کاربرد پروتئین‌های هیدرولیزشده آنزیمی حاصل از جلبک‌ها جهت غنی‌سازی مواد غذایی

Application of enzymatic hydrolyzed proteins from algae for food enrichment

سارا جعفری راد[۱] ، لیلا ناطقی[۱*]، معصومه مسلمی[۲]، کیان پهلوان افشار[۳]

دریافت: ۱۴۰۰/۵/۱۲ پذیرش: ۱۴۰۰/۸/۱۵

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. در طول دهه گذشته، جلبک‌ها به‌عنوان منابع پروتئینی جایگزین و پایدار برای یک رژیم غذایی متعادل و اخیراً به‌عنوان منبع بالقوه پپتیدهای فعال زیستی مشتق شده از جلبک با مزایای بالقوه سلامت موردبررسی قرارگرفته‌اند.تا به امروز، خواص بیولوژیکی اصلی پپتیدهای شناسایی‌شده از جلبک‌ها، از جمله اثرات ضد فشارخون، آنتی‌اکسیدانی، تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی، ضدمیکروبی، ضدالتهاب، کاهش‌دهندگی کلسترول و غیره موردسنجش قرار گرفته است. در سال‌های اخیر، غنی‌سازی محصولات غذایی توسط پپتیدهای فعال بیولوژیکی موردتوجه دانشمندان قرار گرفته است. بنابراین در این مقاله به مروری بر پپتیدهای زیست فعال حاصل از جلبک‌ها و کاربرد آن‌ها در تولید مواد غذایی غنی‌شده پرداخته می‌شود.

کلمات کلیدی: پپتید زیست فعال، هیدرولیز آنزیمی، غنی‌سازی، ریز جلبک.

مقدمه:

اخیراً نقش پروتئین‌ها در رژیم غذایی بسیار بااهمیت‌تر شده است زیرا پروتئین‌ها مولکول‌های پیچیده و بسیار متنوعی هستند که از دیدگاه تغذیه‌ای و عملکردی جایگاه ویژه‌ای دارند. علاوه بر این خواص عملکردی و کاربردی پروتئین‌ها

[۱] گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
[۲] مرکز تحقیقات حلال جمهوری اسلامی ایران، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
[۳] گروه علوم دامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبه کننده: leylanateghi@yahoo.com

مانند جذب آب و روغن، امولسیون کنندگی، کف کنندگی و ژل کنندگی پروتئین‌ها و خواص اصلاح بافت و عطروطعمی کاربرد آن‌ها را در فرمولاسیون‌های مختلف غذایی بیشتر کرده است.

پروتئین‌ها از اجزای اصلی در مواد غذایی هستند، که دارای خواص تغدیه ای، عملکردی و بیولوژیکی هستند. پپتیدهای زیست فعال اجزای پروتئینی هستند که بعد از آزاد شدن توسط هیدرولیز آنزیمی عملکردهای فیزیکوشیمیایی متعددی از خود بروز می‌دهند.پروتئین‌ها، پلیمر اسیدهای آمینه هستند که به دلیل ساختار ویژه خود نقش مهمی در ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی مواد غذایی دارند(Mine, Li-Chan *et al*., 2010). ساختمان اولیه مولکول‌های پروتئین شامل زنجیره‌هایی از آمینواسید است که توسط گروه‌های کربوکسیل از یک آمینواسید و گروه آلفای آمینواسید دیگر توسط پیوند پپتیدی به یکدیگر متصل شده‌اند . علاوه بر این بسیاری از پروتئین‌ها خاصیت زیست فعالی دارند که این ویژگی نتیجه‌ی وجود پپتیدهای زیست فعال در ساختار آن‌ها می‌باشد. با توجه به اثر مستقیم این پپتیدها بر سیستم فیزیولوژیک بدن، تحقیق در زمینه شناسایی این پپتیدها امروزه به یک موضوع مهم تبدیل شده است. پپتیدهای زیست فعال به‌عنوان بخشی از رژیم غذایی انسان در طی سالیان اخیر موردبررسی قرار گرفته است. با پیدایش روش‌های کروماتوگرافی، مطالعات بسیاری در راستای شناسایی این پپتیدها با منابع گیاهی و حیوانی انجام شده است که نتایج آن‌ها نشان می‌دهد این پپتیدها دارای مکانیسم‌های تنظیمی مفید در بدن می‌باشند به‌طوری‌که در برخی کشورها مانند ژاپن، تولید این پپتیدها در مقیاس تجاری انجام شده است (Toldrá and Wu. 2021).

غنی‌سازی مواد غذایی

میوه تولیدشده به دلیل کمبود ریزمغذی یا درشت مغذی‌ها در سیستم بدنی جوامع انسانی به‌خصوص در برخی از دوره‌های زندگی، استقبال از تولید، واردات و مصرف غذاهای غنی‌شده رو به افزایش است. ازنظر متخصصان علوم تغذیه نیز،یکی از بهترین راه‌های دریافت این مکمل‌های غذایی ضروری با کمترین عوارض جانبی و به‌صورت گسترده در سطح جامعه، غنی‌سازی مواد خوراکی و آشامیدنی می‌باشد. به‌صورت کلی غنی‌سازی عبارت است از افزودن یک یا چند ماده مغذی ضروری به مواد غذایی در سطوحی بالاتر از آنچه که به‌طور طبیعی در آن غذا ممکن است وجود داشته یا نداشته باشد، به‌منظور پیشگیری و اصلاح کمبود ناشی از آن مواد مغذی که درکل جامعه و یا گروه‌های خاصی از جمعیت وجود دارد. به همین دلیل، انتخاب غذای حامل نیز می‌بایست بر اساس میزان مصرف آن در جامعه بوده و محدودیت‌های تکنیکی نیز مدنظر قرار گیرد.

