این ویژگی بر جذب، توزیع و حذف پپتیدها در بدن تاثیر می‌گذارد. همچنین، گزارش شده است که حلالیت ضعیف ترکیبات ممکن است سمیت و سایر عوارض جانبی آن‌ها را پنهان کند (۵). از این رو، مسئله حلالیت برای کشف یک ماده عملکردی و همچنین پپتیدهای زیست فعال اساسی است. در خصوص این مهم، به طور کلی پپتیدهای مهارکننده ACE در نقطه ایزوالکتریک قلیایی حاوی حلالیت خوبی در آب بودند، در حالی که نقطه ایزوالکتریک اسیدی حاوی پپتیدهایی با حلالیت کمتر در آب بود (جدول۷). وزن مولکولی پپتیدهای مهارکننده DPP4 از پروتئین‌های بتاکازئین و زیرواحدکوچک پروتئین روبیسکو *Haematococcus pluvialis* از ۱۷۲/۱۸ تا ۷۷۷/۹۱ گرم برمول گزارش شد. جدول۸ نشان می‌دهد که اکثر پپتیدها دارای وزن مولکولی پایینی هستند (در مجموع سبک ترین پپتیدهای مهارکننده ACE) به‌طور کلی پپتیدهای مهارکننده DPP4 همگی نقطه ایزوالکتریک اسیدی را نشان دادند. همچنین کلیه پپتیدها در نقطه ایزوالکتریک اسیدی حلالیت کمی را در آب از خود نشان دادند (جدول۸).

جدول ۸ – پیش بینی ویژگی های فیزیکوشیمیایی، سمیت پپتیدهای با قابلیت ضد DPP4 (http:// pepcalc.com/)

PROTEINS	Peptides	Molecular weight (g/mol)	Isoelectric point ph	Net charge at ph 7	Estimated solubility	Toxicity prediction
BOVINE BETA CASEIN	PF	262.3	4.15	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	FP	262.3	3.57	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	PP	212.25	4.26	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	PG	172.18	4.06	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	PL	228.29	4.08	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	PQNIPPL	777.91	4.08	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	LP	228.29	3.82	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	YP	278.3	3.53	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	VP	214.26	3.76	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	PV	214.26	4.1	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	PM	246.33	4.16	0	Poor water solubility	Non-Toxin
SMALL SUBUNIT RuBisCO *Haematococcus pluvialis*	PPL	325.4	4.08	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	AP	186.21	3.88	0	Poor water solubility	Non-Toxin
	PA	186.21	4.07	0	Poor water solubility	Non-Toxin

سمیت پپتیدهای مهارکننده ACE ممکن است از توسعه مصرف پپتیدهای فعال به‌عنوان مواد غذایی مفید جلوگیری کند (۱۲). در این مطالعه، پپتیدهای مهارکننده ACE از پروتئین‌های گیاهی و جانوری مشتق شده‌اند و آنزیم‌های مورد استفاده برای انتشار این پپتیدها از منابع گیاهی یا حیوانی و میکروبی به دست می‌آید که اغلب در چندین صنایع فرآوری مواد غذایی بدون هیچ گونه خطری برای سلامتی که قبلاً گزارش شده است، مورد استفاده قرار می‌گیرد. پپتیدهای با وزن مولکولی پایین غیرسمی هستند و در مقایسه با پروتئین‌های native خود حساسیت کمتری دارند (۲۳ و ۳۱). در مطالعه حاضر نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل ToxinPred پیش‌بینی کرد که پپتیدهای مهارکننده ACE غیرسمی هستند (SVMscores <0) (جدول ۷). والین، ترئونین، آرژینین، گلوتامین، متیونین، لوسین، لیزین، ایزولوسین، فنیل‌آلانین و آلانین اجزای اولیه پپتیدهای غیرسمی هستند (۱۲). پپتیدهای مهارکننده ACE مشتق از

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.4.5 مقاله پژوهشی، صفحات: ۷۷-۶۳

بتاکازئین، بتالاکتوگلوبولین و زیرواحد بزرگ روبیسکو *Dunaliella salina* حاوی بقایای اسیدهای‌آمینه هستند که معمولاً در پپتیدهای غیرسمی یافت می‌شوند. همچنین با توجه به جدول۸، تمامی پپتیدهای مهارکننده DPP4 نیز غیرسمی گزارش شدند. بنابراین، این پپتیدها می‌توانند به‌عنوان گزینه مناسبی در سنتز غذایی یا دارویی و عملکردی برای مصارف انسانی، در شرایط آزمایشگاهی و غیره باشند، البته این محصولات باید بیشتر بررسی شده و از دستور العمل‌های بین المللی خاصی پیروی کنند (۲۳).

