«مقاله مروری»

پپتیدهای زیست فعال: فرایند تولید، اثرات سلامت بخشی و کاربرد به‌عنوان افزودنی‌های طبیعی در تولید غذاهای فراسودمند

سعید میردامادی[۱*]، نازیلا سلیمان‌زاده[۲]، مهتا میرزایی[۳]، پریا مطهری[۲]

۱. دانشیار پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
۲. دانشجوی دکتری زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
۳. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: mirdamadi@irost.ir
(دریافت مقاله: ۹۵/۷/۲۰ پذیرش نهایی: ۹۶/۱/۱۶)

چکیده

پپتیدهای زیست فعال اجزاء پروتئینی هستند که در درون ساختار پروتئین غیرفعال بوده و وقتی در اثر هیدرولیز آنزیمی آزاد می‌شوند، عملکردهای فیزیولوژیکی مختلفی نشان می‌دهند. اخیراً شناخت و تعیین ویژگی‌های پپتیدهای زیست فعال به‌دست‌آمده از منابع گیاهی، حیوانی و میکروبی مختلف بسیار موردتوجه قرارگرفته است. پپتیدهای زیست فعال با استفاده از هیدرولیز آنزیمی توسط آنزیم‌های استخراج‌شده از میکروارگانیسم‌ها یا گیاهان یا آنزیم‌های گوارشی و تخمیر توسط کشت‌های آغازگر پروتئولیتیک تولید می‌شوند و بر اساس ترکیب و توالی اسیدهای آمینه دارای عملکردهای مختلف شامل اثرات آرامش‌بخشی، باند دهندگی املاح، تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی، آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدالتهاب، کاهش‌دهندگی کلسترول، ضد فشارخون و غیره می‌باشند. پپتیدهای زیست فعال با روش‌های مختلف شامل تکنیک‌های جداسازی غشایی و کروماتوگرافی از محصولات هیدرولیز پروتئینی جداسازی و با استفاده از تکنیک‌های اسپکترومتری مورد شناسایی قرار می‌گیرند. امکان استفاده از پپتیدهای زیست فعال به‌عنوان اجزاء سلامت بخشی یا درمانی وابسته به اطمینان از پایداری زیستی، دسترسی زیستی و ایمنی آن‌ها می‌باشد. امروزه استفاده از تکنیک‌های مبتنی بر کامپیوتر و استفاده از بانک‌های اطلاعاتی مختلف در تکمیل مطالعات آزمایشگاهی، امکان بررسی مکانیسم عملکردی پپتیدهای مختلف را فراهم آورده است.

واژه‌های کلیدی: پپتیدهای زیست فعال، غذاهای فراسودمند، سلامت بخش، افزودنی‌های طبیعی

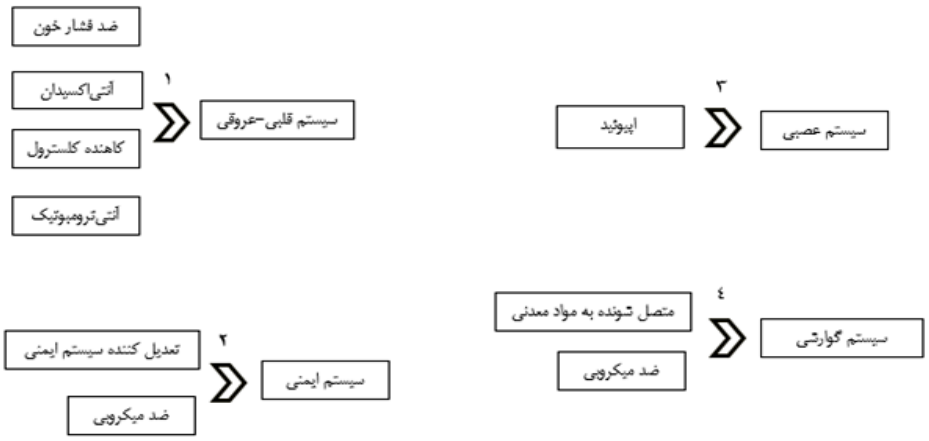
مقدمه

قرن‌ها تحقیق نشان داده است که ارتباط مستقیمی بین تغذیه و سلامت وجود دارد. قابلیت غذاها و ترکیبات آن‌ها برای بهبود کیفیت کلی زندگی سال‌ها موردتوجه دانشمندان بوده است. تابه‌حال ترکیبات زیست فعال بسیاری از ماکروبیومولکول‌ها (مثل لیپیدها و پروتئین‌ها) مشتق شده‌اند. هرچند که ترکیبات مشتق شده از پروتئین‌ها جزء مهم‌ترین و متداول‌ترین انواع موردمطالعه هستند. در بدن انسان بسیاری از محصولات هیدرولیز پروتئینی، منافع سلامت بخشی متفاوتی نشان داده‌اند. محصولات هیدرولیز پروتئینی (پپتیدهای زیست فعال) اجزاء پروتئینی خاصی هستند که دارای اثرات بیولوژیکی قابل‌توجهی می‌باشند و تأثیر مثبتی بر عملکرد یا شرایط بدن دارند، بنابراین دارای اثرات سلامت بخشی هستند و ازنظر اقتصادی به خاطر کاربردشان در تولید غذاهای فراسودمند و داروها بسیار موردتوجه قرارگرفته‌اند (Shahidi and Zhong, 2008) نقش‌های مختلف فیزیولوژیکی پپتیدها، آن‌ها را تبدیل به انتخاب مناسبی برای تولید ترکیبات درمانی کرده است. انواع متفاوتی از فعالیت‌های فیزیولوژیکی از پپتیدهای زیست فعال گزارش‌شده‌اند که وابسته به نوع، تعداد، توالی و خواص آمینواسیدهای موجود در پپتیدها می‌باشند (Danquah and Agyei, 2012).

از دیدگاه تغذیه‌ای، دسترسی زیستی پپتیدها از پروتئین‌ها و آمینواسیدهای آزاد بیشتراست. علاوه بر آن پپتیدهای کوچک‌تر، دارای اثرات حساسیت‌زایی کمتری در مقایسه با پروتئین‌های اولیه هستند و به همین دلیل محصولات هیدرولیز پروتئینی به‌طور گسترده‌ای در فرمولاسیون غذای نوزادان به‌کاربرده می‌شوند (Danquah and Agyei, 2012).

- کاربردهای درمانی پپتیدهای زیست فعال

در سال‌های اخیر توجه بسیاری به استفاده از پپتیدهای زیست فعال درزمینهٔ داروسازی و تولید غذاهای فراسودمند شده است. پپتیدها نسبت به داروهای سنتی به دلایل زیر ارجح می‌باشند: ۱- دارای فعالیت تخصصی بیشتری نسبت به بافت هدف هستند و بنابراین اثرات سمیت کمی دارند و یا فاقد سمیت می‌باشند و حتی در غلظت‌های پایین می‌توانند مؤثر باشند. این ویژگی در درمان بیماری‌های مزمن بسیار مؤثر است. ۲- ترکیبات شیمیایی سنتزی که معمولاً به‌عنوان دارو استفاده می‌شوند، دارای نوعی اثر تجمعی در ارگانیسم هستند. این ترکیبات شیمیایی ممکن است درحالی‌که هنوز فعال هستند، به‌واسطه دفع‌شان مشکلات محیط زیستی ایجاد کنند. برعکس، پپتیدهای زیست فعال هیچ تجمعی در ارگانیسم‌ها ندارند و به‌راحتی در محیط‌زیست تخریب می‌شوند (De castro and Sato, 2015). تعدادی از اثرات مثبت فیزیولوژیکی پپتیدهای زیست فعال شامل اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضد فشارخونی، تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی و غیره در شرایط *in vitro* یا *in vivo* می‌باشند که بروز هرکدام از آن‌ها به‌واسطه اثر بر یکی از سیستم‌های بدن می‌باشد (شکل ۱) در جدول (۱) به مثال‌هایی از فعالیت زیستی پپتیدهای جداسازی شده از منابع پروتئینی مختلف پرداخته شده است.