پپتیدهای زیست فعال

پپتیدهای زیست فعال بخش‌های پروتئینی خاصی هستند که جرم مولکولی آن‌ها کمتر از ۶۰۰۰ دالتون و دارای ۲۰-۲ آمینواسید می‌باشند این پپتیدها در ساختار پروتئینی اصلی غیرفعال بوده و بعد از آزاد شدن برحسب نوع و توالی آمینواسیدی خود، تأثیر مثبتی بر عملکرد و شرایط بدن درنتیجه سلامت فرد دارند، از جمله این تأثیرات می‌توان به اثرات ایمنی بخشی، ضد میکروبی ، آنتی‌اکسیدانی، ضد فشارخون و ضد سرطان اشاره نمود(Karami and Akbari-Adergani. 2019). پپتیدهای زیست فعال از هیدرولیز پروتئین‌های گوناگون حاصل می‌شوند. این پپتیدها شامل تعداد محدودی آمینواسید (۳ تا ۱۶) هستند که به‌واسطه وزن کم خود قادرند وارد رگ‌های خونی شده و تأثیر مستقیم و غیرمستقیم بر سلامت انسان بگذارند. پپتیدها در توالی پروتئینی به‌صورت غیرفعال بوده اما در طی تخمیر، تولید مواد غذایی، هیدرولیز آنزیمی و یا از طریق هضم گوارشی آزادشده و فعالیت شبه هورمونی از خود نشان داده و اثر خود را بر سیستم بدن اعمال می‌کنند(Hettiarachchy, Sato *et al*., 2011).

اثر درمانی این ترکیبات به عواملی مانند میزان دسترس‌پذیری زیستی و میزان جذب پپتید موردنظر توسط بافت هدف بستگی دارد که این دو عامل وابسته به ساختار پپتید فعال (ازلحاظ نوع و ترتیب آمینواسید) است. شکل ۱ اثرات مثبت پپتیدهای زیست فعال بر سلامت بدن را نشان می‌دهد.

ترکیبات مختلفی به‌عنوان منبع تولید پپتیدهای زیست فعال بررسی و معرفی‌شده‌اند که شامل پروتئین‌های شیر (کازئین و پروتئین‌های آب‌پنیر)، پروتئین تخم‌مرغ، پروتئین گوشت، پروتئین‌های دریایی و پروتئین‌های گیاهی می‌شوند(Toldrá and Wu. 2021).

معیار لازم برای انتخاب منبع ۱) استفاده از منابع پروتئینی فراوان اما کم‌مصرف و ۲) استفاده از منابع پروتئینی دارای توالی آمینواسیدی خاص است. افزودن پپتیدهای زیست فعال مختلف به مواد غذایی اثرات متعددی دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به تعویق اثرات نامطلوب حاصل از اکسیداسیون چربی‌ها و افزایش عمر ماندگاری مواد غذایی، کنترل فشارخون با جلوگیری از فعالیت آنزیم ACE و رنین (دو آنزیم مؤثر بر فشارخون در پستانداران)، جلوگیری از آنزیم دی پپتیدیل پپتیداز IV که به تنظیم میزان گلوکز خون کمک می‌کند، اثر بازدارندگی بر آنزیم‌های متابولیز کننده کربوهیدرات و تری گلیسیریدها (لیپاز پانکراسی، آلفا-آمیلاز، گلوکوآمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز) که باعث محدودیت جذب کالری در بدن شده و بر چاقی و دیابت تأثیرگذار است، اثر بازدارندگی بر سنتز کلسترول و کاهش حلالیت آن و دفع

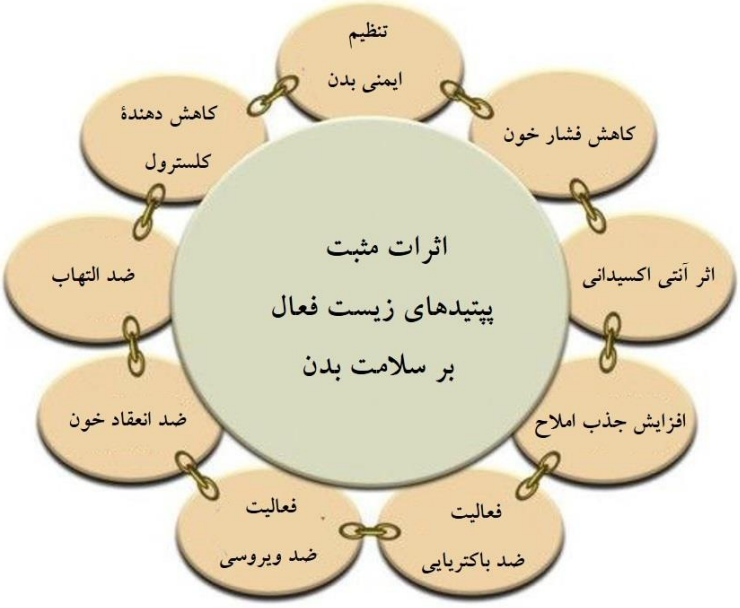
کلسترول از طریق مدفوع، کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی که منجر به افزایش رشد تومور می‌شوند، اشاره نمود(Hettiarachchy, Sato *et al.*, 2011). علاوه بر این، پپتیدهای زیست فعال می‌توانند دارای فعالیت‌های ضد میکروبی و شبه مخدری نیز باشند. پپتیدها معمولاً بعد از فعالیت خود متابولیزه شده و در ترکیب با ماهیچه‌ها قرار گرفته و یا در تولید پروتئین‌های سلولی شرکت کرده، درنتیجه باعث کاهش فشار بر روی کلیه‌ها می‌شود، این در حالی است که داروهای شیمیایی باید حتماً دفع شده و امکان حساسیت فرد به ترکیبات شیمیایی نیز وجود دارد. شدت و نوع فعالیت زیستی پپتیدهای فعال به ساختار پپتید (طول زنجیره پپتیدی، بار سطحی، شدت خاصیت هیدروفوبیک، ویژگی فیزیکی و شیمیایی آمینواسیدهای موجود در توالی و زنجیره جانبی آمینواسیدها) بستگی دارد. تحقیقات انجام شده نشان می‌دهند که وجود برخی از آمینواسیدها در توالی پپتیدهای زیست فعال نقش کلیدی بر اعمال برخی از خواص زیست فعالی دارد. به‌طور مثال وجود آمینواسیدهای والین و پرولین در ایجاد خاصیت کنترل فشارخون نقش عمده‌ای ایفا می‌کند. هم‌چنین پپتیدهای زیست فعال کوتاه زنجیر، هیدروفوبیک و کاتیونی عمدتاً خاصیت ضد باکتریایی از خود نشان می‌دهند. اکثر پپتیدهای زیست فعال که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند، حاوی آمینواسیدهای هیستیدین، سیستئین، پرولین، متیونین و آمینواسیدهای آروماتیک هستند و پپتیدهای زیست فعالی که در درمان دیابت نوع II مؤثر واقع‌شده‌اند، شامل آمینواسیدهای هیدروفوبیک بوده‌اند. تحقیقات نشان داده است پپتیدهای زیست فعال در مصرف روزانه، خطری برای سلامت مصرف‌کننده ایجاد نکرده و ایمن و غیر سمی هستند(Mine, Li-Chan *et al.*, 2010). یکی از راه‌های تولید پپتیدهای زیست فعال، تخمیر است، که احتمالاً می‌توان با اعمال فرآیند تخمیر بر مواد غذایی حاوی پروتئین به آن دست‌یافت.

