اثر شرایط هیدرولیز آنزیمی کازئین با پانکراتین بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و عملکردی کازئین هیدرولیز شده

خشایار سرابندی[۱]، علیرضا صادقی‌ماهونک[۲*]، حامد همیشه‌کار[۳]، محمد قربانی[۲]، سیدمهدی جعفری[۲]

۱- دانش‌آموخته دکتری علوم و صنایع غذایی، شیمی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳- دانشیار مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۵/۰۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۷/۱۱)

چکیده

در این پژوهش، اثر هیدرولیز آنزیمی کازئین بر درجه هیدرولیز، ویژگی‌های عملکردی (مانند انحلال‌پذیری، امولسیون‌کنندگی و کف‌کنندگی)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (مانند مهارراديکال آزاد DPPH، مهار رادیکال ABTS، قدرت احیاءکنندگی، مهار رادیکال هیدروکسیل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی در امولسیون و شلاته‌کنندگی یون‌های آهن و مس) ارزیابی شد. فرآیند هیدرولیز با استفاده از آنزیم پانکراتین و نسبت آنزیم به سوبسترای (وزنی/وزنی ۳-۰/۵٪)، به‌مدت ۱۸۰ دقیقه انجام شد. نتایج نشان دادند که، هیدرولیز آنزیمی کازئین موجب بهبود ویژگی انحلال‌پذیری، تغییر در فعالیت امولسیون-کنندگی و کف‌کنندگی (به‌ویژه در pH اسیدی) شد. به‌طورکلی، کازئین هیدرولیز شده در نسبت آنزیم به سوبسترا ۲/۵ درصد، بهترین ویژگی‌ها را از خود نشان داد. هیدرولیز کازئین با ۲/۵درصد پانکراتین به‌ترتیب منجر به افزایش مهارراديکال DPPH (از ۱۱/۱۳ به ٤۲/۱۷ درصد)، ABTS (۲۲/۰۱ به ۸٤/۳۱ درصد)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترولوکس (۰/۵۱ به ۲/۲۸ میلی‌مولار)، قدرت احیاء کنندگی (۰/٤۱ به ۰/٦۲)، مهار رادیکال هیدروکسیل (۱۳/۳۱ به ۷۳/۰۱ درصد) و ترکیبات واکنش‌پذیر اسید تیوباربیتوریک یا TBARS (۰/٤۱ به ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر امولسیون) شد. همچنین، به‌ترتیب فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن (۱۹/۷ به ٦۸/۹درصد) و فعالیت شلاته‌کنندگی یون مس (۲/٤۹ به ۱۷/۳۸درصد) قبل و بعد از هیدرولیز تغییر کرد. نتایج نشان دادند که هیدرولیز آنزیمی کازئین با پانکراتین، روشی موثر برای تولید محصولی با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و عملکردی مناسب و قابل استفاده در فرمولاسیون امولسیون‌های غذایی مختلف است.

کلید واژگان: درجه هیدرولیز، هیدرولیز آنزیمی، کازئین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ویژگی‌های عملکردی

* مسئول مکاتبات: Sadeghiaz@gau.ac.ir

۱- مقدمه

از گذشته‌های دور، شیر و محصولات آن به‌عنوان جزء مهمی از رژیم غذایی بشر مورد توجه و استفاده قرار گرفته است. پروتئین‌های شیر به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان منبع ترکیبات مغذی، عملگرا و غنی از پپتیدهای زیست فعال شناخته و استفاده می‌شوند و همچنان پژوهش‌های بسیاری بر نقش تغذیه‌ای و قابلیت کاربرد آن در محصولات مختلف در دست انجام است [۱]. در سالیان اخیر، تحقیقات بسیاری بر فعالیت بیولوژیکی پروتئین‌های شیر نظیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کاهندگی فشارخون و فعالیت‌های ضدمیکروبی آن متمرکز شده است. همچنین، مطالعات متعدد انجام گرفته نشان‌دهنده اثر کیفی قابل توجه شرایط هضم پروتئین‌های اولیه شیر بر بازده فیزیولوژیکی پپتیدهای زیست فعال است [۲]. علاوه بر کیفیت و ارزش تغذیه‌ای، ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها برای استفاده در فرمولاسیون‌های مختلف غذایی از اهمیت بسیاری برخوردار است. از آنجائیکه اکثر پروتئین‌های طبیعی فاقد ویژگی‌های عملکردی مناسب و مطلوب در صنایع غذایی هستند، اصلاح آن‌ها با هدف بهبود ویژگی‌هایی مانند حلالیت حائز اهمیت است [۳].

هیدرولیز آنزیمی یکی از راه‌های بهبود ویژگی‌های عملکردی بدون ایجاد اثر منفی بر ارزش تغذیه‌ای پروتئین‌هاست [٤]. از هیدرولیز آنزیمی می‌توان به‌عنوان روشی موثر در حذف ترکیبات ضدتغذیه‌ای پروتئین‌ها استفاده کرد [۳]. همچنین نتایج تحقیقات آزمایشگاهی و بالینی اخیر حاکی از اثر زیست فعال پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی بر سلامت انسان است [۵ و ٦]. به‌طور طبیعی، این پپتیدهای زیست فعال درون توالی پروتئین اولیه غیرفعال هستند و می‌توان با انجام هیدرولیز آنزیمی آن‌ها را آزاد کرد [٦]. از جمله دیگر اثرات سلامتی-بخش این پپتیدها می‌توان به ویژگی‌های ضدمیکروبی، کاهش فشار خون، ضدتروما، کاهش کلسترول خون، اثرات آنتی-اکسیدانی، بهبود جذب املاح معدنی و اثرات ایمونوتراپی اشاره کرد [۵]. همچنین در خصوص ارزیابی فعالیت آنتی-اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده از منابع گیاهی و حیوانی انجام شده است. از جمله این مطالعات می‌توان به ارزیابی ویژگی‌های پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های سویا، کانولا، زئین ذرت، آلبومین سفیده و پروتئین زرده تخم‌مرغ، پروتئین‌های آب پنیر، ماهی تیلاپیا و کاپلین اشاره کرد [۱۳-۷]. همچنین در پژوهشی، فعالیت آنتی-اکسیدانی کازئین هیدرولیز شده و پلاستئین حاصل از آن با آنزیم پاپائین توسط ژائو و همکاران [١٤] بررسی شد. نتایج حاصل نشان‌دهنده افزایش ۷ الی ۹ برابری درصد مهار رادیکال آزاد DPPH و دو برابر شدن قابلیت مهار رادیکال کاتیونی ABTSبود.

نتایج پژوهش‌های مختلف نشان‌دهنده این است که ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و عملکردی پروتئین‌های هیدرولیز شده بسته به نوع و ترکیب پروتئین اولیه، آنزیم مورد استفاده، درجه هیدرولیز و شرایط فرآیند متفاوت است. امروزه روش‌های مختلفی برای ارزیابی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده وجود دارند. از برخی از این روش‌ها می‌توان به اثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سیستم‌های امولسیونی، لیپوزمی، سیستم‌های مدل محصولات گوشتی و غذاهای مختلف با اندازه‌گیری مقدار پرواکسید، ترکیبات واکنش‌پذیر اسید تیوباربیتوریک، مهار رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل، DPPH، ABTSو شلاته‌کنندگی فلزات نام برد. نتایج حاصل از تحقیقات مختلف نشان‌دهنده اثر واکنش‌های متعدد بر فعالیت-های آنتی‌اکسیدانی و ممانعت از اکسیداسیون لیپیدها از جمله دادن اتم هیدروژن، پایدارسازی یا محدود نمودن رادیکال‌های آزاد و یا شلاته کردن یون‌های فلزی پروکسیدان بود [۱۸-۱۵]. با در نظر گرفتن اهمیت پروتئین‌های هیدرولیز شده، هدف از این پژوهش بررسی اثر هیدرولیز آنزیمی کازئین با پانکراتین در نسبت‌های مختلف آنزیم به سوبسترا بر ویژگی‌های عملکردی مانند حلالیت در pHهای مختلف، قابلیت امولسیون و کف کنندگی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و قابلیت شلاته‌کنندگی یون‌های آهن و مس در محصول نهایی هیدرولیز شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد مورد استفاده

کلیه مواد شامل، کازئین، پانکراتین، اسید تری‌کلرواستیک (TCA)، کوماسی بلو (G250)، DPPH، ABTS، پتاسیم پرسولفات، ترولوکس، پتاسیم فری‌سیانید، فریک کلراید، آلفا-

داکسی ریبوز، سولفات آهن، EDTA، پراکسید هیدروژن، دی‌کلرید آهن، فروزین، سولفات مس، پیریدین، پیروکاتکول ویولت، توین ۲۰، اسید اسکوربیک ، اسید تیوباربیتوریک (TBA)، سدیم دودسیل سولفات (SDS) (از شرکت سیگما خریداری شدند). روغن هسته انگور (Olitalia، ایتالیا)، اتانول، سود، اسیدکلریدریک، پتاسیم کلراید، پتاسیم دی هیدروژن فسفات و اسید فسفریک (از شرکت مرک، آلمان) تهیه شدند.