شکل (۱)- عملکرد فیزیولوژیک پپتیدهای زیست فعال

- **پپتیدهای آرامش‌بخش** (Opioid peptides)

مطالعات پیشین نشان دادند که گروهی از پپتیدها می‌توانند نقش مهمی در سیستم عصبی ایفا کنند و به‌نام مولکول‌های اپیوئیدی خوانده شدند (Teschemacher *et al.*, 1997) پپتیدهای اپیوئیدی مولکول‌های کوچک با دو فعالیت هورمونی و انتقال‌دهنده عصبی می‌باشند. این پپتیدها بر اساس فعالیت زیستی خود به دودسته آگونیست و آنتاگونیست تقسیم می‌شوند که با توالی‌های کوتاه اسیدآمینه‌ای خود فعالیت اپیات‌ها در مغز را تقلید می‌کنند (Raikos and Dassios, 2014). پپتیدهای اپیوئیدی حاصل از مواد غذایی معمولاً دارای ٤ تا ۸ اسیدآمینه هستند. این پپتیدها بااتصال به انواع دریافت‌کننده‌ها، فعالیت‌های مختلفی را ایجاد می‌کنند. کنترل حرکت روده و اثر آرام‌بخشی ازجمله فعالیت‌های این دسته از پپتیدها هستند (Shrikant Sharma and Rana, 2011) بتاکازومورفین‌ها اولین پپتیدهای اپیوئیدی شناخته شده حاصل از پروتئین‌های مواد غذایی هستند که از پروتئین بتا کازئین شیر مشتق شده‌اند. بتاکازومورفین-۷ با داشتن توالی "Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile" معروف‌ترین پپتید از این خانواده است. توالی این پپتید ممکن است به دلیل تفاوت در ساختار پروتئین کازئین در نژادهای مختلف گاوها اندکی متفاوت باشد. آلفالاکتورفین "Tyr-Gly-Leu-Phe" و بتالاکتورفین "Tyr-Leu-Leu-Phe" ازجمله پپتیدهای اپوئیدی مشتق شده از پروتئین‌های شیر هستند (Chakrabarti and Wu, 2016) هضم آنزیمی گلوتن گندم منجر به کشف پپتیدهای اپوئیدی متعددی شد که توالی اسیدآمینه‌ای آن‌ها از پپتیدهای مشتق شده از سایر منابع متفاوت است (Rutherfurd-Markwick, 2012).

- **پپتیدهای ضد میکروبی**

پپتیدهای دارای فعالیت ضدمیکروبی هم از طریق هیدرولیز پروتئین‌های ماده غذایی و هم به‌عنوان متابولیت ثانویه از باکتری‌ها (باکتریوسین‌ها) قابل تولیدند. تاکنون پپتیدهای با فعالیت ضدمیکروبی متفاوتی در شیر ردیابی شده‌اند که لاکتوفرین از مهم‌ترین آن‌ها است. هضم آنزیمی لاکتوفرین‌ها منجر به تولید سایر پپتیدهای ضد میکروبی با فعالیت بیشتر کشندگی و یا مهارکنندگی نسبت به لاکتوفرین می‌شود.

مکانیسم اثر فعالیت ضدمیکروبی این پپتیدها متنوع است. اگرچه اکثر آن‌ها با ایجاد منفذ در غشای سیتوپلاسمی ثبات غشای هدف را از بین می‌برند ولی گروهی از پپتیدها باهدف قرار دادن مولکول‌های درون‌سلولی و با ایجاد اختلال در سنتز پروتئین، DNA، فعالیت آنزیمی و یا دیواره سلولی منجر به نابودی سلول هدف می‌شوند (Nicolas, 2009).

پپتیدهای ایجادکننده منفذ بااتصال به سطح باکتری هدف، فعالیت غشای سلول هدف را مختل و درنتیجه منجر به از بین رفتن آن می‌شوند (Abdou *et al*. 2007). بررسی‌ها نشان می‌دهد که ناحیه انتهای آمین در این گروه از پپتیدها در فعالیت کشندگی نقش دارد (Dionysius and Milne, 1997) این پپتیدهای نفوذکننده به غشای سیتوپلاسمی معمولاً توالی‌های کوتاهی هستند که توانایی عبور از غشای سلول هدف رادارند و به‌صورت بی ساختار در محلول‌ها بوده و به‌محض تماس با غشای سیتوپلاسمی، ساختار ثانویه از نوع آلفاهلیکس و یا صفحات بتا پیدا می‌کنند. در این شرایط ساختار دوگانه دوست در این پپتیدها دیده می‌شود. به‌این‌ترتیب که از قسمت قطبی با سر قطبی لیپیدها و از قسمت غیر قطبی با سر اسیل غشا اتصال می‌یابند (Last *et al*., 2013) تحقیقات نشان داده است که اکثر این پپتیدها حاوی کمتر از ۵۰ اسیدآمینه و غنی از اسیدآمینه‌های کاتیونی و آبگریز هستند. تحقیقات قبلی نیز نشان داده‌اند که کوتاه بودن طول زنجیره پپتیدی باعث کاهش احتمال اتصال پپتید به غشاء می‌شود. زیرا برای بروز فعالیت ضدمیکروبی لازم است که پپتید ضخامت غشای سلولی که حدوداً ٤٠Å می‌باشد را پر کند. علاوه بر آن حفره‌های ایجادشده به‌وسیله پپتیدهای کوچک به‌اندازه کافی پایدار نخواهند بود. از طرفی کاهش طول پپتید باعث کاهش تمایل آن‌ها به ایجاد ساختار نوع دوم آلفاهلیکس می‌شود که تحقیقات نشان داده‌اند نقش مهمی در فعالیت ضدمیکروبی پپتیدها ایفا می‌کند (Strömstedt *et al*., 2010). پپتیدهای کوچک‌تر از ۳ کیلودالتون حاصل از هیدرولیز پروتئین‌های آب پنیر شیر شتر به‌وسیله پروتئاز K فعالیت ضد باکتریایی بیشتری در مقابل *اشریشیا کولای* در مقایسه با سایر اجزاء پپتیدی دارند و علت آن عبور راحت‌تر پپتیدهای کوچک از غشاء باکتری‌ها در مقایسه با پپتیدهای درشت‌تر است (Salami *et al*., 2010) جزء پپتیدی (۵–۱۰ KDa) حاصل از اتولیز مخمر *کلاوروما یسس مارکسیانوس* در غلظت ۱۳/۳±۰/۰۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به میزان ۱۰۰٪ از رشد هر دو باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* جلوگیری کرده و در غلظت ۵/۳۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌ترتیب دارای فعالیت بازدارندگی ٤٤/٨٢±٢٪ و ٦٨/٧٧±١/٥٪ در مقابل *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد (Mirzaei *et al*., 2015).

بررسی‌ها نشان می‌دهد که فعالیت مهارکنندگی باکتریوسین‌ها، گروه دیگر پپتیدهای ضدمیکروبی به ترکیبات محیط کشت و شرایط رشد باکتری تولیدکننده وابسته است. غلظت NaCl و زمان گرم‌خانه‌گذاری در تولید بهینه *باکتریوسین پنتوسین* مؤثر است. دو فاکتور مذکور از بین سایر فاکتورها (مقدار توین ۸۰، مقدار پپتون، مقدار عصاره مخمر، اندازه تلقیح) به‌عنوان مؤثرترین عوامل در تولید پنتوسین با استفاده از برنامه آماری روش سطح پاسخ انتخاب شدند (Motahari *et al*., 2016).

جدول (۱)- انواعی از پپتیدهای زیست فعال جداسازی شده از منابع پروتئینی مختلف

منبع پروتئینی	میکروارگانیسم یا آنزیم استفاده‌شده	توالی آمینواسیدی	کاربرد درمانی	منبع
شیر	*Streptococcus thermophiles* *Lactobacillus bulgaricus*	YPYY	ضد فشارخون	Tsai *et al*., (2008)
ساکارومایسس سروزیه	تریپسین	YGKPVAVPAR	ضد فشارخون و آنتی‌اکسیدان	Mirzaei *et al*., (2015)
کازئینات سدیم	*L. acidophilus* ATCC 4356 *Lc. lactis* subsp. *lactis* GR5	پپتیدها با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون	تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی	Stuknyte *et al*., (2011)
شیر شتر و شیر گاو	*L. rhamnosus* PTCC 1637	پپتیدهای با وزن ۱۰-۵ و کمتر از ۵ کیلودالتون	آنتی‌اکسیدان ضد فشارخون	Moslehishad *et al*., 2013)
بتا لاکتوگلوبولین	تریپسین	IPAVFK	ضدباکتریایی	Pellegrini *et al*., 2001)
پروتئین‌کازئین شیر (κ-cn f(58–59))	*Lb. helveticus* CPN4	YP	ضد فشار خون	Yamamoto *et al*.,1999)
ریزجلبک Chlorella vulgaris	پپسین	VECYGPNRPQF	آنتی‌اکسیدان	Sheih *et al*.,2009)
پروتئین شیر	*Lactobacillus helveticus* LBK-16H	VPP	اتصال به کلسیم	Narva *et al*., (2007)
پروتئین‌کازئین شیر αs1-CN 31-40	*S. thermophiles* *Lb. bulgaricus*	VFGKEKVNEL	آنتی‌اکسیدان	Sabeena *et al*., (2010)
α- لاکتالبومین	پپسین	YGLF	اوپیوئید	Antila *et al*., (1991)
بتاکازئین	*Lactobacillus helveticus*	VPP	ضد فشار خون	Nakamura *et al*., 1995)
کازئین-K	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO13953	ARHPHPHLSFM	آنتی‌اکسیدان	Nakano *et al*., (2006)
بتاکازئین	*Streptococcus thermophilus*+*Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*	SLVYP	ضد فشار خون	Seppo *et al*., (2003)
آلفالاکتوالبومین	Synthetic peptides derived from milk proteins	YGG	تعدیل‌کننده سیستم ایمنی	Kayser and (Meisel, 1996)
کازئین-k	Synthetic peptides derived from milk proteins	YG	تعدیل‌کننده سیستم ایمنی	
بتا کازئین-کازئین as1	*Lactobacillus* GG enzymes+pepsin & trypsin	YPFP	اوپیوئید	Park and Nam, (2015)