بر اساس تحقیقات انجام شده این پپتیدها با توجه به نقش آن‌ها در سلامتی بدن در دو دسته تقسیم‌بندی می‌شوند:

۱- ترکیبات حاصل از هیدرولیز پروتئین به‌طور غالب از پپتیدها و آمینواسیدها تشکیل‌شده‌اند و در طی پروسه هیدرولیز پروتئین به‌وسیله آنزیم، تیمار اسیدی و قلیایی و یا تخمیر حاصل می‌شوند.

۲- پپتیدهای زیست فعال: این پپتیدها از تعدادی آمینواسید متصل‌به‌هم تشکیل‌شده است و از هیدرولیزها خالص‌سازی شده‌اند.

به نظر می‌رسد در حیطه علم تغذیه، استفاده از پروتئین‌های غیر خالص نظیر هیدرولیزها مزایای بیشتری نسبت به انواع خالص‌شده دارد زیرا جذب الیگو پپتیدها در حضور قند و آمینواسیدها افزایش می‌یابد و علاوه بر این دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر در مقایسه با انواع خالص‌شده است.



شکل ۱- آثار سلامتی بخش پپتیدهای زیست فعال

منابع پپتیدهای زیست فعال

انواع مختلفی از پروتئین‌های غذایی حیوانی، دریایی و گیاهی به‌عنوان منابع پپتیدهای زیست فعال مورداستفاده قرارگرفته‌اند. از آن جمله می‌توان پروتئین‌های شیر (کازئین و آب‌پنیر)، تخم‌مرغ، ماهیچه گوشت، ماهی، سالمون، صدف، جلبک‌های دریایی، میگو، سخت‌پوستان و اسب دریایی، انواع حبوبات، جو، گندم و بذر کتان و کلزا را نام برد .

دو معیار اصلی جهت انتخاب منابع پپتیدهای زیست فعال عبارت‌اند از: ۱- استفاده از پروتئین‌هایی که دارای توالی‌های پپتیدی ویژه یا ترکیب اسیدآمینه‌ی ویژه با اهداف سلامتی بخشی و دارویی هستند ۲- تولید محصولی با ارزش‌افزوده بالا از حجم زیادی از پروتئین‌های استفاده‌نشده یا فرآورده‌های جانبی کارخانه‌های صنایع غذایی.

در تحقیقات پپتیدهای زیست فعال، پپتیدهای حاصل از جلبک‌ها یکی از بهترین گزینه‌ها معرفی‌شده‌اند. از علل این امر می‌توان به این موضوع اشاره کرد که جلبک‌ها منابع غنی از ترکیبات فعال ازلحاظ دارویی و بیولوژیکی هستند که فعالیت اصلی آن‌ها خاصیت آنتی‌اکسیدانی است. از طرفی جلبک‌ها آروماتیک حاوی دهندگان الکترونی هستند

که می‌توانند به‌عنوان پایان دهنده‌ی زنجیره‌ی رادیکال‌ها عمل کنند و مانع ترشـــیدگی غذا و طعم بهتر آن شـــوند. توجه بیشـــتر به آن‌ها به خاطر طبیعی بودن، ارزش غذایی بالا و خالی بودن از کلســـترول حیوانی اســـت. درنتیجه تولید پپتیدهای زیست فعال حاصل از جلبک‌ها نسبت به منابع حیوانی در ارجحیت است (Toldrá, Reig *et al*., 2018).

پپتیدهای زیست فعال حاصل از جلبک‌ها

ریز جلبک‌ها ، جلبک‌های میکروسکوپی هستند که هم در آب شیرین و هم آب دریا یافت می‌شوند. ریز جلبک‌ها گونه‌های تک‌سلولی هستند که به‌صورت تکی، زنجیره‌ای یا گروهی زندگی می‌کنند. با توجه به گونه، اندازه ریز جلبک‌ها از چند میکرومتر تا چند صد میکرومتر متغیر است. برخلاف گیاهان، ریز جلبک‌ها ریشه، ساقه و برگ ندارند. ریز جلبک‌ها توانایی فتوسنتز دارند و نقش مهمی را در چرخه حیات کره زمین ایفا می‌کنند، و به‌طور میانگین نصف اکسیژن موجود در اتمسفر را تولید می‌کنند. تنوع زیستی ریز جلبک‌ها بسیار زیاد است. تعداد گونه‌های ریز جلبک‌ها حدود ۲۰۰۰۰۰ تا ۸۰۰۰۰۰ گونه تخمین زده‌شده است و تاکنون ۵۰۰۰۰ گونه از آن‌ها به‌طور کامل شناسایی‌شده‌اند. بسیاری از این ریز جلبک‌ها موادی با خواص منحصربه‌فرد مانند کارتنوئیدها، آنتی‌اکسیدان‌ها، اسیدهای چرب، آنزیم‌ها، پلیمرها، پپتیدها، توکسین‌ها و استرول‌ها تولید می‌کنند.