۲-۲-تهیه کازئین هیدرولیز شده

برای فرآیند هیدرولیز آنزیمی، کازئین را در غلظت (وزنی-حجمی) ۵٪ در بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH=۷/٤) حل نموده و امکان هیدراته شدن کامل آن در حین هم‌زدن مداوم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط مهیا شد. سپس محلول اولیه آنزیم پانکراتین در بافر فوق و در نسبت آنزیم به پروتئین سوبسترا (وزنی-وزنی) ۳-۰/۵ درصد به محلول حاوی کازئین افزودن شد. دمای واکنش برای پانکراتین ٤٠ ^{o}C و زمان واکنش در شرایط هم‌زدن مداوم (۲۰۰rpm) به‌مدت ۱۸۰ دقیقه برای همه نسبت‌های آنزیم به سوبسترا ثابت در نظر گرفته شد. پس از اتمام فرآیند هیدرولیز، برای غیرفعال کردن واکنش و فعالیت آنزیم، محیط واکنش در حمام آب ۹۰ ^{o}C به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. پس از آن، محلول تا دمای محیط خنک گردید. محلول در دور ۵۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی جدا، با خشک‌کن انجمادی (Christ، آلمان) در دمای ۲۰ ^{o}C- و فشار ۰/۱ میلی‌بار، لیوفیلیزه و تا زمان استفاده در دمای ۲۰ ^{o}C- نگهداری گردید [۱۹].

۲-۳- تعیین درجه هیدرولیز

سوسپانسیون کازئین هیدرولیز شده و اسید تری کلرواستیک (۰/٤٤ مولار) در نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ ^{o}C انکوبه شد. سپس، مخلوط در ۱۰۰۰۰rpm و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت حاوی اسید تری کلرواستیک ۰/۲۲ مولار با روش بردفورد [۲۰] تعیین گردید. در نهایت، درجه هیدرولیز با استفاده از فرمول شماره ۱، در زیر تعیین شد:

$$DH\ (\%) = \text{Protein (TCA+Supernatant)} / \text{Protein (Casein hydrolysate suspension)} \times 100 \quad (1)$$

۲-٤- ویژگی‌های عملکردی

۲-٤-۱- حلالیت

برای تعیین حلالیت پروتئین‌های هیدرولیز شده از روش جامدار و همکاران [۱۷] با مقداری اصلاحات استفاده شد. بدین ترتیب که، ۲۰۰ میلی‌گرم پروتئین هیدرولیز شده در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر پراکنده و pH مخلوط با استفاده از سود یا اسیدکلریدریک ۱ نرمال روی ۱ تا ۱۲ تنظیم شد. محلول در g ۱۰۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مقدار پروتئین موجود در محلول رویی با استفاده از روش بردفورد تعیین و درصد حلالیت بر اساس مقدار پروتئین محلول بر پروتئین کل نمونه تعیین گردید.

۲-٤-۲- ویژگی‌های امولسیفیه‌کنندگی

ویژگی‌های امولسیفیه کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده بر-طبق روش کلامپانگ و همکاران [۲۱] با اندکی اصلاحات تعیین گردید. ابتدا ۵ میلی‌لیتر روغن هسته انگور و ۱۵ میلی-لیتر محلول ۱٪ پروتئین با هم مخلوط و pH با استفاده از سود یا اسید کلریدریک ۱ نرمال به ۳، ۵، ٦، ۷ و ۹ تنظیم شد. مخلوط با استفاده از هموژنایزر در سرعت ۲۰۰۰۰rpm به-مدت ۱ دقیقه هموژن گردید. سپس، ۵۰ میکرولیتر نمونه امولسیون در زمان ۰ و ۱۰ دقیقه پس از هموژنیزاسیون از انتهای ظرف برداشته و با ۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد سدیم دودسیل سولفات (SDS) مخلوط شد. جذب محلول رقیق شده در ۵۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار جذب در زمان اولیه (A_0) و ۱۰ دقیقه پس از تشکیل امولسیون (A_{10}) برای محاسبه فعالیت امولسیون کنندگی (EAI) و شاخص پایداری امولسیون (ESI) با استفاده از معادلات زیر به‌کار می‌روند:

$$EAI\ (m^2/g) = (2 \times 2.303 \times A_0)/ 0.25 \times \text{protein weight (g)} \quad (2)$$

$$ESI\ (\%) = (A_0 - A_{10}/A_0) \times 100 \quad (3)$$

۲-٤-۳- ویژگی‌های کف کنندگی

ظرفیت و پایداری کف‌کنندگی پروتئین هیدرولیز شده برطبق روش کلامپانگ و همکاران [۲۱] با اندکی اصلاحات تعیین گردید. حجم ۱۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۵ درصد نمونه با استفاده از سود یا اسیدکلریدریک ۱ نرمال، pH آن به ۳، ۵، ٦، ۷ و ۹ تنظیم و هموژنیزاسیون در سرعت ۱٦۰۰۰rpm به‌مدت ۲ دقیقه با هدف ورود هوا به درون محلول در دمای محیط انجام گرفت. نمونه زده شده به سرعت به استوانه مدرج ۲۵ میلی‌لیتر منتقل و حجم کل پس از ۱ دقیقه خوانده شد. ظرفیت کف کنندگی (FC) بر طبق معادله زیر محاسبه گردید:

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

(٤)

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

نمونه‌های زده شده در دمای ۲۵ ^{o}C برای ۱۰ دقیقه نگهداری، سپس حجم کف خوانده شد. پایداری کف (FS) با معادله زیر محاسبه گردید:

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

(۵)

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

۲-۵- ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی

۲-۵-۱- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از روش وو و همکاران [۲۲] با کمی اصلاحات تعیین گردید. ابتدا پودرهای کازئین هیدرولیز شده در آب مقطر (با غلظت ٤۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) حل شدند. سپس، ۱/۵ میلی‌لیتر از هر نمونه با ۱/۵ ملی‌لیتر از محلول اتانولی DPPH (۰/۱۵ میلی‌مولار) مخلوط و به‌مدت ۲۰ ثانیه عمل ورتکس انجام شد. سپس، مخلوط حاصل در ۲۵۰۰rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و به‌مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. جذب محلول رویی در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده می‌شود. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$I\ (\%) = [A_{blank} - A_{sample} / A_{blank}] \times 100$$

(٦)

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

۲-۵-۲- فعالیت مهار رادیکال ABTS

فعالیت مهار رادیکال ABTS پودرهای کازئین هیدرولیز شده با استفاده از روش تشریح شده توسط یو و همکاران [۲۳] با کمی اصلاحات تعیین گردید. محلول رادیکال $ABTS^{+}$ با ترکیب نسبت حجمی یکسانی از ABTS در غلظت ۷ میلی-مولار و ۲/٤۵ میلی‌مولار پتاسیم پرسولفات تهیه گردید. مخلوط در تاریکی و در دمای محیط به‌مدت ۱٦-۱۲ ساعت قبل از مصرف قرار داده شد. در این مدت، اکسیداسیون و تولید رادیکال $ABTS^{+}$ به‌وسیله پتاسیم پرسولفات انجام می‌گیرد. قبل از آزمون، محلول $ABTS^{+}$ با استفاده از (۰/۲, pH 7.4 مولار) PBS تا جذب ۰/۰۲ ± ۰/۷ در ۷۳٤ نانومتر رقیق شد. سپس ٤۰ میکرولیتر از هر نمونه (با غلظت ٤ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به ٤ میلی‌لیتر محلول رقیق شده $ABTS^{+}$ افزوده شد. مخلوط برای ۳۰ ثانیه به‌شدت هم‌زده شد و به‌مدت ٦ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. جذب محلول نهایی در ۷۳٤ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با واکنش ٤۰ میکرولیتر ترولوکس (میکرومولار ۱۰۰۰، ۷۵۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰، ۵۰) با ٤ میلی‌لیتر 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 آنتی‌اکسیدانی معادل ترولوکس (میلی‌مولار ,TEAC) بیان گردید.

$$AA\ (\%) = [A_{blank} - A_{sample} / A_{blank}] \times 100$$

(۷)

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

۲-۵-۳- فعالیت آنتی‌اکسیدانی در امولسیون

امولسیون روغن در آب با هموژن کردن ۱ گرم روغن ذرت و ۱۰۰ میکرولیتر توین ۲۰ با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با استفاده از هموژنایزر با سرعت ۲۲۰۰۰rpm برای ۲ دقیقه در حمام یخ تهیه گردید. نمونه‌ها برای ارزیابی اکسیداسیون لیپیدی با مخلوط نمودن ۸ میلی‌لیتر امولسیون روغن، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۲ درصد اسید اسکوربیک ، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۲۰۰ppm سولفات آهن ($FeSO_4$) و ۱ میلی‌لیتر محلول پروتئین هیدرولیز شده (در غلظت ٤٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تهیه شدند. سپس، نمونه‌ها در ۳۷°C برای ١٦ ساعت انکوبه گردیدند. پس از انکوباسیون، ۱ میلی‌لیتر از هر نمونه به ۲ میلی‌لیتر محلول اسید تیوباربیتوریک / اسید تری کلرواستیک (۲۰mM TBA/ ۱۵٪TCA) و ۵۰ میکرولیتر محلول ۱۰٪BHA در اتانول ۹۰ درصد افزوده و سپس هم‌زده شد. مخلوط حاصل برای توسعه رنگ در حمام آب ۹۰ °C برای ۱۵ دقیقه انکوبه گردید. نمونه‌ها در حمام آب یخ برای ۱۰ دقیقه خنک و در ۳۰۰۰rpm برای ۱۵ دقیقه و در دمای ۵ °C سانتریفوژ شدند. جذب محلول در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تهیه نمونه شاهد از مخلوط ۱ میلی‌لیتر آب مقطر با ۲ میلی‌لیتر محلول TBA/TCA استفاده شد. مقدار TBARS (ترکیبات حاصل از واکنش اسید تیوباربیتوریک) به شکل میلی‌گرم مالون آلدهید (MDA) بر لیتر امولسیون بیان می‌شود [۱۸].

