مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال سیزدهم، شماره 4، زمستان 1397، صفحات 74-61

ویژگی‌های عملکردی و ضداکسایشی کازئین هیدرولیز شده با پانکراتین

خشایار سرابندی[1]، علیرضا صادقی‌ماهونک[2]، حامد همیشه‌کار[3]، محمد قربانی[2]، سیدمهدی جعفری[2]

1- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

2- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

3- نویسنده مسئول: دانشیار مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. پست الکترونیکی: Sadeghiaz@yahoo.com

تاریخ دریافت: 96/6/18 تاریخ پذیرش: 96/10/4

چکیده

سابقه و هدف: هیدرولیز آنزیمی یکی از راه‌های بهبود ویژگی‌های عملکردی، حذف ترکیبات ضدتغذیه‌ای و تولید پپتیدهای زیست فعال با ویژگی‌های ضدمیکروبی، کاهش فشارخون، ضدتروما، کاهش کلسترول خون، اثرات ضداکسایشی، بهبود جذب املاح معدنی و اثرات ایمونوتراپی است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر زمان فرآیند هیدرولیز آنزیمی با استفاده از پانکراتین بر ویژگی‌های عملکردی و ضداکسایشی کازئین هیدرولیز شده بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، فرآیند هیدرولیز کازئین با استفاده از پانکراتین در زمان‌های مختلف (30، 60، 90، 120، 150 و 180 دقیقه) انجام گرفت. درجه هیدرولیز، ویژگی‌های عملکردی (انحلال‌پذیری، امولسیون‌کنندگی و کف‌کنندگی در pH مختلف)، ویژگی‌های ضداکسایشی مانند مهار رادیکال آزاد DPPH، ABTS، مهار رادیکال هیدروکسیل، قدرت احیاءکنندگی، فعالیت ضداکسایشی در امولسیون وشلاته‌کنندگی یون‌های آهن و مس ارزیابی شد.

یافته‌ها: هیدرولیز آنزیمی کازئین به طورقابل ملاحظه‌ای موجب بهبود ویژگی‌های عملکردی در pH متفاوت گردید. ویژگی‌های ضداکسایشی کازئین تحت تأثیر زمان هیدرولیز قرار گرفت. بهترین مقدار برای هر یک از شاخص‌های ضداکسایشی مهار رادیکال آزاد DPPH (46/04 درصد)، فعالیت مهار رادیکال ABTS (84/42 درصد)، ظرفیت ضداکسایشی معادل ترولوکس (2/28 میلی‌مولار)، مهار رادیکال هیدروکسیل (72/91 درصد)، قدرت احیاءکنندگی (61/97 درصد)، ترکیبات واکنش‌پذیر تیوباربیتوریک اسید (0/251 میلی‌گرم معادل مالون دی‌آلدئید در لیتر)، شلاته‌کنندگی یون آهن (70/31 درصد) و شلاته‌کنندگی یون مس (16/81 درصد) پس از هیدرولیز آنزیمی بودند.

نتیجه‌گیری: زمان فرآیند با تأثیر بر درجه هیدرولیز، کلیه ویژگی‌های محصول نهایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. به‌طور کلی، هیدرولیز آنزیمی کازئین در زمان 180 دقیقه، بهترین ویژگی‌های عملکردی و ضداکسایشی را از خود نشان داد.

واژگان کلیدی: پانکراتین، کازئین، فعالیت ضداکسایشی، ویژگی‌های عملکردی، هیدرولیز آنزیمی

• مقدمه

اکسیداسیون لیپیدها در مواد غذایی با تجزیه اسیدهای چرب و تولید بو و طعم اکسیده موجب از بین رفتن کیفیت، قابلیت استفاده و ماندگاری مواد غذایی می‌شود. در این بین، تخریب اکسیداتیو اسیدهای چرب چند غیراشباع به دلیل مستعد بودن به اکسیداسیون، چالشی در طراحی و تولید غذاهای پایدار فرآیند شده ایجاد کرده است (1). در بین عوامل مؤثر در اکسیداسیون لیپیدها، یون‌های فلزی اصلی‌ترین پرواکسیدان‌ها در امولسیون‌های غذایی مانند نوشیدنی‌ها، سس، سوپ، دسر سالاد و مایونزها به شمار می‌روند (2). بنابراین، کاهش فعالیت پرواکسیدانی یون‌های فلزی روش بسیار مؤثری در کاهش تند شدن امولسیون‌هاست. سالیان زیادی است که در صنایع مختلف برای کنترل فعالیت یون‌های فلزی از شلاته‌کننده‌ها استفاده می‌شود.اما شلاته‌کننده‌های رایج دارای مسائلی مانند اشکالات نشانه‌گذاری EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid)، ناکارآمدی (اسید سیتریک) (3) و ناپایداری (پلی‌فسفات‌ها) (4) هستند. همچنین، برخی از این ترکیبات مانند پلی‌فسفات‌ها می‌توانند

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-18]

بر ویژگی‌های عملکردی سایر اجزاء غذایی نظیر پروتئین‌ها، اثر منفی بگذارند (5).

از این رو تحقیقات اخیر به سوی استفاده از منابع ضداکسایشی و شلاته‌کننده‌های طبیعی متمایل گردیده است. این ترکیبات با دارا بودن حداکثر ایمنی و حفظ سلامتی مصرف کننده از کارایی مطلوبی به عنوان جایگزین ضداکسیدان‌های سنتزی در فرمولاسیون غذاهای مختلف برخوردارند. از این ترکیبات طبیعی می‌توان به استفاده از پروتئین‌ها اشاره کرد. نتایج تحقیقات اخیر حاکی از قابلیت اتصال پروتئین‌ها به فلزات و ممانعت از انجام واکنش‌های اکسیداتیو در امولسیون‌های روغن در آب دارد که این ویژگی-ها، استفاده از این ترکیبات را به عنوان شلاته‌کننده‌های طبیعی در مواد غذایی امکان‌پذیر می‌نماید (6).

اما استفاده از پروتئین‌های طبیعی در مواد غذایی به عنوان شلاته‌کننده‌های فلزی با مشکلاتی همراه است. به علت دناتوراسیون پروتئین‌ها، ویژگی‌های اتصال به فلزات آن‌ها تغییر و با از دست رفتن حلالیت و تشکیل توده‌های پروتئینی موجب تغییر ویژگی‌های کیفی مواد غذایی می‌شود (7). یکی از راه‌های کاهش و به حداقل رساندن این مشکل، اصلاح آنزیمی پروتئین‌هاست. از مزایای این روش می‌توان به بهبود قابلیت جذب، هضم‌پذیری و ویژگی‌های عملکردی مانند حلالیت اشاره کرد که کاربرد آن‌ها را در طیف وسیع‌تری از مواد غذایی و فرمولاسیون‌های مختلف میسر ساخته است (8).

این ویژگی‌ها ممکن است در مورد پروتئین‌های فسفوریله-شده و پپتیدهای موجود در شیر مانند کازئین و کازئینوفسفوپپتیدها صادق باشد (9). کازئینوفسفوپپتیدها، منابع شلاته‌کننده طبیعی و کاربردی‌تری نسبت به پروتئین-های اولیه محسوب می‌شوند و فعالیت آن‌ها تحت تاثیر دناتوراسیون قرار نمی‌گیرد (10). علاوه بر مزایای فوق، پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز و اصلاح آنزیمی شیر دارای ویژگی‌هایی نظیر تنظیم‌کننده سیستم ایمنی، ضداکسید، کاهنده فشار خون و حفظ سلول‌های بدن از تنش اکسیداتیو هیدروژن پراکسید هستند (11).

در تحقیقی، زیست دسترسی کازئین و پپتیدهای حاصل از هیدرولیز کازئین مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، فعالیت ضداکسایشی در طول هضم گوارشی و جذب سلولی کربنات کلیسم به عنوان شاخص‌های تخریب پپتیدها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاکی از بهبود قابل توجه زیست دسترسی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز کازئین نسبت به کازئین بودند. همچنین، ترکیب آمینواسیدی پپیتیدها موجب افزایش پایداری آن‌ها به آنزیم‌های هضم کننده و پپتیدازهای روده شد. پپتیدهایی با هضم و جذب جزء اسیدی با بالاترین زیست دسترسی (23/14 درصد) و حفظ فعالیت آنتی اکسیدانی شناسایی شدند. 12 پپتید دست نخورده و جذب شده به دست آمد. 11 نوع از این 12 پپتید از بتاکازئین و ترکیبات آمینواسیدی آن‌ها غنی از آمینواسیدهای هیدروفوب و اسیدی بودند (9). همچنین این ترکیبات موجب افزایش زیست دسترسی املاح معدنی، بهبود پاسخ ایمنی، کاهش امکان رشد سلول‌های سرطانی (12)، تحریک تولید ترکیبات معدنی استخوان‌ها شده و به‌عنوان عامل ضدپوسیدگی دندان عمل می‌کنند (13).

