

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



مرکز آموزش عالی  
علوم پزشکی  
وارسنتگان

# تولید بیوتکنولوژیک بیوپیتید ها و کاربرد های آنها

استاد راهنما: دکتر پرریان پزشکی

ارائه دهندگان: انسیه روان جمجاه، زهرا ابراهیم زاده و

شکیبا برادران





مرکز آموزش عالی  
علوم پزشکی  
وارسنگان

# Biotechnological production of biopeptides and their applications

Supervisor: Dr.Parnian Pezeshki

Providers: Ensiye Ravanjamjah

Zahra Ebrahimzadeh

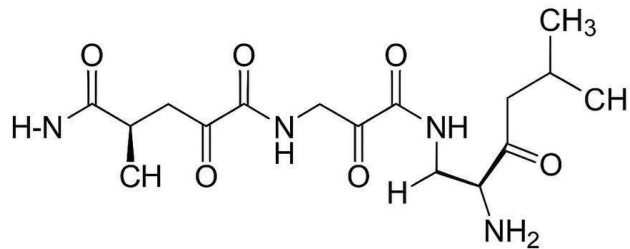
Shakiba Baradaran

## مقدمه

بیوپپتیدها (Bioactive peptides) قطعات کوتاه پپتیدی (شامل ۲ تا ۲۰ اسیدآمینه) هستند که به صورت توالی‌های نهفته (encrypted sequences) در ساختار اولیه پروتئین‌های طبیعی وجود دارند.

این پپتیدها فاقد فعالیت زیستی در فرم اولیه خود بوده و تنها در صورت آزادسازی از پروتئین مادر، از طریق فرآیندهایی مانند سنتز شیمیایی، هیدرولیز آنزیمی یا تخمیر میکروبی به شکل فعال در می‌آیند.