۲-۵-٤- تعیین قدرت احیاءکنندگی

برای تعیین قدرت احیاءکنندگی نمونه‌های هیدرولیز شده، ۰/۵ml نمونه حل شده در آب مقطر (در غلظت ٤٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با ۰/۵ میلی‌لیتر بافرفسفات ۰/۲ مولار (pH 6.6) و ۰/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری‌سیانید ۱ درصد وزنی–حجمی مخلوط و در دمای ۵۰ °C برای ۲۰ دقیقه انکوبه شد. سپس، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول اسید تری‌کلرو استیک ۱۰ درصد به مخلوط اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰۰rpm سانتریفوژ شد. در نهایت، ۱ میلی‌لیتر سوپرناتانت با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی‌لیتر فریک کلراید ۰/۱ درصد وزنی–حجمی مخلوط گردید. جذب نمونه در ۷۰۰ نانومتر پس از ۱۰ دقیقه نگهداری مخلوط در دمای محیط، قرائت شد. حجم یکسانی آب مقطر به جای نمونه برای تهیه نمونه کنترل استفاده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش نشان دهنده افزایش قدرت احیاءکنندگی است [۲٤].

۲-۵-۵- فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل

فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل با استفاده از اکسیداسیون ۲-داکسی ریبوز برطبق روش جامدار و همکاران[۱۷] تعیین شد. برای این آزمون، ۰/۲ میلی‌لیتر از مخلوط ۱۰ میلی‌مولار ($FeSO_4$-EDTA)، ۰/۵ میلی‌لیتر (۱۰ میلی‌مولار) آلفاداکسی ریبوز، ۰/۲ میلی‌لیتر نمونه هیدرولیز شده، ۰/۹ میلی‌لیتر سدیم فسفات بافر ۰/۲ مولار (pH 7.4) و ۰/۲ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن (۱۰ میلی‌مولار) با هم مخلوط شدند. مخلوط در °C ۳۷ برای ۱ ساعت انکوبه شد. سپس، ۱ میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک (TCA) ۲/۸ درصد و ۱ میلی‌لیتر اسید تیوباربیتوریک ۱ درصد برای توقف واکنش به مخلوط افزوده شد. مخلوط برای ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار، سپس در یخ سرد شده، سپس جذب آن در ۵۳۲ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. به جای نمونه برای تهیه کنترل، حجم یکسانی آب مقطر استفاده گردید. نتایج به‌شکل درصد مهار رادیکال هیدروکسیل با استفاده از معادله زیر اندازه‌گیری شدند:

$$\text{Inhibition (\%)} = (1- A_s/A_b) \times 100 \quad (۸)$$

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

۲-۵-٦- فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن

فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن بر طبق روش دکر و ولچ [۲۵] اندازه‌گیری شد. ابتدا، ۱ میلی‌لیتر نمونه حل شده در آب مقطر (در غلظت ٤٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با ۰/۰۵ میلی‌لیتر محلول دی کلرید آهن (۲ میلی‌مولار) و ۱/۸۵ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر مخلوط شد. سپس، ۰/۱ میلی‌لیتر محلول فروزین (۵ میلی‌مولار) افزوده و مخلوط به‌شدت هم‌زده شد. جذب پس از ۱۰ دقیقه نگهداری مخلوط در دمای محیط در ٥٦٢ نانومتر

خوانده شد. از آب دوبار تقطیر به‌عنوان نمونه کنترل استفاده شد. فعالیت شلاته‌کنندگی نمونه‌ها با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید:

$$\text{Chelating effect (\%)} = [(A_{control} - A_{sample}/A_{control})] \times 100 \quad (۹)$$

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

۲-۵-۷- فعالیت شلاته کنندگی یون مس

فعالیت شلاته‌کنندگی یون مس پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از روش کانگ و ژیانگ [۲۶] اندازه‌گیری شد. در ابتدا، ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۲ میلی‌مولار سولفات مس با ۱ میلی‌لیتر کازئین هیدرولیز شده در فالکون ۱۵ میلی‌لیتر مخلوط و برای ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس، ۱ میلی‌لیتر محلول اسید تری کلرواستیک ۱۱/۳ درصد افزوده و نمونه‌ها در ۲۵۰۰rpm برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از آن، ۲ میلی‌لیتر از سوپرناتانت به ۱ میلی‌لیتر محلول ۱۰٪ پیریدین و ۲۰ میکرولیتر پیروکاتکول ویولت افزوده و مخلوط ورتکس و برای ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. جذب نمونه‌ها در ۶۳۲ نانومتر خوانده و فعالیت شلاته‌کنندگی یون مس با استفاده از معادله زیر تعیین گردید:

$$\text{Cu chelating activity (\%)} = [1 - (A_{sample} / A_{blank})] \times 10 \quad (۱۰)$$

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

۲-۶- تجزیه و تحلیل آماری

در پژوهش حاضر، اثر نسبت‌های مختلف آنزیم پانکراتین به سوبسترا (۳-۰/۵ درصد) بر ویژگی‌های عملکردی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کازئین‌های هیدرولیز شده با کاربرد آنالیز واریانس و استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ مورد ارزیابی قرار گرفتند تا فاکتورهای مؤثر از لحاظ آماری شناسایی شوند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن جهت بررسی معنی‌دار بودن اثر متغیرها در ($P< 0.05$) انجام گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تعیین درجه هیدرولیز

مقدار هیدرولیز پروتئین‌ها بر حسب درجه هیدرولیز اندازه‌گیری می‌شود. درجه هیدرولیز شاخص بسیار مهمی در تعیین ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌های هیدرولیز شده است. ویژگی‌هایی مانند اندازه و ترکیب اسید آمینه‌های پپتیدها، فعالیت بیولوژیکی و همچنین طعم پروتئین‌های هیدرولیز شده تحت تأثیر درجه هیدرولیز قرار می‌گیرند [۱۷و۴].

همان‌گونه که در شکل ۱ مشخص است، درجه هیدرولیز کازئین به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر نسبت آنزیم به سوبسترا قرار گرفت. بدین شکل که با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا، درجه هیدرولیز کازئین افزایش یافت ($P< 0.05$).در شرایط ثابت زمان فرآیند (۱۸۰ دقیقه) در این مطالعه و استفاده از آنزیم پانکراتین، کمترین و بیشترین میزان درجه هیدرولیز به‌ترتیب مربوط به نسبت‌های آنزیم به سوبسترای ۰/۵ و ۳ با درجه هیدرولیز ٤ و ۲۱/٤ درصد بود.

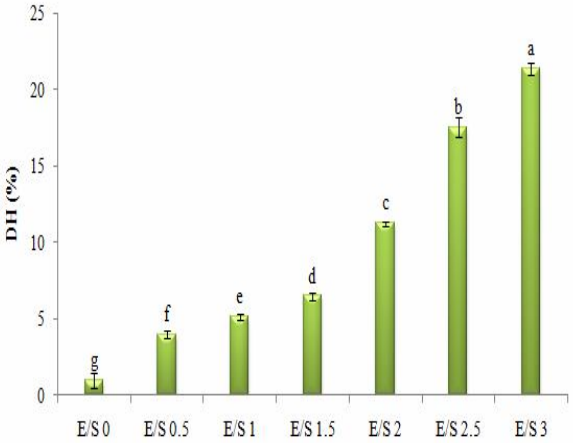

Fig 1 Progress of hydrolysis of casein protein treated with pancreatin. The reaction was carried at pH 7.4 and 40 ºC with different enzyme: substrate ratio of 0.5-3% (w/w). The values represents mean of three independent experiment ± S.D.

این یافته را می‌توان به افزایش عملکرد آنزیم در دسترسی و فعالیت بیشتر بر سوبسترا در زمان ثابت و هیدرولیز پروتئین‌های اولیه، شکست بیشتر زنجیره‌ها، افزایش آمینواسیدها و

تولید پپتیدهای کوچکتر نسبت داد [۲۳]. این یافته‌ها در تطابق با تحقیقات جرارد و همکاران [۲۷] و شهیدی و همکاران [۲۸] است که اثر نسبت‌های مختلف آنزیم پروتئاز تجاری به ترتیب بر درجه هیدرولیز ضایعات ماهی تن و ماهی کاپلین را بررسی کردند.