با در نظر گرفتن مزایای اصلاح آنزیمی پروتئین‌های اولیه و تولید پپتیدهای زیست فعال، هدف از این تحقیق بررسی کارایی فرآیند هیدرولیز آنزیمی کازئین در زمان‌های مختلف بر درجه هیدرولیز، ویژگی‌های عملکردی، قابلیت مهار انواع رادیکال‌های پراکسید، کاتیونی و آنیونی، کاهش تولید ترکیبات واکنش‌پذیر تیوباربیتوریک اسید در امولسیون و شلاته‌کنندگی یون‌های فلزی پراکسیدان (آهن و مس) بود.

• مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده: کازئین (95% پروتئین)، پانکراتین، تری‌کلرواستیک اسید TCA (Trichloroacetic acid)، کوماسی بلو (G250)، DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)، ABTS (2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt)، پتاسیم پرسولفات، ترولوکس، پتاسیم فری‌سیانید، فریک کلراید، آلفا-داکسی ریبوز، سولفات آهن، EDTA، پراکسید هیدروژن، دی‌کلرید آهن، فروزین، سولفات مس، پیریدین، پیروکاتکول ویولت، توین 20، اسکوربیک اسید، تیوباربیتوریک اسید TBA (Thiobarbituric acid)، سدیم دودسیل سولفات SDS (Sodium dodecyl sulphate) از شرکت سیگما خریداری شدند. روغن هسته انگور (Olitalia، ایتالیا)، اتانول، سود، اسیدکلریدریک، پتاسیم کلراید، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، اسید فسفریک (مرک، آلمان).

هیدرولیز کازئین: برای فرآیند هیدرولیز آنزیمی، کازئین را در غلظت (W/V) 5 درصد در بافر فسفات 0/2M مولار (pH=7/4) حل نموده و امکان هیدراته شدن کامل آن در حین هم‌زدن مداوم به مدت 30min در دمای محیط مهیا شد. سپس آنزیم پانکراتین در نسبت آنزیم به پروتئین سوبسترا 2/5(W/W) درصد به محلول حاوی کازئین افزودن شد. دمای واکنش برای پانکراتین 40°C و زمان واکنش در شرایط هم-

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-18]

زدن مداوم با دور 200rpm در مقادیر 30، 60، 90، 120، 150 و 180 دقیقه متغیر در نظر گرفته شد. برای غیرفعال کردن فعالیت آنزیم، محیط واکنش در حمام آب 90°C به مدت 15min قرار داده شد. محلول تا دمای محیط خنک گردید. محلول در دور 5000rpm به مدت 10min سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت جدا، لیوفیلیزه و تا زمان استفاده در دمای 20- °C نگهداری گردید (14).

درجه هیدرولیز: سوسپانسیون کازئین هیدرولیز شده و تری کلرواستیک اسید (0/44M) در نسبت حجمی 1:1 مخلوط و به‌مدت 15 دقیقه در دمای 4°C انکوبه شد. سپس، مخلوط در 10000rpm و به مدت 10min سانتریفوژ شد. مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت حاوی تری کلرواستیک اسید 0/22 M با روش Bradford (15) تعیین گردید. در نهایت، درجه هیدرولیز بر حسب مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت حاوی TCA به پروتئین موجود در سوسپانسیون (پس از رقیق‌سازی با آب مقطر به حجم مساوی) و بر حسب درصد محاسبه شد.

ویژگی‌های عملکردی

انحلال‌پذیری: برای تعیین میزان انحلال‌پذیری پروتئین‌های هیدرولیز شده از روش Jamdar و همکاران (16) با مقدار جزئی اصلاحات استفاده شد. به این شکل که، برای ارزیابی اثر هر pH بر حلالیت پروتئین‌ها، 200mg پروتئین هیدرولیز شده در 20ml میلی‌لیتر آب مقطر پراکنده و pH مخلوط با استفاده از سود یا اسیدکلریدریک 1 نرمال در مقادیر (1، 2، 3، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10، 11 و 12) تنظیم شد. محلول در 10000 g برای 10min سانتریفوژ شد. سپس مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت با استفاده از روش بردفورد تعیین و درصد حلالیت بر اساس مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت بر پروتئین محلول اولیه تعیین گردید.

ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی: ویژگی‌های امولسیفیه کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده بر طبق روش Klompong و همکاران (17) با اندکی اصلاحات تعیین گردید. ابتدا 5ml روغن هسته انگور و 15ml محلول 1 درصد پروتئین با هم مخلوط و pH با استفاده از سود یا اسید کلریدریک 1 نرمال به 3، 5، 6، 7 و 9 تنظیم شد. مخلوط با استفاده از هموژنایزر در سرعت 20000rpm برای 1min هموژن گردید. سپس، 50µl نمونه امولسیون در زمان 0 و 10min پس از هموژنیزاسیون از ته ظرف برداشته و با 5ml محلول 0/1% سدیم دودسیل سولفات مخلوط شد. جذب محلول رقیق شده در 500nm با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار جذب در زمان اولیه (A_0) و 10 دقیقه پس از تشکیل امولسیون (A_{10}) برای محاسبه فعالیت امولسیون کنندگی (EAI) و شاخص پایداری امولسیون (ESI) با استفاده از معادلات زیر به‌کار گرفته شد:

$$EAI(m^2/g)=(2\times 2/303\times A_0)/\ 0/25\times \text{وزن پروتئین(گرم)} \quad (1)$$

$$ESI\ (\%) = (A_0 - A_{10}/A_0) \times 100 \quad (2)$$

ویژگی‌های کف کنندگی: ظرفیت و پایداری کف کنندگی پروتئین هیدرولیز شده بر طبق روش Klompong و همکاران (17) با اندکی اصلاحات تعیین گردید. حجم 15ml محلول 0/5% نمونه با استفاده از سود یا اسیدکلریدریک 1 نرمال، pH آن به 3، 5، 6، 7 و 9 تنظیم و هموژنیزاسیون در سرعت 16000rpm برای 2min با هدف ورود هوا به درون محلول در دمای محیط انجام گرفت. نمونه زده شده به سرعت به استوانه مدرج 25ml منتقل و حجم کل پس از 1min خوانده شد. ظرفیت کف کنندگی (FC) بر طبق معادله زیر محاسبه شد:

$$FC\ (\%) = (A\ /B) \times 100 \quad (3)$$

در اینجا، A حجم کف پس از زدن (ml) و B حجم اولیه محلول قبل از زدن (ml) می‌باشد.

نمونه‌های زده شده در دمای 25 °C برای 10min نگهداری، سپس حجم کف خوانده شد. پایداری کف (FS) با معادله زیر محاسبه گردید:

$$FS\ (\%) = (A\ /B) \times 100 \quad (4)$$

در اینجا، Aحجم کف پس از نگهداری (ml) و B حجم اولیه محلول قبل از زدن (ml) می‌باشد.

ویژگی‌های ضداکسایشی

قدرت احیاءکنندگی: برای تعیین قدرت احیاءکنندگی نمونه‌های هیدرولیز شده، 0/5ml نمونه حل شده در آب مقطر (در غلظت 40mg/ml) با 0/5ml بافرفسفات 0/2M (pH6.6) و 0/5ml پتاسیم فری‌سیانید (W/V)1% مخلوط شد. مخلوط در دمای 50°C برای 20min دقیقه انکوبه شد. سپس، 0/5ml محلول تری‌کلرو استیک اسید 10 درصد به مخلوط اضافه و به‌مدت 10min در 2500rpm سانتریفوژ شد. در نهایت، 1ml سوپرناتانت با 1ml آب مقطر و 0/2ml فریک کلراید (W/V)0/1% مخلوط گردید. جذب نمونه در 700nm پس از 10min نگهداری مخلوط در دمای محیط، خوانده شد. حجم

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-18]

یکسانی آب مقطر به جای نمونه برای تهیه نمونه کنترل استفاده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش نشان دهنده افزایش قدرت احیاءکنندگی است (18).

مهار رادیکال هیدروکسیل: فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل با استفاده از اکسیداسیون 2-داکسی ریبوز بر طبق روش Kim و Minamikawa (19) و با اندکی اصلاحات تعیین شد. برای این آزمون، 0/2ml از مخلوط 10mM ($FeSO_4$-EDTA)، 0/5ml (10mM) آلفاداکسی ریبوز، 0/2ml نمونه هیدرولیز شده، 0/9ml سدیم فسفات بافر 0/2M (pH 7.4) و 0/2ml پراکسید هیدروژن (10mM) با هم مخلوط شدند. مخلوط در 37°C برای 1h انکوبه شد. سپس، 1ml تری کلرواستیک اسید (TCA) 2/8 درصد برای توقف واکنش به مخلوط افزوده شد. مخلوط برای 15min در حمام آب جوش قرار، در یخ سرد شده، سپس جذب آن در 532nm با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. حجم یکسانی آب مقطر به جای نمونه برای تهیه شاهد استفاده گردید. نتایج به شکل درصد مهار رادیکال هیدروکسیل با استفاده از معادله زیر اندازه‌گیری شد:

$$\text{بازدارندگی } (\%) = (1- A_s/A_b) \times 100 \qquad (5)$$

در اینجا، A_b جذب شاهد و A_s جذب نمونه است.