- پپتیدهای تعدیل‌کننده سیستم ایمنی

ارتباط مشخصی بین تغذیه انسان و ایمنی وجود دارد. تحقیقات نشان داده است که پپتیدهای زیست فعال مشتق شده از منابع پروتئینی مختلف، دارای اثرات تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی در مطالعات *in vitro* و *in vivo* هستند. پپتیدهای تقویت‌کننده سیستم ایمنی می‌توانند به‌صورت طبیعی در جریان هضم گوارشی تولید شوند و بنابراین بر پاسخ‌های ایمونولوژیکی و عملکرد سلول‌ها تأثیرگذار باشند و یا در طی هیدرولیز آنزیمی در شرایط آزمایشگاهی تولید شوند و به‌عنوان غذا دارو مورداستفاده قرار گیرند. شیر علاوه بر نقش‌های تغذیه‌ای معمولش، نقش مهمی را در تقویت سیستم ایمنی نوزادان در بدو تولد ایفا می‌کند.

تولید پپتیدهای با فعالیت تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی در اثر هضم پروتئین‌های شیر گاو را گزارش کردند. تحقیقات قبلی نشان می‌دهند که پپتیدهای زیست فعال مشتق شده از کازئین یا آب پنیر در تحریک و تکثیر لنفوسیت‌ها، ماکروفاژها، سنتز آنتی‌بادی، تنظیم

سیتوکین‌ها و فعالیت فاگوسیتوزی مؤثرند. گروهی از این پپتیدها مثل بتاکازئین f191 در تحریک ماکروفاژها نقش دارند. بتاکازئین f63 در تحریک عمل فاگوسیتوز مؤثر است. اگرچه تحقیقات *In vivo* نشان می‌دهد که هر دو پپتید مذکور در ایجاد ایمنی در موش‌ها بی‌اثر هستند (Fiat *et al*., 1993) همچنین مطالعات نشان می‌دهد پپتیدهای مشتق شده از پروتئین‌های شیر در تکثیر لنفوسیت‌های پری‌فرال انسانی نیز مؤثرند (Kayser and Meisel 1996) مونوسیت‌ها و سلول‌های کمکی T (T helper cells) نیز ازجمله سلول‌هایی هستند که تحت برهم‌کنش با این پپتیدها قرار می‌گیرند. لاکتوفرین پس از تجزیه و ایجاد لاکتوفرین بتا بااتصال به نوتروفیل‌ها فعالیت مشابه اپسونین (Opsonin) را ایفا می‌کند (Mohanty *et al*., 2016) تحقیقات دیگری نشان داده که بتاکازومورفین ۷ (β-casomorphin-7) هم دارای فعالیت تحریکی و هم فعالیت مهارکنندگی روی لنفوسیت‌ها است و نوع فعالیت تحت تأثیر غلظت پپتید است. به‌گونه‌ای که در غلظت‌های پایین، دارای فعالیت مهارکنندگی و در غلظت‌های بالاتر دارای اثرات تحریک‌کنندگی است (Trompette *et al*., 2003)

- پپتیدهای ضد فشار خون

آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتانسین (Angiotensin Converting Enzyme) با برش انتهای کربوکسیل، آنژیوتانسین I را به آنژیوتانسین II تبدیل و درنتیجه باعث افزایش فشار خون می‌گردد. پپتیدهای ضد فشار خون با مهار این آنزیم از افزایش فشار خون جلوگیری می‌کنند. اکثر پپتیدهای ضد فشار خون شناخته شده از کازئین شیر گاو جداشده‌اند. گرچه پپتیدهای ضد فشار خون نظیر آلفالاکتورفین (α-lactorphin) و بتالاکتورفین (β-lactorphin) نیز به‌ترتیب از پروتئین‌های آلفالاکتالبومین و لاکتاگلوبومین جداسازی شده‌اند (Mohanty *et al*., 2016).

ارتباط بین اندازه پپتیدها و فعالیت بازدارندگی ACE پپتیدها را گزارش کردند (Ruiz-ruiz *et al*., 2013) هم‌چنین تحقیقات نشان داد که اجزای پپتیدی کوچک‌تر از ۳ و ۵-۳ کیلودالتون حاصل از هیدرولیز پروتئین‌های مخمر *کلاوروما یسس مارکسیانوس* به‌وسیله آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین دارای بیشترین فعالیت بازدارندگی ACE هستند (Mirzaei *et al*., 2016). هر دو ناحیه آنزیم مذکور (ناحیه C و N) دارای سایت فعال حاوی توالی His-Glu-XX-His هستند. این سایت‌های فعال درون شکاف دو ناحیه قرارگرفته‌اند و به‌وسیله سرپوش انتهای آمین محافظت می‌شوند. این سرپوش، دسترسی پلی پپتیدهای بزرگ را به سایت فعال محدود می‌کند و این موضوع می‌تواند تأثیر بیشتر پپتیدهای کوچک را در جلوگیری از فعالیت آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتانسین توضیح دهد (Gobbetti *et al*., 2002).

گرچه اطلاعات دقیقی در مورد ارتباط ساختار و عملکرد این گروه از پپتیدها در دسترس نیست، اما تحقیقات نشان می‌دهد اتصال پپتیدها به آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتانسین وابسته به انتهای کربوکسیل پپتید است و پپتیدهای دارای اسیدآمینه‌های آبگریز در این بخش مهارکننده‌های قوی‌تری می‌باشند. این اسیدآمینه‌ها در حققیت با جایگاه فعال آنزیم برهم‌کنش می‌دهند. از طرفی تحقیقات دیگر خبر از مؤثر بودن بیشتر اسیدآمینه‌های آروماتیک شامل تریپتوفان، تایروزین و فنیل الانین و همچنین پرولین بر این

برهم‌کنش می‌دهند (Cheung *et al.*, 1980). نسبت آمینواسیدهای آبدوست/آبگریز در توالی پپتیدها نقش کلیدی در میزان فعالیت بازدارندگی ACE ایفا می‌کند. زیرا آمینواسیدهای آبدوست دسترسی پپتید به سایت فعال آنزیم را محدود می‌سازند (Li *et al.*, 2004).

- پپتیدهای متصل‌شونده به مواد معدنی

پروتئین‌ها از طریق اسیدآمینه‌های زنجیره جانبی‌شان با یون‌ها برهم‌کنش می‌دهند. برای مثال آلفاکازئین و بتاکازئین با کاتیون‌های دو ظرفیتی و سه‌ظرفیتی مثل کلسیم برهم‌کنش می‌دهند. اما علاوه بر پروتئین‌ها، پپتیدها نیز دارای فعالیت اتصال‌دهندگی به مواد معدنی هستند. برای مثال فسفوپپتیدهای مشتق شده از کازئین که به‌عنوان کازئین فسفوپپتیدها خوانده می‌شوند نیز دارای این فعالیت می‌باشند (Walther and Sieber, 2011) این فسفوپپتیدها در حفظ کلسیم، فسفر و سایر عناصر معدنی به شکل محلول در شرایط pH روده نقش دارند. این فعالیت درنتیجه حضور اسیدآمینه فسفوریله سرین است که دارای توانایی ایجاد نمک با مواد معدنی مثل کلسیم می‌باشد. درنتیجه هضم آنزیمی شیر گروه متنوعی از این پپتیدها تولید می‌شوند (Miquel *et al.*, 2005) ساختار آنیونی این پپتیدها آن‌ها را از هضم پروتئولیتیک بیشتر در امان نگه‌داشته و منجر به ایجاد کمپلکس محلول با کلسیم و درنتیجه عدم تشکیل فسفات کلسیم غیرمحلول می‌شود. نوع ترکیب اسیدآمینه‌ای در منطقه فسفوریله شده نقش اساسی در میزان فعالیت اتصالی به کلسیم را در این دسته از پپتیدها ایفا می‌کند (Gagnaire *et al.*, 1996). این پپتیدها در جلوگیری از پوسیدگی دندان‌ها، پوکی استخوان، بی‌خوابی و فشار خون نیز مؤثر گزارش‌شده‌اند.

بررسی‌ها در حیوانات خبر از اثر مثبت این پپتیدها در جذب کلسیم در حیوانات را می‌دهد. گروهی از محققان نشان داده‌اند تخمیر پروتئین آب‌پنیر با *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* در تکثیر استئوبلاست‌ها به‌صورت *in vitro* مؤثر است. گزارش‌های دیگری مبتنی بر افزایش در دسترس قرارگیری زیستی آهن در مدل‌های موش آزمایشگاهی نیز وجود دارد (Korhonen and Pihlanto, 2006).