ریز جلبک‌ها موجودات یوکاریوتی میکروسکوپی و فتوسنتزی هستند که منبع خوبی از پروتئین‌ها و سایر مواد مغذی محسوب می‌شوند. این میکروارگانیسم‌ها علاوه بر این، طیف گسترده‌ای از ترکیبات فعال زیستی را تولید می‌کنند و منابع بالقوه مولکول‌های ضد میکروبی، ضد سرطانی، ضدالتهابی و همچنین تعدیل‌کننده ایمنی هستند و ممکن است اثرات سلامتی دیگری نیز داشته باشند. علاوه بر این، تقاضای فزاینده‌ای برای استفاده از ریز جلبک‌ها به‌عنوان مواد مغذی و مکمل‌های غذایی وجود دارد. ریز جلبک‌ها منبع وسیع و اساساً دست‌نخورده‌ای از ساختارهای جدید و مولکول‌های فعال بیولوژیکی هستند. خواص دارویی ریز جلبک‌ها به‌طورکلی بر اساس اجزای فیتوشیمیایی آن‌ها است، به‌ویژه متابولیت های ثانویه، که منابع برجسته ترکیبات زیست فعال با ارزش‌افزوده هستند. بااین‌حال، پپتیدها گروهی از ترکیبات هستند که به‌اندازه کافی بررسی نشده‌اند و پتانسیل بالایی برای استفاده در داروسازی دارند. پپتیدها زنجیره‌های اسیدآمینه کوتاهی هستند که معمولاً از ۲ تا ۲۰ واحد متغیر هستند و وزن مولکولی آن‌ها کمتر از ۳ کیلو دالتون است. در گیاهان، پپتیدهای زیست فعال در پاسخ دفاعی، و همچنین در سیگنال دهی سلولی و تنظیم رشد نقش دارند. ریز جلبک‌ها پپتیدهایی با عملکرد فعال تولید می‌کنند، اما پپتیدهای زیست فعال را می‌توان در شرایط آزمایشگاهی با هیدرولیز

آنزیمی پروتئین‌های استخراج‌شده یا با هضم (در دستگاه گوارش) پروتئین‌ها از زیست‌توده جلبک‌ها تولید کرد. بنابراین پتانسیل بیشتری برای تولید پپتید نسبت به آنچه بلافاصله از ریز جلبک‌ها استخراج می‌شود وجود دارد.

جلبک‌های دریایی مانند سارگاسوم نیز به‌منزله آنتی‌اکسیدان‌ها توجه شده است. جلبک سارگاسوم یکی از بزرگ‌ترین اعضای خانواده جلبک‌های قهوه‌ای است که دارای خاصیت بالای آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. نتایج حاصل از تحقیقات نشان داد که این جلبک گونه مناسبی به‌منزله نگه‌دارنده طبیعی است. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی حاصل از جلبک سارگاسوم توانایی ممانعت از اکسیداسیون چربی ماهی را داشته و همچنین حاوی ویتامین‌ها، کارتنوییدها، پیکوبیلی پروتیین‌ها و پلییولها می‌باشند که جزو مواد محرک ایمنی محسوب می‌شوند (Asmi, Ahmad *et al*., 2021).

روش‌های تولید پپتیدهای زیست فعال

پپتیدهای زیست فعال، زنجیرهای از آمینواسیدهای مختلف بوده که عموماً به‌صورت غیرفعال در ساختار اولیه پروتئین وجود دارد. این ترکیبات از منابع غذایی پروتئینی حاصل می‌شوند. اگرچه برخی از پروتئین‌ها فعالیت زیستی در بدن در راستای بهبود سلامت از خود نشان می‌دهند مانند لیزوزیم و آلفالاکتوآلبومین (دارای خاصیت ضد باکتریایی)، اما در اغلب موارد پپتیدهای زیست فعال دارای فعالیت زیستی بالاتر و متنوع‌تری هستند.(از روش‌های تولید پپتید زیست فعال می‌توان ۱) هیدرولیز پروتئین توسط آنزیم‌های گوارشی در دستگاه گوارش، ۲) تخمیر مواد غذایی و ۳) پروتؤلیز پروتئین توسط آنزیم‌های میکروبی و یا گرفته‌شده از میکرو ارگانیزم‌ها را نام برد. علاوه بر استفاده منفرد از هر یک از روش‌های نام‌برده می‌توان ترکیبی از این روش‌ها را نیز برای تولید پپتیدهای زیست فعال استفاده کرد(Daliri, Oh *et al*., 2017).

تولید پپتیدهای زیست فعال به روش هیدرولیز آنزیمی

از روش‌های به‌کاررفته در تولید پپتیدهای زیست فعال به هیدرولیز آنزیمی تحت شرایط آزمایشگاهی توجه بیشتری شده است. از دلایل آن می‌توان نیاز به شرایط متعادل آزمایشگاهی، تولید مقادیر کم و یا عدم تولید ترکیبات جانبی در طی فرآیند و کیفیت بالای پپتیدهای زیست فعال تولیدشده را نام برد. در انجام این فرآیند استفاده از آنزیم با منبع میکروبی، یکی از رایج‌ترین موارد استفاده از آنزیم در جهت هیدرولیز پروتئین است. منابع میکروبی علاوه بر صرفه اقتصادی، عمر ماندگاری و ثبات بیشتری داشته و تولید، جداسازی و خالص‌سازی آن‌ها نیز راحت‌تر است هم‌چنین دارای محدوده وسیعی از فعالیت آنزیمی بوده که با توجه به هدف از هیدرولیز پروتئین می‌تواند مورداستفاده قرار گیرد. از گذشته تاکنون پروتئأزها با منشأ میکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌عنوان یک ماده GRAS در صنایع غذایی و دارویی مورداستفاده