## ساختار بیوپپتید

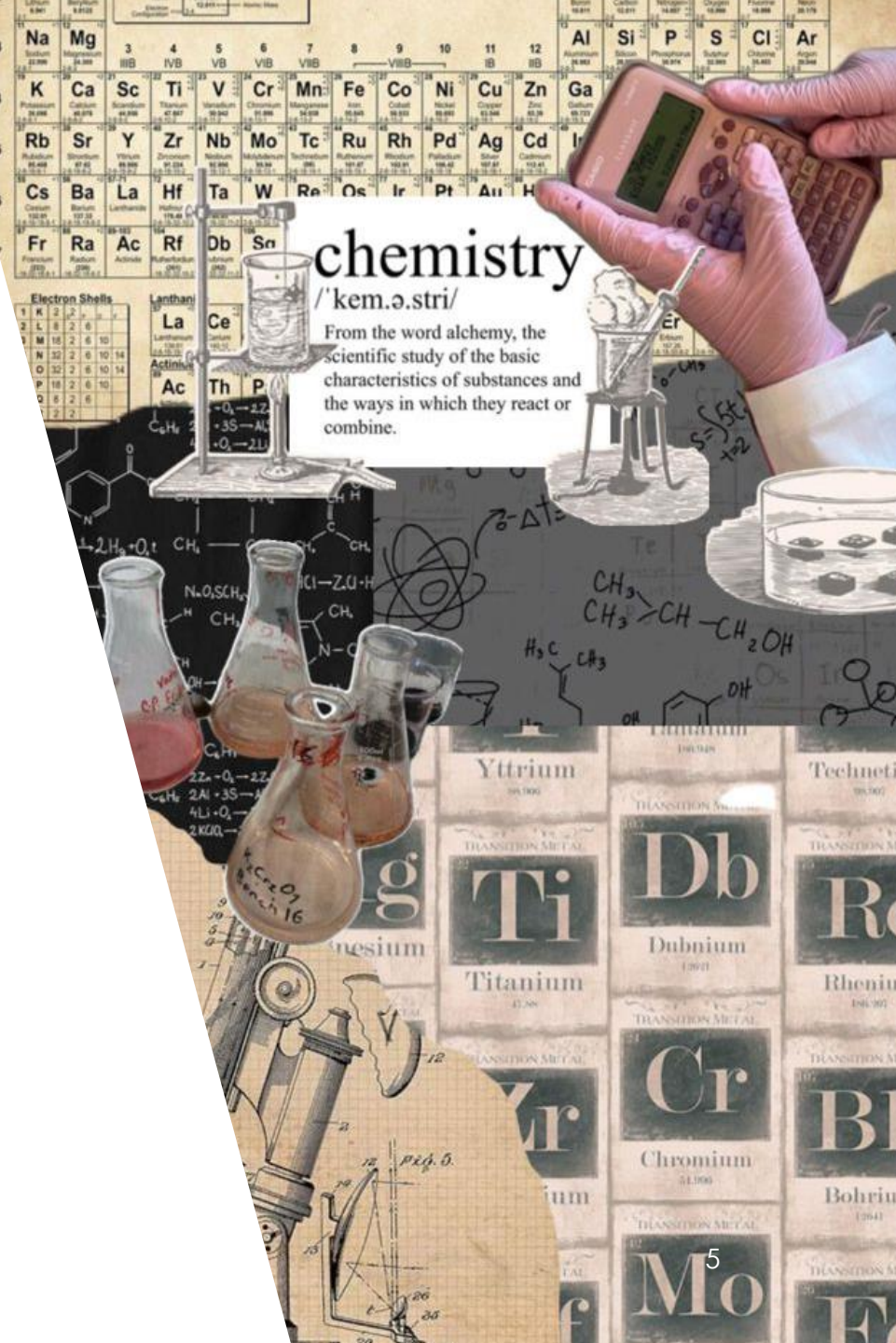


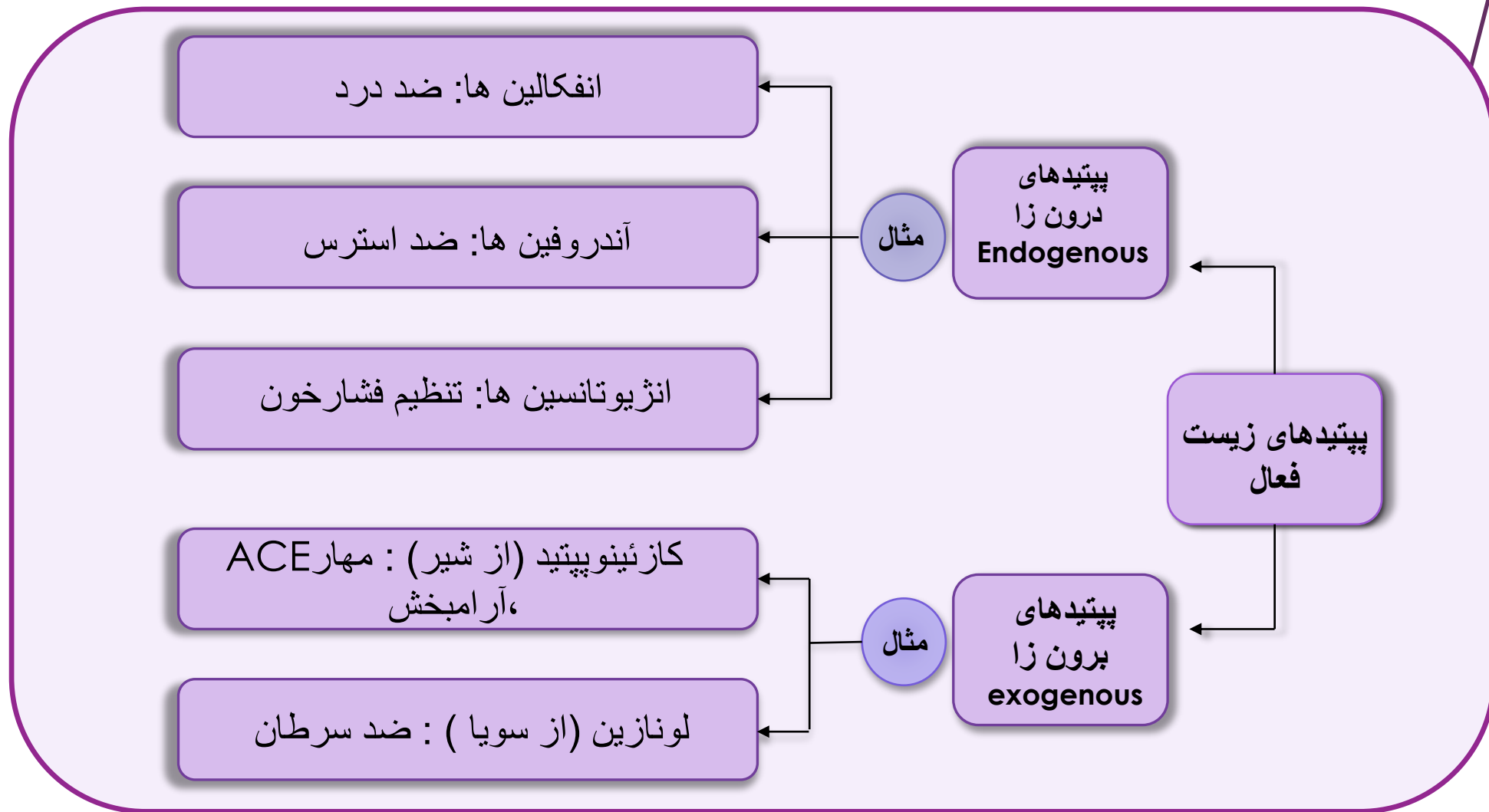
اثرات :

- ضد فشار خون
- آنتی اکسیدان
- ضد التهاب، ضد دیابت، ضد سرطان

مزایا : منشا طبیعی ، ایمنی بالا، زیست سازگار، غیر سمی

کاربرد : صنایع غذایی، دارویی، آرایشی ، پزشکی





# منابع بیوپپتیدها

## ۱. منابع حیوانی: (Animal Sources)

- شیر گاو
- تخم مرغ
- گوشت قرمز، مرغ و آبزیان

## ۲. منابع گیاهی: (Plant Sources)

- سویا، گندم، جو، ذرت، برنج
- حبوبات: نخود، عدس، ماش
- دانه‌های روغنی: کتان، چیا، آفتابگردان





### ۳. منابع میکروبی : (Microbial Sources)

- پروبیوتیک‌ها (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*)
- قارچ‌ها (*Aspergillus niger*)
- مخمرها: (*Saccharomyces cerevisiae*)