- پپتیدهای آنتی‌اکسیدان

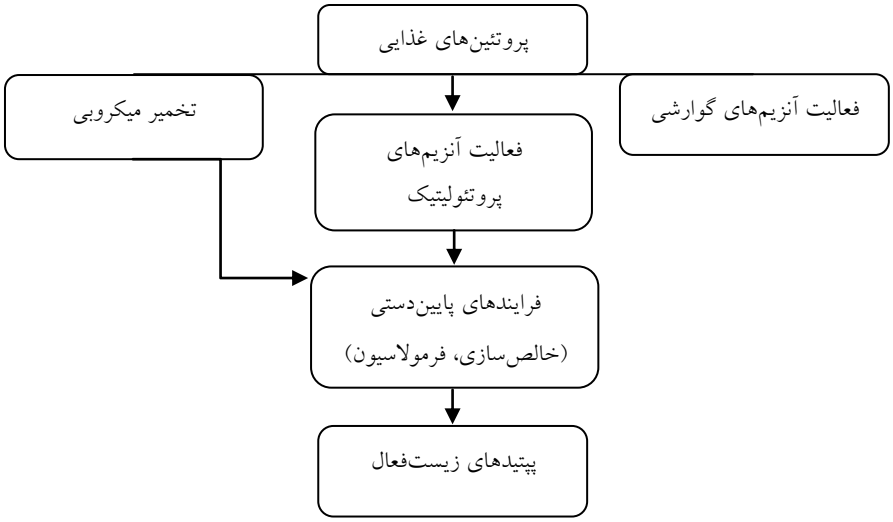
پپتیدهای با فعالیت آنتی‌اکسیدانی از هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های غذایی به دست می‌آیند. تحقیقات گسترده‌ای بر روی پپتیدهای آنتی‌اکسیدان مشتق شده از کازئین، پروتئین‌های آب پنیر، دانه سویا، سبوس برنج، پروتئین گندم، پروتئین تخم‌مرغ و محصولات دریایی انجام‌شده است (Chang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2015; Wattanasiritham *et al.*, 2015; Cian *et al.*, 2015; Ko *et al.*, 2013; Nimalaratne *et al.*, 2015). این پپتیدها با مکانیسم‌های مختلف شامل مهار پراکسیداسیون چربی‌ها، حذف رادیکال‌های آزاد، شلاته کردن یون‌های فلزی و تشکیل ترکیبات اضافی مؤثر هستند. مهار اکسیداسیون علاوه بر آن‌که در زنده‌مانی سلول‌های بدن مهم است، در مواد غذایی و به‌منظور کاهش احتمال فساد نیز دارای اهمیت می‌باشد (Walther and Sieber, 2011). اکثر پپتیدهای مطالعه شده در این گروه، از کازئین-αs مشتق شده‌اند. بررسی‌های مختلف نشان داده‌اند که پپتیدهای با وزن مولکولی پایین خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به انواع با وزن مولکولی

بالا دارند. این اثر با واکنش بهتر رادیکال‌های آزاد فعال با پپتیدهای کوچک مرتبط است و قبلاً در مورد اجزاء پپتیدی حاصل از محصولات هیدرولیز پروتئین‌های گوشت، جو و کانولا نیز گزارش‌شده بود (Bamdad *et al.*, 2011; He *et al.*, 2013; Alashi *et al.*,2014). همچنین نتایج تحقیقات نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول هیدرولیز پروتئین ضایعات ماهی ساردین با افزایش درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد و پیشنهاد کردند که پپتیدهای کوتاه زنجیر آنتی‌اکسیدان‌های بهتری در مقایسه با پپتیدهای بلند زنجیر هستند (Bougatef *et al.*, 2010). مطالعات نشان داد که جزء پپتیدی کوچک‌تر از ۳ کیلودالتون حاصل از هیدرولیز پروتئین مخمر *ساکارومایسس سروزیه* به‌وسیله آنزیم تریپسین فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و ABTS بیشتری نسبت به سایر اجزاء پپتیدی دارد (Mirzaei *et al.*, 2015). آمینواسیدهای آبگریز حلالیت پپتیدها را در فاز چربی و دسترسی آن‌ها را به رادیکال‌های آبگریز افزایش می‌دهند و بنابراین باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شوند (Chen *et al.*, 1996) واکنش‌پذیری بالای گروه‌های آلیفاتیک در آلانین و والین را با اسیدهای چرب چند غیراشباعی آبگریز را گزارش‌شده است (Qian *et al.*, 2008) همچنین حضور اسیدآمینه آلانین در موقعیت‌های انتهایی و پرولین در توالی پپتیدهای با خاصیت آنتی‌اکسیدانی جداسازی شده از گلوتن را گزارش کرده‌اند (Suetsuna and Chen, 2002). به‌علاوه، به نقش آمینواسیدهای آروماتیک به‌خصوص تیروزین در فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها اشاره‌شده است (Duan *et al.*, 2014; Pena-Ramos *et al.*, 2004).

- روش‌های تولید پپتیدهای زیست فعال

متداول‌ترین روش برای تولید پپتیدهای زیست فعال، هیدرولیز آنزیمی به‌وسیله آنزیم‌های گوارشی می‌باشد. وقتی توالی آمینواسیدی مولکول‌ها شناخته شد، پپتیدها ممکن است با روش سنتز شیمیایی و یا تکنولوژی DNA نوترکیب سنتز شوند. روش‌های سنتز شیمیایی برای تولید توالی‌های کوتاه و تکنولوژی DNA نوترکیب برای تولید پپتیدهای بزرگ‌تر مناسب هستند (Moller *et al.*, 2008)

اساساً پپتیدهای زیست فعال می‌توانند از پروتئین‌های پیش ساز به سه طریق (شکل۱) تولید شوند: الف- هیدرولیزآنزیمی توسط آنزیم‌های استخراج شده از میکروارگانیسم‌ها یا گیاهان، ب- هیدرولیزآنزیمی توسط آنزیم‌های گوارشی، ج- تخمیر توسط کشت‌های آغازگر پروتئولیتیک، در بیشتر مطالعات، ترکیبی از (الف) و (ب) یا (الف) و (ج) در تولید پپتیدهای کوتاه زنجیر مؤثر واقع شده‌اند (Korhonen and Pihlanto, 2006).



شکل (۲)- روش‌های مختلف تولید پپتیدهای زیست فعال

- هیدرولیز آنزیمی

استفاده از پروتئازهای اختصاصی یا غیراختصاصی رایج‌ترین راه برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال است، چراکه نیاز به زمان کوتاه‌تری برای رسیدن به درجه هیدرولیز مشابه و امکان کنترل بهتر بر فرایند هیدرولیز برای دست‌یابی به پپتیدهایی با وزن‌های مولکولی و ترکیب آمینواسیدی خاص دارد. در این فرایند از آنزیم‌های مختلفی نظیر پپسین، بروملاین، تریپسین، کیموتریپسین و پاپائین تحت شرایط pH و دمای بهینه آن‌ها استفاده می‌شود (Singh *et al*., 2014).

بسیاری از پپتیدهای زیست فعال شناخته شده، عمدتاً با استفاده از آنزیم‌های گوارشی، شامل پپسین و تریپسین تولید شده‌اند. برای مثال پپتیدهای مهارکننده ACE و فسفو پپتیدهای اتصال شونده به کلسیم (CPPs) به‌طور رایج توسط تریپسین تولید می‌شوند (Korhonen and Pihlanto, 2006). سایر آنزیم‌های گوارشی و ترکیب‌های آنزیمی متفاوت پروتئینازها شامل آلکالاز، کیموتریپسین، پانکراتین، پپسین وترمولایزین همانند آنزیم‌هایی از منابع باکتریایی و قارچی نیز برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال از پروتئین‌های مختلف استفاده‌شده‌اند (Kilara and Panyam, 2003). به‌علاوه چندین آنزیم با منبع گیاهی، مانند پاپائین و پروناز برای هیدرولیز آنزیمی آرد سویا و آرد گندم بکار رفته‌اند. بسیاری از پپتیدهای زیست فعال، مانند پپتیدهای بیوژنیک، اوپیوئید، تنظیم‌کننده ایمنی، متصل‌شونده به املاح، ضد فشارخون و ضد میکروبی می‌توانند توسط هیدرولیز آنزیمی مواد غذایی از قبیل شیر، گوشت حیوانات و ماهی، ذرت، گندم، سویا و تخم‌مرغ تولید شوند (Singh *et al*., 2014).