قرار گرفته است. آنزیم‌های جداشده از باکتری‌های لاکتیک اسید حاوی تعداد زیادی از پپتیدازهای درون‌سلولی از جمله اندو پپتیدازها، آمینو پپتیدازها، تری پپتیدازها و دی پپتیدازها بوده که با ترکیبی از آنزیم‌های به‌دست‌آمده از یک‌گونه و یا حتی گونه‌های مختلف، می‌توان ترکیبی از پپتیدهای زیست فعال را تنها از یک پروتئین واحد به دست آورد(Hettiarachchy, Sato *et al*., 2011). آنزیم‌های گوارشی گرفته‌شده از لوله گوارش انسان مانند پپسین، تریپسین، کیمو تریپسین و پانکراتین نیز در شرایط آزمایشگاهی مورداستفاده قرار می‌گیرند. در هنگام انجام فرآیند شرایط باید مطابق با شرایط بهینه فعالیت آنزیم مورداستفاده در بدن باشد. در هیدرولیز آنزیمی به فاکتورهایی هم چون مدت‌زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز با توجه به هدف از تولید پپتید زیست فعال، نسبت آنزیم و سوبسترای در دسترس و پیش تیمارهای انجام شده قبل از هیدرولیز آنزیمی توجه نمود؛ برای مثال پیش تیمار حرارتی می‌تواند میزان هیدرولیز پروتئین را تحت فرآیند آنزیمی بهبود ببخشد. پپتیدهای زیست فعال کوتاه زنجیر حاصل از هیدرولیز آنزیمی خواص زیست فعالی متعددی ازجمله کنترل فشارخون و آنتی‌اکسیدانی از خود نشان می‌دهد درحالی‌که پپتیدهای زیست فعال با تعداد آمینواسید بیشتر در زنجیره که توسط همان آنزیم به‌دست‌آمده از خود خاصیت کنترل کلسترول خون نشان می‌دهد که این نتیجه نشان‌دهنده اهمیت مدت‌زمان هیدرولیز و درنتیجه درجه هیدرولیز است. برای انجام فرآیند هیدرولیز آنزیمی می‌توان از یک آنزیم و یا ترکیبی از آنزیم‌های مختلف برای افزایش کیفیت و راندمان استفاده نمود . در برخی مواقع بعد از فرآیند هیدرولیز پپتیدهای تولیدشده از خود خاصیت زیست فعالیتی نشان نمی‌دهند، برای جلوگیری از این واقعه باید آنزیم‌های تجاری مورداستفاده ازنظر توانایی تولید پپتید زیست فعال و ثبات در حین فرآیند موردبررسی قرار بگیرند. در طی فرآیند هیدرولیز در صورت ادامه فعالیت آنزیم ممکن است خاصیت زیست فعالی با توجه به نوع پپتید حاصله، کاهش‌یافته و یا بهبود یابد(Mine, Li-Chan *et al*., 2010).

در حال حاضر تیمارهای آنزیمی متداول‌ترین راه برای اصلاح کردن پروتئین‌ها هستند. ارزش تغذیه‌ای و خواص عملکردی هیدرولیز شده‌های نهایی بستگی به وزن مولکولی و ویژگی‌های ساختمانی داشته و انجام عملیات هیدرولیز آنزیمی تحت شرایط کنترل‌شده امکان تبدیل پروتئین‌ها به هیدرولیز شده‌هایی با ویژگی‌های مطلوب را فراهم خواهد آورد. عمل هیدرولیز به شکسته شدن پروتئین‌ها به اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدهایی با اندازه متفاوت اطلاق می‌شود. هیدرولیز آنزیمی یک فرایند پیچیده بوده و مطالعات اولیه فراوانی به‌منظور درک و ایجاد یک فرایند آنزیمی مؤثر ضروری است. پارامترهای فرایند شامل دما، pH، نسبت آنزیم به سوبسترا و زمان فرایند بسته به تأثیری که بر فعالیت پروتئاز و رفتار

سوبسترا دارند باید به نحو مناسبی انتخاب گردند. معمولاً هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها توسط آنزیمی‌هایی با منشأ حیوانی مانند تریپسین،آنزیم‌هایی با منشأ گیاهی مانند پاپائین و آنزیم‌هایی با منشأ میکروبی انجام شده و به علت شرایط فرایند ملایم و عدم تخریب آمینواسیدها به روش‌های شیمیائی مانند استفاده از اسید یا قلیا ترجیح داده می‌شود.(Karami and Akbari-Adergani. 2019)

چالش‌های کاربرد پروتئین‌های هیدرولیز شده

طعم تلخ پروتئین هیدرولیز شده

هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها منجر به رهایش پپتیدهایی با طعم تلخ می‌گردد که منجر به ایجاد طعم نامطلوب در مواد غذایی می‌گردد .از جمله عوامل متعدد مؤثر بر ایجاد طعم تلخ در هنگام پروتئولیز پروتئین‌ها می‌توان به آب‌گریز یا آب‌دوست بودن زنجیره‌های جانبی ایجادشده، نوع آنزیم مورداستفاده، درجه هیدرولیز و حیوانی یا گیاهی بودن پروتئین اشاره کرد. در تحقیقات گوناگون به اثبات رسیده است که پپتیدهایی با وزن مولکولی کم (کمتر از ۶۰۰۰ دالتون) همراه با زنجیره‌های جانبی آب‌گریز دارای طعم تلخ می‌باشند. معمولاً این پپتیدها در انتهای کربوکسیلی خود دارای لوسین بوده و هیدروفوب هستند و افزایش زنجیره‌های هیدروفوب جانبی منجر به افزایش تلخی پپتیدها می‌گردد(Chakrabarti, Guha *et al*., 2018).

ویژگی‌های انحلال‌پذیری

این ترکیبات از حلالیت بالایی در آب برخوردارند، بنابراین می‌توان به‌آسانی از آن‌ها در تولید محصولات غذایی بر پایه آب (مانند نوشیدنی‌ها، سس‌ها، دسرها و سوپ‌ها) استفاده کرد. اما حلالیت پائین این ترکیبات در فاز لیپیدی منجر به ایجاد اختلال در انتقال جرم این ترکیبات از یک ناحیه به ناحیه دیگر در سامانه غذایی می‌شود، بنابراین برای استفاده از این ترکیبات در فرمولاسیون‌های غذایی بر پایه روغن یا چربی مانند مایونز، مارگارین یا کره، باید از تکنیک‌های ریزپوشانی مناسب استفاده نمود(Udenigwe and Fogliano. 2017).

ناپایداری شیمیایی

پروتئین‌ها و هیدرولیز شده‌های آن‌ها نسبت به تغییرات pH، قدرت یونی، دما، نور، اکسیژن و یا حضور ترکیبات واکنش‌دهنده حساس بوده و دچار تخریب شیمیایی می‌شوند. در این موارد، ریزپوشانی امری حیاتی در جهت حفاظت از این ترکیبات در برابر عوامل نامساعد محیطی می‌باشد(Udenigwe and Fogliano. 2017).