۳-۲- ویژگی‌های عملکردی

۳-۲-۱- انحلال‌پذیری

شکل ۲ نشان‌دهنده درصد انحلال‌پذیری پروتئین‌های کازئین و کازئین هیدرولیز شده در نسبت‌های مختلف آنزیم به سوبسترا و تحت تأثیر pHهای مختلف است. همان‌گونه که شکل نشان می‌دهد، درصد حلالیت کازئین در pH محدوده ۵-٤ حداقل است که pH ایزوالکتریک کازئین (٤/٦) در آن قرار دارد. اما با افزایش pH محیط به ٦، به‌طور قابل توجهی بر میزان حلالیت کازئین افزوده شد ($P< 0.05$).

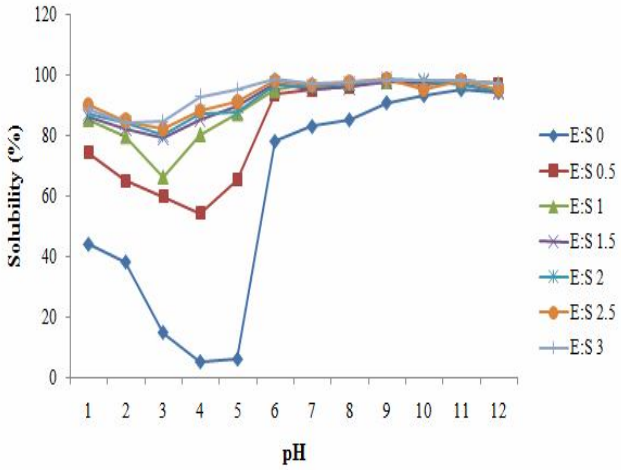

Fig 2 Solubility profiles of casein and casein hydrolysate at different pH. The reaction was carried at pH 7.4 and 40 ºC with different enzyme: substrate ratio of 0.5-3% (w/w). The values represents mean of three independent experiment ± S.D.

این یافته موافق با تحقیقات یو و همکاران [۱۵]، جامدار و همکاران [۱۷] ووو و همکاران [۲۲] است که نتایج مشابهی را گزارش کردند. اما هیدرولیز آنزیمی کازئین در نسبت ۰/۵ درصد و بالاتر، به‌طور قابل توجهی مقدار انحلال‌پذیری نمونه‌های هیدرولیز شده را در محدوده pH=٤-۵ افزایش داد. این یافته نشان دهنده کاهش حساسیت محصولات حاصل از هیدرولیز کازئین به شرایط اسیدی است. همچنین، مقدار حلالیت محصولات با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا و به تبع آن افزایش درجه هیدرولیز، افزایش یافت. به طور مثال، حلالیت کازئین هیدرولیز شده در نسبت آنزیم به سوبسترا ۰/۵ و ۱ در pH=٤ به ترتیب ٥٤/٣٩ و ٨٠/٣٦ درصد بود. نتایج این قسمت از پژوهش مشابه یافته‌های جامدار و همکاران [۱۷]، چن و همکاران [۱۹] و تومارا و همکاران [۲۹] است که به‌ترتیب افزایش قابل ملاحظه حلالیت را در پروتئین‌های هیدرولیز شده بادام زمینی، ایزوله پروتئین سویا و سویا (با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا و درجه هیدرولیز) به ویژه در pH اسیدی مشاهده کردند.

۳-۲-۲- ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی

شکل ۳ (A و B)، اثر pH را بر فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون‌های حاصل از کازئین و کازئین‌های هیدرولیز شده را در نسبت‌های مختلف آنزیم به سوبسترا نشان می‌دهد. امولسیون کنندگی کازئین در pH=۵ که نزدیک به مقدار ایزوالکتریک آن (٤/٦) است در کمترین مقدار می‌باشد. همچنین، مقدار این شاخص برای کازئین در pH=۹ در حداکثر مقدار است. با توجه به نتایج حاصل از آزمون انحلال‌پذیری، مشاهده می‌شود ارتباط مستقیمی بین مقدار امولسیون کنندگی کازئین با حلالیت آن وجود دارد. به عبارت دیگر، کاهش حلالیت پروتئین موجب کاهش فعالیت امولسیون‌کنندگی آن می‌شود [۱۷].

مقدار این شاخص برای کازئین و محصولات هیدرولیز شده در pH=۳ کمتر از pH=٦ است که این نیز به‌دلیل حلالیت کمتر پروتئین و پپتیدها در این بازه از pH است. اما با استفاده از نسبت آنزیم به سوبسترا ۰/۵ درصد و به‌دلیل کاهش حساسیت حلالیت به بازه pH می‌توان افزایش امولسیون‌کنندگی را نسبت به کازئین در pH=۵ مشاهده کرد. با افزایش نسبت آنزیم و سوبسترا و درجه هیدرولیز، علیرغم افزایش حلالیت نمونه‌ها، از فعالیت امولسیون‌کنندگی آن‌ها کاسته شد. علت این یافته را می‌توان به کاهش طول زنجیره پپتیدها در اثر هیدرولیز و افت قابلیت آن‌ها در کاهش تنش سطحی بیان کرد [٤]. با افزایش pH نیز فعالیت امولسیون کنندگی با توجه به افزایش حلالیت آن‌ها افزایش یافت. همچنین، کارایی و فعالیت امولسیون کنندگی در pHهای مختلف تحت تأثیر بار سطحی پروتئین و پپتیدها قرار می‌گیرد [۱۷]. مشابه همین نتایج در خصوص قابلیت پایدار کنندگی امولسیون‌های تولیدی تحت تأثیر محدوده pHهای مختلف در محصولات هیدرولیز شده با نسبت‌های متفاوت آنزیم به سوبسترا مشاهده شد.

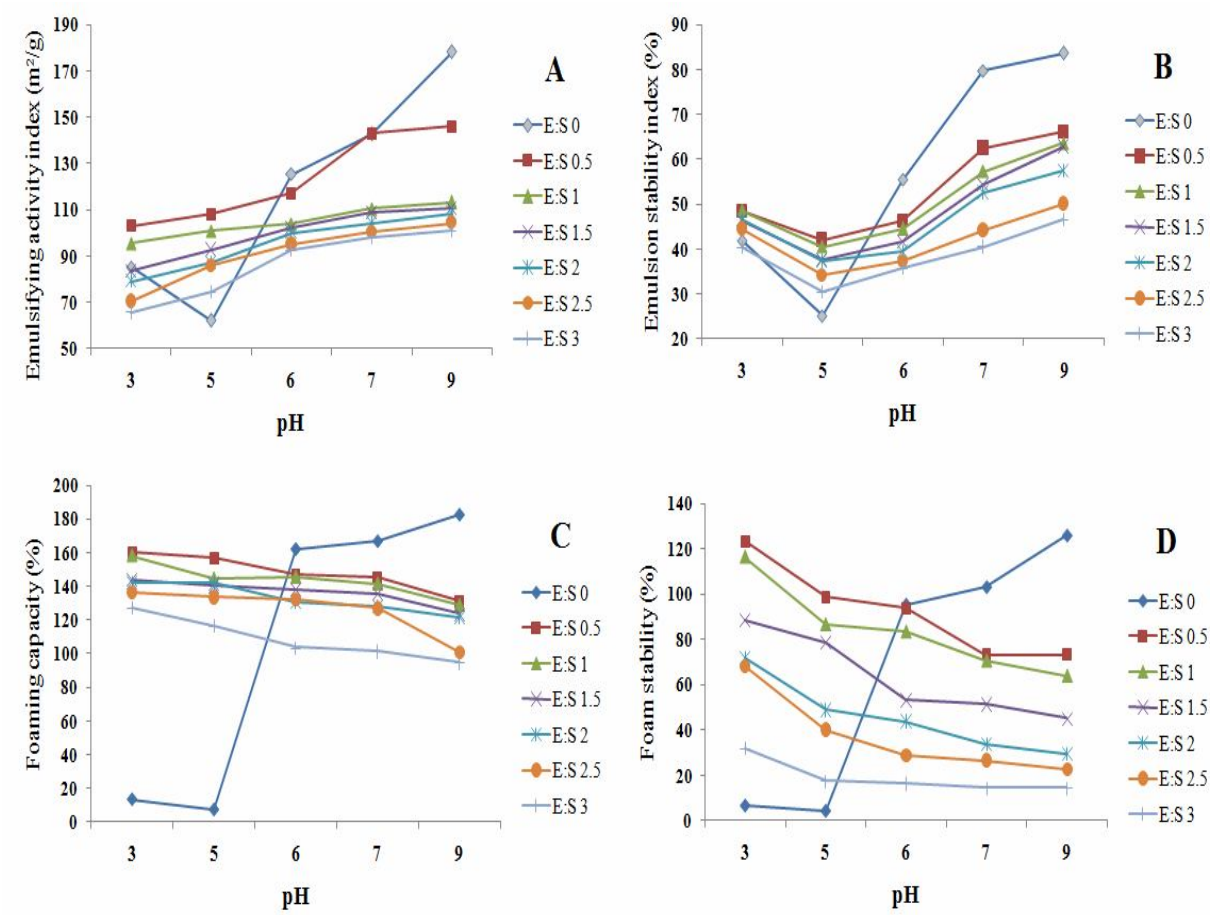

Fig 3 Emulsifying and foaming properties of casein and casein hydrolysate at different pH. (A) Emulsifying activity index (EAI); (B) emulsification stability index (ESI); (C) foaming capacity; and (D) foaming stability. The values represents means of three independent experiment ± S.D.