### ۴. منابع فرعی یا پسماندهای غذایی (Byproducts)

- آب پنیر (whey)
- ضایعات صنعت گوشت
- کشاورزی (ضایعات گوجه فرنگی)
- سبوس‌ها، کیک دانه‌های روغنی

| Name              | Primary Structure     | Source                                           | Activity       |
|-------------------|-----------------------|--------------------------------------------------|----------------|
| Animal Sources    |                       |                                                  |                |
| Tachyplesin I     | VGINVKCKHSGQCLKPCK    | Scorpion venom                                   | Anti-bacterial |
|                   | DAGMRFGKCKINGKCDCTPK  |                                                  |                |
|                   | KWCFRVCYRGICYRRCR     | Horseshoe crab ( <i>Tachypleus tridentatus</i> ) | Anti-bacterial |
| Temporin 1Tb (TB) | SIITMTKEAKLPQLWKQIAC- | Yunnan frog, <i>Rana pleuraden</i>               | Antioxidant    |
|                   | RLYNTC                |                                                  |                |
|                   | ALWKTMLKKLGTMALHA     | Frog skin                                        | Antimicrobial  |
|                   | GKAALGAAADTISQGTQ     |                                                  |                |
| Plant Sources     |                       |                                                  |                |
|                   | FFL                   | Soy                                              | ACE inhibitory |
|                   | RQSHFANAQP            | Chickpea ( <i>Cicer anetinum</i> )               | Anticancer     |
|                   | AIRQGDVF              | Crude rice bran                                  | Antioxidant    |
|                   | FGER                  | Potato                                           | Antioxidant    |

بیوپپتیدهای مهم  
استخراج شده از منابع  
حیوانی و گیاهی

## اثرات بیوپپتیدها بر سلامت

### ۱. ضد فشار خون

مهار آنزیم ACE ← گشاد شدن عروق ← مثال: پپتیدهای VPP و IPP

### ۲. ضد میکروبی

نفوذ به غشای باکتری‌ها و قارچ‌ها ← نابودی سلول میکروبی

### ۳. آنتی‌اکسیدان

خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد ← پیشگیری از سرطان، بیماری‌های قلبی، پیری زودرس

### ۴. تنظیم سیستم ایمنی

تقویت یا مهار پاسخ ایمنی ← مؤثر در التهاب، آلرژی، بیماری‌های خودایمنی

### ۵. ضد سرطان

مهار رشد تومور ← القای آپوپتوز

### ۶. ضد دیابت

مهار آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز ← کنترل جذب قند و کاهش قند خون

### ۷. کاهش چربی خون

کاهش جذب کلسترول و تری‌گلیسرید ← بهبود متابولیسم لیپیدها

## کاربردهای بیوپپتیدها

| مزیت‌ها                                                                  | مثال                                                               | زمینه کاربرد             |
|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| بهبود سلامت قلب، کاهش فشارخون، تنظیم قند خون، جایگزین طبیعی نگهدارنده‌ها | نوشیدنی‌های پروتئینی، لبنیات تخمیری، پروتئین‌بارها، مکمل‌های غذایی | صنایع غذایی              |
| سمیت پایین، زیست‌سازگاری بالا، اثرات درمانی متنوع                        | داروهای ضد فشار خون، ضد دیابت، مکمل‌های ضد التهاب                  | داروسازی                 |
| تحریک تولید کلاژن، خاصیت ضد التهاب و مرطوب‌کنندگی                        | کرم‌های ضد چروک، سرم ضد پیری، محصولات مراقبت از پوست               | آرایشی-بهداشتی           |
| تقویت سیستم ایمنی، رشد بهتر، جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها                      | افزودنی‌های طبیعی به خوراک دام و طیور                              | دامپزشکی و تغذیه حیوانات |
| دارورسانی هدفمند، افزایش اثربخشی درمان، تشخیص سریع بیماری‌ها             | حامل‌های دارویی پپتیدی، نانوذرات پپتیدی، زیست‌حسگرها               | زیست‌پزشکی و نانو فناوری |



## روش های تولید بیوپپتید ها

روش های تولید پپتیدهای زیست فعال شامل تکنیک های بیوتکنولوژیکی زیر می باشند:

- ۱) سنتز شیمیایی
- ۲) هیدرولیز آنزیمی
- ۳) تخمیر میکروبی

# سنتز شیمیایی پپتیدها

## (Chemical Synthesis of Peptides)

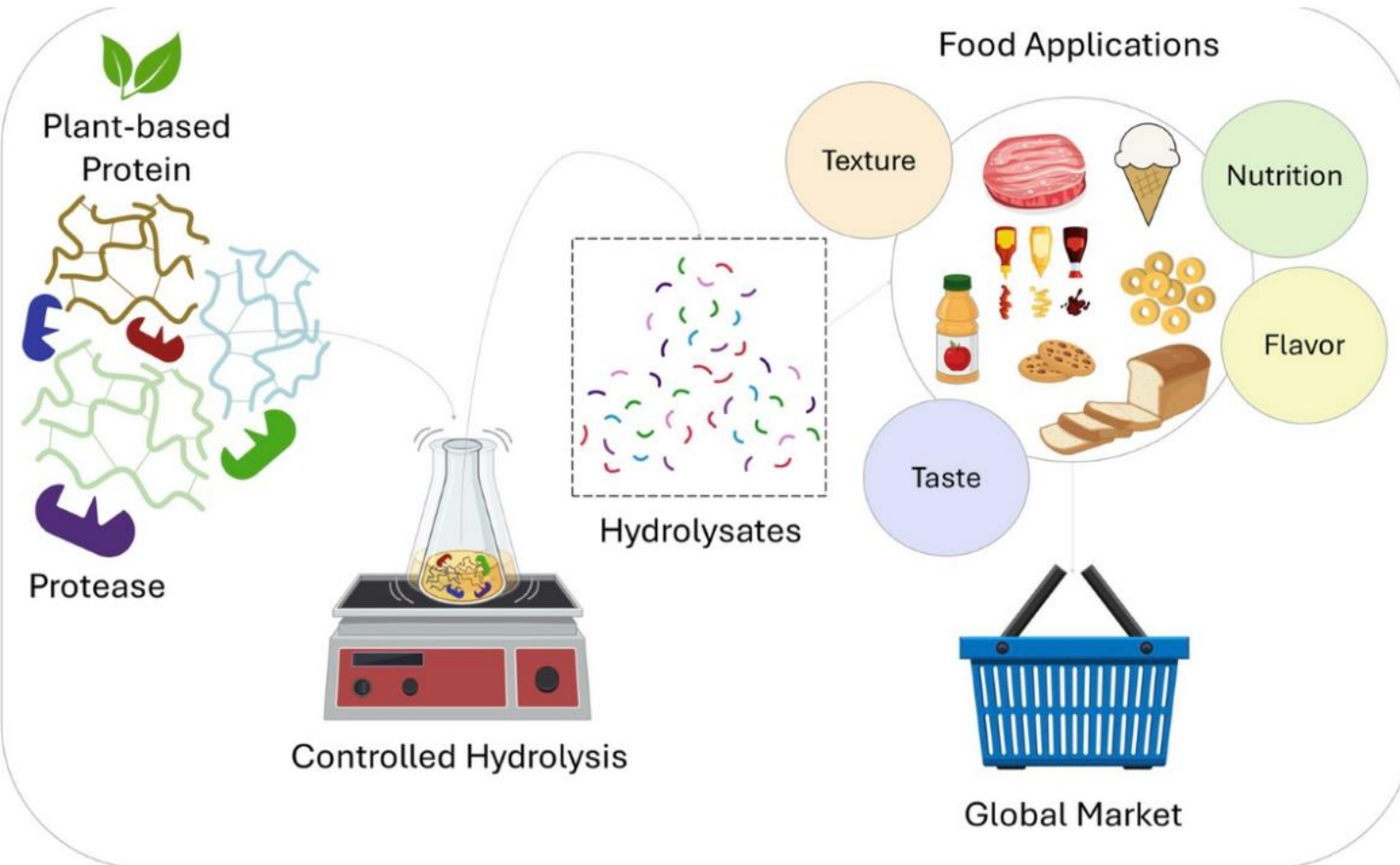
○ در این روش، بیوپپتیدها از اتصال آمینواسیدها در محیطی شیمیایی و کنترل شده ساخته می‌شوند، بدون اینکه به سیستم‌های زیستی مثل آنزیم یا میکروارگانیسم نیاز باشد.

○ همچنین گاهی روش ترکیبی (Hybrid) برای تولید پپتیدهای دارویی به کار می‌رود.

سنتز در فاز محلول  
(Soluble-phase synthesis)

سنتز در فاز جامد  
(Solid-phase synthesis)

روش های سنتز شیمیایی



## هیدرولیز آنزیمی (Enzymatic Hydrolysis)

هیدرولیز آنزیمی فرآیندی است که در آن پروتئین‌ها با استفاده از آنزیم‌های پروتئولیتیک مانند پپسین، پانکراتین، آکالاز، تریپسین، نوترالاز و... به پپتیدهای کوچکتر و زیست‌فعال تجزیه می‌شوند. این روش یکی از مهم‌ترین و رایج‌ترین روش‌های صنعتی برای تولید بیوپپتیدها است.