ناپایداری فیزیکی

یون‌های فلزی (مانند کلسیم، مس و آهن) می‌توانند منجر به رسوب برخی از پروتئین‌ها شوند (بوری و همکاران، ۲۰۰۸). روش‌های ریزپوشانی با جداسازی گونه‌های واکنش‌دهنده از یکدیگر و حفاظت ترکیبات زیست فعال از بروز تغییرات فیزیکی نامطلوب در سامانه جلوگیری می‌کنند. به‌طور مثال، می‌توان با استفاده از تکنیک ریزپوشانی نوعی سامانه را طراحی کرد که در آن یکی از ترکیبات زیست فعال در فاز آبی اول (W_1) و ترکیبات دیگر در فاز آبی دوم (W_2) به دام می‌افتند و با ایجاد یک مانع فیزیکی از انتشار ترکیبات زیست فعال از فاز آبی داخلی به فاز آبی خارجی ممانعت می‌کند.(Tadesse and Emire. 2020).

رسانش هدفمند

پروتئین‌ها و هیدرولیز شده‌های آن‌ها و همچنین برخی از ترکیبات زیست فعال آب‌دوست ممکن است در حین انتقال از سیستم گوارشی و تحت تأثیر شرایط اسیدی یا آنزیم‌های موجود دچار تخریب شیمیایی شوند. به‌طور مثال، بسیاری از پپتیدها یا پروتئین‌ها ممکن است درون معده با قرار گرفتن در معرض شرایط بسیار اسیدی یا فعالیت پروتئازی مایع گوارشی، دناتوره یا هیدرولیز شوند بنابراین ریزپوشانی برای حفاظت از این ترکیبات امری ضروری است(Tadesse and Emire. 2020).

ایمنی استفاده از پپتیدهای زیست فعال

علی‌رغم وجود فواید بسیار استفاده از پپتیدهای زیست فعال قبل از اینکه به‌عنوان محصول قابل‌مصرف عرضه شوند باید ازنظر تأثیرات نامطلوب در بدن هم ارزیابی شوند. مطالعات محدودی در این زمینه انجام شده است. اثرات سایتوتوکسیک پپتیدها بر روی سلول‌های سرطانی و بدخیم گزارش‌شده است؛ بنابراین می‌توانند به‌صورت بالقوه به‌عنوان ترکیبات ضد سرطان هم در نظر گرفته شوند . بیشتر ترکیبات آلرژن موجود در غذاها و گرده‌ها پروتئینی هستند. پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز پروتئین که پپتیدهایی با وزن مولکولی کم هستند خاصیت آلرژنیک کمتری نسبت به پروتئین دارند. اگرچه برخی پپتیدها زمانی که از پروتئین اصلی جدا می‌شوند خاصیت آلرژنیک پیدا می‌کنند که این تأثیر آلرژنیک نیز باید در نظر گرفته شود. برای مثال در یک مطالعه یک آلرژن در بادام‌زمینی به نام Ara h1 در طی هضم در روده‌ی کوچک به پپتیدهای کوچک‌تر تبدیل می‌شود ولی همچنان خاصیت آلرژنیک پروتئین اولیه را حفظ می‌کند(Liu, Li *et al*., 2020).

پپتیدهای زیســـت فعال از گذشـــته از منابع غذایی با کمترین اثرات مخرب تولید و مصـــرف می‌شوند. از طرفی برخی از پپتیدهای زیســـت فعال هم‌اکنون تجاری شـــده و در فروشگاه‌های برخی کشـورها مثل ژاپن به فروش می‌رسند. اگرچه آن‌ها دارای فعالیت بیشـتری نسبت به پروتئین اولیه هســـتند ولی در مواد غذایی با ســـایر ترکیبات مثل کربوهیدرات‌ها و لیپیدها واکنش می‌دهند و ممکن اســـت مواد آلرژنیک تا سمی را تولید کنند. بنابراین درزمینه‌ی اســـتفاده از آن‌ها در غذا تحقیقات بیشتری موردنیاز است. پیشرفت روش‌های مدرن برای دستیابی به این پپتیدها و تسهیل تولید آن‌ها در مقیاس وسـیع برای عرضه در فروشگاه‌ها موردنیاز است. تحقیقات محدودی درزمینه‌ی اثرات بالینی این پپتیدها در انســـان انجام شـــده اســـت و درنتیجه تحقیقات بعدی می‌تواند درزمینه‌ی اهمیت فیزیولوژیک این پپتیدها در سلامت انسان باشد (Liu, Li *et al*., 2020).

مطالعات صورت گرفته بر کاربرد پپتیدهای زیست فعال در محصولات غذایی

کرمی و همکاران (۱۳۹۸) در این پژوهش پروتئین جوانه گندم با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز، پپسین و پروتئیناز K ، جهت تولید پپتیدهای آنتی اکسیدانت هیدرولیز شد. از روش سطح پاسخ جهت بهینه سازی شرایط هیدرولیز (زمان (ساعت)، دما (درجه سانتی‌گراد) و نسبت آنزیم به سوبسترا ((g/100g) استفاده شد. از پپتیدهای سنتز شده، پپتید با توالی SGGSYADELVSTAK که دارای خواص بیولوژیکی مناسبی بود به‌صورت انتخابی به فرمولاسیون ماست اضافه شد و در مدت‌زمان ماندگاری ماست، پایداری نسبتا مناسبی نشان داد. به‌طورکلی چنین استنباط می‌شود که هیدرولیز با آنزیم‌های پپسین، آلکالاز و پروتئیناز K استراتژی مناسبی جهت تبدیل ضایعات پروتئینی به محصولات با ارزش‌افزوده بالا می‌باشد.

ریانی و همکاران،، (۱۳۹۹) در یک مطالعه آزمایشگاهی حداقل غلظت بازدارندگی رشد(MIC) دوغ‌های پروبیوتیک و معمولی و قطر هاله عدم رشد باکتری‌های *استرپتوکوکوس موتانس* و *انتروکوکوس فیکالیس* را در حضور هر دو نوع دوغ ، به ترتیب به روش میکروبراث دایلوشن و دیسک آگار دیفیوژن مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج این مطالعه حاکی از وجود اختلاف آماری معنی‌دار حداقل غلظت بازدارندگی از رشد دو نوع دوغ مورداستفاده بر علیه *انتروکوکوس فیکالیس* و *استرپتوکوکوس موتانس* بود. درحالی که این میزان در دو دوغ معمولی بیشتر از دوغ پروبیوتیک بود .قطر هاله عدم رشد *استرپتوکوکوس موتانس* و *انتروکوکوس فیکالیس* در حضور دو نوع دوغ مورد آزمایش، تفاوت معناداری نداشت.