۳-۲-۳- ویژگی‌های کف‌کنندگی

شکل ۳ (C و D) ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف‌های تولیدی کازئین و کازئین هیدرولیز شده در نسبت‌های مختلف آنزیم به سوبسترا تحت تأثیر pH های مختلف را نشان می‌دهد. همان‌گونه که در شکل مشخص است، کازئین در pHهای اسیدی ۳ و ۵ فاقد ظرفیت کف‌کنندگی می‌باشد که این امر تحت تأثیر حلالیت پائین آن قرار دارد. اگرچه با افزایش pH به ٦ و بیشتر، ظرفیت کف‌کنندگی کازئین به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت. اما در بین تیمارهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی، نمونه‌های تولید شده در نسبت آنزیم به سوبسترا ۰/۵ بالاترین و با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا از ظرفیت کف‌کنندگی محصولات هیدرولیز شده کاسته شد. این یافته‌ها در مورد آزمون پایداری کف نمونه‌ها نیز صدق نمود و به جز pHهای اسیدی، در مقادیر بالاتر از ٦، کف تولید شده با کازئین بالاترین پایداری و با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا و درجه هیدرولیز از پایداری کف‌های حاصل کاسته شد.

نتایج این تحقیق مشابه با یافته‌های جامدار و همکاران [۱۷] است که اثر pHهای مختلف بر ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف پروتئین بادام زمینی هیدرولیز شده در درجات مختلف را بررسی کردند. همچنین، نتایج نشان دهنده این است که اگرچه افزایش درجه هیدرولیز موجب بهبود کف‌کنندگی به‌ویژه در pHهای اسیدی گردید، اما اثر آن بر پایداری کف‌های تولیدی بسیار بیشتر و مشخص‌تر بود. علت این یافته را می‌توان این‌گونه بیان کرد که اگرچه پپتیدهای کوچک حاصل از درجه هیدرولیز بالا قابلیت بالایی در حفظ هوای زیادی در محلول و ظرفیت کف کنندگی بالایی هستند، اما این پپتیدها قدرت کافی برای پایدار نمودن کف‌های تولید شده را ندارند. همچنین هیدرولیز پروتئین‌ها بسته به نوع ماده اولیه، آنزیم و شرایط

هیدرولیز موجب رهایش آمینواسیدهایی با قطبیت و یا درجه آب‌گریزی متفاوتی می‌شود که این ویژگی‌ها بر ظرفیت کف کنندگی و پایداری کف‌های تولید شده موثر هستند [٤].

۳-۳- فعالیت آنتی‌اکسیدانی

۳-۳-۱- قدرت احیاءکنندگی

در ارزیابی قدرت احیاءکنندگی، آنتی‌اکسیدان‌های موجود در نمونه‌های مورد بررسی موجب احیاء کمپلکس فری‌سیانید (Fe^{3+}) به شکل فروس (Fe^{2+}) می‌شوند [۳۰]. شکل ٤، قدرت احیاءکنندگی کازئین و تیمارهای هیدرولیز شده در نسبت‌های مختلف آنزیم به سوبسترا را نشان می‌دهد. با هیدرولیز آنزیمی کازئین، قدرت احیاءکنندگی نمونه‌ها به طور قابل توجهی افزایش یافت ($P< 0.05$). همچنین افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا که با افزایش درجه هیدرولیز و رهایش آمینواسیدهای با فعالیت آنتی‌اکسیدانی همراه است، بر قدرت احیاءکنندگی نمونه‌ها افزوده شد. در بین نسبت‌های مختلف آنزیم به سوبسترا، نمونه‌های تولید شده با ۲/۵ و ۰/۵ درصد آنزیم به‌ترتیب بیشترین و کمترین قدرت احیاءکنندگی کمپلکس فری‌سیانید را دارا بودند.

به‌طورکلی، تفاوت در قدرت احیاءکنندگی نمونه‌ها را می‌توان به تفاوت در ترکیب آمینواسیدها و پپتیدها مرتبط دانست. افزایش رهایش آمینواسیدهایی مانند تریپتوفان، متیونین، لیزین، هیستیدین و تیروزین که عموماً از فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی برخوردارند، موجب بهبود قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌شود [۳۱]. در پژوهش مشابهی، اثر هضم آنزیمی بر پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی تیان بررسی گردید. قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده با پاپائین پس از هضم با پپسین از ۰/٤۲ به ۰/۵۳ افزایش یافت. اما بالاترین افزایش قدرت احیاءکنندگی مربوط به تیمار هضم پانکراتین بود که مقدار این شاخص به ۰/۷۲ رسید. افزایش قدرت احیاءکنندگی را می‌توان به افزایش قابلیت هیدروژن یا الکترون‌دهی پپتیدها و آمینواسیدها نسبت داد [۲۳].

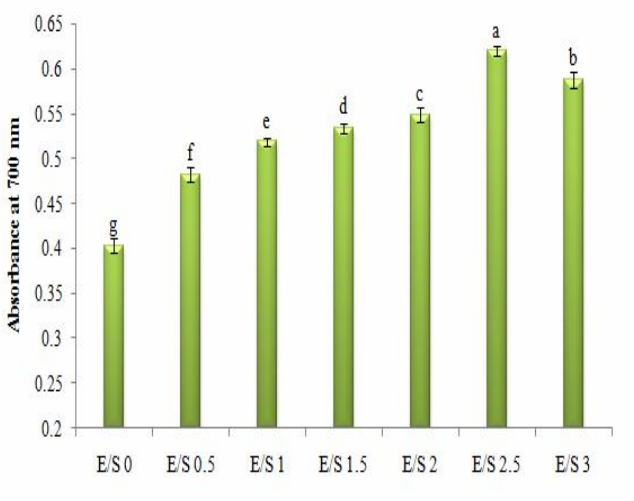

Fig 4 Reducing power of casein and casein hydrolysate at different enzyme: substrate ratio of 0.5-3% (w/w). The values represents mean of three independent experiment ± S.D.

اگرچه افزایش نسبت آنزیم مورد استفاده موجب کاهش این شاخص گردید. این کاهش در قدرت احیاءکنندگی موافق با نتایج حاصل از تحقیقات یو و همکاران [۱۵] و جامدار و همکاران [۱۷] است که به‌ترتیب اثر درجه هیدرولیز و آنزیم-های مختلف را بر قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی تیان و بادام زمینی بررسی کردند. علت کاهش ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی با افزایش درجه هیدرولیز را می‌توان به تغییر در طول و اندازه زنجیره پپتیدی و گروه‌های آمینو آزاد نسبت داد. دلیل این امر این است که در اثر هیدرولیز، پپتیدهای با قابلیت آنتی اکسیدانی به‌وجود می‌آیند که در ادامه با هیدرولیز شدیدتر از بین رفته و باعث افت قابلیت آنتی-اکسیدانی می‌شود [۱۵].

۳-۳-۲- مهار رادیکال هیدروکسیل

یکی از گونه‌های اکسیژن فعال تولید شده در بدن انسان، رادیکال هیدروکسیل است که به سهولت می‌تواند با مولکول-های زیستی مانند آمینواسیدها، پروتئین‌ها و DNA واکنش و موجب اختلالات فیزیولوژیکی شود [۳۲]. از این رو، حذف رادیکال هیدروکسیل موجب حفاظت بدن در برابر رادیکال هیدروکسیل می‌شود [۳۳]. جدول ۱، درصد مهار رادیکال هیدروکسیل در تیمارهای کازئین و کازئین هیدرولیز شده در نسبت‌های مختلف آنزیم سوبسترا را نشان می‌دهد. همان‌گونه که در جدول مشخص است، استفاده از نسبت ۰/۵ درصد آنزیم برای هیدرولیز کازئین موجب افزایش قابل ملاحظه‌ای در مهارراديکال هیدروکسیل محصول از حدود ۱۳ به ۵۷٪ گردید

($P< 0.05$). همچنین، به‌طور کلی با افزایش نسبت آنزیم مصرفی و افزایش درجه هیدرولیز کازئین بر قابلیت مهار رادیکال هیدروکسیل افزوده شد.

نتایج حاصل از این تحقیق در تطابق با یافته‌های یو و همکاران [۱۵] است که گزارش کردند با افزایش درجه هیدرولیز از ۱۸ به ۲۳٪، مهار رادیکال هیدروکسیل از ٤٥/٥ به ٦٥/١ درصد افزایش یافت. اما افزایش بیشتر درجه هیدرولیز از ۲۳ به ۳۳٪ موجب کاهش درصد فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل گردید.