## تخمیر میکروبی

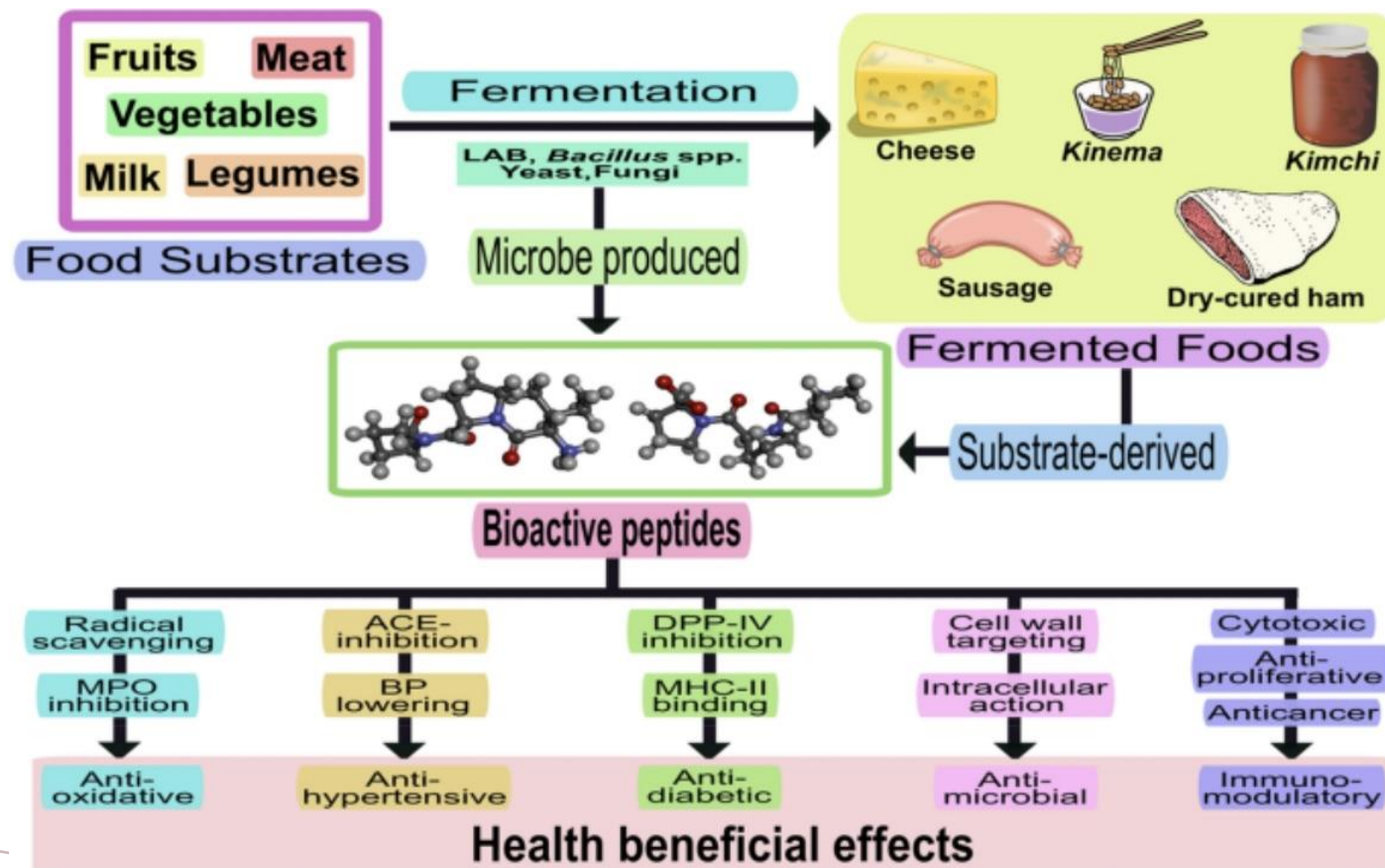
### (Microbial Fermentation)

تخمیر میکروبی یکی از مؤثرترین و پایدارترین روش‌های بیوتکنولوژیک برای تولید بیوپپتیدهاست که طی آن میکروارگانیسم‌ها، با استفاده از سیستم‌های آنزیمی خود، پروتئین‌ها را به پپتیدهای کوچکتر تجزیه می‌کنند. میکروارگانیسم‌های مورد استفاده معمولاً شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها یا مخمرها هستند. این روش زیرمجموعه‌ای از هیدرولیز آنزیمی محسوب می‌شود، با این تفاوت که آنزیم‌ها به‌صورت طبیعی توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند.

**تخمیر در محیط مایع: (Submerged Fermentation):**  
مناسب برای باکتری‌ها؛ محصول نهایی به راحتی جداسازی می‌شود.

**تخمیر در محیط جامد: (Solid-State Fermentation):**  
مناسب برای قارچ‌ها و میکروارگانیسم‌های مقاوم به رطوبت پایین؛ آزادسازی تدریجی مواد مغذی.

## تخمیر میکروبی (Microbial Fermentation)



## مقایسه روش‌های تولید بیوپپتیدها

| روش تولید       | مزایا                                                                                                             | معایب                                                                                          |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| سنتز شیمیایی    | مواد و تجهیزات ارزان<br>امکان تولید پپتیدهای خاص با توالی دقیق<br>کنترل بالا بر ترکیب و ساختار پپتیدها            | آلودگی‌های شیمیایی بالقوه<br>زیست‌سازگاری کمتر<br>مناسب نبودن برای کاربردهای غذایی             |
| هیدرولیز آنزیمی | فرآیند ملایم و کنترل‌پذیر<br>تولید پپتیدهای ایمن و قابل استفاده<br>در صنایع غذایی و دارویی<br>سازگار با محیط زیست | نیاز به آنزیم‌های خاص و خالص<br>هزینه بالا<br>کنترل دقیق پارامترها                             |
| تخمیر میکروبی   | ارزان و اقتصادی<br>دارای قابلیت کنترل<br>امکان استفاده از ضایعات                                                  | مدت زمان نسبتاً طولانی<br>نیاز به کنترل دقیق شرایط تخمیر<br>احتمال تولید متابولیت‌های ناخواسته |

# آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE) و اهمیت آن در کنترل فشار خون

آنزیم مبدل آنژیوتانسین که به اختصار ACE (Angiotensin-Converting Enzyme) نامیده می‌شود، یک آگروپپتیداز است که نقش بسیار مهمی در تنظیم فشار خون و تعادل آب و الکترولیت‌های بدن دارد. این آنزیم گلیکوپروتئینی اسیدی است که حاوی یون  $Zn^{2+}$  بوده و با حضور کلر فعال می‌شود.