آیتی و همکاران، (۲۰۲۱) تولید ماست غنی‌شده با سه پپتید فعال زیستی مشتق شده از کلاژن ماهی شامل GPLGAAGP (P1)، GRDGEP (P2) و MTGTQGEAGR (P3) در غلظت‌های مختلف (۰/۲ تا ۱ میلی‌گرم در میلی لیتر) آن را بررسی کردند. پپتیدهای زیست فعال به‌طور قابل‌توجهی pH، اسیدیته قابل تیتراسیون، رطوبت، خاکستر و چربی و همچنین خواص حسی (طعم، بافت و ظاهر) نمونه‌ها را در تمام غلظت‌ها تغییر ندادند. محتوای پروتئین، ظرفیت نگهداری آب و ویسکوزیته ارتباط مستقیمی با غلظت پپتیدها نشان داد. بالاترین مهار رادیکالDPPH (۱۷٪)برای P1)، چلات کنندگی آهن (۷۷٪برای P1)، قدرت احیاکنندگی (۰/۴۶ برای P2)، مهارکنندگی آنزیم دی‌پپتیدیل پپتیداز-۴ (۵۵٪ برای P1) در ۱ mg/ml بود(Ayati, Eun *et al.*, 2022).

Karimi و همکاران، (۲۰۲۱) از پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین آب‌پنیر ماست با تریپسین برای دوغ استفاده کردند و با استفاده از RP-HPLC آنالیز انجام دادند. حداقل غلظت بازدارنده (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کش (MBC) این پپتید بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی تعیین شد. این پپتید در غلظت‌هایppm ۱۲/۲۰، ۲۴/۴۰ و ۴۸/۸۰ به دوغ حرارت داده‌شده ترکیب شد. همچنین نمونه‌های دوغ با 10^6 CFU/mL استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی تلقیح شدند. نمونه‌های دوغ به مدت دو ماه نگهداری شدند. در طی ۶۰ روز نگهداری، تعداد باکتری، pH، اسیدیته، فعالیت بازدارندگی کاتیون رادیکال ABTS و ویژگی‌های حسی (طعم، بو، بافت، رنگ و پذیرش کلی) نمونه‌های دوغ موردبررسی قرار گرفتMIC . پپتید آب‌پنیر ماست علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و اشریشیاکلی به ترتیبppm ۱۲/۲ و ۲۴/۴ بود. همچنین، MBC پپتید آب‌پنیر ماست علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و اشریشیا کلی به ترتیب ppm ۱۲/۲ و ۴۸/۸ بود. نتایج بررسی افزودن این پپتید به دوغ نشان داد که در طول مدت نگهداری، شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* و اشریشیا کلی، pH و فعالیت بازدارندگی رادیکال کاتیون ABTS نمونه‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت، اما اسیدیته آن افزایش یافت. پپتید آب‌پنیر ماست فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی خوبی در نمونه‌های دوغ نشان داد، به‌طوری‌که با افزایش سطح پپتید در نمونه‌ها، فعالیت بازدارندگی رادیکال کاتیون ABTS به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. در طول نگهداری، نمونه شاهد (بدون پپتید زیست فعال) بیشترین کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کمترین کاهش مربوط به نمونه حاوی ppm ۴۸/۸ پپتید فعال زیست را نشان داد. فعالیت مهاری رادیکال کاتیونی ABTS نمونه شاهد و نمونه حاوی ppm ۴۸/۸ پپتید فعال زیستی به ترتیب ۹/۷۲ و ۳/۶۶ واحد در میلی لیتر در روز ۶۰ بود. با افزایش سطح پپتید فعال زیستی از آب‌پنیر ماست، تعداد باکتری‌های بیماری‌زا کاهش یافت. نمونه حاوی بالاترین سطح پپتید (ppm ۴۸/۸)

در روز بیستم نگهداری عاری از *استافیلوکوکوس اورئوس* و E.coli بود. نمونه شاهد و نمونه‌های حاوی پپتید زیست فعال ppm ۱۲/۲ و ۲۴/۴ به ترتیب در روزهای ۶۰ و ۴۰ عاری از این باکتری‌های بیماری‌زا بودند. بیشترین میزان تغییرات اسیدیته و pH مربوط به نمونه شاهد بود و نمونه حاوی پپتید زیست فعال ppm ۴۸/۸کمترین تغییرات را در طول نگهداری داشت. اسیدیته نمونه شاهد و نمونه حاویppm ۴۸/۸ پپتید زیست فعال به ترتیب ۰/۶۸ و ۰/۵۶ درصد اسیدلاکتیک در روز ۶۰ بود. امتیاز ویژگی‌های حسی در طول دوره نگهداری کاهش یافت، اما استفاده از بالاترین سطح پپتید آب‌پنیر ماست (ppm ۴۸/۸) در فرمولاسیون دوغ توانست میزان از دست دادن خواص حسی را کاهش دهد و کیفیت محصول را در طول زمان حفظ کند. نمونه حاوی ppm ۴۸/۸پپتید فعال زیستی بالاترین امتیاز پذیرش کلی را داشت. در این پژوهش غلظت پپتید ppm ۴۸/۸ به‌عنوان بهترین سطح برای غنی‌سازی دوغ ازنظر خواص فیزیکوشیمیایی، میکروبی و حسی در نظر گرفته شد.