مهار رادیکال آنیونی DPPH: درصد مهار رادیکال آزاد DPPHبا استفاده از روش Wu و همکاران (20) با کمی اصلاحات تعیین گردید. ابتدا پودرهای کازئین هیدرولیز شده در آب مقطر (40mg/ml) حل شدند. سپس، 1/5ml از هر نمونه با 1/5ml از محلول اتانولی DPPH (0/15mM) مخلوط و بمدت 20 ثانیه ورتکس شد. سپس، مخلوط حاصل در 2500rpm به مدت 10min سانتریفوژ و بمدت 20min در تاریکی نگهداری شد. جذب محلول سوپرناتانت در طول موج 517nm خوانده شد. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

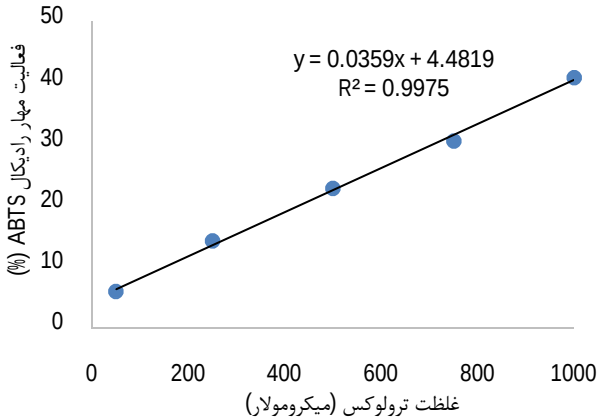
$$I\ (\%) = [\frac{Ablank-Asample}{Ablank}] \times 100 \qquad (6)$$

در اینجا A_{blank} جذب شاهد (حجم یکسانی از آب مقطر به جای محلول نمونه با محلول DPPH مخلوط شد)، A_{sample} جذب نمونه می‌باشند.

مهار رادیکال کاتیونی $ABTS^+$: فعالیت مهار رادیکال ABTS پودرهای کازئین هیدرولیز شده با استفاده از روش تشریح شده توسط You و همکاران (21) با کمی اصلاحات تعیین گردید. محلول رادیکال $ABTS^+$ با ترکیب نسبت حجمی یکسانی از ABTS در غلظت 7mM و 2/45mM پتاسیم پرسولفات تهیه گردید. مخلوط در تاریکی و در دمای محیط به مدت 12-16 h قبل از مصرف قرار داده شد. در این مدت، اکسیداسیون و تولید رادیکال $ABTS^+$ به وسیله پتاسیم پرسولفات انجام گرفت. قبل از آزمون، محلول $ABTS^+$ با استفاده از PBS (0/2M, pH 7.4) تا جذب 0/02 ± 0/7 در 734nm رقیق شد. سپس 40µl از هر نمونه (با غلظت mg 4/mL) به 4ml محلول رقیق شده $ABTS^+$ افزوده شد. مخلوط برای 30 ثانیه به شدت ورتکس و به مدت 6min در تاریکی قرار داده شد. جذب محلول نهایی در 734nm اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با واکنش 40µl ترولوکس (1000 µM، 750، 500، 250، 100، 50) با 4ml محلول رقیق شده $ABTS^+$ تهیه شد. درصد مهار رادیکال $ABTS^+$ نمونه‌ها بر اساس معادله زیر محاسبه گردید. همچنین، فعالیت مهار رادیکال $ABTS^+$ بر اساس منحنی استاندارد ترولوکس به شکل ظرفیت ضداکسایشی معادل ترولوکس (TEAC, mM) بیان گردید.

$$AA\ (\%) = [\frac{Ablank-Asample}{Ablank}] \times 100 \qquad (7)$$

در اینجا، A_{blank} (جذب نمونه شاهد فاقد ترکیب فعال) و A_{sample} (جذب نمونه کازئین هیدرولیز شده) هستند.



شکل 1. ارتباط بین درصد فعالیت مهار رادیکال ABTS با غلظت معادل ترولوکس در منحنی استاندارد.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-18]

فعالیت مهار ترکیبات واکنش‌پذیر تیوباربیتوریک اسید: امولسیون روغن در آب با هموژن کردن 1g روغن ذرت و 100µl توین 20 با 100ml آب مقطر با استفاده از هموژنایزر با سرعت 22000rpm برای 2min در حمام یخ تهیه گردید. نمونه‌ها برای ارزیابی اکسیداسیون لیپیدی با مخلوط نمودن 8ml امولسیون روغن، 0/5ml محلول 0/2 درصد اسکوربیک اسید، 0/5ml محلول 200ppm سولفات آهن ($FeSO_4$) و 1 ml محلول پروتئین هیدرولیز شده (در غلظت 40mg/ml) تهیه شدند. سپس، نمونه‌ها در ^oC 37 برای 16 h انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، 1 ml از هر نمونه به 2 ml محلول تیوباربیتوریک اسید/ تری کلرواستیک اسید (mM TBA 20/ 15%TCA) و 50µl محلول 10%BHA در اتانول 90% افزوده و سپس ورتکس گردید. مخلوط حاصل برای توسعه رنگ در حمام آب ^oC 90 برای 15min انکوبه شد. نمونه‌ها در حمام آب یخ برای 10min خنک و در 3000rpm برای 15min و در دمای ^oC 5 سانتریفوژ شدند و جذب محلول در طول موج 532 nm اندازه‌گیری شد. برای تهیه نمونه شاهد از مخلوط 1ml آب مقطر با 2ml محلول TBA/TCA استفاده شد. مقدار TBARS (ترکیبات حاصل از واکنش تیوباربیتوریک اسید) به شکل میلی‌گرم مالون دی آلدهید MDA (Malondialdehyde) در لیتر امولسیون بیان می‌شود (22).

شلاته‌کنندگی یون آهن: فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن بر طبق روش Jamdar و همکاران (16) اندازه‌گیری شد. ابتدا، ml 1 نمونه حل شده در آب مقطر (در غلظت 40mg/ml) با 0/05ml محلول دی کلرید آهن (2mM) و 1/85ml آب دوبار تقطیر مخلوط شد. سپس، 0/1ml محلول فروزین (5mM) (3-(2-pyridyl)-5,6-Diphenyl-1,2,4-triazine-4′,4″-disulphonic acid) افزوده و مخلوط به شدت هم‌زده شد. جذب پس از 10min نگهداری مخلوط در دمای محیط در 562nm خوانده شد. آب دوبار تقطیر به عنوان نمونه شاهد مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت شلاته‌کنندگی نمونه‌ها با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$\text{شلاته‌کنندگی یون آهن}\ (\%) = [(A_{control} - A_{sample}/A_{control})] \times 100 \qquad (8)$$

در اینجا، A_{blank} (جذب نمونه شاهد فاقد ترکیب فعال) و A_{sample} (جذب نمونه کازئین هیدرولیز شده) هستند.

شلاته کنندگی یون مس: فعالیت شلاته‌کنندگی یون مس پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از روش Kong و Xiong (23) اندازه‌گیری شد. در ابتدا، 1ml محلول 0/2mM سولفات مس با 1ml کازئین هیدرولیز شده در فالکون 15ml مخلوط و برای 5min در دمای اتاق انکوبه شد. سپس، 1ml محلول تری کلرواستیک اسید 11/3 درصد افزوده و نمونه‌ها در 2500rpm برای 10min سانتریفوژ شدند. پس از آن، 2ml از سوپرناتانت به 1ml محلول 10% پیریدین و 20µl پیروکاتکول ویولت افزوده و مخلوط ورتکس و برای 5min در دمای اتاق انکوبه شد. جذب نمونه‌ها در 632 nm خوانده و فعالیت شلاته‌کنندگی یون مس با استفاده از معادله زیر تعیین گردید:

$$\text{شلاته‌کنندگی یون مس}\ (\%) = [1 - (A_{sample} / A_{blank})] \times 100 \qquad (9)$$

در اینجا، A_{blank} (جذب نمونه شاهد فاقد ترکیب فعال) و A_{sample} (جذب نمونه کازئین هیدرولیز شده) هستند.

تجزیه و تحلیل آماری: در پژوهش حاضر، اثر زمان‌های مختلف هیدرولیز کازئین (30، 60، 90، 120، 150 و 180 دقیقه) با آنزیم پانکراتین (نسبت آنزیم به سوبسترای 2/5 درصد وزنی-وزنی) بر ویژگی‌های عملکردی و فعالیت ضداکسایشی کازئین‌های هیدرولیز شده با کاربرد آنالیز واریانس یک طرفه و استفاده از نرم افزار SPSS نسخه 19 مورد ارزیابی قرار گرفت تا فاکتورهای مؤثر از لحاظ آماری شناسایی شوند. کلیه آزمون‌ها در 3 تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن جهت بررسی معنی‌دار بودن اثر متغیرها در (P<0/05) انجام گردید.

