

پتیدهای زیست فعال: فرایند تولید، اثرات سلامت بخشی و کاربرد به عنوان افزودنی های طبیعی در تولید غذاهای فراسودمند

سعید میردامادی^{۱*}، نازیلا سلیمان زاده^۲، مهتا میرزایی^۳، پریا مطهری^۲

۱. دانشیار پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

۲. دانشجوی دکتری زیست فناوری، سازمان پژوهش های 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

پتیدهای زیست فعال اجزاء پروتئینی هستند که در درون ساختار پروتئین غیرفعال بوده و وقتی در اثر هیدرولیز آنزیمی آزاد می شوند، عملکردهای فیزیولوژیکی مختلفی نشان می دهند. اخیراً شناخت و تعیین ویژگی های پتیدهای زیست فعال به دست آمده از منابع گیاهی، حیوانی و میکروبی مختلف بسیار مورد توجه قرار گرفته است. پتیدهای زیست فعال با استفاده از هیدرولیز آنزیمی توسط آنزیم های استخراج شده از میکروارگانیسم ها یا گیاهان یا آنزیم های گوارشی و تخمیر توسط کشت های آغازگر پروتئولیتیک تولید می شوند و براساس ترکیب و توالی اسیدهای آمینه دارای عملکردهای مختلف شامل اثرات آرامش بخشی، بانددهندگی املاح، تقویت کنندگی سیستم ایمنی، آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد التهاب، کاهش دهندگی کلسترول، ضد فشار خون و غیره می باشند. پتیدهای زیست فعال با روش های مختلف شامل تکنیک های جداسازی غشایی و کروماتوگرافی از محصولات هیدرولیز پروتئینی جداسازی و با استفاده از تکنیک های اسپکترومتری مورد شناسایی قرار می گیرند. امکان استفاده از پتیدهای زیست فعال به عنوان اجزاء سلامت بخشی یا درمانی وابسته به اطمینان از پایداری زیستی، دسترسی زیستی و ایمنی آنها می باشد. امروزه استفاده از تکنیک های مبتنی بر کامپیوتر و استفاده از بانک های اطلاعاتی مختلف در تکمیل مطالعات آزمایشگاهی، امکان بررسی مکانیسم عملکردی پتیدهای مختلف را فراهم آورده است.

واژه های کلیدی: پتیدهای زیست فعال، غذاهای فراسودمند، سلامت بخش، افزودنی های طبیعی

مقدمه

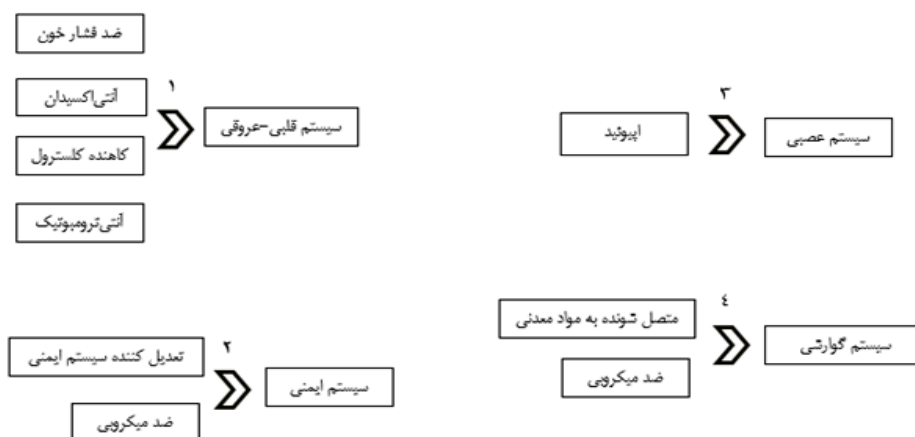
قرن‌ها تحقیق نشان داده است که ارتباط مستقیمی بین تغذیه و سلامت وجود دارد. قابلیت غذاها و ترکیبات آن‌ها برای بهبود کیفیت کلی زندگی سال‌ها مورد توجه دانشمندان بوده است. تا به حال ترکیبات زیست فعال بسیاری از ماکروبیومولکول‌ها (مثل لیپیدها و پروتئین‌ها) مشتق شده‌اند. هرچند که ترکیبات مشتق شده از پروتئین‌ها جزء مهمترین و متداول‌ترین انواع مورد مطالعه 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 قابل توجهی می‌باشند و تأثیر مثبتی بر عملکرد یا شرایط بدن دارند، بنابراین دارای اثرات سلامت بخشی هستند و از نظر اقتصادی به‌خاطر کاربردشان در تولید غذاهای فراسودمند و داروها بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (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 گزارش شده‌اند 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 بیشتر است. علاوه بر آن پپتیدهای کوچک‌تر، دارای اثرات حساسیت‌زایی کمتری در مقایسه با پروتئین‌های اولیه هستند و به‌همین دلیل