اگرچه یو و همکاران [۲۳] گزارش کردند که مهارراديکال هیدروکسیل پروتئین‌های هیدرولیز شده پس از هضم با پپسین از ۷۸/۹ به ٦٤/٣ درصد کاهش یافت. اما ادامه هضم با پانکراتین موجب افزایش ۱۲٪ مهار رادیکال هیدروکسیل نسبت به نمونه‌های اولیه گردید. این یافته نشان دهنده بهبود قابلیت پپتیدهای هیدرولیز شده به دادن اتم هیدروژن یا الکترون نسبت به پپتیدهای قبل از هضم است.

Table 1 Antioxidant properties of casein and casein hydrolysate at different enzyme: substrate ratio of 0.5-3% (w/w).

Enzyme/substrate ratio (%)	Hydroxyl radical scavenging (%)	DPPH radical scavenging (%)	ABTS radical scavenging (%)	TEAC (mM)
0	13.31 ± 2.19^{f}	11.14 ± 1.96^{f}	22.01 ± 2.1^{f}	0.5 ± 0.06^{f}
0.5	57.35 ± 1.73^{e}	$21,94\pm1.66^{e}$	72.67 ± 1.7^{e}	1.95 ± 0.04^{e}
1	60.48 ± 1.22^{d}	36.41 ± 1.07^{d}	77.33 ± 0.8^{d}	2.08 ± 0.01^{d}
1.5	63.65 ± 1.14^{c}	39.85 ± 0.55^{c}	79.47 ± 0.3^{c}	2.14 ± 0.02^{c}
2	66.73 ± 1.06^{b}	45.56 ± 0.71^{a}	81.63 ± 0.5^{b}	2.21 ± 0.01^{b}
2.5	73.01 ± 1.57^{a}	42.17 ± 0.78^{b}	84.31 ± 0.3^{a}	2.28 ± 0.01^{a}
3	70.87 ± 0.65^{a}	40.05 ± 0.23^{c}	85.55 ± 0.8^{a}	2.32 ± 0.02^{a}

Different letters in the same column indicate significant difference among samples $P< 0.05$.

۳-۳-۳- مهار رادیکال DPPH

یکی از ویژگی‌های آنتی‌اکسیدان‌ها قابلیت آن‌ها با واکنش با رادیکال‌های آزاد و ایجاد گونه با ثبات و شکل پایدار است که این عملکرد موجب کاهش اکسیداسیون می‌شود [۱۵]. از این رو در مطالعات مختلف، رادیکال آزاد DPPH به‌طور گسترده برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مختلف احیاءکننده به‌کار می‌رود.

شکل ٤ نشان‌دهنده تاثیر قابل توجه هیدرولیز آنزیمی با پانکراتین در تولید پپتیدهای زیست فعال با قابلیت مهار رادیکال آنیونی DPPH است. افزایش نسبت آنزیم به‌کار رفته (تا نسبت آنزیم به سوبسترا ۲٪) در فرآیند هیدرولیز با افزایش درجه هیدرولیز و رهایش بیشتر پپتیدها و آمینواسیدهای هیدروفوب و فعال موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها گردید ($P< 0.05$). در پژوهش مشابهی، با افزایش درجه هیدرولیز پروتئین‌های ماهی تیان از ۱۸ به ۲۳ درصد، مهارراديکال آزاد DPPH از ۸۳/٥ به ۹٥/٥ درصد افزایش یافت. اما با افزایش درجه هیدرولیز به بیش از ۲۳ درصد، از فعالیت مهارراديکال آزاد DPPH کاسته شد [۱۵]. همچنین، تیمار پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی تیان با پاپائین پس از ۲ ساعت هضم با پپسین موجب افزایش ۹ درصدی قابلیت مهارراديکال آزاد DPPH گردید [۲۳]. علت این نتیجه را می‌توان به افزایش گروه‌های با زنجیره‌های جانبی حاوی آمینواسیدهای هیدروفوب نسبت داد که موجب سهولت دسترسی بیشتر این پپتیدها با واکنش با رادیکال‌های آزاد DPPH می‌شوند [۳٤].

اگرچه افزایش بیشتر مقدار آنزیم و پیشرفت فرآیند هیدرولیز موجب کاهش قابلیت مهارراديکال آزاد DPPH شد. علت این یافته را می‌توان به هیدرولیز کامل پپتیدهای حاصل و تجمع پپتیدهای کوچکتر (دی و تری‌پپتید) و آمینواسیدها نسبت داد که منجر به رهایش کامل و دسترسی بالای آمینواسیدهای هیدروفیل بر خلاف هیدروفوب‌ها می‌شود [۲۳]. افزایش قطبیت موجب دشوار شدن واکنش آمینواسیدهای فعال با رادیکال محلول در لیپید DPPH می‌شود [۳٤].

۳-۳-٤- مهار رادیکال ABTS

ارزیابی فعالیت مهارراديکال کاتیونی ABTS با قابلیت استفاده در هر دو نوع ترکیبات هیدروفیل و لیپوفیل به‌طور گسترده به‌عنوان یک آزمون فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳٥]. شکل ٤، درصد مهار رادیکال کاتیونی ABTS و

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترولوکس را در کازئین و محصولات حاصل از هیدرولیز آن در نسبت‌های مختلف آنزیم به سوبسترا نشان می‌دهد. نتایج آنالیز آماری نشان دهنده افزایش قابل توجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی کازئین (از ۲۲ به ۷۳ درصد) پس از هیدرولیز با ۰/۵ درصد پانکراتین است. به‌طور کلی با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا و افزایش درجه هیدرولیز، بر مهارراديکال ABTS افزوده می‌شود ($P< 0.05$). همچنین، متناسب با افزایش فعالیت مهارراديکال ABTS، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترولوکس نیز افزایش یافت.

نتایج تحقیقات مختلف نشان دهنده این هستند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز به‌طور قابل توجهی به منبع اولیه پروتئین، نوع و مقدار آنزیم، درجه هیدرولیز و شرایط فرآیند وابسته می‌باشند. این نتایج مشابه یافته وانگ و جیانگ [۳۶] است که اثر درجه هیدرولیز پروتئین سیب زمینی بر مهار رادیکال آزاد ABTS را بررسی کردند. برخلاف نتیجه آزمون مهار رادیکال آزاد DPPH به‌عنوان یک رادیکال نامحلول در آب که با افزایش زیاد درجه هیدرولیز و تغییر در ترکیب آمینواسیدی، فعالیت مهار این نوع رادیکال در کازئین‌های هیدرولیز شده کاهش یافت. اما این روند در مورد اثر آنتی-اکسیدانی این پپتیدها بر مهار رادیکال ABTS مشاهده نشد. این یافته‌ها مشابه تحقیقات یو و همکاران [۲۳] هستند که گزارش کردند، هضم با پپسین پروتئین‌های ماهی تیان هیدرولیز شده موجب کاهش قابلیت مهار رادیکال‌های کاتیونی و محلول در آب ABTS گردید. آن‌ها این یافته را به افزایش رهایش پپتیدها و آمینواسیدهای هیدروفوب نسبت دادند. اما ادامه فرآیند هضم با پانکراتین موجب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترولوکس گردید. این نتیجه به‌دلیل افزایش رهایش آمینواسیدهای هیدروفیل و دسترسی بیشتر به رادیکال‌های آب-دوست ABTS است.

۳-۳-۵- فعالیت آنتی‌اکسیدانی در امولسیون

شکل ۵، اثر نسبت‌های مختلف آنزیم به سوبسترا بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کازئین‌های هیدرولیز شده در امولسیون روغنی حاوی هسته انگور را نشان می‌دهد. نتایج نشان‌دهنده کاهش ترکیبات واکنش‌پذیر اسید تیوباربیتوریک و شاخص آن، مقدار مالون‌آلدئید از حدود ۰/۴۱ به ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر امولسیون است. عوامل مختلفی نظیر ترکیب آمینواسیدی پپتیدها و طول زنجیره، همچنین قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد، شلاته‌کنندگی یون‌های فلزی پرواکسیدان در پپتیدهای حاصل از کازئین هیدرولیز شده بر پایداری امولسیون‌های غذایی و تولید ترکیبات ثانویه حاصل از اکسیداسیون لیپیدها موثرند.

در تحقیقی، آبیران و همکاران [۱۸] اثر آنزیم‌های پاپائین، آلکالاز و تیمارهای مختلف را بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی اوموسین بررسی کردند. نتایج حاکی از این بود که تیمار اوموسین هیدرولیز شده در دمای ۱۰۰°C به‌مدت ۱۵ دقیقه و در pH=۱۲ موجب افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های حاصل گردید. همچنین، استفاده از اوموسین هیدرولیز و تیمار شده در شرایط فوق در امولسیون روغنی مدل موجب کاهش تولید ترکیبات واکنش‌پذیر اسید تیوباربیتوریک شد. اگرچه سایر تیمارهای انجام شده بر اوموسین‌های هیدرولیز شده نشان‌دهنده افزایش مقدار ترکیبات ثانویه حاصل از اکسیداسیون و عملکرد این ترکیبات به‌عنوان پروکسیدان بودند.