Zhao و همکاران، (2022) به بررسی تغییرات طعم و ویژگی‌های کیفی ماست بز در طول نگهداری با افزودن پپتیدهای زیست فعال لبنیات و مخلوطی از دانه نیلوفر آبی و پودر پیاز زنبق پرداختند. افزودن پپتیدهای زیست فعال لبنیات و هم دانه‌های نیلوفر آبی/پودر پیاز زنبق منجر به کاهش زمان تخمیر، بهبود ظرفیت نگهداری آب و ممانعت از اسیدی شدن ماست بز در طول ذخیره‌سازی شد. درمجموع ۵۰ جزء طعمی فرار در نمونه‌های ماست شیر بز شناسایی شد و افزودن دو مکمل فوق در بهبود طعم و ویژگی‌های بافتی ماست شیر بز در طول نگهداری مؤثر بود. گروهی که با دانه‌های نیلوفر آبی/پودر پیاز زنبق اضافه شد، بهترین ظرفیت نگهداری آب و خواص بافتی را نشان داد، پس‌ازآن گروهی که با پپتیدهای زیست فعال لبنیات اضافه شد و بعدازآن گروهی که هر دو را اضافه کردند. افزودن هر دو مکمل برای جبران دو نقص ماست بز، تخمیر طولانی‌مدت و دلمه نرم مفید بود.

نتیجه‌گیری

پروتئین‌ها حاوی اسیدهای آمینه ضروری بوده که برای بدن موردنیاز می‌باشد. پپتیدهای زیست فعال نیز قطعاتی می‌باشند که در ساختار اصلی پروتئین به شکل غیرفعال وجود دارند. پروتئین‌ها فراتر از نقش‌های تغذیه‌ای و عملکردی در فراورده‌های غذایی، ویژگی زیست فعالی نیز دارند که این ویژگی آن‌ها را به‌عنوان یکی از اجزاء سازنده غذاهای سلامتی بخش مطرح ساخته است. این پپتیدها در بستره پروتئین به شکل غیرفعال بوده و از طریق هیدرولیز در شرایط آزمایشگاهی، آنزیم‌ها و فرایند تخمیر ایجاد می‌گردند. این پپتیدها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، کاهنده فشارخون،

ضدمیکروبی، ضد آلرژی، ضد تومور و غیره می‌باشند. با توجه به افزایش شیوع بیماری‌هایی از قبیل افزایش فشارخون و کلسترول،کاهش سیستم ایمنی بدن و سرطان به دلیل شیوه‌ی زندگی و افزایش ورود مواد تشدیدکننده استرس اکسیداتیو به بدن، مصرف غذاهای با خواص سلامت بخش و در اصطلاح غذاهای عمل‌گرا بسیار موردتوجه قرار گرفته است.

منابع

1. **Asmi N, Ahmad H. Natsir M. Massi. N and Karim H. 2021.** Identification and bioinformatics study of antibacterial peptides from symbiotic bacteria associated with Macroalgae Sargassum sp. Egypt. J. Chem. 64, 9: 1-10.21608/EJCHEM.2021.68242.3492
2. **Chakrabarti S. Guha. S. and Majumder.K. 2018.** Food-derived bioactive peptides in human health: Challenges and opportunities. Nutrients. 10.3390/nu10111738.
3. **Daliri E. B.-M. B. Lee. H and Oh. D. H. 2018.** Current trends and perspectives of bioactive peptides. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 58.13: 2273-2284. 10.1080/10408398.2017.1319795
4. **Daliri E. B.-M. Oh. D. H and Lee. B. H. 2017.** Bioactive peptides. Foods 6.5: 32. 10.3390/foods6050032
5. **Hettiarachchy. N S. Sato K. Marshall. M. R and Kannan.A. 2011.** Bioactive food proteins and peptides: Applications in human health. CRC Press.
6. **Karami Z. and Akbari-Adergani. B. 2019.** Bioactive food derived peptides: A review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. JFST .56.2: 535-547. https://doi.org/10.1007/s13197-018-3549-4
7. **Liu L. Li J. Zheng T. Bu G and Wu. J. 2020.** Safety considerations on food protein-derived bioactive peptides. Trends Food Sci. Technol. 96: 199-207 https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.022
8. **Mine, Y., E. Li-Chan and B. Jiang. 2010.** Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals, John Wiley & Sons.
9. **Rabail R. Khan M. Mehwish M. Rajoka J. Lorenzo, M .Kieliszek R. Khalid M. Shabbir.A and Aadil. R. 2021.** An overview of chia seed (Salvia hispanica L.) bioactive

peptides' derivation and utilization as an emerging nutraceutical food. Frontiers in Bioscience-Landmark. 26.9: 643-654. 10.52586/4973

10. **Tadesse S and Emire S.2020.** Production and processing of antioxidant bioactive peptides: A driving force for the functional food market. Heliyon 6.8: 47-65. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04765

11. **Toldrá F and Wu.K. 2021.** Biologically Active Peptides: From Basic Science to Applications for Human Health, Academic Press.

12. **Toldrá F. Reig. M. Aristoy M and Mora L. 2018.** Generation of bioactive peptides during food processing. Food Chem. 267: 395-404. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.119

13. **Udenigwe C and Fogliano V.2017.** Food matrix interaction and bioavailability of bioactive peptides: Two faces of the same coin. JFF. 35: 9-12. https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.029

14. **Zhao Q. Xiong H. Selomulya C. Chen. X. D and Zhou Q.2012.** Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. Food chem. 134.3: 1360-1367. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.033

Application of enzymatic hydrolyzed proteins from algae for food enrichment

Sara Jafari Rad[1], Leila Nateghi[1*], Masoumeh Moslemi[2], Kian Pahlevan Afshari[3]

Received: 2021/08/03 Accepted: 2021/11/06

Abstract

Bioactive peptides are protein components that are inactive within the protein structure and when they are released by enzymatic hydrolysis, they show different physiological functions. Recently, the recognition and determination of the characteristics of bioactive peptides obtained from different plant, animal and microbial sources have received much attention. During the last decade, algae have been investigated as alternative and sustainable protein sources for a balanced diet and more recently as a potential source of algal-derived bioactive peptides with potential health benefits. To date, the main biological properties of peptides Identified algae, including anti-hypertensive, antioxidant, immune system strengthening, antimicrobial, anti-inflammatory, cholesterol lowering effects, etc., have been measured. In recent years, the enrichment of food products by biologically active peptides has attracted the attention of scientists. Therefore, in this article, an overview of bioactive peptides obtained from algae and their use in the production of enriched food is discussed.

Keywords: bioactive peptide, enzymatic hydrolysis, enrichment, microalgae

[1] Department of Food Science and Technology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
[2] Halal Research Center of IRI., Iran Food and Drug, Administration, Ministry of Health and Medical Education,Tehran, Iran
[3] Department of Animal Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
***Corresponding author:** leylanateghi@yahoo.com