محصولات هیدرولیز پروتئینی به‌طور گسترده‌ای در فرمولاسیون غذای نوزادان به‌کار برده می‌شوند (Danquah and Agyei, 2012).

- کاربردهای درمانی پپتیدهای زیست فعال

در سال‌های اخیر توجه بسیاری به استفاده از پپتیدهای زیست فعال در زمینه داروسازی و تولید غذاهای فراسودمند شده است. پپتیدها نسبت به داروهای سنتی به‌دلایل 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 موثر باشند. این ویژگی در درمان بیماری‌های مزمن بسیار موثر است. ۲- ترکیبات شیمیایی سنتزی که معمولاً به‌عنوان دارو استفاده می‌شوند، دارای نوعی اثر تجمعی در ارگانسیم هستند. این ترکیبات شیمیایی ممکن است درحالی‌که هنوز فعال هستند، به‌واسطه دفع‌شان مشکلات محیط زیستی ایجاد کنند. برعکس، پپتیدهای زیست فعال هیچ تجمعی در ارگانسیم‌ها ندارند و به راحتی در محیط زیست تخریب می‌شوند (De castro and Sato, 2015). تعدادی از اثرات مثبت فیزیولوژیکی پپتیدهای زیست فعال شامل اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد فشارخونی، تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی و غیره در شرایط *in vitro* یا *in vivo* می‌باشند که بروز هر کدام 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

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" از جمله 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 (Rutherford-Markwick, 2012)

- پپتیدهای ضد میکروبی

پپتیدهای دارای فعالیت ضد میکروبی هم از طریق هیدرولیز پروتئینهای ماده غذایی و هم به عنوان متابولیت ثانویه از باکتریها (باکتریوسینها) قابل تولیدند. تاکنون پپتیدهای با فعالیت ضد میکروبی 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.

- پپتیدهای آرامش بخش (Opioid peptides)

مطالعات پیشین نشان دادند که گروهی از پپتیدها می‌توانند نقش مهمی در سیستم عصبی ایفا کنند و به نام مولکولهای اپوئیدی خوانده شدند (Teschemacher et al., 1997) پپتیدهای اپوئیدی مولکولهای کوچکی با دو فعالیت هورمونی و انتقال دهنده عصبی می‌باشند. این پپتیدها براساس فعالیت زیستی خود به دو دسته آگونیزست و آنتاگونیزست تقسیم می‌شوند که با توالیهای کوتاه اسیدآمینه‌ای خود فعالیت اپیاتیها در مغز را تقلید می‌کنند (Raikos and Dassios, 2014). پپتیدهای اپوئیدی حاصل از مواد غذایی معمولاً دارای ۴ تا ۸ اسیدآمینه هستند. این پپتیدها با اتصال به انواع دریافت کننده‌ها، فعالیت‌های مختلفی را ایجاد می‌کنند. کنترل حرکت روده و اثر آرام‌بخشی از جمله فعالیت‌های این دسته از پپتیدها هستند (Shrikant Sharma and Rana, 2011) بتاکازومورفینها اولین پپتیدهای اپوئیدی 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"