نتیجه‌گیری

بر اساس تجزیه و تحلیل in silico پروتئین روبیسکو ریزجلبک‌ها، می‌توان نتیجه گرفت که زیر واحدهای کوچک و بزرگ دارای چشم اندازهای خوبی به‌عنوان پیش‌ساز پپتیدهای فعال زیستی در مقایسه با پروتئین‌های غذایی معمول مصرف شده، به جز پروتئین‌های شیر هستند (البته در خصوص dipeptidyl peptidase 4 inhibitor ریزجلبک‌ها حتی از پروتئین‌های شیر هم کارآمد تر بودند). ریزجلبک‌ها با توجه به پایداری و فراوانی طبیعی RuBisCO، برای تولید و استخراج پپتیدهای زیست‌فعال چشم‌انداز بسیار مناسبی هستند که وابستگی شدید به پروتئین‌های معمولی گران‌قیمت را کاهش می‌دهد. پروتئازهای گوارشی پپسین و تریپسین بهترین پتانسیل را برای استخراج و آزادسازی توالی‌های فعال زیستی پنهان از روبیسکو در خصوص فعالیت‌های بررسی شده نشان دادند. به‌ویژه اگر محصولی متشکل از پپتیدهای حاصل از روبیسکو هر سه ریزجلبک تهیه شود، مکمل بسیار با ارزش و کارآمدی در راستای بهره گیری از اثرات فیزیولوژیک آنها خواهد بود. پپتیدهای حاصل از اثر آنزیم‌ها دارای عملکردهای بیولوژیکی مربوط به مدیریت و درمان بیماری‌های انسانی، مانند دیابت، بیماریهای قلبی عروقی، کنترل درد و بیماری‌های عصبی هستند. زیر واحد بزرگ روبیسکو میزان همولوژی بالاتری را نسبت به زیر واحد کوچک از خود نشان می‌دهد و ممکن است تفاوت‌های قابل توجه در زنجیره کوچک، باعث ایجاد پروفایل پپتیدهای زیست‌فعال منحصر به فرد هر ریزجلبک باشد. این یافته‌ها، لزوم مطالعات بیشتر تجربی برای بررسی کشت و پرورش ریزجلبک‌ها به‌عنوان منابع روبیسکو و پپتیدهای زیست فعال (جهت تولید مواد مغذی مبتنی بر پپتید برای مصرف و سلامت انسان) را آشکار می‌کند.

منابع

۱- خواجه پور زاوه ع, آسوده ا, نادری منش ح. استخراج و شناسایی یک پپتید فعال زیستی جدید حاصل از هیدرولیزات کرم سفید ریشه. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۲۰۲۱.

۲- زرندی میاندوآب ل, زاده حسینقلی ا. تجزیه و تحلیل آماری پپتیدهای ضدسرطان گیاهی با استفاده از محیطR. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۲۰۱۸;۳۱(۳):۳۱۲-۲۴.

3- Amerongen A, Beelen M, Wolbers L, Gilst Wv, Buikema J, Nelissen J. 2009; Egg protein hydrolysates. *World Intellectual Property Organization, Patent no WO* 2009128713: A1.

4- Andersson I, Backlund A. 2008; Structure and function of Rubisco. *Plant Physiology and Biochemistry* 46(3): 275-91.

5- Balakin KV, Savchuk NP, Tetko IV. 2006; In silico approaches to prediction of aqueous and DMSO solubility of drug-like compounds: trends, problems and solutions. *Current medicinal chemistry* 13(2): 223-41.

6- Becker J, Zelder O, Häfner S, Schröder H, Wittmann C. 2011;From zero to hero-design-based systems metabolic engineering of Corynebacterium glutamicum for l-lysine production. *Metabolic engineering* 13(2): 159-68.