فسفوپپتیدهای کازئینی با مهار رادیکال آزاد و همچنین شلاته-کنندگی فلزات از طریق بقایای فسفوریل مانع از اکسیداسیون لیپیدها می‌شوند[۳۷]. این نتایج نشان‌دهنده قابلیت پپتیدهای حاصل از کازئین هیدرولیز شده به‌عنوان ترکیبات‌دهنده الکترون است که می‌تواند با واکنش و مهار رادیکال‌های آزاد موجب کاهش و محدود کردن انجام واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال‌ها شود. پروتئین‌های هیدرولیزشده در امولسیون‌ها و لیپوزوم‌ها می‌توانند از طریق ایجاد یک مانع فیزیکی در اطراف قطرات چربی تشکیل شده موجب کاهش سرعت اکسیداسیون شوند. بدین شکل که پپتیدهای کوچک با نفوذ به سطح مشترک روغن/آب، جذب سطح شده و یا حتی به فسفولیپیدهای غشای لیپوزومی در محلی که اکسیداسیون لیپید رخ می‌دهد، متصل شوند [۳۸].

به‌طورکلی، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و عملکردی پروتئین‌های هیدرولیز شده بسته به نوع و ترکیب پروتئین اولیه، آنزیم مورد استفاده، درجه هیدرولیز و شرایط فرآیند متفاوت است. همچنین کارایی پپتیدها در ممانعت از واکنش‌های مخرب در طول اکسیداسیون لیپیدها به‌وجود بقایای اسید آمینه‌ای مشخص در آن‌ها بستگی دارد. از جمله مهمترین آمینواسیدها می‌توان به تیروزین، هیستیدین، تریپتوفان و متیونین اشاره کرد. این آمینواسیدها با شلاته کردن یون‌های فلزی که موجب تشدید واکنش‌های اکسیداسیون می‌شوند می‌توانند به‌عنوان منبع آنتی-

اکسیدان طبیعی در محصولات غذایی مختلف و امولسیون‌های روغن در آب عمل کنند [۷ و ۳۷].

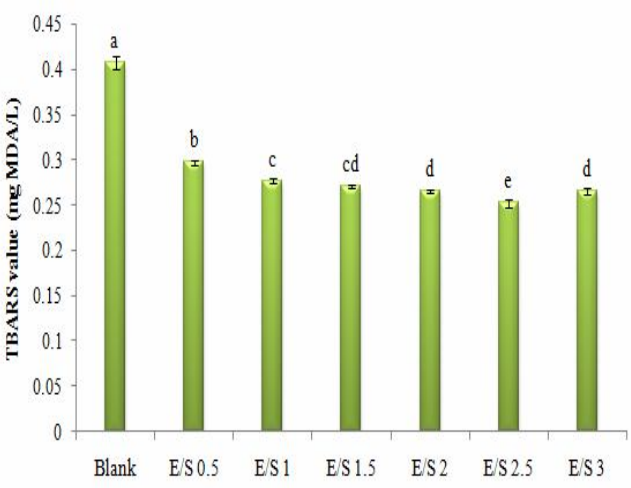

Fig 5 Thiobarbituric acid reactive substances value of casein and casein hydrolysate at different enzyme: substrate ratio of 0.5-3% (w/w). The values represents mean of three independent experiment ± S.D.

۳-۳-٦- شلاته‌کنندگی یون آهن

آهن و دیگر فلزات به‌دلیل تسریع در روند شکست هیدروپروکسیدهای لیپیدی به رادیکال‌های آلکوکسیل بسیار واکنش‌پذیر به‌عنوان پروکسیدان در بسیاری از سیستم‌های غذایی عمل می‌کنند [۳۹]. نتایج حاصل از این پژوهش نشان-دهنده افزایش قابل ملاحظه قابلیت شلاته‌کنندگی یون آهن با هیدرولیز آنزیمی کازئین بود. به‌طور مثال، شلاته‌کنندگی یون آهن کازئین هیدرولیز شده با استفاده از نسبت آنزیم به سوبسترای ۰/۵ درصد از ۱۹ به ۵۳ درصد افزایش یافت. این یافته نشان‌دهنده تحت تأثیر قرار گرفتن قابلیت شلاته‌کنندگی یون آهن با درجه هیدرولیز پروتئین است. این نتایج نشان دهنده قابلیت استفاده از پپتیدهایی با شلاته‌کنندگی بالای فلزات به‌عنوان عامل مهار اکسیداسیون و رشد میکروب‌ها است [٤٠]. نتایج مشابهی توسط جامدار و همکاران [۱۷] در مطالعه اثر شرایط و درجه هیدرولیز بر درصد شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین‌های هیدرولیز شده بادام زمینی گزارش شد اما مکانیسمی در تشریح عملکرد پپتیدها و محصولات حاصل از هیدرولیز آنزیمی بیان نگردید.

اما، پپتیدهای مشتق شده از کازئین شیر با دارا بودن بخش‌های قطبی فسفوریله شده می‌توانند یون‌های کلسیم، آهن و مس را شلاته کنند. عملکرد کازئین و پپتیدهای هیدرولیز کازئینی با قابلیت اتصال به یون آهن موجب می‌شود که این ترکیبات بتوانند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان بالقوه در سیستم‌های غذایی عمل کنند. همچنین، نتایج تحقیقات مختلف نشان دادند که فسفوپپتیدهای کازئینی و کازئین هیدرولیز شده نه تنها موجب بهبود پایداری اکسیداتیو مواد غذایی می‌شوند، بلکه با افزایش جذب کلسیم، آهن، روی و افزایش زیست دسترسی املاح معدنی موجب ارزش افزوده در غذاهای سنتی شوند [۳۷].

Table 2 Metal ions (Fe^{2+} and Cu^{2+}) chelating activity of casein and casein hydrolysate at different enzyme: substrate ratio of 0.5-3% (w/w).

Enzyme/substrate ratio (%)	Fe^{2+} (%)	Cu2+ (%)
0	19.71 ± 2.06^{f}	2.49 ± 0.61^{f}
0.5	53.86 ± 1.14^{e}	8.15 ± 0.32^{e}
1	61.03 ± 0.64^{d}	11.53 ± 0.83^{cd}
1.5	63.07 ± 0.19^{c}	12.66 ± 1.37^{bc}
2	66.16 ± 0.79^{b}	13.68 ± 1.18^{b}
2.5	68.91 ± 0.72^{a}	17.38 ± 0.81^{a}
3	69.26 ± 1.14^{a}	10.51 ± 0.76^{d}

Different letters in the same column indicate significant difference among samples $P< 0.05$.

۳-۳-۷- شلاته‌کنندگی یون مس

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که فعالیت شلاته‌کنندگی یون مس در کازئین و کازئین‌های هیدرولیز شده تحت تأثیر نسبت‌های مختلف آنزیم به سوبسترا و به تبع آن درجه هیدرولیز قرار می‌گیرد (جدول ۲). فعالیت شلاته‌کنندگی یون مس با هیدرولیز کازئین تنها با نسبت آنزیم به سوبسترای ۰/۵، به‌طور قابل توجهی افزایش یافت ($P< 0.05$). همچنین با افزایش نسبت آنزیم مصرفی تا ۲/۵ درصد بر فعالیت شلاته-کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده افزوده شد، اما با استفاده از نسبت‌های بیشتر آنزیم و افزایش درجه هیدرولیز از قابلیت

پپتیدهای حاصل از هیدرولیز کازئین در شلاته نمودن یون مس کاسته شد. اگرچه در پژوهش انجام شده توسط آبیران و همکاران [۱۸] که شلاته‌کنندگی یون مس تیمارهای مختلف اوواموسین هیدرولیز شده را بررسی کردند نشان‌دهنده کاهش شلاته‌کنندگی یون مس در این پپتیدها پس از انجام تیمار در حد کمتر از نمونه کنترل و عدم قابلیت استفاده از این محصولات به‌عنوان عامل شلاته‌کننده بود.

نتایج حاصل از این پژوهش در تطابق با یافته‌های یو و همکاران [۲۳] است که گزارش کردند فعالیت شلاته‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی تیان با پاپائین پس از هضم با پپسین از ۵۸/٦ به ۵۵/۱ درصد کاهش یافت. اما پس از هضم با پانکراتین، شلاته‌کنندگی پپتیدهای حاصل به ٦۵/٦ درصد افزایش یافت. علت این نتیجه را می‌توان به ساختار پپتیدهای حاصل و گروه‌های زنجیره جانبی اسیدآمینه‌ها نسبت داد که هم نقش موثری در حذف رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کنند و هم عوامل موثری در شلاته‌کردن یون‌های فلزی به حساب می‌آیند. اما تیمار پانکراتین با افزایش درجه هیدرولیز و رهایش آمینواسیدهای آزاد موجب افزایش دسترسی گروه‌های با قابلیت اتصال به یون‌های فلزی می‌گردد [۲۳]. گروه‌های ایمیدازول و کربوکسیل نیز موجب افزایش واکنش‌های الکترواستاتیک و یونی با یون‌های فلزی می‌شوند و از این طریق می‌توانند به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان در سیستم‌های امولسیونی و غذایی عمل کنند [۳٤].