کوچک به اندازه 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 ضد میکروبی پپتیدها ایفا می‌کند (Strömstedt et al., 2010). پپتیدهای کوچکتر از ۳ کیلو دالتون حاصل از هیدرولیز پروتئین‌های آب پنیر شیر شتر به وسیله پروتئاز K فعالیت ضدباکتریایی 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 *کلارومایسس مارکسیانوس* در غلظت $13/3 \pm 0/1$ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به میزان ۱۰٪ از رشد هر دو باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* جلوگیری کرده و در غلظت $5/32$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ترتیب دارای فعالیت بازدارندگی $2 \pm 44/82$ ٪ و $1/5 \pm 68/77$ ٪ در مقابل *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد (Mirzaei et al., 2015)

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

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

پپتیدهای ایجاد کننده منفذ با اتصال به سطح باکتری هدف، فعالیت غشای سلول هدف را مختل و در نتیجه 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 نفوذ کننده به غشای سیتوپلاسمی معمولاً توالی‌های کوتاهی هستند که توانایی عبور از غشای سلول هدف را دارند و به صورت بی‌ساختار در محلول‌ها بوده و به محض 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. به این ترتیب که از قسمت قطبی با سر قطبی لپیدها 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 اسید آمینه و غنی از اسید آمینه‌های 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 ضد میکروبی لازم است که پپتید ضخامت غشای سلولی که حدودا 40 \AA می‌باشد را پر کند. علاوه بر آن حفره‌های ایجاد شده به وسیله پپتیدهای

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

منبع پروتئینی	میکروارگانیزم یا آنزیم استفاده شده	توالی آمینواسیدی	کاربرد درمانی	منبع
شیر	<i>Streptococcus thermophiles</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	YPYY	ضد فشار خون	Tsai et al., (2008)
ساکارومایسس سروزیه	تریپسین	YGKPVAVPAR	ضد فشار خون و آنتی اکسیدان	Mirzaei et al., (2015)
کازئینات سدیم	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> GR5	پپتیدها با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون	تقویت کنندگی سیستم ایمنی	Stuknyte et al., (2011)
شیر شتر و شیر گاو	<i>L. rhamnosus</i> PTCC 1637	پپتیدهای با وزن ۱۰-۵ و کمتر از ۵ کیلودالتون	آنتی اکسیدان ضد فشار خون	Moslehisad et al., 2013
بتا لاکتوگلوبولین	تریپسین	IPAVFK	ضد باکتریایی	Pellegrini et al., 2001
پروتئین کازئین شیر (κ-cn f(58-59))	<i>Lb. helveticus</i> CPN4	YP	ضد فشار خون	Yamamoto et al., 1999
ریز جلبک <i>Chlorella vulgaris</i>	پپسین	VECYGPNRPQF	آنتی اکسیدان	Sheih et al., 2009
پروتئین شیر	<i>Lactobacillus helveticus</i> LBK-16H	VPP	اتصال به کلسیم	Narva et al., (2007)
پروتئین کازئین شیر αs1-CN	<i>S. thermophiles</i> <i>Lb. bulgaricus</i>	VFGKEKVNEL	آنتی اکسیدان	Sabeena et al., (2010)
α-لاکتالبومین	پپسین	YGLF	اوپیوئید	Antila et al., (1991)
بتاکازئین	<i>Lactobacillus helveticus</i>	VPP	ضد فشار خون	Nakamura et al., 1995
کازئین-K	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> IFO13953	ARHPHPLSFM	آنتی اکسیدان	Nakano et al., (2006)
بتاکازئین	<i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	SLVYP	ضد فشار خون	Seppo et al., (2003)
آلفالاکتالبومین	Synthetic peptides derived from milk proteins	YGG	تعدیل کننده سیستم ایمنی	Kayser and (Meisel, 1996)
کازئین-k	Synthetic peptides derived from milk proteins	YG	تعدیل کننده سیستم ایمنی	
بتا کازئین-کازئین as1	<i>Lactobacillus</i> GG enzymes+pepsin & trypsin	YFPF	اوپیوئید	Park and Nam, (2015)

پپتیدهای تعدیل کننده سیستم ایمنی -

آنزیمی در شرایط آزمایشگاهی تولید شوند و به عنوان غذا دارو مورد استفاده قرار گیرند. شیر علاوه بر نقش های تغذیه ای معمولش، نقش مهمی را در تقویت سیستم ایمنی نوزادان در بدو تولد ایفا می کند.