## نقش در سیستم رنین-آنژیوتانسین

- تبدیل آنژیوتانسین I (غیرفعال) به آنژیوتانسین II (فعال و تنگ‌کننده عروق)

- تجزیه و غیرفعال‌سازی برادی‌کینین (ماده گشادکننده عروق)

➤ در نتیجه، ACE از دو مسیر باعث افزایش فشار خون می‌شود.

## اهمیت بالینی ACE

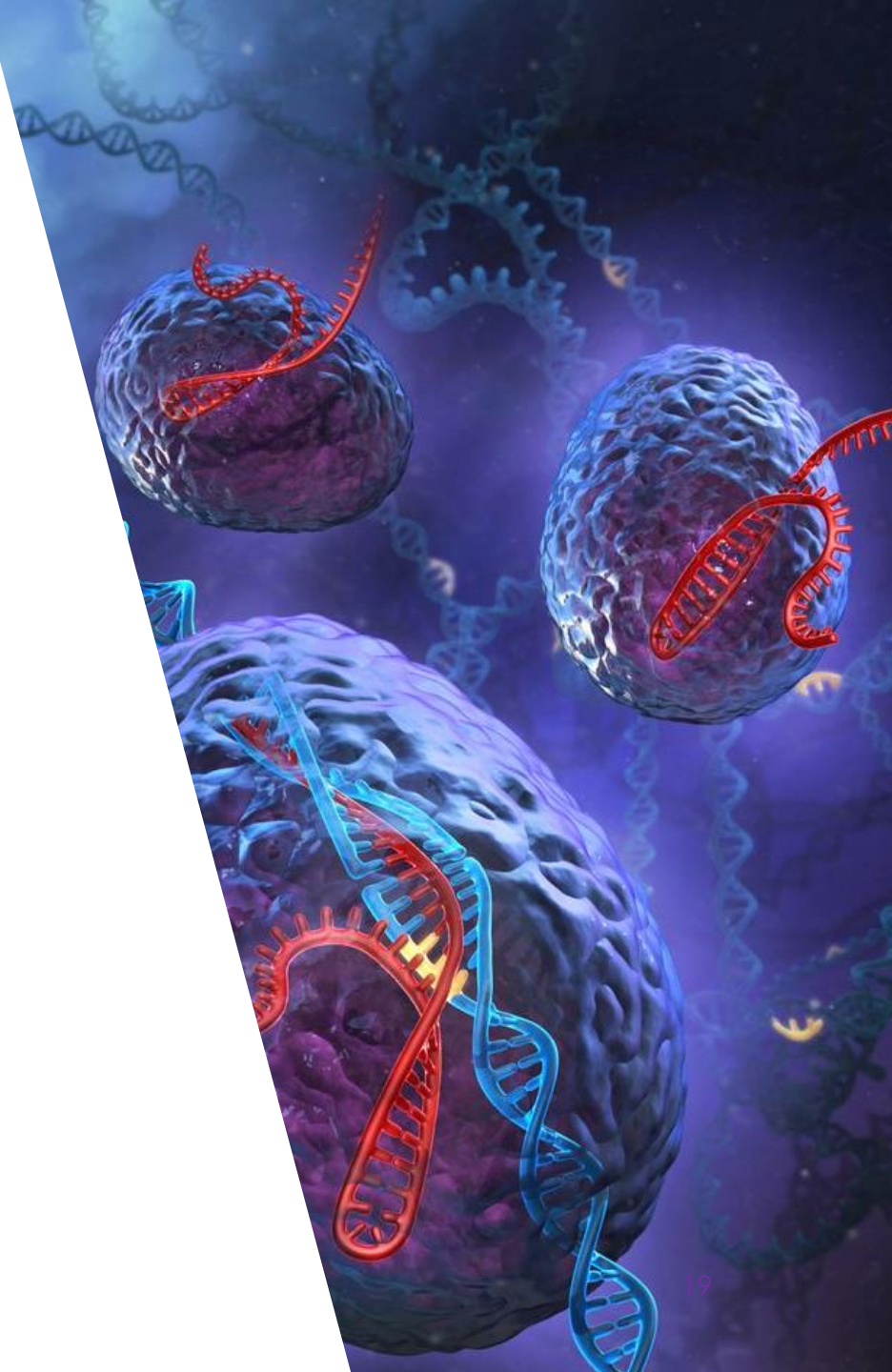
مهار ACE باعث کاهش تولید آنژیوتانسین II و حفظ برادی کینین می شود که این دو اثر باعث گشاد شدن رگ ها و کاهش فشار خون می گردد. بنابراین، مهارکننده های ACE در درمان فشار خون بالا، نارسایی قلبی، حمله قلبی و بیماری های کلیوی دیابتی کاربرد گسترده ای دارند.