در شرایط مقیاس صنعتی، استفاده از آنزیم‌های تثبیت شده نسبت به آنزیم‌های محلول مرسوم متداول‌تر است و دارای چندین مزیت می‌باشد. آنزیم‌های تثبیت شده اجازه هیدرولیز آنزیمی تحت شرایط معتدل‌تر و کنترل شده‌تر را می‌دهند. به‌علاوه آنزیم تثبیت شده می‌توانند بازیابی شده و از تولید متابولیت‌های ثانویه ناشی از

اتولیز آنزیم‌ها جلوگیری شود (Agyei and Danquah, 2011). روش متدوال دیگر در مقیاس صنعتی، استفاده از فرایند هیدرولیز مداوم است که به‌طور گسترده‌ای برای تبدیل کامل پروتئین‌های غذایی از منابع مختلف به محصولات هیدرولیز با ویژگی‌های تغذیه‌ای و یا عملکردی بهبود یافته به کار می‌رود. این روش تحت شرایط صنعتی مؤثرتر و کم‌هزینه‌تر از روش‌های بسته مرسوم است و با استفاده از راکتورهای مجهز به غشاهای اولترافیلتراسیون با اجزاء مختلف به دست می‌آید که ممکن است با تکنیک‌ها و یا واحدهای خالص‌سازی دیگر همراه شود (Dionysius *et al*., 1997).

- تخمیر توسط کشت‌های آغازگر پروتئولیتیک

بسیاری از کشت‌های آغازگر لبنی که به‌طور صنعتی استفاده می‌شوند، قدرت پروتئولیتیکی بالایی دارند. بنابراین، پپتیدهای زیست‌فعال می‌توانند توسط باکتری‌های آغازگر و غیرآغازگر استفاده شده در محصولات غذایی تخمیری تولید شوند. باکتری‌های اسیدلاکتیک که گروه بزرگی از باکتری‌های مفید در طبیعت هستند و در سیستم گوارشی ما نیز یافت می‌شوند، برای تولید پپتیدهای زیست فعال به کار می‌روند. نقش آن‌ها در تهیه محصولات تخمیری نه‌تنها به خاطر اثر فیزیولوژیکی بلکه به خاطر اهمیت تکنولوژیکی آن‌ها در توسعه بافت و مزه می‌باشد (Singh *et al*., 2014).

سیستم پروتئولیتیک باکتری‌های اسید لاکتیک مانند *لاکتوکوکوس لاکتیس*، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* در حال حاضر به خوبی شناخته شده است. این سیستم از یک پروتئین از متصل به دیواره سلولی و تعدادی پروتئین از درون‌سلولی شامل اندوپپتیدازها، آمینوپپتیدازها، تری‌پپتیدازها و دی‌پپتیدازها تشکیل شده است (Christensen *et al*., 1999; Kunjiet *et al*., 1996).

پاره‌ای از تحقیقات نشان داده‌اند استفاده از تخمیر چندگانه و همچنین هیدرولیز آنزیمی در ترکیب با فرایند تخمیر باعث افزایش تولید پپتیدهای زیست فعال می‌شود. در تحقیقی گزارش کرده‌اند که تخمیر شیر با یک کشت مخلوط آغازگر تجاری شامل پنج سویه باکتری اسید لاکتیک باعث افزایش فعالیت مهارکنندگی ACE می‌شود (Chen *et al*., 2007). تیمار شیر با آنزیم تریپسین قبل از تخمیر با کشت‌های آغازگر ماست منجر به ایجاد اجزای غنی از فسفوپپتیدها می‌شود. به‌طوری‌که در نمونه‌های تخمیری تیمار شده با تریپسین، تولید فسفوپپتیدهای کلسیمی (CPP)β-CN(1-25)-4P و α_{s1}-CN(43-79)-7 گزارش شد، درحالی که میزان پروتئولیز در نمونه‌هایی که به‌تنهایی تخمیر شدند، چشمگیر نبود (Lorenzen and Meisel, 2005). فعالیت بالای مهارکنندگی رادیکال‌های ABTS و DPPH شیر شتر تخمیر شده با باکتری *لکونوستوک لاکتیس* گزارش‌شده است (Soleymanzadeh *et al*., 2016). علاوه بر میکروارگانیسم‌های زنده، آنزیم‌های پروتئولیزی جداشده از باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌طور موفقیت‌آمیزی برای ایجاد پپتیدهای زیست‌فعال از پروتئین‌های شیر به‌کار رفته‌اند. در یک مطالعه، فعالیت مهارکنندگی ACE محصول هیدرولیز کازئین با استفاده از ۹ آنزیم پروتئولیتیک تجاری متفاوت را اندازه‌گیری کردند. در میان این آنزیم‌ها پپتیدهای تولید شده از یک پروتئاز جدا شده از *آسپرژیلوس اوریزه* بالاترین فعالیت مهارکنندگی ACE را در *in vitro* نسبت به سایر پپتیدها

نشان می‌دهد (Mizuno *et al*., 2005). در مقام مقایسه، تخمیر میکروبی روش ارزان‌تری برای تولید پپتیدهای زیست فعال نسبت به هیدرولیز آنزیمی است. به این دلیل که میکروارگانیسم‌ها منبع ارزان پروتئازها بوده و ایمن شناخته می‌شوند. هزینه کشت‌های باکتریایی به خاطر حداقل نیازمندی‌های غذایی لازم و زمان کوتاه رشد نسبتاً پایین است، به‌علاوه پروتئازهای باکتری‌های اسیدلاکتیک بر روی دیواره سلولی بیان می‌شوند که پروتکل‌های استخراج را نسبتاً آسان و ارزان می‌کند (Agyei and Danquah, 2011).

– تغلیظ، خالص‌سازی و شناسایی پپتیدهای زیست فعال

محصول هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها، حاوی انواعی از پپتیدها با طول‌ها و ترکیبات آمینواسیدی متفاوت است. بنابراین جداسازی و خالص‌سازی پپتیدهای زیست فعال بخش مهمی در فرایند شناسایی پپتیدهای زیست فعال و تعیین خواص فیزیک و شیمیایی آن‌ها و ارزیابی فعالیت بیولوژیکی آن‌ها می‌باشد. پپتیدهای زیست‌فعال با روش‌های مختلفی شامل تکنیک‌های جداسازی غشایی و کروماتوگرافی از محصولات هیدرولیز پروتئینی جداسازی می‌شوند (Aluko, 2012).

در روش جداسازی غشایی، محصول هیدرولیز پروتئینی با استفاده از فشار بر سطح غشاء متخلخل ریخته شده و بسته به ویژگی‌های غشاء، جداسازی بر اساس اندازه پپتید و یا بار الکتریکی انجام می‌شود. غشاها به انواع میکروفیلتراسیون، اولترافیلتراسیون و نانوفیلتراسیون تقسیم می‌شوند. متداول‌ترین انواع غشاهای اولترافیلتراسیون انواعی با Cut-off ۱، ۳، ۵، ۱۰ هستند. هرچند که انواع غشاهای دیگر مثلاً با Cut-off ۲ و ٦ کیلودالتون نیز در تحقیقات مختلف برای جداسازی اجزاء پپتیدی مورداستفاده قرارگرفته‌اند (Aluko, 2012). کروماتوگرافی فازمعکوس متداول‌ترین روش برای جداسازی و خالص‌سازی پپتیدهاست که امکان جداسازی سریع و شناسایی پپتیدها را فراهم می‌کند و علاوه بر آن خواص آب‌دوستی، آب‌گریزی آن‌ها را مشخص می‌کند. معمولاً دستگاه کروماتوگرافی در ترکیب با تجهیزات آنالیز کننده کمی و کیفی مثل شناساگر UV یا اسپکترومتری جرمی به‌کار می‌رود. معمولاً از ترکیب چند تکنیک برای جداسازی و خالص‌سازی پپتیدها استفاده می‌شود. به‌عنوان مثال ابتدا اجزاء پپتیدی با استفاده از فیلتراسیون غشایی جدا شده و سپس با استفاده از کروماتوگرافی فازمعکوس خالص‌سازی انجام می‌شود. پپتیدهای خالص شده می‌توانند مورد آنالیزهای کیفی قرار گیرند. Amino acid Analzer و Protein sequencer متداول‌ترین دستگاه‌های مورداستفاده برای تعیین ترکیب آمینواسیدها و توالی آن‌ها هستند. روش‌های دیگر مثل UV-detection، fluorescence detection، Mass spectrometry، Electrospray Ionization –tandem mass spectrometry نیز برای شناسایی پپتیدها مورداستفاده قرار می‌گیرند (Shahidi and Zhong, 2008).

– استفاده از پپتیدهای زیست فعال در فرمولاسیون غذاهای فراسودمند

حضور پپتیدهای زیست فعال به‌عنوان اجزاء غذایی به‌عنوان اجزاء سلامت بخشی یا درمانی در بسیاری از محصولات غذایی تخمیری گزارش‌شده است و مطمئناً پتانسیلی جهت کاربرد پروتئین‌ها و پپتیدهای زیست فعال به‌عنوان غذاهای فراسودمند وجود دارد. افرادی که نگران سلامتی هستند و افراد با نیازهای تغذیه‌ای خاص،

گروه‌های هدف برای غذاهای غنی‌شده با پپتیدهای زیست فعال می‌باشند. علاوه بر آن امکان افزودن پپتیدهای زیست فعال خالص و یا سنتزی با فعالیت‌های زیستی مختلف به مواد غذایی مختلف وجود دارد. برای مثال دو پپتید VPP و IPP با فعالیت ضد فشار خون شناسایی و به شکل تجاری تولید شده‌اند (Korhonen and Phlanto, 2006). اما استفاده از پپتیدهای زیست فعال، وابسته به حل مشکلاتی نظیر پایداری زیستی پپتیدها و دسترسی زیستی آن‌ها می‌باشد.