تولید پپتیدهای با فعالیت تعدیل کنندگی سیستم ایمنی در اثر هضم پروتئین های شیر گاو را گزارش کردند. تحقیقات قبلی نشان می دهند که پپتیدهای زیست فعال مشتق شده از کازئین یا آب پنیر در تحریک و تکثیر لنفوسیت ها، ماکروفاژها، سنتز آنتی بادی، تنظیم

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 تقویت کنندگی سیستم ایمنی در مطالعات *in vitro* و *in vivo* هستند. پپتیدهای تقویت کننده سیستم ایمنی می توانند به صورت طبیعی در جریان هضم گوارشی تولید شوند و بنابراین بر پاسخ های ایمنولوژیکی و عملکرد سلول ها تأثیرگذار باشند و یا در طی هیدرولیز

(β -lactorphin) نیز به ترتیب 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 ۳-۵ کیلودالتون حاصل از هیدرولیز پروتئین‌های مخمر کلاورومایسس 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 قرار گرفته‌اند و به‌وسیله سرپوش انتهایی 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 انتهایی کربوکسیل پپتید است و پپتیدهای دارای اسیدآمینه‌های آبگریز در این بخش مهارکننده‌های قوی‌تری می‌باشند. این اسیدآمینه‌ها در حقیقت با جایگاه فعال آنزیم برهم‌کنش می‌دهند. از طرفی تحقیقات دیگر خبر از موثر بودن بیشتر اسیدآمینه‌های آروماتیک شامل تریپتوفان، تیروزین و فنیل‌الانین و همچنین پرولین بر این برهم‌کنش می‌دهند (Cheung *et al.*, 1980). نسبت آمینواسیدهای

سیتوکین‌ها و فعالیت فاگوسیتوزی موثرند. گروهی از این پپتیدها مثل بتاکازئین f191 در تحریک ماکروفاژها نقش دارند. بتاکازئین f63 در تحریک عمل فاگوسیتوز موثر 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 موثرند (Kayser and Meisel 1996) مونوسیت‌ها و سلول‌های کمکی T (T helper cells) نیز از جمله سلول‌هایی هستند که تحت برهم‌کنش با این پپتیدها قرار می‌گیرند. لاکتوفرین پس از تجزیه و ایجاد لاکتوفرین بتا با اتصال 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 انتهایی کربوکسیل، آنژیوتانسین I را به آنژیوتانسین II تبدیل و در نتیجه 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 جدا شده‌اند. گرچه پپتیدهای ضد فشار خون نظیر آلفالاکتورفین (α -lactorphin) و بتالاکتورفین

جذب کلسیم در حیوانات را می‌دهد. گروهی از محققان نشان داده‌اند تخمیر پروتئین آب‌پنیر با لاکتوباسیلوس *in vitro* هلویتیکوس در تکثیر استئوبلاست‌ها به صورت موثر 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 آب‌پنیر، دانه سویا، سبوس برنج، پروتئین گندم، پروتئین تخم‌مرغ و محصولات دریایی انجام شده 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 موثر هستند. مهار اکسیداسیون علاوه بر آن که 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- α S 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

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 اسید آمینه‌های زنجیره جانبی‌شان با یون‌ها برهم‌کنش می‌دهند. برای مثال آلفاکازئین و بتاکازئین با کاتیون‌های دو ظرفیتی و سه ظرفیتی 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 در نتیجه حضور اسید آمینه فسفوریله سرین است که دارای توانایی ایجاد نمک با مواد معدنی مثل کلسیم می‌باشد. در نتیجه 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 نگه داشته و منجر به ایجاد کمپلکس محلول با کلسیم و در نتیجه عدم تشکیل فسفات کلسیم غیرمحلول می‌شود. نوع ترکیب اسید آمینه‌ای 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 موثر گزارش شده‌اند. بررسی‌ها در حیوانات خبر از اثر مثبت این پپتیدها در