• یافته‌ها

درجه هیدرولیز: جدول 1، اثر زمان فرآیند هیدرولیز را بر درجه هیدرولیز کازئین نشان می‌دهد. در این تحقیق، درجه هیدرولیز کازئین در محدوده 1 تا 19/23 درصد متغیر بود. نتایج آنالیز آماری نشان دهنده اثر قابل توجه زمان فرآیند بر هیدرولیز کازئین است (P<0/05). بدین ترتیب که میزان شکست پپتیدها و در نهایت درجه هیدرولیز در طول فرآیند افزایش یافت.

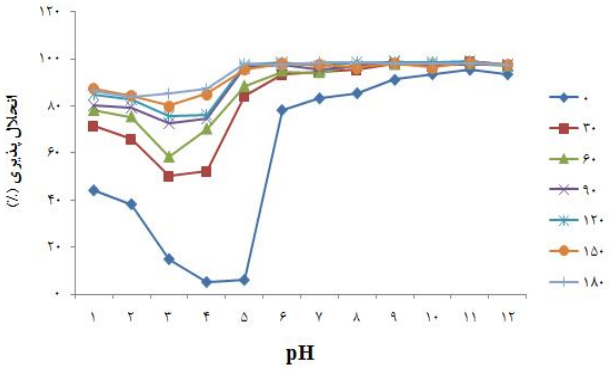
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-18]

جدول1. تأثیر زمان هیدرولیز آنزیمی بر درجه هیدرولیز، قدرت احیاءکنندگی، مهار رادیکال هیدروکسیل و رادیکال آزاد DPPH

زمان هیدرولیز (دقیقه)	درجه هیدرولیز (%)	احیاءکنندگی (%)	مهار رادیکال هیدروکسیل (%)	مهار رادیکال DPPH (%)
0	1/21±0/50g	0/404±0/007e	13/31±2/19f	11/13±1/96f
30	5/83±0/32f	0/511±0/003d	61/77±0/93e	35/09±0/41e
60	9/51±0/41e	0/541±0/008c	64/13±0/63d	39/85±0/65d
90	12/42±0/38d	0/548±0/006c	66/95±0/84c	42/79±1/23bc
120	13/50±0/40c	0/567±0/004b	69/03±0/79bc	43/52±1/05b
150	16/04±0/58b	0/609±0/006a	70/04±0/91b	46/04±0/88a
180	19/23±0/46a	0/619±0/008a	72/91±1/34a	40/99±0/84cd

مقادیر ارائه شده میانگین 3 تکرار به همراه انحراف از استاندارد هستند. میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $p<0/05$ می‌باشند.

انحلال‌پذیری: شکل 2، انحلال‌پذیری کازئین و هیدرولیز شده‌های کازئین را تحت تأثیر pH های مختلف نشان می‌دهد. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود، کازئین هیدرولیز نشده بیشترین افت حلالیت را در pH های اسیدی (به‌ویژه در حدود 5-4) با توجه به نقطه ایزوالکتریک آن (4/6) از خود نشان می‌دهد. اما حلالیت نمونه‌های هیدرولیز شده به خصوص با افزایش زمان و درجه هیدرولیز، خیلی کمتر تحت تأثیر pH اسیدی قرار می‌گیرند. همچنین، نتایج نشان دهنده این است که استفاده از هیدرولیز آنزیمی و افزایش زمان هیدرولیز موجب بیشتر شدن حلالیت کازئین و پپتیدهای حاصل از آن گردید ($P<0/05$).

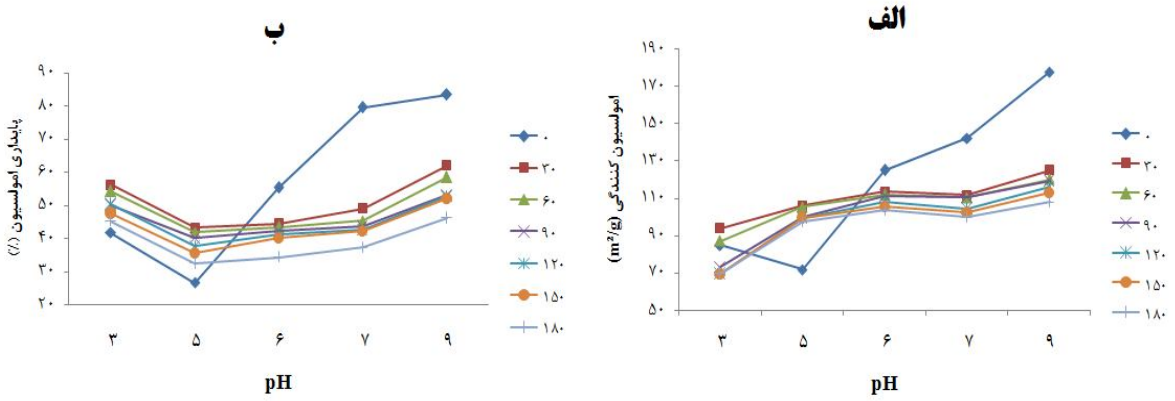


شکل 2. اثر pH بر انحلال‌پذیری کازئین و کازئین‌های هیدرولیز شده با پانکراتین در زمان‌های مختلف (180-30 دقیقه)

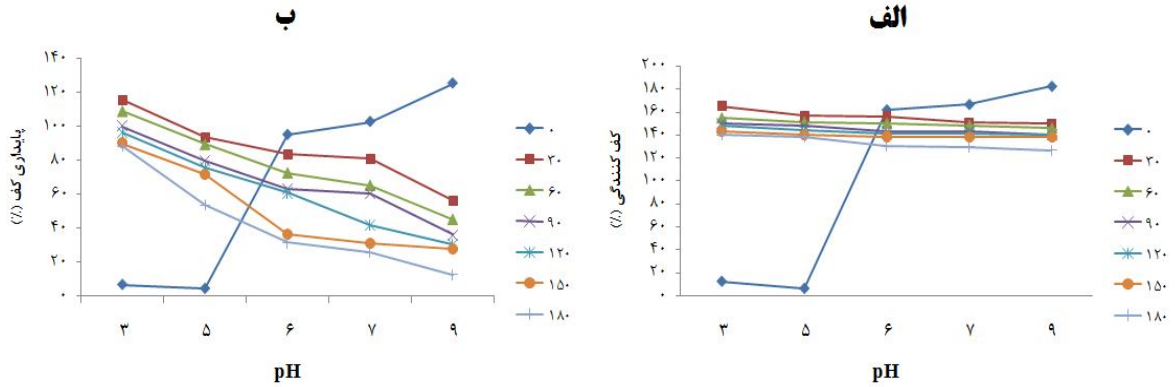
ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی: شکل 3 (الف و ب) نشان دهنده قدرت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون‌های تولید شده با استفاده از کازئین هیدرولیز شده با پانکراتین تحت تأثیر pH های مختلف است. نتایج حاکی از این بود که شاخص امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون تولید شده با کازئین به شدت تحت تأثیر pH قرار می‌گیرند. علت این است که کازئین در مقدار pH کمتر از 6 و به ویژه 5 (نزدیک به نقطه ایزوالکتریک)، کمترین مقدار حلالیت را داراست. با توجه به اینکه یکی از عوامل مؤثر بر ویژگی‌های عملکردی مانند ظرفیت امولسیون کنندگی، حلالیت است، لذا به حداقل رسیدن حلالیت موجب افت این ویژگی‌ها می‌شود. این یافته حاکی از عدم قابلیت استفاده از کازئین هیدرولیز نشده با هدف غنی‌سازی و قابلیت امولسیون کنندگی در فرمولاسیون‌های مختلف در pH اسیدی (به‌ویژه نزدیک به نقطه ایزوالکتریک) است. اما شیب کاهشی و افزایشی برای محصولات هیدرولیز شده در هر یک از این شاخص‌ها ملایم‌تر بود. نتایج حاصل از این آزمون‌ها حاکی از حساسیت کمتر کازئین‌های هیدرولیز شده به pH اسیدی، در نتیجه تغییر در اندازه پپتیدها، ترکیب آمینواسیدها، درجه هیدرولیز و حلالیت است. اما در مقدار pH بالاتر از 6، کازئین هیدرولیز نشده قابلیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون بالاتری از خود نشان داد. همچنین در بین تیمارهای هیدرولیز شده، کازئین هیدرولیز شده در زمان 30 دقیقه، از شاخص امولسیون کنندگی و پایداری بیشتری نسبت به محصولات با درجات بالاتر هیدرولیز برخوردار بود. علت این نتیجه را می‌توان به بهبود فعالیت امولسیون‌کنندگی در نتیجه تغییر در ترکیب پپتیدها و قابلیت تشکیل فیلم در اطراف قطرات نسبت داد. با افزایش درجه هیدرولیز به دلیل تولید پپتیدهای با زنجیره کوتاه‌تر، از قابلیت امولسیون‌کنندگی کاسته می‌شود.