وقتی ترکیبات فراسودمند به غذا یا نوشیدنی افزوده می‌شوند، در معرض واکنش با ترکیبات دیگر هستند و ممکن است اثرات قابل‌توجهی بر کیفیت کلی محصول داشته باشند. بنابراین بررسی پایداری و کیفیت، اولین مرحله در تولید غذاهای فراسودمند می‌باشد. از دست رفتن یک یا تعدادی از ترکیبات مغذی یا طعمی یا ایجاد بدطعمی از عوامل کاهش‌دهنده عمر نگه‌داری محصولات می‌باشند (Abdul-Hamid *et al*., 2002; Harbourne *et al*., 2013).

پایداری پپتیدهای زیست‌فعال در طی نگهداری محصولات غذایی نیز موضوع مهمی است که بر دسترسی زیستی آن‌ها تأثیرگذار است و عواملی نظیر شدت نور، سطح اکسیژن، نفوذپذیری بسته‌بندی، دما، رطوبت نسبی و فاکتورهای داخلی شامل آب‌گریزی سطحی، حضور قندهای احیاء کننده، محتوای رطوبت، pH، و درجه هیدرولیز بر پایداری پپتیدها تأثیرگذار هستند (Rao *et al*., 2012; Day *et al*., 2009) به‌عنوان مثال اثر تیمار حرارتی در ترکیب با اسید و باز را بر فعالیت بازدارندگی آنزیم ACE پپتیدهای مشتق شده از کازئین گاوی بررسی کردند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که حرارت دهی در دمای ۱۰۰ °C در pH ۹ تا ۱۲ باعث کاهش فعالیت پپتیدهای بازدارنده ACE شد و ظاهر پپتیدها به‌طور قابل‌توجهی تیره شد. بعد از حرارت دهی در حضور اسید و قلیا محتوای گروه‌های آمینی پپتیدها به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافت (Wu *et al*., 2014). اما در تحقیقاتی پپتیدهای بازدارنده آنزیم ACE به‌دست‌آمده از گوشت رسیده خشک اسپانیایی (Dry-cured)، دارای فعالیت یکسانی قبل و بعد از تیمار حرارتی (از ۱۱۷–۵۰ °C) در زمان‌های ۶۰–۳ دقیقه بوده‌اند (Escudero *et al*., 2014).

برای بروز فعالیت زیستی پپتیدها لازم است این ترکیبات بعد از هضم گوارشی به فرم فعال باقی بمانند و از دستگاه گوارش جذب شوند. بنابراین ضروری است که دسترسی زیستی پپتیدهای زیست‌فعال غذایی قبل از تولید گسترده آن‌ها موردبررسی قرار گیرد.

وقتی پروتئین‌ها و پپتیدهای زیست‌فعال، بعد از مصرف وارد سیستم گوارش می‌شوند، عملکرد آنزیم‌های گوارشی ممکن است بر فعالیت زیستی آن‌ها با ایجاد تغییر در ساختارشان، تأثیرگذار باشد (Daniel and Kottra, 2004). پپتیدهای آزاد شده ممکن است عملکردهای متفاوتی نشان دهند. تعدادی از آن‌ها در دستگاه گوارش و تعدادی بعد از جذب و توزیع در جریان خون و رسیدن به اندام هدف اثرات خود را نشان می‌دهند. دی و تری‌پپتیدها می‌توانند به‌صورت دست نخورده از دستگاه گوارش جذب شوند (Shimizu and Son, 2007).

علاوه بر این مطالعات حیوانی نشان داده‌اند که پپتیدهای بزرگ‌تر (۵۱–۱۰ آمینواسید)، حاصل از هضم پروتئین‌های غذایی نیز می‌توانند به‌صورت دست نخورده جذب دستگاه گوارش شوند و اثرات زیستی

خود را نشان دهند. هرچند که دسترسی زیستی پپتیدها و مکانیسم جذب آن‌ها هنوز تحت مطالعه هستند.

تحقیقات نشان داد که فعالیت پپتیدهای بازدارنده آنزیم ACE به‌دست‌آمده از گوشت رسیده خشک اسپانیایی بعد از هضم به‌وسیله آنزیم‌های گوارشی در محیط *in vitro* دچار تغییر معنی‌داری نشد (Escudero, Mora *et al*. 2014).

از روش‌های کاربردی برای افزایش پایداری پپتیدهای زیست فعال، ریزپوشانی آن‌هاست. ریزپوشانی ترکیبات باعث محافظت اجزاء حساس موجود در کپسول می‌شود و بنابراین آن‌ها را از محیط خارج ایزوله می‌کند. این مانع محافظتی در برابر عوامل مختلف مانند اکسیژن، نور و آب فراهم می‌آورد و باعث آزادسازی کنترل شده ترکیبات می‌شود و از تماس با ترکیبات دیگر جلوگیری می‌کند. از دیگر منافع ریزپوشانی، قابلیت آزادسازی کنترل شده ترکیبات می‌باشد که انتقال هدفمند آن‌ها را در زمان مناسب فراهم می‌آورد. آزادسازی تدریجی ترکیبات می‌تواند تأثیر افزودنی‌های غذایی را افزایش دهد و باعث اطمینان از دز مصرف آن‌ها شود. استفاده از لیپوزوم‌ها در پوشش دهی پروتئین‌ها و سایر اجزاء غذایی موردمطالعه قرارگرفته است و روش‌های متفاوتی برای آماده‌سازی لیپوزوم‌ها در تحقیقات مختلف موردمطالعه قرارگرفته‌اند. بنابراین ریزپوشانی محصولات هیدرولیز پروتئینی می‌تواند باعث محافظت آن‌ها تا رسیدن و آزاد شدن در غذا و یا بدن انسان شود (da Rosa Zavareze, Telles *et al*. 2014).

– ایمنی پپتیدهای زیست فعال

هرچند که پپتیدها پتانسیل زیادی برای استفاده به‌عنوان افزودنی‌های غذایی دارند اما ممکن است برای تمام کاربردهای غذایی مناسب نباشند و بررسی ایمنی و سمی بودن این ترکیبات مهم می‌باشد (Phelan, Aherne *et al*. 2009). به‌طورکلی نگرانی کمی در مورد ایمنی پپتیدهای زیست فعال ناشی از پروتئین‌های غذایی وجود دارد. زیرا بدن به‌طور نرمال پروتئین‌های غذایی را به پپتیدها هیدرولیز می‌کند و آنزیم‌ها و فرایندها با درجه غذایی برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال به‌کاربرده می‌شوند. مطالعات بسیاری عدم سمی بودن پپتیدهای زیست فعال را در کشت‌های سلولی گزارش کرده‌اند (Udenigwe and Aluko, 2012) موضوع ایمنی پپتیدهای مشتق شده از شیر موردبررسی قرارگرفته است (Phelan, Aherne *et al*. 2009). علاوه بر آن مطالعات جدیدی نشان داده‌اند که هر دو دز واحد (mg/kg ۲۰۰۰) و دز تکرارشونده روزانه (mg/kg ۱۰۰۰ برای چهار هفته) از محصولات هیدرولیز کازئین حاوی پپتیدهای ضد فشار خون اثر منفی بر پارامترهای کلینیکی (شامل خواص بیوشیمیایی خون، هماتولوژی، یا هیستوپاتولوژی) یا مرگ‌ومیر موش‌ها نداشته است. مقادیر دزهای مصرفی بسیار بالاتر از مقداری بوده است که برای ایفای فعالیت‌های فارماکولوژیکی لازم است (Anadón, Martínez *et al*. 2010).