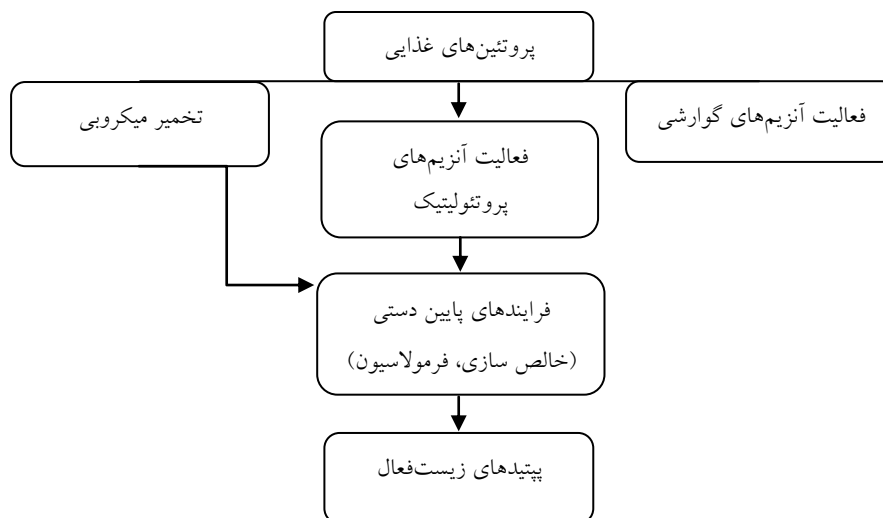
گوشت، جو و کانولا نیز گزارش شده بود (Bamdad et al., 2011; He et al., 2013; Alashi et al., 2014). همچنین نتایج تحقیقات نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول هیدرولیز پروتئین ضایعات ماهی سردین با افزایش درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد و پیشنهاد کردند که پپتیدهای کوتاه زنجیر آنتی‌اکسیدان‌های بهتری در مقایسه 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

گوشت، جو و کانولا نیز گزارش شده 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 سردین 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 گزارش شده است (Qian et al., 2008) همچنین حضور اسیدآمینو آلانین در موقعیت‌های انتهایی و پرولین در توالی پپتیدهای با خاصیت آنتی‌اکسیدانی جداسازی شده از گلوتن را گزارش کرده‌اند (Suetsuna

- روش‌های تولید پپتیدهای زیست فعال

متداول‌ترین روش برای تولید پپتیدهای زیست فعال، هیدرولیز آنزیمی بوسیله 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 زیست‌فعال می‌توانند از پروتئین‌های پیش‌ساز به سه طریق (شکل ۱) تولید شوند: الف- هیدرولیز آنزیمی توسط آنزیم‌های استخراج شده از میکروارگانیسم‌ها یا گیاهان، ب- هیدرولیز آنزیمی 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 موثر واقع شده‌اند (Korhonen and Pihlanto, 2006).



شکل (۲) - روش‌های مختلف تولید پپتیدهای زیست‌فعال

- هیدرولیز آنزیمی

آنزیم‌هایی از منابع باکتریایی و قارچی نیز برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال از پروتئین‌های مختلف استفاده شده‌اند (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 زیست‌فعال، مانند پپتیدهای بیورژنیک، اوبیوئید، 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 تخم مرغ 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 می‌تواند بازیابی‌شده و از تولید متابولیت‌های ثانویه ناشی از

استفاده از پروتئازهای اختصاصی یا غیراختصاصی رایج‌ترین راه برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال است، چرا که 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 زیست‌فعال شناخته شده، عمدتاً با استفاده از آنزیم‌های گوارشی، شامل پپسین و تریپسین تولید شده‌اند. برای مثال پپتیدهای مهارکننده ACE و فسفو پپتیدهای اتصال‌شونده 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 و ترمولایزین همانند