ویژگی‌های کف کنندگی: شکل 4 (الف و ب)، اثر pH های مختلف بر ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف تولید شده توسط کازئین و محصولات هیدرولیز شده آن را در زمان‌های مختلف نشان می‌دهد. برخلاف نتایج حاصل از ارزیابی قدرت امولسیون کنندگی، مقادیر این شاخص‌ها برای کازئین هیدرولیز نشده به شکل بسیار قابل توجهی تحت تأثیر pH در محدوده اسیدی و نزدیک به نقطه ایزوالکتریک قرار گرفت. اما هیدرولیز جزئی کازئین (در زمان 30 دقیقه) موجب بهبود شاخص‌های کف‌کنندگی شد.اگرچه با افزایش زمان فرآیند و درجه هیدرولیز از ظرفیت کف کنندگی و پایداری کف‌های حاصل کاسته شد.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-18]



شکل 3. اثر pH بر امولسیون‌کنندگی (الف) و پایداری امولسیون (ب) کازئین و کازئین هیدرولیز شده با پانکراتین در زمان‌های مختلف (30-180 دقیقه)



شکل 4. اثر pH بر ظرفیت کف‌کنندگی (الف) و پایداری کف (ب) کازئین و کازئین هیدرولیز شده با پانکراتین در زمان‌های مختلف (30-180 دقیقه)

قدرت احیاءکنندگی: جدول 1، اثر زمان هیدرولیز آنزیمی کازئین را بر قدرت احیاءکنندگی ترکیبات هیدرولیز شده نشان می‌دهد. مقدار این شاخص برای کازئین و کازئین‌های هیدرولیز شده در طول زمان بین 0/404 تا 0/619 متغیر بود. هیدرولیز آنزیمی محدود کازئین (30 دقیقه) موجب افزایش قابل توجهی در قدرت احیاءکنندگی ترکیبات حاصل از آن گردید (P<0/05). همچنین، با افزایش زمان هیدرولیز از 30 به 150 دقیقه، مقدار این شاخص افزایش پیدا کرد. اگرچه هیدرولیز بیشتر کازئین اثری بر افزایش قدرت احیاءکنندگی از خود نشان نداد.

مهار رادیکال هیدروکسیل: اثر زمان هیدرولیز آنزیمی بر فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل در کازئین و محصولات هیدرولیز شده در جدول 1 نشان داده شده است. مقدار این شاخص در تیمارهای مختلف بین 13/31-72/91 درصد متغیر بود. آنالیز آماری نتایج نشان دهنده افزایش قابل توجه فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل پس از انجام فرآیند هیدرولیز آنزیمی است. همچنین، افزایش زمان هیدرولیز آنزیمی کازئین با افزایش درجه هیدرولیز که منجر به تغییر در ترکیب آمینواسیدی، تولید پپتیدهای با وزن مولکولی کم و افزایش دسترسی و رهایش آمینواسیدهای با فعالیت ضداکسایشی می‌شود، موجب بهبود فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل گردید (P<0/05).

مهار رادیکال آنیونی DPPH: نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت مهار رادیکال DPPH در نمونه‌های کازئین و محصولات حاصل از هیدرولیز آنزیمی در طول زمان در جدول 1 ارائه شده است. یافته‌ها حاکی از قابلیت اندک کازئین هیدرولیز نشده در مهار رادیکال DPPH است. اما تیمار آنزیمی کازئین به مدت 30 دقیقه، درصد مهار رادیکال آزاد را به بیش از 3 برابر افزایش داد. همچنین افزایش زمان هیدرولیز تا 150 دقیقه موجب افزایش فعالیت ضداکسایشی در نمونه‌ها شد. اما ادامه هضم

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-18]

پپتیدهای حاصل با پانکراتین موجب کاهش قابل توجهی در قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH گردید ($P<0/05$).

مهار رادیکال کاتیونی ABTS: ارزیابی ظرفیت ضداکسایشی معادل ترولوکس متکی به کاهش رنگ رادیکال کاتیونی ABTS و ظرفیت ضداکسایشی به شکل غلظت ترولوکس با اثر یکسان تعیین می‌شود. همانند نتایج حاصل از ارزیابی دیگر شاخص‌های ضداکسایشی، مهار رادیکال کاتیونی ABTS و ظرفیت ضداکسایشی معادل ترولوکس به طورکامل تحت تأثیر فرآیند هیدرولیز آنزیمی با پانکراتین قرار گرفت. بدین شکل که پس از 30 دقیقه، هیدرولیز آنزیمی،درصد مهار رادیکال ABTS و ظرفیت ضداکسایشی معادل ترولوکس از 22 به 73% و از 0/51 به 1/97 میلی‌مولار افزایش یافت. با ادامه هیدرولیز آنزیمی (تا 150 دقیقه) نیز مقادیر هر یک از این دو شاخص افزایش و سپس بدون تغییر ماند ($P<0/05$).

فعالیت مهار ترکیبات واکنش‌پذیر تیوباربیتوریک اسید: از روش‌های استاندارد برای تعیین مقدار اکسیداسیون در لیپیدها می‌توان به اندازه‌گیری ترکیبات واکنش‌پذیر تیوباربیتوریک اسید یا TBARS (به عنوان محصولات ثانویه اکسیداسیون بر مبنای اندازه‌گیری مالون آلدئید) اشاره کرد.نتایج ارائه شده در جدول 2 نشان دهنده تأثیر استفاده از کازئین‌های هیدرولیز شده در کاهش اکسیداسیون لیپید موجود در امولسیون و کاهش تشکیل محصولات ثانویه اکسیداسیون است. به طوری‌که افزایش زمان هیدرولیز آنزیمی موجب کاهش تشکیل این ترکیبات گردید ($P<0/05$).

شلاته‌کنندگی یون آهن: جدول 2، اثر زمان هیدرولیز آنزیمی بر قابلیت شلاته‌کنندگی یون آهن در کازئین‌های هیدرولیز شده را نشان می‌دهد. درصد شلاته‌کنندگی در بین نمونه‌های کازئین و محصولات هیدرولیز شده بین 19/7-70/3 درصد متغیر بود. در بین نمونه‌ها، کمترین فعالیت شلاته-کنندگی مربوط به کازئین هیدرولیز نشده و بیشترین مربوط به کازئین هیدرولیز شده با پانکراتین به مدت 180 دقیقه بود. به‌طورکلی، نتیجه این آزمون حاکی از تأثیر قابل توجه زمان فرآیند و درجه هیدرولیز آنزیمی بر شلاته‌کنندگی پپتیدهای حاصل از کازئین است.

شلاته‌کنندگی یون مس: نتایج حاصل از ارزیابی اثر زمان هیدرولیز کازئین بر فعالیت شلاته‌کنندگی یون مس حاکی از اثر قابل توجه فرآیند هیدرولیز آنزیمی و افزایش درجه هیدرولیز بر کارایی پپتیدهای هیدرولیز شده است. فعالیت شلاته‌کنندگی یون مس در تیمارهای مختلف بین 2/5-16/8% متغیر بود. به طور مثال، شلاته‌کنندگی کازئین پس از 30 دقیقه هیدرولیز حدود 3 برابر افزایش یافت (جدول 2).

جدول 2. تأثیر زمان هیدرولیز آنزیمی کازئین بر درصد مهار رادیکال ABTS، ظرفیت ضداکسایشی معادل ترولوکس، مقدار ترکیبات واکنش‌پذیر تیوباربیتوریک اسید و شلاته‌کنندگی یون‌های آهن و مس

زمان هیدرولیز (دقیقه)	مهار رادیکال ABTS (%)	TEAC (میلی‌مولار)	TBARS (میلی‌گرم در لیتر)	شلاته‌کنندگی یون آهن (%)	شلاته‌کنندگی یون مس (%)
0	22/01±2/11f	0/51±0/06f	0/407±0/006a	19/71±2/07f	2/49±0/61e
30	73/64±0/47e	1/97±0/0.1e	0/283±0/004b	56/53±1/43e	8/71±1/02d
60	77/38±0/23d	2/08±0/01d	0/282±0/005bc	64/28±0/81d	11/39±0/68c
90	79/39±0/35c	2/14±0/02c	0/277±0/006cd	65/33±0/92cd	11/38±1/15c
120	81/19±0/66b	2/19±0/01b	0/269±0/007de	66/48±0/56bc	12/54±0/55c
150	83/57±0/15a	2/26±0/01a	0/264±0/006e	67/79±0/55b	14/76±0/72b
180	84/42±0/33a	2/28±0/01a	0/251±0/004f	70/30±0/76a	16/80±0/81a

مقادیر ارائه شده میانگین 3 تکرار به همراه انحراف از استاندارد هستند. میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $p<0/05$ می‌باشند.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-18]

• بحث

درجه هیدرولیز: درجه هیدرولیز، اندازه و ترکیب اسید آمینه‌ای پپتیدها، فعالیت بیولوژیکی و همچنین طعم پروتئین-های هیدرولیز شده را تعیین می‌کند. به طورکلی با افزایش درجه هیدرولیز، تولید پپتیدهای تلخ در محصول هیدرولیز شده بیشتر می‌شود (8). همچنین، با افزایش درجه هیدرولیز طول زنجیره پپتیدها کوچکتر و توزیع وزن مولکولی آن‌ها کاهش می‌یابد که به علت شکست بیشتر زنجیره‌ها، افزایش آمینواسیدها و پپتیدهای کوچکتر است (21).