## مهار ACE و کاربردهای درمانی

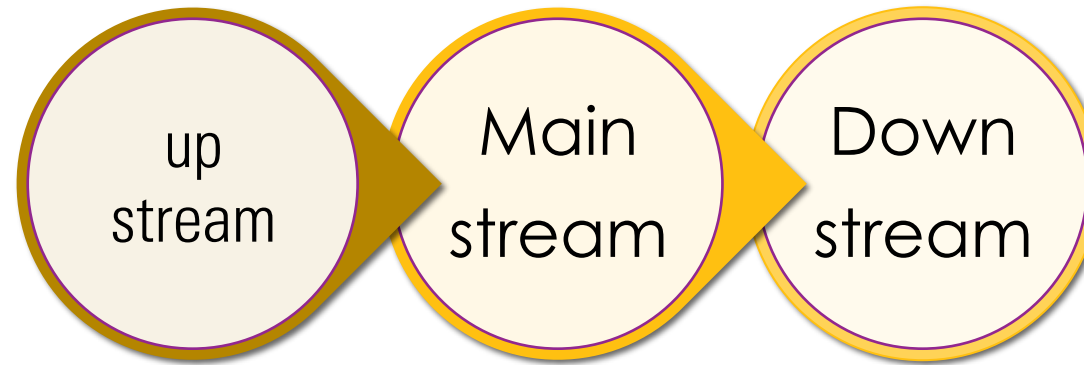
- داروهای مهارکننده ACE باعث کاهش فشار خون، حفظ برادی کینین می شوند.
- کاربرد در درمان: پرفشاری خون، نارسایی قلبی، ن فروپاتی دیابتی

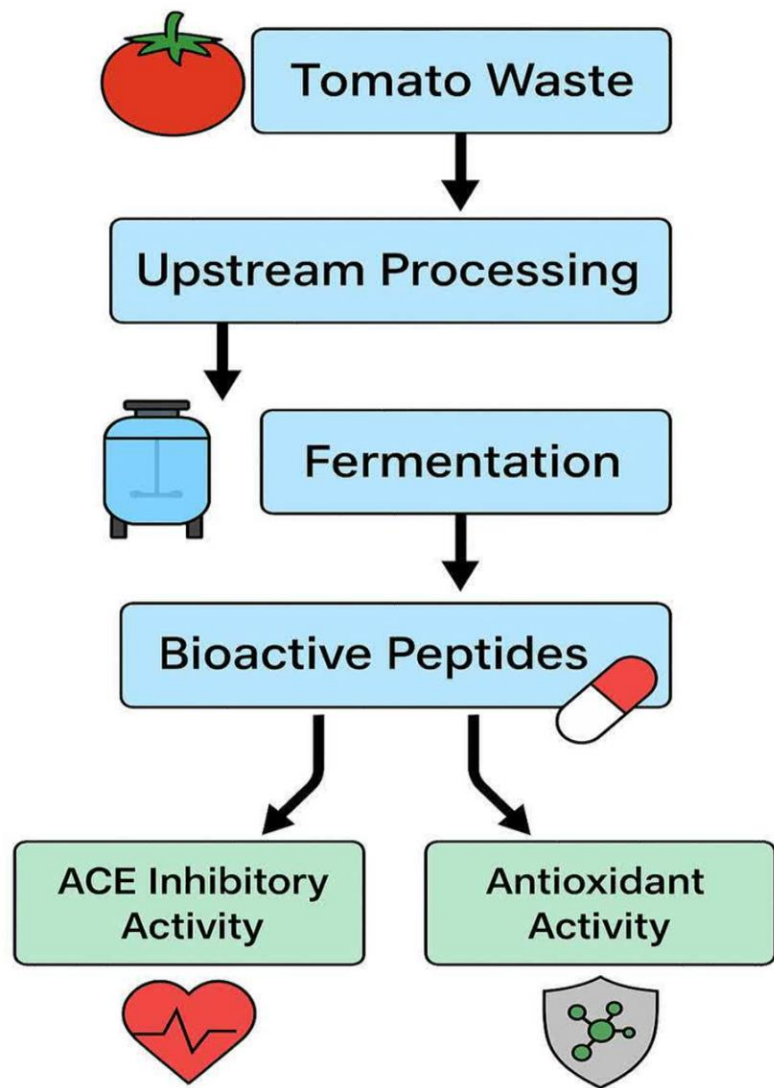
## پپتیدهای غذایی مهارکننده ACE

- اغلب دی پپتیدها یا تری پپتیدها
- اسید آمینه های کلیدی: پرولین، تریپتوفان، آرژنین، فنیل آلانین، تیروزین
- منابع: محصولات تخمیری، شیر، ماهی، ضایعات گیاهی مثل گوجه فرنگی



# تخمير





نمای کلی

# ۱. مرحله Upstream - پیش‌فرآوری

مواد و معرف ها:

○ DPPH و آنزیم ACE از ریه خرگوش از شرکت Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) تهیه شدند.

○ Abz-Gly-p-nitro-phe-pro-OH trifluoroacetate salt به عنوان سوبسترا از Bachem AG (Bubendorf, Switzerland) خریداری شد.

○ محیط‌های کشت میکروبی از Sharlau (Barcelona, Spain) تهیه شدند.

○ حلال‌ها شامل استونیتریل، اسید کلریدریک ۳۷٪ و تری‌فلوئورواستیک اسید (TFA) از درجه HPLC بودند (Scharlau).

○ سایر مواد شیمیایی از درجه آنالیتیکال تهیه شدند.