درون سلولی شامل اندوپیتیدازها، آمینوپیتیدازها، تریپتیدازها و دیپتیدازها 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 پیتیدهای 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 فسفوپیتیدها می‌شود. به طوری که در نمونه‌های تخمیری تیمار شده با تریپسین، تولید فسفوپیتیدهای کلسیمی α_1 - و $(CPP)\beta-CN(1-25)-4P$ و $CN(43-79)-7$ گزارش شد، در حالی که میزان پروتئولیز در نمونه‌هایی که به تنهایی تخمیر شدند، چشمگیر نبود (Lorenzen and Meisel, 2005). فعالیت بالای مهارکنندگی رادیکال‌های ABTS و DPPH شیر شتر تخمیر شده با باکتری لکونوستوک لاکتیس گزارش شده است (Soleymanzadeh *et al.*, 2016). علاوه بر میکروارگانسیم‌های زنده، آنزیم‌های پروتئولیزی جدا شده از باکتری‌های اسیدلاکتیک به طور موفقیت‌آمیزی برای ایجاد پیتیدهای زیست‌فعال از پروتئین‌های شیر به کار 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 پیتیدهای تولید شده از یک پروتئاز جدا شده از اسپیریلوس / اوریزه بالاترین فعالیت مهارکنندگی ACE را در *in vitro* نسبت به سایر پیتیدها

اتولیز آنزیم‌ها جلوگیری شود (Agyei and Danquah, 2011). روش متداول دیگر در مقیاس صنعتی، استفاده از فرایند هیدرولیز مداوم است که به طور 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 موثرتر و کم هزینه‌تر 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 به طور صنعتی استفاده می‌شوند، قدرت پروتئولیتیکی بالایی دارند. بنابراین، پیتیدهای 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 پیتیدهای زیست‌فعال به کار می‌روند. نقش آن‌ها در تهیه محصولات تخمیری نه تنها 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 هلویتیکوس 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

جداسازی اجزاء پپتیدی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Aluko, 2012). کروماتوگرافی فاز معکوس 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 به کار 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 فاز معکوس خالص‌سازی انجام می‌شود. پپتیدهای خالص شده می‌توانند مورد آنالیزهای کیفی قرار گیرند. Amino acid Analyzer و Protein sequencer متداول‌ترین دستگاه‌های مورد استفاده برای تعیین ترکیب آمینواسیدها و توالی آن‌ها هستند. روش‌های دیگر مثل UV-detection، fluorescence detection، Mass Spectrometry، Electro Spray Ionization – tandem، mass spectrometry نیز برای شناسایی پپتیدها مورد استفاده 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 گزارش شده 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

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 پروتئین‌ها بوده و ایمن شناخته می‌شوند. هزینه کشت‌های باکتریایی به خاطر حداقل نیازمندی‌های غذایی لازم و زمان کوتاه رشد نسبتاً پایین است، به‌علاوه پروتئین‌های 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 فیزیکی 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 براساس 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 ۶ کیلودالتون نیز در تحقیقات مختلف برای

ظاهر پپتیدها به طور قابل توجهی تیره شد. بعد از حرارت دهی در حضور اسید و قلیا محتوای گروه های آمینی پپتیدها به طور قابل توجهی کاهش یافت (Wu et al., 2014). اما در تحقیقاتی پپتیدهای بازدارنده آنزیم ACE به دست آمده از گوشت رسیده خشک اسپانیایی (Dry-cured)، دارای فعالیت یکسانی قبل و بعد از تیمار حرارتی (از $50-117^{\circ}\text{C}$) در زمان های ۳-۶۰ دقیقه بوده اند (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 زیست فعال غذایی قبل از تولید گسترده آنها مورد بررسی قرار گیرد.

وقتی پروتئین ها و پپتیدهای زیست فعال، بعد از مصرف وارد سیستم گوارش می شوند، عملکرد آنزیم های 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 می دهند. دی و تری پپتیدها می توانند به صورت دست نخورده از دستگاه گوارش جذب شوند (Shimizu and Son, 2007).

علاوه بر این مطالعات حیوانی نشان داده اند که پپتیدهای بزرگتر (۵۱-۱۰ آمینو اسید)، حاصل از هضم پروتئین های غذایی نیز می توانند به صورت 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.

زیست فعال می باشند. علاوه بر آن امکان افزودن پپتیدهای زیست فعال خالص و یا سنتزی با فعالیت های 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 شده اند (Korhonen and Phlanto, 2006). اما استفاده از پپتیدهای زیست فعال، وابسته به حل مشکلاتی نظیر پایداری زیستی پپتیدها و دسترسی زیستی آنها می باشد.