این یافته موافق با نتایج حاصل از تحقیقات You و همکاران (24)، Mao و همکاران (7)، Jamdar و همکاران (16)، Zhao و همکاران (25) و Chen و همکاران (14) است که به ترتیب اثر پروتئازهای مختلف بر درجه هیدرولیز پروتئین‌های ماهی تیان (پاپایین و پروتامکس)، کازئین شیر گاو میش (تریپسین، پپسین، آلکالاز و پاپایین)، بادام زمینی (آلکالاز)، کازئین شیر گاو (پاپایین) و ایزوله پروتئین سویا (پانکراتین) بررسی کردند. در تحقیق دیگری، You و همکاران (21) پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی تیان با آنزیم پاپایین را تحت تأثیر آنزیم‌های پپسین و پانکراتین بررسی کردند. نتایج نشان دهنده اثر زمان هضم آنزیمی بر افزایش آمینواسیدهای آزاد، کاهش وزن مولکولی پپتیدها از 3000-1000 دالتون به کمتر از 500 دالتون و در نتیجه افزایش درجه هیدرولیز از حدود 37 به 46 درصد بود.

انحلال‌پذیری: حلالیت یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های پروتئین-هاست که به طور مستقیم دیگر ویژگی‌های عملکردی آن‌ها را چه در شرایط ارزیابی آزمایشگاهی و چه در هنگام استفاده به عنوان جزء افزودنی در فرمولاسیون غذایی و امولسیون‌ها تحت تأثیر قرار می‌دهد (14). افزایش حلالیت پروتئین‌ها در pH های مختلف را می‌توان به تأثیر مثبت هیدرولیز آنزیمی کنترل شده بر کاهش وزن مولکولی و افزایش گروه‌های باردار نسبت داد. همچنین، هیدرولیز آنزیمی با شکست توده‌های پروتئینی نامحلول، تولید پپتیدهای کوچک‌تر، افزایش دسترسی گروه-های هیدروفیل و تسهیل واکنش آمینواسیدهای هیدروفیل با محیط آبی موجب افزایش حلالیت پروتئین‌ها می‌شود (26).

مشابه یافته‌های این تحقیق، نتایج حاصل از تحقیقات متعددی حاکی از این بود که حلالیت پروتئین‌های هیدرولیز شده تابع درجه هیدرولیز است. به طور مثال، پروتئین‌های هیدرولیز شده بادام زمینی در درجه هیدرولیز 10 درصد و 6-pH=4 از حلالیت حدود 40 درصد برخوردار بودند. در حالی‌که افزایش درجه هیدرولیز به 20 درصد موجب افزایش حلالیت به بیش از 90 درصد در کلیه محدوده pH های مورد بررسی گردید (16). همچنین، نتایج حاصل از این تحقیق در تطابق با یافته‌های Tsumura و همکاران (27)، Chen و همکاران (14) و Aluko و Monu (26) است که اثر زمان و درجه هیدرولیز را بر حلالیت پروتئین‌های سویا، ایزوله پروتئین سویا پیش تیمار شده با اکستروژن و کنسانتره پروتئین دانه کینوآ بررسی کردند.

ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی: امولسیون‌کنندگی یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها و محصولات هیدرولیز شده آن‌ها می‌باشد. ظرفیت امولسیون کنندگی به توانایی یک امولسیفایر در تشکیل و پایدارسازی قطرات کوچک فاز پراکنده در طول هموژنیزاسیون و در زمان نگهداری امولسیون تازه تهیه شده است. پایداری یک امولسیون نیز به توانایی یک امولسیون به مقاومت در برابر عوامل ناپایدار کننده مانند خامه‌ای شدن، توده‌ای شدن و ادغام اطلاق می‌شود (14). نتایج مشابهی در تحقیق Chen و همکاران (14) گزارش گردید که اثر تیمارهای اکستروژن و هیدرولیز آنزیمی بر قابلیت امولسیون کنندگی ایزوله پروتئین سویا را بررسی کردند. آن‌ها گزارش کردند که هیدرولیز جزئی ایزوله پروتئین سویا موجب بهبود ویژگی‌های امولسیون کنندگی شد. اما با ادامه زمان و افزایش درجه هیدرولیز، از مقدار این شاخص کاسته شد. نتایج حاصل از این تحقیق در تطابق با یافته‌های Jamdar و همکاران (16) بود که اثر درجات مختلف هیدرولیز آنزیمی پروتئین بادام زمینی بر قابلیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون در pH های مختلف را بررسی و بیان کردند که پایداری امولسیون‌های تولید شده در همه نمونه‌ها در محدوده pH قلیایی به دلیل تغییر در بار سطحی پپتیدها و آمینواسیدها، بیشتر از شرایط اسیدی است.

اگرچه، Aluko و Monu (26) بیان کردند ظرفیت امولسیون کنندگی پروتئین کینوآ بالاتر از نمونه‌های هیدرولیز شده با آلکالاز است. آن‌ها علت این یافته را به عدم قابلیت پپتیدهای با وزن مولکولی پایین به تشکیل فیلم پایدار و کارآمد در اطراف قطرات روغن نسبت دادند. از سوی دیگر pH، با تحت تأثیر قراردادن بار سطحی، واکنش زنجیره‌های پپتیدها با هم و قابلیت تشکیل فیلم پایدار، به طور قابل ملاحظه‌ای پایداری و ظرفیت امولسیون کنندگی را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

ویژگی‌های کف کنندگی: ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف‌های تولید شده یکی دیگر از ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها و محصولات حاصل از هیدرولیز آن‌هاست که به

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-18]

طور قابل توجهی تحت تأثیر نوع پروتئین، pH و شرایط هیدرولیز، درجه هیدرولیز و نوع آنزیم مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین حلالیت، بار سطحی، قابلیت واکنش زنجیره‌های پپتیدی و تشکیل فیلم در سطح مشترک حباب‌ها از جمله عوامل مؤثر بر کارایی کف کنندگی و پایداری آن به شمار می‌روند (14). با توجه به حلالیت بالای هیدرولیز شده و کاهش حساسیت به شرایط اسیدی، هیدرولیز آنزیمی کازئین به ویژه در pH های اسیدی موجب بهبود قابلیت کف‌کنندگی و پایداری کف‌های تولیدی در مقایسه با کازئین هیدرولیز نشده می‌شود. همچنین، هیدرولیز آنزیمی با کاهش وزن مولکولی و افزایش انعطاف‌پذیری پپتیدها، موجب تسهیل تشکیل غشای بین سطحی و تولید کف می‌شود (26). اگرچه در pH های قلیایی و خنثی، ظرفیت کف کنندگی و پایداری کف‌های تولیدی با افزایش درجه هیدرولیز کاهش می‌یابد، که این یافته را می‌توان به قابلیت بالاتر پپتیدهای با وزن مولکولی بیشتر به تشکیل غشای بین سطحی قوی‌تر نسبت داد. در تحقیق مشابهی، پروتئین‌های هیدرولیز شده آب پنیر با درجه هیدرولیز کمتر و به تبع آن وزن مولکولی بیشتر (بیش از 3000 دالتون) ظرفیت کف کنندگی بهتری از پپتیدهای با وزن مولکولی پایین از خود نشان دادند (28).

ویژگی‌های ضداکسایشی

قدرت احیاءکنندگی: یکی از مهمترین ویژگی‌های آنتی‌اکسیدان‌ها در نمونه‌های غذایی، احیاء کمپلکس فری‌سیانید به شکل فروس است. نتایج حاصل از تحقیقات مختلف حاکی از دارا بودن فعالیت ضداکسایشی پپتیدهای تولید شده از هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های مختلف است. علت افزایش قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده را می‌توان به شکست زنجیره پپتیدی، افزایش رهایش آمینواسیدهای با فعالیت ضداکسایشی (مانند تریپتوفان، متیونین، لیزین، هیستیدین و تیروزین) و قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد نسبت داد (16). در تحقیق دیگری، اثر زمان، درجه هیدرولیز و نوع آنزیم مورد استفاده برای هضم پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی تیان بررسی و نتایج حاکی از افزایش قدرت احیاءکنندگی پس از هضم با پانکراتین بود. اگرچه نتایج برخی تحقیقات نشان دهنده اثر نوع آنزیم و ترکیب آمینواسیدها بر قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده بود، به طور مثال، Jamdar و همکاران (16) و Tang و همکاران (29) افزایش و سپس کاهش قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده بادام زمینی و گندم سیاه را در نتیجه افزایش درجه هیدرولیز و زمان فرآیند مشاهده کردند.