– استفاده از تکنیک‌های مبتنی بر کامپیوتر در تحقیقات مربوط به پپتیدها

روش‌های مبتنی بر کامپیوتر مثل مطالعات پروتئومیکس و پپتیدومیکس در انجام تحقیقات درمانی پپتیدها بسیار کمک‌کننده هستند. با استفاده از تکنیک‌های مبتنی بر کامپیوتر، امکان پیش‌بینی تولید پپتیدها از پروتئین‌های غذایی خاص وجود دارد. با این روش انتخاب آنزیم‌ها، پروتئین‌ها و محصولات هیدرولیز و همچنین مطالعه ساختار دوم و خواص

فیزیک و شیمیایی پپتیدهای تولید شده امکان‌پذیر می‌باشد. روش کلاسیک شناسایی و پردازش پپتیدهای زیست‌فعال شامل هضم *in vitro* و خالص‌سازی کروماتوگرافیک محصول هیدرولیز است. بعد از آزمون فعالیت زیستی معمولاً توالی پپتیدی واقعی شناسایی می‌شود. این فرایند معمولاً با تائید فعالیت زیستی توالی پپتیدی سنتز شده شیمیایی ادامه می‌یابد. مشکل اصلی در روش کلاسیک، محصول پایین و محدودیت در تعداد گونه‌های پپتیدی است که در یک‌زمان موردمطالعه قرار می‌گیرند. از سوی دیگر روش‌های مبتنی بر اومیکس بر هضم پروتئینی با بازدهی بالا و تکنیک‌های پیش‌بینی فعالیت پپتیدی با استفاده از تکنیک‌های مبتنی بر کامپیوتر (*in silico*) استوار است که اطلاعات زیستی و شیمیومتری درباره توالی پپتیدی موردنظر فراهم می‌کنند. مراحل کلیدی در این روش به‌این‌ترتیب هستند: ابتدا، پایگاه‌های داده پروتئینی برای انتخاب پروتئین‌های موردنظر با توالی‌های آمینواسیدی شناخته شده مورد مشورت قرار می‌گیرند. سپس پروتئین‌ها به‌صورت *in silico* با استفاده از آنزیم‌های پرتئولیتیک مناسب برای پروتئین انتخاب‌شده هضم می‌شوند. سپس پپتیدهای تولید شده *in silico* برای شناسایی خصوصیات ساختاری و فعالیت‌های زیستی بالقوه شامل سمیت و حساسیت‌زایی موردبررسی قرار می‌گیرند (Agyei, Ongkudon *et al.* 2016) و BIOPEP و PEPBANK ازجمله پایگاه‌های داده‌ای پپتیدها می‌باشند (جدول ۲) و Peptide Cutter وPOPS برنامه‌های پیش‌بینی کننده پروتئولیز هستند (Danquah and Agayei, 2012).

جدول (۲)- برخی پایگاه‌های داده برای توالی‌های پروتئینی/پپتیدی، هضم و پیش‌بینی خصوصیت زیستی

پایگاه‌های داده	نام	صفحه اینترنتی
پایگاه داده توالی پروتئین/ پپتید	BIOPEP	http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep
	PepBank	http://pepbank.mgh.harvard.edu/
	BioPD	http://biopd.bjmu.edu.cn/
	EROP-Moscow	http://www.swepep.org/
	SwePep	http://erop.inbi.ras.ru/
	MilkAMP	http://milkampdb.org/home.php
	UniProtKB	http://www.uniprot.org/
	NCBI Protein database	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
	PeptideDB	http://www.peptides.be/
	AMPer	http://marray.cmdr.ubc.ca/cgi-bin/amp.pl
پایگاه هضم *in silico*	BIOPEP	http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep
	PeptideCutter	http://web.expasy.org/peptide cutter/
	POPS	http://pops.csse.monash.edu.au/pops-cgi/index.php
	NeuroPred	http://stagbeetle.animal.uiuc.edu/cgi-bin/neuropred.py
پیش‌بینی فعالیت زیستی بالقوه	PeptideRanker	http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb/
	BIOPEP	http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep
	AntiBP2	http://www.imtech.res.in/raghava/antibp2/
پیش‌بینی سمیت/حساسیت‌زایی	ToxinPred	http://www.imtech.res.in/raghava/toxinpred/
	BIOPEP	http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep
	AlgPred	http://www.imtech.res.in/raghava/algpred/
	Allerdictor	http://allerdictor.vbi.vt.edu/
	EPIMHC	http://bio.dfci.harvard.edu/epimhc/
	SORTALLER	http://sortaller.gzhmu.edu.cn/

نتیجه‌گیری

پپتیدهای زیست‌فعال می‌توانند به‌عنوان توالی‌های آمینواسیدی خاصی شناخته شوند که دارای اثرات فیزیولوژیکی مفیدی می‌باشند. تکنولوژی تولید پپتیدهای زیست‌فعال شامل هیدرولیز پروتئینی به‌وسیله آنزیم‌های میکروبی، آنزیم‌های گیاهی یا حیوانی و تخمیر با استفاده از آمینواسیدی مختلف امکان تولید پپتیدها با عملکردهای بیولوژیکی جداگانه یا چندگانه را فراهم آورده است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Abdul-Hamid, A., Bakar, G. and Bee, G.H. (2002). Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from Black Tilapia (Oreochromis mossambicus). Food Chemistry 78(1): 69-74.
- Agyei, D. and Danquah, M.K. (2011). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. Biotechnology Advances 29(3): 272-277.
- Agyei, D., Ongkudon, C.M., Wei, C.Y., Chan, A.S. and Danquah, M.K. (2016). Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. Food and Bioproducts Processing 98: 244-256.
- Alashi, A. M., Blanchard, C.L., Blanchard, C.L., Mailer, R.G., Agboola, S.O., Mawson, J., *et al.* (2014). Antioxidant properties of Australian canola meal protein hydrolysates. Food Chemistry 146: 500-506.
- Aluko, R. E. (2012). Bioactive peptides. Functional foods and nutraceuticals. New York, Springer-verlag.
- Anadón, A., Martínez, M.A., Ares, I., Ramos, E., Martinez-Larranaga, M.R., Contreras, M.M., *et al*. (2010). Acute and repeated dose (4 weeks) oral toxicity studies of two antihypertensive peptides, RYLGY and AYFYPEL, that correspond to fragments (90–94) and (143–149) from αs1-casein. Food and Chemical Toxicology 48(7): 1836-1845.
- Antila, P., Paakkari, I., Jarvinen, A., Mattila, M.J., Laukkanen, M., Pihlanto-leppala, A., *et al*. (1991). Opioid peptides derived from in-vitro proteolysis of bovine whey proteins. International Dairy Journal 1(4): 215-229.
- Bamdad, F., Wu, J., Chen, L. (2011). Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein. Journal of Cereal Science 54(1): 20-28.
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., *et al*. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (Sardinella aurita) by-products proteins. Food Chemistry 118(3): 559-565.
- Chakrabarti, S. and Wu, J. (2016). Bioactive peptides on endothelial function. Food Science and Human Wellness 5(1): 1-7.
- Chang, O. K., Ha, G.E., Han, G.S., Seol, K.H., Kim, H.W., Jeong, S.G., *et al*. (2013). Novel antioxidant Peptide derived from the ultrafiltrate of ovomucin hydrolysate. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61(30): 7294-7300.
- Chen, G.-W., Tsai, J.-S. Pan, B.S. (2007). Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. International Dairy Journal 17(6): 641-647.

- Chen , H., Muramoto , K., Yamauchi, F., Nokihara, K., (1996). Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44: 2619-2623.
- Da Rosa Zavareze, E., Telles, A.C., Halal, S.L.M., Meritaine, D.R., Colussi, R., Assis, L.M.D. *et al*. (2014). Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (Micropogonias furnieri) muscle and byproduct. LWT - Food Science and Technology 59(2, Part 1): 841-848.
- Danquah, MK. and Agyei, D. (2012). Pharmaceutical applications of bioactive peptides. OA Biotechnology 1: 5.
- Day, L., Seymour, R.B., Pitts, K.F., Konczak, I., Lundin, L. (2009). Incorporation of functional ingredients into foods. Trends in Food Science & Technology 20(9): 388-395.
- De Castro, R. J. S. and Sato, H.H. (2015). Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. Food Research International 74: 185-198.
- Dionysius, D. A. and Milne, J.M. (1997). Antibacterial peptides of bovine lactoferin:purification and characterization. Journal of Dairy Science 80: 667-674.
- Escudero, E., L. Mora, Toldra, F. (201 4). Stability of ACE inhibitory ham peptides against heat treatment and in vitro digestion. Food Chemistry 161: 305-311.
- Fiat, A.M, Migliore-Samour, D., Jolles, P., Drouet, L., Bal dit Sollier, C., Caen, J. (1993). Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. Journal of dairy science 76(1): 301-310.
- Gagnaire, V., Pierre, A., Molle, D., Leonil, J. (1996). Phosphopeptides interacting with colloidal calcium phosphate isolated by tryptic hydrolysis of bovine casein micelles. Journal of Dairy Research 63: 405-422.
- Gobbetti, M., Stepaniak, L.,De Angelis, M., Corsetti, A., D Cagno, R. (2002). Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 42(3): 16.
- Harbourne, N., Marete, E., Jacquier, J.C., O'Riordan, D. (2013). Stability of phytochemicals as sources of anti-inflammatory nutraceuticals in beverages A review. Food Research International 50(2): 480-486.
- He, R., Girgih, A.T., Malomo, S. A., Ju, X., Aluko, R.E. (2013). Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. Journal of Functional Foods 5(1): 219-227.
- Kayser, H. and Meisel, H. (1996). Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins." FEBS Letters 25, 383 (1-2):18-20.
- Kilara, A. and Panyam, D. (2003). Peptides from milk proteins and their properties. Critical Review in Food Science and Nutrition 43: 607-633.
- Korhonen, H. and Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. International Dairy Journal 16(9): 945-960.
- Last, N.B., Schlamadinger, D.E., Miranker, A.D. (2013). A common landscape for membrane-active peptides. Protein Science 22: 870-882.
- Li, G.-H., Le, G.W., Shi, Y.H., Shrestha, S. (2004). Angiotensin I–converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. Nutrition Research 24: 469-486.
- Lorenzen, P. C. and Meisel, H. (2005). Influence of trypsin action in yoghurt milk on the release of caseinophosphopeptide-rich fractions and physical properties of the fermented products. International Journal of Dairy Technology 58(2): 119-124.