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

پایداری پپتیدهای زیست فعال در طی نگهداری محصولات غذایی نیز موضوع مهمی است که بر دسترسی زیستی آنها تأثیرگذار است و عواملی نظیر شدت نور، سطح اکسیژن، نفوذپذیری بسته بندی، 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). به عنوان 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 100°C در pH ۹ تا ۱۲ باعث کاهش فعالیت پپتیدهای باز دارنده ACE شد و

سمی بودن این ترکیبات مهم می‌باشد (Phelan, Aherne *et al.* 2009). به‌طور کلی 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 به‌کار برده 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 مورد بررسی قرار گرفته است (Phelan, Aherne *et al.* 2009). علاوه بر آن مطالعات جدیدی نشان داده‌اند که هر دو دز واحد (۲۰۰۰ mg/kg) و دز تکرار شونده روزانه (۱۰۰۰ mg/kg) 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 مرگ و میر 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 فیزیکی و شیمیایی پپتیدهای تولید شده امکان‌پذیر

تحقیقات نشان داد که فعالیت پپتیدهای بازدارنده آنزیم ACE به‌دست آمده 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 پوشش‌دهی پروتئین‌ها و سایر اجزاء غذایی مورد مطالعه قرار گرفته‌است و روش‌های متفاوتی برای آماده‌سازی لیپوزوم‌ها در تحقیقات مختلف مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. 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

هستند: ابتدا، پایگاه‌های داده پروتئینی برای انتخاب پروتئین‌های مورد نظر با توالی‌های آمینواسیدی شناخته شده مورد مشورت قرار می‌گیرند. سپس پروتئین‌ها به صورت *in silico* با استفاده از آنزیم‌های پرتئولیتیک مناسب برای پروتئین انتخاب شده هضم می‌شوند. سپس پپتیدهای تولید شده *in silico* برای شناسایی خصوصیات ساختاری و فعالیت های زیستی بالقوه شامل سمیت و حساسیت‌زایی مورد بررسی قرار می‌گیرند (Agyei, Ongkudon *et al.* 2016) BIOPEP و PEPBANK از جمله پایگاه‌های داده‌ای پپتیدها می‌باشند (جدول ۲) و Peptide Cutter و POPS و برنامه‌های پیش‌بینی کننده پروتئولیز هستند (Danquah MK and D 2012).

می‌باشد. روش کلاسیک شناسایی و پردازش پپتیدهای زیست‌فعال شامل هضم *in vitro* و خالص‌سازی کروماتوگرافیک محصول هیدرولیز است. بعد از آزمون فعالیت زیستی معمولا توالی پپتیدی واقعی شناسایی می‌شود. این فرایند معمولا با تایید 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 یک زمان مورد مطالعه قرار می‌گیرند. از سوی دیگر روش‌های مبتنی بر اومیکس بر هضم پروتئینی با بازدهی بالا و تکنیک‌های پیش‌بینی فعالیت‌پپتیدی با استفاده از تکنیک‌های مبتنی بر کامپیوتر (*in silico*) استوار است که اطلاعات زیستی و شیمیومتری درباره توالی پپتیدی مورد نظر فراهم می‌کنند. مراحل کلیدی در این روش به این ترتیب

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

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

نتیجه گیری

پپتیدهای زیست فعال می توانند به عنوان توالی های آمینواسیدی خاصی شناخته شوند که دارای اثرات فیزیولوژیکی مفیدی می باشند. تکنولوژی تولید پپتیدهای زیست فعال شامل هیدرولیز پروتئینی به وسیله آنزیم های میکروبی، آنزیم های 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 هیچ گونه تعارض منافی 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 Bioprocess 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., Martínez-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 α s1-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., Meritain, 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 lactoferrin: purification and characterization. *Journal of Dairy Science* 80: 667-674.
- Escudero, E., L. Mora, Toldra, F. (2014). 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 of antioxidant 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.
- Rutherford-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., Jauhiainen, 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 of bioactive 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 product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *Journal of Dairy Science* 82: 1388-1393.

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

Mirdamadi, S.^{1*}, Soleymanzadeh, N.¹, Mirzaei, M.³, Motahari, P.¹

1. Assisntent Professor of Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Tehran, Iran
2. Ph.D Graduate 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, cholesterol 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