مهار رادیکال هیدروکسیل: توانایی پروتئین‌های هیدرولیز شده در جلوگیری از ایجاد تغییرات مخرب ناشی از اکسیداسیون لیپیدها بسته به ماهیت و ترکیب قسمت‌های مختلف پپتیدی، همچنین ویژگی‌های پروتئاز مورد استفاده متفاوت است (30). برای مثال، فعالیت ضداکسایشی پروتئین‌های هیدرولیز شده سویا به توالی لوسین-لوسین-پرولین-هیستیدین-هیستیدین این پپتیدها وابسته است (31). افزایش آمینواسیدها و گروه‌های فعال پس از هیدرولیز آنزیمی موجب افزایش خاصیت ضداکسایشی پروتئین‌ها می‌شوند. به طور مثال، اسیدهای آمینه‌ای مانند تیروزین و سیستئین در پروتئین‌های شیر و آب پنیر قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد را دارند (30). همچنین، مطالعات انجام گرفته روی پپتیدهای حاوی هیستیدین نشان دادند که این پپتیدها به عنوان شلاته‌کننده یون‌های فلزی، خاموش کننده اکسیژن فعال و مهارکننده رادیکال هیدروکسیل هستند. از طرف دیگر، آمینواسیدهای آروماتیک مانند تریپتوفان نیز با قابلیت پرتون دهی به رادیکال‌های آزاد دارای فعالیت ضداکسایشی در سیستم‌های غذایی هستند (31). نتایج حاصل از این تحقیق مشابه یافته‌های You و همکاران (24) و Chen و همکاران (32) است که اثر زمان و درجه هیدرولیز پروتئین‌های ماهی تیان و سفیده تخم‌مرغ را بر مهار رادیکال هیدروکسیل بررسی کردند.

مهار رادیکال آنیونی DPPH: ترکیب DPPH، فرم رادیکال آزاد پایدار با حداکثر جذب در طول موج 517 نانومتر در اتانول است (24). هنگامی‌که DPPH با ترکیبات پروتون دهنده مواجه می‌شود، رادیکال آزاد مهار شده و جذب کاهش می‌یابد. در تحقیقی، فعالیت ضداکسایشی کازئین هیدرولیز شده و پلاستئین حاصل از آن با پاپایین توسط Zhao و همکاران (25) بررسی شد. نتایج حاصل نشان دهنده افزایش 7 الی 9 برابری درصد مهار رادیکال آزاد DPPH و دو برابر شدن قابلیت مهار رادیکال کاتیونی ABTS بود. Suetsuna و همکاران (33) پپتیدهای حاصل از هضم کازئین که دارای فعالیت مهار رادیکال آزاد هستند را جداسازی و شناسایی نمودند. پپتید با توالی اسیدآمینه‌ای تیروزین-فنیل آلانین-تیروزین-پرولین-گلوتامیک اسید-لوسین فعالیت مهار رادیکال آنیونی سوپراکسید را از خود نشان دادند. توالی گلوتامیک اسید-لوسین در انتهای C دی پپتید برای بروز این فعالیت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-18]

اما علت کاهش در قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH در نتیجه افزایش زیاد درجه هیدرولیز را می‌توان به هیدرولیز کامل پپتیدها نسبت داد که منجر به رهایش کامل و دسترسی بالای آمینواسیدهای هیدروفیل می‌شود (21). افزایش قطبیت موجب دشوار شدن واکنش آمینواسیدهای فعال با رادیکال محلول در لیپید DPPH می‌شود (34).

مهار رادیکال کاتیونی ABTS: فعالیت ضداکسایشی و قابلیت مهار رادیکال کاتیونی و محلول در آب ABTS نیز مانند سایر شاخص‌ها به نوع آنزیم پروتئاز، درجه هیدرولیز و ترکیب اسیدآمینه‌ای پپتیدها وابسته است. برخلاف نتایج حاصل از آزمون DPPH که افزایش زیاد درجه هیدرولیز به علت افزایش رهایش آمینواسیدهای هیدروفیل با کاهش قابلیت واکنش با رادیکال‌های محلول در لیپید DPPH همراه بود، هیدرولیز کازئینی با پانکراتین به دلیل افزایش رهایش آمینواسیدهای هیدروفیل و آنتی‌اکسیدان، موجب افزایش و در نهایت عدم تغییر در مهار رادیکال ABTS شد. به‌طور مثال، You و همکاران (24) و Wang و Xiong (35) افزایش و سپس کاهش فعالیت مهار رادیکال ABTS را در نتیجه افزایش درجه هیدرولیز پروتئین‌های ماهی تیان و سیب زمینی گزارش کردند.

فعالیت مهار ترکیبات واکنش‌پذیر تیوباربیتوریک اسید: در صنایع غذایی برای پیشگیری از اکسیداسیون لیپیدها از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHA (Butylated hydroxyanisole) BHT (Butylated hydroxytoluene) و پروپیل گالات‌ها استفاده می‌شود. اما به علت خطرات بالقوه استفاده از این آنتی‌اکسیدان‌ها، میل به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مانند پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی افزایش یافته است (30). تحقیقات زیادی اثر و مکانیسم عملکرد پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های مختلف را بر پایداری اکسایشی امولسیون‌های غذایی بررسی کردند. به طورمثال، ارزیابی اثر مهار کنندگی فعالیت لیپوکسی‌ژناز توسط بخش‌های مختلف کازئینی انجام گرفت. نتایج نشان داد بتاکازئین هضم شده با تریپسین، یا کازئین هضم شده با تریپسین و سوبتیلین ویژگی‌های بازدارندگی خود را حفظ کردند.

در تحقیق صورت گرفته، مکانیسم ضداکسایشی کازئین و کازئین‌های هیدرولیز شده در سیستم مدل لیپوزومی فسفاتیدیل کولین بررسی شد (36). در غلظت‌های کم، هر دو این ترکیبات از خود خاصیت ضداکسایشی نشان دادند اما فسفوپپتیدهای کازئینی در غلظت‌های بالا ویژگی پرواکسیدانی نشان داد در حالی‌که کازئین هیدرولیز شده در غلظت‌های بالا هم به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل نمود. علت این نتیجه را می‌توان به غلظت بالاتر آمینواسیدهای آنتی‌اکسیدان مانند هیستیدین، لیزین، پرولین و تیروزین در کازئین هیدرولیز شده نسبت به کازئین اصلی نسبت داد. همچنین، کازئین‌ها نیز در برابر تولید ترکیبات فعال تیوباربیتوریک اسید حاصل از پراکسیداسیون موجب شده با آهن یا اسکوربات در لیپوزوم‌ها و سیستم‌های مدل لینولئیک اسید فعالیت ضداکسایشی از خود نشان دادند (37). مکانیسم عملکرد پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی را می‌توان علاوه بر قابلیت مهار انواع رادیکال‌های آزاد و شلاته‌کنندگی فلزات پروکسیدان، به تشکیل غشاء و فیلم در اطراف قطرات امولسیون و ممانعت از دسترسی عوامل اکسیداتیو به لیپیدها نسبت داد (10).

شلاته‌کنندگی یون آهن: آهن یکی از یون‌های فلزی است که با تسریع شکست هیدروپرواکسیدها در انواع محصولات و امولسیون‌های غذایی حاوی لیپید به عنوان یک عامل مؤثر پروکسیدان در تسریع واکنش‌های اکسیداسیون نقش ایفا می‌کند. قابلیت پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از منابع مختلف در شلاته کردن یون آهن به نوع آنزیم به کار رفته، ماهیت پروتئین اولیه و درجه هیدرولیز آن بستگی دارد (30). در بین منابع پروتئینی مختلف، کازئین‌ها دارای بخش‌های قطبی حاوی بقایای سرینی فسفوریله شده و توالی سرین-سرین-سرین-گلوتامیک اسید-گلوتامیک اسید می‌باشند که با ایجاد کمپلکس با کلسیم، آهن و روی به عنوان شلاته‌کننده‌های مؤثر عمل می‌کنند (10). تحقیقات مشابهی اثر افزایش درجه هیدرولیز پروتئین‌ها و در نتیجه افزایش زمان فرآیند را بر بیشتر شدن کارایی پپتیدهای هیدرولیز شده در شلاته‌کنندگی یون‌های فلزی گزارش کردند (21، 16).