7- Bergman R, Finegood D, Kahn S. 2002;The evolution of β-cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes. *European journal of clinical investigation* 32: 35-45.

8- Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. 2000;Ubiquitin-mediated proteolysis: biological

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.4.5 مقاله پژوهشی، صفحات: ۷۷-۶۳

regulation via destruction. *Bioessays* 22(5): 442-51.

9- Deacon CF. 2019; Physiology and pharmacology of DPP-4 in glucose homeostasis and the treatment of type 2 diabetes. *Frontiers in endocrinology* 10: 80.

10- Dhanda S, Singh J, Singh H. 2011;Goat brain enkephalin degrading enzyme: interaction with analgesic and antihypertensive drugs. *Medicinal Chemistry Research* 20(8): 1294-7.

11- Dziuba J, Minkiewicz P, Nałecz D, Iwaniak A. 1999; Database of biologically active peptide sequences. *Food/Nahrung* 43(3): 190-5.

12- Gupta S, Kapoor P, Chaudhary K, et al. 2013;In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins. *PloS one* 8(9): e73957.

13- Hatanaka T, Inoue Y, Arima J, et al. 2012; Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran. *Food chemistry* 134(2): 797-802.

14- He H-L, Chen X-L, Wu H, Sun C-Y, Zhang Y-Z, Zhou B-C. 2007;High throughput and rapid screening of marine protein hydrolysates enriched in peptides with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity by capillary electrophoresis. *Bioresource Technology* 98(18): 3499-505.

15- 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* 205-18.

16- Ibañez E, Cifuentes A. 2013; Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93(4): 703-9.

17- Iwaniak A, Minkiewicz P. 2007;Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 6(3): 5-15.

18- Jao C-L, Hung C-C, Tung Y-S, Lin P-Y, Chen M-C, Hsu K-C. 2015; The development of bioactive peptides from dietary proteins as a dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the management of type 2 diabetes. *BioMedicine* 5(3): 1-7.

19- Khaket TP, Redhu D, Dhanda S, Singh J. 2015;In silico evaluation of potential DPP-III inhibitor precursors from dietary proteins. *International Journal of Food Properties* 18(3): 499-507.

20- Korhonen H, Pihlanto A. 2006; Bioactive peptides: production and functionality. *International dairy journal* 16(9): 945-60.

21- Lacroix IM, Li-Chan EC. 2012; Evaluation of the potential of dietary proteins as precursors of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors by an in silico approach. *Journal of Functional Foods* 4(2): 403-22.

22- Lafarga T, O'Connor P, Hayes M. 2014; Identification of novel dipeptidyl peptidase-IV and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from meat proteins using in silico analysis. *Peptides* 59: 53-62.

23- Lafarga T, Wilm M, Wynne K, Hayes M. 2016;Bioactive hydrolysates from bovine blood globulins: Generation, characterisation, and in silico prediction of toxicity and allergenicity. *Journal of Functional Foods* 24: 142-55.

24- Lavoie JL, Sigmund CD. 2003; Minireview: overview of the renin-angiotensin system—an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* 144(6): 2179-83.

25- Liu R, Cheng J, Wu H. 2019; Discovery of food-derived dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides: A review. *International journal of molecular sciences* 20(3): 463.

26- Lu I-L, Tsai K-C, Chiang Y-K, et al. 2008;A three-dimensional pharmacophore model for dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *European journal of medicinal chemistry* 43(8): 1603-11.

27- Miyazaki H, Nakamura T, Ohki K, Nagai K. 2017; Effects of the bioactive peptides Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro upon autonomic neurotransmission and blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Autonomic Neuroscience* 208: 88-92.

28- Mooney C, Haslam NJ, Pollastri G, Shields DC. 2012;Towards the improved discovery and design of functional peptides: common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity.

29- Nwachukwu ID, Aluko RE. 2019;Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. *Journal of Food Biochemistry* 43(1): e12761.

30- Pal Khaket T, Singh J, Attri P, Dhanda S. 2012;Enkephalin degrading enzymes: metalloproteases with high potential for drug development. *Current pharmaceutical design* 18(2): 220-30.

31- Pooja K, Rani S, Prakash B. 2017;In silico approaches towards the exploration of rice bran

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.4.5 مقاله پژوهشی، صفحات: ۷۷-۶۳

proteins-derived angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. *International journal of food properties* 20(sup2): 2178-91.