٤- نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان‌دهنده اثر قابل توجه هیدرولیز آنزیمی کازئین بر ویژگی‌های عملکردی، آنتی‌اکسیدانی و شلاته‌کنندگی یون‌های فلزی بود. با افزایش نسبت وزنی آنزیم پانکراتین به سوبسترا، درجه هیدرولیز کازئین هیدرولیز شده افزایش یافت. بر اساس نتایج حاصل از مطالعات پیشین، افزایش درجه هیدرولیز با تولید پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر، رهایش و تغییر در ترکیب اسیدآمینه‌ای (مانند افزایش رهایش آمینواسیدهای هیستیدین، متیونین و تریپتوفان) و در معرض قرار گرفتن گروه‌های فعال، کلیه ویژگی‌های محصول هیدرولیز شده را تحت تأثیر قرار می‌دهد. به‌طورمثال، انحلال‌پذیری، امولسیون‌کنندگی و کف‌کنندگی بسیار پائین کازئین در pHهای اسیدی (به‌ویژه در محدوده نقطه ایزوالکتریک) پس از هیدرولیز آنزیمی و با افزایش درجه هیدرولیز به طورچشمگیری افزایش یافت. همچنین، هیدرولیز آنزیمی کازئین موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و شلاته-کنندگی یون‌های فلزی پرواکسیدان گردید. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی کازئین با دارا بودن ویژگی‌های عملکردی و آنتی‌اکسیدانی بسیار مناسب، از قابلیت بالایی در تولید، غنی-سازی و فرمولاسیون محصولات غذایی مختلف با هدف افزایش سطح سلامتی عموم برخوردارند.

۵- منابع

[1] López-Fandiño, R., Otte, J., & Van Camp, J. (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE inhibitory activity. International Dairy Journal, 16(11), 1277-1293.

[2] Pihlanto, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. International Dairy Journal, 16(11), 1306-1314.

[3] Moure, A., Sineiro, J., Dominguez, H., & Parajo, J. C. (2006). Functionality of oilseed protein products: A review. Food Research International, 39, 945–963.

[4] Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40, 43–81

[5] Hartman, R., & Meisel, H. (2007). Food derived peptides with biological activity: From research to food applications. Current Opinion in Biotechnology, 18, 163–169

[6] Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. Journal of Functional Foods, 1, 177–187.

[7] Peñta□Ramos, E. A., & Xiong, Y. L. (2002). Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system. Journal of Food Science, 67(8), 2952-2956.

[8] Sakanaka, S., & Tachibana, Y. (2006). Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. Food Chemistry, 95(2), 243-249.

[9] Kong, B., & Xiong, Y. L. (2006). Antioxidant activity of zein hydrolysates in a

liposome system and the possible mode of action. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(16), 6059-6068.
[10] Cumby, N., Zhong, Y., Naczk, M., & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. Food Chemistry, 109(1), 144-148.
[11] Amarowicz, R., & Shahidi, F. (1997). Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates. Food Chemistry, 58(4), 355-359.
[12] Shahidi, F., & Amarowicz, R. (1996). Antioxidant activity of protein hydrolyzates from aquatic species. Journal of the American oil chemists' society, 73(9), 1197-1199.
[13] Raghavan, S., & Kristinsson, H. G. (2008). Antioxidative efficacy of alkali-treated tilapia protein hydrolysates: a comparative study of five enzymes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(4), 1434-1441.
[14] Zhao, X. H., Wu, D., & Li, T. J. (2010). Preparation and radical scavenging activity of papain-catalyzed casein plasteins. Dairy science & technology, 90(5), 521-535.
[15] You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H., & Yang, B. (2009). Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (Misgurnus anguillicaudatus) protein hydrolysates. Innovative food science & emerging technologies, 10(2), 235-240.
[16] Mao, X. Y., Cheng, X., Wang, X., & Wu, S. J. (2011). Free-radical-scavenging and anti-inflammatory effect of yak milk casein before and after enzymatic hydrolysis. Food Chemistry, 126(2), 484-490.
[17] Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., & Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. Food Chemistry, 121(1), 178-184.
[18] Abeyrathne, E. D. N. S., Lee, H. Y., Jo, C., Suh, J. W., & Ahn, D. U. (2016). Enzymatic hydrolysis of ovomucin and the functional and structural characteristics of peptides in the hydrolysates. Food chemistry, 192, 107-113.
[19] Chen, L., Chen, J., Ren, J., & Zhao, M. (2011). Modifications of soy protein isolates using combined extrusion pre-treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improved emulsifying properties. Food Hydrocolloids, 25(5), 887-897.
[20] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2), 248-254.
[21] Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007). 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 Chemistry, 102, 1317–1327.
[22] Wu, H. C., Chen, H. M., & Shiau, C. Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (Scomber austriasicus). Food research international, 36(9), 949-957.
[23] You, L., Zhao, M., Regenstein, J. M., & Ren, J. (2010). Changes in the antioxidant activity of loach (Misgurnus anguillicaudatus) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. Food Chemistry, 120(3), 810-816.
[24] Ahmadi, F., Kadivar, M., & Shahedi, M. (2007). Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Mozaff. in model and food systems. Food chemistry, 105(1), 57-64.
[25] Decker, E. A., & Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. Journal of Agricultural and food Chemistry, 38(3), 674-677.
[26] Kong, B., & Xiong, Y. L. (2006). Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(16), 6059-6068.
[27] Guerard, F., Guimas, L., & Binet, A. (2002). Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 19, 489-498.
[28] Shahidi, F., Han, X. Q., & Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (Mallotus villosus). Food chemistry, 53(3), 285-293.
[29] Tsumura, K., Saito, T., Tsuge, K., Ashida, H., Kugimiya, W., & Inouye, K. (2005). Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. LWT-Food Science and Technology, 38(3), 255-261.

[30] Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., & Tikkanen, M. J. (2003). Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. Food chemistry, 83(2), 255-262.
[31] Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., & Nokihara, K. (1996). Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. Journal of agricultural and food chemistry, 44(9), 2619-2623.
[32] Cacciuttolo, M. A., Trinh, L., Lumpkin, J. A., & Rao, G. (1993). Hyperoxia induces DNA damage in mammalian cells. Free Radical Biology and Medicine, 14(3), 267-276.
[33] Je, J. Y., Park, P. J., & Kim, S. K. (2005). Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (Theragra chalcogramma) frame protein hydrolysate. Food Research International, 38(1), 45-50.
[34] Zhu, L. J., Chen, J., Tang, X. Y., & Xiong, Y. L. (2008). Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 2714–2721.
[35] Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., & Van Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food chemistry, 85(2), 231-237.
[36] Wang, L. L., & Xiong, Y. L. (2005). Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 9186–9192.
[37] Díaz, M., & Decker, E. A. (2004). Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. Journal of agricultural and food chemistry, 52(26), 8208-8213.
[38] Kong, B., & Xiong, Y. L. (2006). Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(16), 6059-6068.
[39] McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Lipid oxidation in oil□in□water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. Journal of Food Science, 65(8), 1270-1282.
[40] Omana, D. A., Wang, J., & Wu, J. (2010). Co-extraction of egg white proteins using ion-exchange chromatography from ovomucin-removed egg whites. Journal of Chromatography B, 878(21), 1771-1776.

Effect of casein enzymatic hydrolysis by pancreatin conditions on functional and antioxidant properties of casein hydrolysate

Sarabandi, Kh. [1], Sadeghi Mahoonak, A. R. [2*], Hamishehkar, H. [3], Ghorbani, M. [2], Jafari, S. M. [2]

1. Ph.D. Graduated, 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. Associate Professor, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

(Received: 2017/07/23 Accepted:2017/11/02)

In this research, the effect of enzymatic hydrolysis of casein on the degree of hydrolysis, functional characteristics (solubility, emulsifying and foaming properties) and antioxidant activity (DPPH free radical scavenging, ABTS radical scavenging, reducing power, hydroxyl radical scavenging, antioxidant activity in emulsion and chelating properties of iron and copper ions) was evaluated. The hydrolysis process was performed using pancreatin enzyme and enzyme to substrate ratio (3-5% w/w) for 180 min. The results showed that enzymatic hydrolysis of casein improved the solubility and induced the change in the emulsion and foaming activity (especially in acidic pH). In general, hydrolyzed casein showed the best characteristics in 2.5% enzyme to substrate ratio. Hydrolysis of casein with 2.5% pancreatin resulted changes in DPPH radical scavenging (from 11.13 to 42.17%), ABTS (from 22.01 to 84.31%), Trolox equivalent antioxidant capacity (0.51% to 2.28 mM), reducing power (0.41 to 0.62), hydroxyl radical scavenging (13.31 to 73.01%) and Thiobarbituric acid reactive substances or TBARS (0.41 to 0.25 mg/liter emulsion), respectively. Also, iron chelating activity (19.7 to 68.9%) and copper chelating activity (2.49 to 17.38%) changed before and after hydrolysis, respectively. The results showed that enzymatic hydrolysis of casein by pancreatin is an effective method for producing a product with antioxidant properties and proper operation that can be used in the formulation of different food emulsions.

Keywords: Degree of hydrolysis, Enzymatic hydrolysis, Casein, Antioxidant activity, Functional properties

*Corresponding Author E-Mail Address: Sadeghiaz@gau.ac.ir