شلاته‌کنندگی یون مس: یافته‌های این تحقیق حاکی از قابلیت بالای پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی کازئین به عنوان عامل شلاته‌کننده یون مس دارد. اگرچه فعالیت شلاته‌کنندگی فلزات بسته به نوع آنزیم، درجه هیدرولیز و ترکیب آمینواسیدی ماده اولیه متفاوت است. به طورمثال، پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی اوموسین علیرغم فعالیت شلاته‌کنندگی بالای یون آهن (تیمار بهینه بیش از 80%)، شلاته‌کنندگی کمتر از نمونه شاهد و مقادیر منفی از خود نشان دادند که حاکی از ناکارآمدی آن‌ها دارد. نتایج حاصل از این تحقیق، در تطابق با یافته‌های You و همکاران (21) است که افزایش درصد شلاته‌کنندگی یون مس را در نتیجه افزایش درجه هیدرولیز پروتئین‌های ماهی تیان هضم شده با

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-18]

پانکراتین گزارش کردند. مکانیسم اثر پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی در شلاته‌کنندگی یون مس را می‌توان به افزایش گروه‌های آزاد کربوکسیل، آمینواسیدهای مؤثر مانند هیستیدین با دارا بودن حلقه ایمیدازول و واکنش‌های یونی نسبت داد (34). اگرچه، برخی تحقیقات گزارش کردند که افزایش درجه هیدرولیز و شکست پروتئین‌ها موجب کاهش فعالیت ضداکسایشی پپتیدها می‌شوند. به عبارت دیگر، پپتیدهایی با 5 تا 19 آمینواسید از بازدارندگی و فعالیت ضداکسایشی بهتری در ممانعت از اتواکسیداسیون لینولئیک اسید و لیپیدها ایفا می‌کنند (14).

• References

1. Akoh CC. Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology. CRC press; 2017.
2. McClements DJ, Decker EA. Lipid oxidation in oilinwater emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. J Food Sci 2000; 65:1270–82.
3. Shahidi F, Rubin LJ, Diosady LL, Kassam N, Fong JCLS, Wood DF. Effect of sequestering agents on lipid oxidation in cooked meats. Food Chem 1986; 21:145–52.
4. LI WEI, BOWERS JA, CRAIG JA, PERNG SK. Sodium tripolyphosphate stability and effect in ground turkey meat. J Food Sci 1993; 58:501–4.
5. Sofos JN. Use of phosphates in low-sodium meat products. Food Technol 1986;
6. Tong LM, Sasaki S, McClements DJ, Decker EA. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. J Agric Food Chem 2000; 48:1473–8.
7. Mao X-Y, Cheng X, Wang X, Wu S-J. Free-radical-scavenging and anti-inflammatory effect of yak milk casein before and after enzymatic hydrolysis. Food Chem 2011; 126:484–90.
8. Kristinsson HG, Rasco BA. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. Crit Rev Food Sci Nutr 2000; 40:43–81.
9. Wang C, Wang B, Li B. Bioavailability of peptides from casein hydrolysate in vitro: Amino acid compositions of peptides affect the antioxidant efficacy and resistance to intestinal peptidases. Food Res Int 2016; 81:188–96.
10. Díaz M, Dunn CM, McClements DJ, Decker EA. Use of caseinophosphopeptides as natural antioxidants in oil-in-water emulsions. J Agric Food Chem 2003; 51:2365–70.
11. Rival SG, Boeriu CG, Wichers HJ. Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. J Agric Food Chem 2001; 49:295–302.
12. Mao XY, Ren FZ, Li YH, Nan QX. Growth-inhibiting activity of casein and its hydrolysate to tumor cells. Milchwissenschaft 2006; 61:127–30.
13. Scholz-Ahrens KE, Schrezenmeir J. Effects of bioactive substances in milk on mineral and trace element metabolism with special reference to casein phosphopeptides. Br J Nutr 2000; 84:147–53.
14. Chen L, Chen J, Ren J, Zhao M. Modifications of soy protein isolates using combined extrusion pre-treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improved emulsifying properties. Food Hydrocoll 2011; 25:887–97.
15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72:248–54.
16. Jamdar SN, Rajalakshmi V, Pednekar MD, Juan F, Yardi V, Sharma A. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. Food Chem 2010; 121:178–84.
17. Klompong V, Benjakul S, Kantachote D, Shahidi F. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (Selaroides leptolepis) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food Chem 2007; 102:1317–27.
18. Ahmadi F, Kadivar M, Shahedi M. Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Mozaff. in model and food systems. Food Chem 2007; 105:57–64.
19. Kim JW, Minamikawa T. Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (Brassica nigra). Biosci Biotechnol Biochem 1997; 61:118–23.
20. Wu H-C, Chen H-M, Shiau C-Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (Scomber austriasicus). Food Res Int 2003; 36:949–57.
21. You L, Zhao M, Regenstein JM, Ren J. Changes in the antioxidant activity of loach (Misgurnus anguillicaudatus) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. Food Chem 2010; 120:810–6.
22. Abeyrathne E, Lee HY, Jo C, Suh JW, Ahn DU. Enzymatic hydrolysis of ovomucin and the functional and structural characteristics of peptides in the hydrolysates. Food Chem 2016; 192:107–13.
23. Kong B, Xiong YL. Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. J Agric Food Chem 2006; 54:6059–68.
24. You L, Zhao M, Cui C, Zhao H, Yang B. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (Misgurnus anguillicaudatus) protein hydrolysates. Innov food Sci Emerg Technol 2009; 10:235–40.
25. Zhao XH, Wu D, Li TJ. Preparation and radical scavenging activity of papain-catalyzed casein plasteins. Dairy Sci Technol 2010; 90:521–35.
26. Aluko RE, Monu E. Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates. J Food Sci 2003; 68:1254–8.
27. Tsumura K, Saito T, Tsuge K, Ashida H, Kugimiya W, Inouye K. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. LWT-Food Sci Technol 2005; 38:255–61.
28. van der Ven C, Gruppen H, de Bont DBA, Voragen AGJ.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-18]

Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and-stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. J Agric Food Chem 2002; 50:2938–46.

29. Tang C-H, Wang X-S, Yang X-Q. Enzymatic hydrolysis of hemp (Cannabis sativa L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. Food Chem 2009; 114:1484–90.
30. Pihlanto A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. Int Dairy J 2006; 16:1306–14.
31. Chen H-M, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K, Nokihara K. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. J Agric Food Chem 1998; 46:49–53.
32. Chen C, Chi Y-J, Zhao M-Y, Xu W. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate. Food Sci Biotechnol 2012; 21:27–34.
33. Suetsuna K, Ukeda H, Ochi H. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. J Nutr Biochem 2000; 11:128–31.
34. Zhu L, Chen J, Tang X, Xiong YL. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. J Agric Food Chem 2008; 56:2714–21.
35. Wang LL, Xiong YL. Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability. J Agric Food Chem 2005; 53:9186–92.
36. Díaz M, Decker EA. Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. J Agric Food Chem 2004; 52:8208–13.
37. Wong PYY, Kitts DD. Chemistry of buttermilk solid antioxidant activity. J Dairy Sci 2003; 86:1541–7.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-18]

Functional and Antioxidant Properties of Casein Hydrolysate Prepared with Pancreatin

Sarabandi Kh[1], Sadeghi Mahoonak AR[2], Hamishehkar H[3], Mohammad Ghorbani M[2], Jafari M[2]*

1- Ph.D. Student, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

2- Associate Professor, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

*3-*Corresponding author: Associate Professor, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. Email: Sadeghiaz@yahoo.com*

Received 9 Sept, 2017 **Accepted 25 Dec, 2017**

Background and Objectives: Enzymatic hydrolysis is one way to improve functional properties, eliminate anti-nutritional compounds, and produce bioactive peptides with antimicrobial, antihypertensive, antioxidant and antiemetic properties, reducing blood cholesterol, mineral absorption improvement and immunotherapy effects. The purpose of this study was to evaluate the effect of enzymatic hydrolysis process on the functional and antioxidant properties of hydrolyzed casein prepared using pancreatin.

Materials and Methods: In this study, the casein hydrolysis process by pancreatin was performed at different times (30, 60, 90, 120, 150 and 180 minutes). The degree of hydrolysis, functional properties (solubility, emulsifying and foaming properties at different levels of pH), antioxidant properties such as DPPH, ABTS, hydroxyl radical scavenging, reducing power, antioxidant activity in the emulsion, and Fe and Cu chelating activities were evaluated.

Results: The enzymatic hydrolysis of casein significantly improved the functional properties of hydrolysate at different pH levels. The antioxidant properties of casein were influenced by the time of hydrolysis. The best value for each of the antioxidant indices after enzyme hydrolysis was 46.04% for DPPH free radical scavenging, 84.44% for ABTS radical scavenging, 2.28 mM for Trolox equivalent antioxidant capacity, 72.91% for hydroxyl radical scavenging, 61.97% for reducing power, 0.251 Milligrams MDA/L for Thiobarbituric acid reactive substances, 70.31% for iron ion chelating, and 16.81% for chelating of copper ion.

Conclusion: The processing time with effect on the degree of hydrolysis affects all properties of the final product. In general, the enzymatic hydrolysis of casein at 180 minutes showed the best functional and antioxidant properties.

Keywords: Pancreatin, Casein, Antioxidant activity, Functional properties, Enzymatic hydrolysis

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-18]