32- Pratley RE. 2008; Overview of glucagon-like peptide-1 analogs and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for type 2 diabetes. *The Medscape Journal of Medicine* 10(7): 171.

33- Raven JA. 2013;Rubisco: still the most abundant protein of Earth? *New Phytologist* 198(1): 1-3.

34- Saito Y, Wanezaki K, Kawato A, Imayasu S. 1994; Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 58(10): 1767-71.

35- Selvaraj G, Kaliamurthi S, Cakmak Z, Cakmak T. 2017; RuBisCO of microalgae as potential targets for nutraceutical peptides: a computational study. *Biotechnology* 16(4-6): 130-44.

36- Shahidi F, Zhong Y. 2008; Bioactive peptides. *Journal of AOAC international* 91(4): 914-31.

37- Taylor TC, Backlund A, Bjorhall K, Spreitzer RJ, Andersson I. 2001;First crystal structure of Rubisco from a green alga, Chlamydomonas reinhardtii. *Journal of Biological Chemistry* 276(51): 48159-64.

38- Thanawala V, Kadam V, Ghosh R. 2008;Enkephalinase inhibitors: potential agents for the management of pain. *Current drug targets* 9(10): 887-94.

39- Udenigwe CC, Gong M, Wu S. 2013; In silico analysis of the large and small subunits of cereal RuBisCO as precursors of cryptic bioactive peptides. *Process Biochemistry* 48(11): 1794-9.

40- Udenigwe CC, Howard A. 2013; Meat proteome as source of functional biopeptides. *Food Research International* 54(1): 1021-32.

41- Udenigwe CC, Okolie CL, Qian H, Ohanenye IC, Agyei D, Aluko RE. 2017; Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase as a sustainable and promising plant source of bioactive peptides for food applications. *Trends in Food Science & Technology* 69: 74-82.

42- Zhang B, Zhang X. 2013;Separation and nanoencapsulation of antitumor polypeptide from Spirulina platensis. *Biotechnology progress* 29(5): 1230-8.

43- Zhang J, Du H, Zhang G, et al. 2020;Identification and characterization of novel antioxidant peptides from crucian carp (*Carassius auratus*) cooking juice released in simulated gastrointestinal digestion by UPLC-MS/MS and in silico analysis. *Journal of Chromatography B* 1136: 121893.

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.4.5 مقاله پژوهشی، صفحات: ۷۷-۶۳

In silico comparison of bioactive peptides derived from three microalgae RuBisCO enzyme with commonly consumed proteins

Zarandi-Miandoab L., Razavi S.F., Pouryosef F. and Chaparzadeh N.

Det. of Biology, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, I.R. of Iran

Abstract

Nowadays**,** bioactive peptides are one of the important tools in improvement of human health. Microalgae proteins may be a good alternative to expensive sources such as meat and milk as precursors for production of bioactive peptides. RuBisCO is a hexadecameric enzyme composed of eight large subunits and eight small subunits, and accounts for 2 to 10 percent of the total cell protein. RuBisCO protein belonging to three microalgae (*Arthrospira plantensis* (*Spirulina*), *Dunaliella salina, Haematococcus pluvialis*) were *in silico* digested enzymatically. The antioxidant properties, inhibition of angiotensin-converting enzyme and dipeptidyl peptidase-4, activation of ubiquitin mediated proteolysis of resulted peptides were compared with peptides products of commonly used proteins such as meat and milk by using various bioinformatics databases such as BIOPEP, ProtParam, PeptiDeranker, Pepcalc and ToxinPred. A wide range of bioactive peptides with multiple capabilities were predicted during digestion of large and small subunits of RuBisCO with human, plant and microbial digestive enzymes. The results confirm high rank and low toxicity of these RuBisCO derived peptides in comparison with peptides derived from meat and milk proteins. It seems that the RuBisCO derived active peptides of microalgae have a good function as antioxidant, anti-cancer, anti-allergy and anti-atherosclerotic. This advantage is due to the composition of its amino acids. Probably, preparation of a complement product consisting of the three microalgae peptides will be a perfect supplement for the treatment of some diseases.

Keywords: Bioactive peptides, Rubisco enzyme, Microalgae, Health promotion.