**هدف:** آماده‌سازی سوبسترا (پودر بذر گوجه) و رشد اولیه باکتری

## مراحل

الف) آماده‌سازی آرد بذر گوجه‌فرنگی Tomato Seed Meal – TSM:

۱. تفاله گوجه (حاوی پوست و بذر) از کارخانه‌ای در قزوین تأمین شد.
۲. بذرها با خیساندن تفاله در آب از پوست جدا شدند.
۳. در آفتاب خشک شدند.
۴. با بلندر آسیاب شدند.
۵. چربی‌زدایی با روش سوکسله و  $n$ -هگزان انجام شد.
۶. پودر چربی‌زدایی‌شده دوباره خشک و آسیاب گردید.
۷. در یخچال (دمای پایین) ذخیره شد تا استفاده شود.

ب) کشت و آماده‌سازی باکتری *Bacillus subtilis* A14h:

۱. این سویه از بانک میکروبی مؤسسه ABR II گرفته شد.

۲. روی محیط آگار مغذی فعال‌سازی شد.

۳. سپس به محیط مایع مغذی با ترکیب زیر منتقل شد:

✦ ۳٪ پپتون

✦ ۰/۵٪ عصاره گوشت

✦ ۰/۵٪ NaCl

✦ ۰/۱٪ گلوکز

۴. شرایط رشد:

✦ دما: ۳۰ درجه سانتی‌گراد

✦ مدت زمان: ۱۸ ساعت

✦ سرعت شیکر: ۱۶۰ دور در دقیقه

۵. در ابتدای فاز لگاریتمی رشد، سلول‌ها:

✦ در ۳۸۰۰ rpm و دمای ۱۵ درجه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند.

✦ در سرم فیزیولوژیک استریل دوباره تعلیق شدند.

✦ آماده تلقیح به محیط تخمیر شدند

## ۲. مرحله Main Fermentation - تخمیر اصلی

**هدف:** تولید پپتیدهای زیست فعال از پروتئین های بذر گوجه توسط باکتری

**اتفاقات و شرایط:**

**راه اندازی سیستم تخمیر:**

- ظروف: ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری

- حجم کاری: ۲۵ میلی لیتر

**ترکیب محیط تخمیر per 100 ml:**

آرد بذر گوجه (6): 6 %TSM w/v

0.05 %K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> w/v

0.01 %MgSO<sub>4</sub> w/v

0.16 %CaCO<sub>3</sub> w/v



### تلقیح باکتری:

- مقدار تلقیح: ۲٪ v/v از محلول باکتری تازه تهیه شده
- غلظت باکتری:  $10^8$  CFU/mL

### شرایط تخمیر:

- دما: درجه سانتی گراد
- زمان: ۲۴ ساعت
- شیکر: (Agitation) فعال (سرعت ذکر نشده اما متداول  $150 \sim 37$  rpm)



## ۳. مرحله Downstream - پس فرآوری

**هدف:** توقف تخمیر، استخراج پپتیدها، حذف سلول‌ها و ذخیره‌سازی  
**اتفاقات:**

**پایان دادن به تخمیر:**

- حرارت‌دهی نمونه‌ها در آب جوش به مدت ۱۵ دقیقه  
(برای غیرفعال کردن آنزیم‌های پروتئولیتیک باکتری)

**جدا کردن فاز مایع:**

- سانتریفیوژ نمونه‌ها در:
- سرعت: ۱۲'۰۰۰ rpm
- مدت: ۱۰ دقیقه
- (دستگاه: TOMY Suprema 25)



## حذف کامل رطوبت و ذخیره سازی:

- سوپرناتانت جمع آوری شد.
- لیوفیلیزاسیون (خشک کردن انجمادی) انجام شد.
- پودر به دست آمده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره گردید.
- این پودر به عنوان TSMH (Tomato Seed Meal Hydrolysate) نام گذاری شد.



## نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که ضایعات گوجه فرنگی می توانند به عنوان منبعی اقتصادی و پایدار برای تولید پپتیدهای زیست فعال با خاصیت مهارکنندگی ACE و فعالیت آنتی اکسیدانی مورد استفاده قرار گیرند. تخمیر با *Bacillus subtilis* فرآیندی مؤثر برای استخراج و بهبود عملکرد زیستی پپتیدها فراهم کرد. همچنین مشخص شد که ترکیب اسیدهای آمینه و توزیع وزن مولکولی پپتیدها تأثیر مستقیمی بر قابلیت مهار ACE و قدرت آنتی اکسیدانی آنها دارد. به طور کلی، استفاده از این ضایعات می تواند راهکاری نوآورانه برای ارزش افزوده بخشی به محصولات جانبی صنایع غذایی و تولید ترکیبات مفید برای صنایع دارویی و غذایی باشد.



## منابع

1. Akbarian M, Khani A, Eghbalpour S, Uversky VN. Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. *Biomolecules*. 2022;12(9):1236. doi:10.3390/biom12091236
2. Cruz-Casas DE, Aguilar CN, Ascacio-Valdés JA, Rodríguez-Herrera R, Chávez-González ML, Flores-Gallegos AC. Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*. 2022;126:139–153. doi:10.1016/j.tifs.2022.05.029
3. Barati, M. et al. (2020). ACE-Inhibitory and Antioxidant Activities of Peptides from Tomato Seed Fermentation.
4. Purohit K, Reddy N, Sunna A. Exploring the potential of bioactive peptides: From natural sources to therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2024;25(3):1341. doi:10.3390/ijms25031341



با تشکر از  
توجه شما