- Miquel, E., Gomez, J.A., Aleqria, A.,Barbera, R., Farre, R., Recio, I.(2005). Identification of casein phosphopeptides released after simulated digestion of milk-based infant formulas. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 3426-3433.
- Mirzaei, M., Mirdamadi, S., Ehsani, M.R., Aminlari, M. (2016). Antioxidant, ACE-Inhibitory and antibacterial activities of Kluyveromyces marxianus protein hydrolysates and their peptide fractions. Functional Foods in Health and Disease 6(7): 425-439.
- Mirzaei, M., Mirdamadi, S., Ehsani, M.R., Aminlari, M. Hosseini, E. (2015). Purification and identification ofantioxidant and ACE-inhibitory peptide from Saccharomyces cerevisiae protein hydrolysate. Journal of Functional Foods 19: 259-268.
- Mizuno, S., Matsuura, K., Gotou, T., Nishimura, S., Kajimoto, O., Yabune, M. et al. (2005). Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo-controlled study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. British Journal of Nutrition 94(1): 84-91.
- Mohanty, D. P., Mohapatra, S., Misra, S., Sahu, P.S. (2016). Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. Saudi Journal of Biological Sciences 23(5): 577-583.
- Möller N.P., KE, S.-A. Roos, N., Schrezenmeir, J. *et al*. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. European Journal of Nutrition. 47: 171-182.
- Moslehishad, M., Ehsani, M.R., Salami, M., Mirdamadi, S., Ezzatpanah, H., Niasari Naslaji, A., *et al*. (2013). The comparative assessment of ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions obtained from fermented camel and bovine milk by Lactobacillus rhamnosus PTCC 1637. International Dairy Journal 29: 82-87.
- Motahari, P., Mirdamadi, S., Kiani Rad, M. (2016). A Sequential Statistical Approach Towards an Optimized Production of Bacteriocin by Lactobacillus pentosus TSHS. Journal of Food Processing and Preservation 40(6):1238-1246.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Takano, T. (1995). Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. Journal of Dairy Science, 78: 1253-1257.
- Nakano, D., OGURA K., Miyakoshi, M., Ishii, F., Kawanishi, H., Kurumazuka, D., *et al*. (2006). Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from a sesame protein hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 70: 1118-1126.
- Narva, M., Rissanen, J., Halleen, J., Vapaatalo, H., Vaananen, K., Korpela, R. (2007). Effects of bioactive peptide, valyl-prolyl-proline (VPP), and lactobacillus helveticus fermented milk containing VPP on bone loss in ovariectomized rats. Annals of Nutrition and Metabolism 51: 65-74.
- Nicolas, P. (2009). Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. Febs Journal 276: 6483-6496.
- Park, Y. W. and Nam, M.S. (2015). Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review. ." Korean Journal for Food Science of Animal Resources 35: 831-840.
- Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U., Hunziker, P. (2001). Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine beta-lactoglobulin. Biochimica and Biophysica Acta. 1526: 131-140.
- Phelan, M., Aherne, A., FitzGerald, R.J. O´Brien, N.M. (2009). Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regu (2008) .Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, Rana catesbeiana Shaw. Bioresource Technology 99(6): 1690-1698.
- Raikos, V., Dassios, T. (2014). Health-promoting properties of bioactive peptides derived from milk proteins in infant food: a review. Dairy Science & Technology 94: 91-101.

- Rao, S., Sun, J., Liu, Y., Zeng, H., Su, Y., Yang, Y. (2012). ACE inhibitory peptides and antioxidant peptides derived from in vitro digestion hydrolysate of hen egg white lysozyme. Food Chemistry 135: 1245-1252.
- Ruiz-ruiz, J., Davila-Ortiz, G., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D., Ruiz-Ruiz, J., Davila-Ortiz, G., *et al*. (2013). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antioxidant peptide fractions from hard-to-cook bean enzymatic hydrolysates. Journal of Food Biochemistry 37: 26-35.
- Rutherfurd-Markwick ,K. J. (2012). Food proteins as a source of bioactive peptides with diverse functions. British Journal of Nutrition, 108.
- Sabeena Farvin, K. H., Baron, C.P., Nielsen, N.S., Otte, J., Jacobsen, C. (2010). Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 2 – Characterisation of peptide fractions. Food Chemistry, 123: 1090-1097.
- Salami, M., Moosavi-movahedi, A.A., Ehsani, M.R., Yousefi, R., Haertle, T., Chobert, J.M. *et al*. (2010). Improvement of the antimicrobial and antioxidant activities of camel and bovine whey proteins by limited proteolysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58: 3297-3302.
- Seppo, L., Jauhiaineh, T., Poussa, T., Korpela, R. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure–lowering effect in hypertensive subjects. The American Journal of Clinical Nutrition 77: 326-330.
- Shahidi, F. and Zhong, Y. (2008). Bioactive Peptides. Journal of AOAC International, 91: 914-931.
- Sheih, I. C., Wu, T.K., Fang, T.J. (2009). Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. Bioresource Technology 100: 3419-3425.
- Shimizu, M. and Son, D.O. (2007). Food-derived peptides and intestinal functions. Current Pharmaceutical Design, 13: 885-895.
- Singh, B. P., Vij, S., Hati, S. (2014). Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. Peptides 54: 171-179.
- Soleyanzadeh, N., Mirdamadi, S., KianiRad, M. (2016). Antioxidant activity of camel and bovine milk fermented by lactic acid bacteria isolated from traditional fermented camel milk (Chal). Dairy Science & Technology 96: 443-457.
- Stuknyte, M., De Noni, I., Guglielmetti, S., Minuzzo, M., Mora, D. (2011). Potential immunomodulatory activity of bovine casein hydrolysates produced after digestion with proteinases of lactic acid bacteria. International Dairy Journal 21(10): 763-769.
- Suetsuna, K. and Chen, J.R. (2002). Isolation and Characterization of Peptides with Antioxidant Activity Derived from Wheat Gluten. Food science and technology research 8: 227-230.
- Teschemacher, H., Koch, G., Brantl, V. (1997). Milk protein-derived opioid receptor ligands. Biopolymers 43: 99-117.
- Trompette, A., Claustre, J., Caillon, F., Jourdan, G., Chayvialle, J.A., Plaisancie, P. (2003). Milk bioactive peptides and beta-casomorphins induce mucus release in rat jejunum. Journal of Nutrition 133: 3499-3503.
- Tsai, J. S., Chen, T.J., Pan, B.S., Gong, S.D., Chung, M.Y. (2008). Antihypertensive effect ofbioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk. Food Chemistry 106: 552-558.
- Udenigwe, C. C. and Aluko, R.E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. Journal of Food Science 77: 11-24.
- Walther, B. and Sieber, R. (2011). Bioactive proteins and peptides in foods. International Journal of Vitamin and Nutrition Research 81: 181-192.
- Wu, W., Yu, P.P., Zhang, F.Y., Hx, C., ZM, J. (2014). Stability and cytotoxicity of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine casein. Journal of Zhejiang University- Science B 15(2): 143-152.

• Yamamoto, N., Maenom, M., Takano, T. (1999). Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like productfermented by Lactobacillus helveticus CPN4. Journal of Dairy Science 82: 1388-1393.

«Review Article»

Bioactive peptides: production, health effects and application as natural supplements for functional foods production

Mirdamadi, S.[1*], Soleymanzadeh, N.[2], Mirzaei, M.[3], Motahari, P.[2]

1. Assisstent Professor of Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Tehran, Iran
2. Ph.D student of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Tehran, Iran
3. Associated Professor of Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author's email: mirdamadi@irost.ir
(Received: 2016/10/11 Accepted: 2017/4/ 5)

Abstract

Bioactive peptides, are inactive components within the structure of the protein and when they are released by enzymatic hydrolysis, show different physiological functions. Recently, the identification and characterization of bioactive peptides derived from plant and animal sources and different microorganisms is highly regarded. They are produced during enzymatic hydrolysis by gastrointestinal enzymes or enzymes extracted from microorganisms and plants or by proteolytic starter cultures during fermentation process and exhibit different activities including: opioid, mineral binding, immunomodulatory, antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, chlosterol lowering and so on. Take advantage of bioactive peptides as components of health is related to bio stability assurance, bioavailability and safety of them. The use of computer-based techniques and the use of various databases completed in laboratory studies, have provided the possibility of studying the mechanisms of action of different peptides.

Keywords: Bioactive peptides, Functional foods, Health, Natural suppliments