JRIFST

www.rifst.ac.ir/jrifst.aspx
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹۳، جلد ۳، شماره ۳، صفحات ۲۵۴-۲۴۵

تأثیر دما، زمان و نسبت‌های مختلف آنزیم به سوبسترا در تهیه پروتئین هیدرولیز شده آب‌پنیر

شیما پیری قشلاقی[1*]، علیرضا صادقی ماهونک[2]، محمد قربانی[2]، مهران اعلمی[2]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
*نویسنده مسئول (shima_piri1366@yahoo.com)
۲. دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۱/۲۸
تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۷/۲۰

واژه‌های کلیدی
پروتئین هیدرولیز شده
فعالیت ضداکسایشی
کنسانتره پروتئین آب‌پنیر
هیدرولیز آنزیمی

چکیده

در تحقیق حاضر، کنسانتره پروتئین آب‌پنیر، با بکارگیری آنزیم آلکالاز هیدرولیز شد. اثر متغیرهای دما (۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد)، زمان (۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه) و نسبت آنزیم به سوبسترا (۳۰، ۶۰ و ۹۰ واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین) بر میزان درجه هیدرولیز و فعالیت ضداکسایشی، در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی گردید. بیشترین میزان درجه هیدرولیز در ۵۵ درجه سانتی‌گراد، زمان هیدرولیز ۱۸۰دقیقه و نسبت آنزیم ۶۰ (واحد آنسون/کیلوگرم سوبسترا) حاصل شد که تحت این شرایط، میزان درجه هیدرولیز به ۵۱/۶۲ درصد رسید. فعالیت ضداکسایشی پروتئین هیدرولیز شده آب‌پنیر، توسط آزمون‌های قدرت احیاءکنندگی و فعالیت مهارکنندگی یون آهن، اندازه گیری شد. فعالیت مهارکنندگی یون آهن در شرایطی که درجه هیدرولیز در حداکثر مقدار خود باشد، ۵۰/۴۱ درصد حاصل شد. همچنین تحت این شرایط قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده ۰/۱۵۶ به دست آمد که در مقایسه با اسید آسکوربیک ۱۰۰ قسمت در میلیون، قدرت احیاءکنندگی به میزان ۲۰/۴۷ درصد آن از خود نشان داد ($P<0/05$).

مقدمه

مهار پراکسیداسیون لیپیدی در مواد غذایی و بدن بسیار مهم است. بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مانند BHT به عنوان مکمل‌های غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند، اگر چه این آنتی‌اکسیدان‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از خود نشان می‌دهند ولی استفاده از این ترکیبات شیمیایی به دلیل آسیب به DNA و سمیت محدود شده است (Ito *et al*., 1986). در سال‌های اخیر علاقه زیاد به پیدا کردن آنتی‌اکسیدان‌های جدید از منابع طبیعی، برای استفاده در مواد غذایی و دارویی به جای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی، منجر به تحقیقاتی در زمینه بررسی قابلیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای فعال بیولوژیک از پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ای نظیر کازئین شیر (Blanca *et al*., 2007)، پروتئین سویا (Gibse *et al*., 2004)، سبوس برنج (Parrado *et al*., 2006)، پروتئین دانه بذر گنه گنه (Aluko *et al*., 2003)، کانولا (Cumby *et al*., 2008)، پروتئین زرده تخم مرغ (sakanaka *et al*., 2004) و آب پنیر (Recio & Visser, 1999) شده است. پپتیدهای زیست فعال به عنوان اجزاء پروتئینی مورد بررسی قرار می‌گیرند که در ساختار پروتئین اصلی غیرفعال بوده و بعد از آزاد شدن توسط هیدرولیز آنزیمی، عملکردهای

Archive of SID
www.SID.ir

فیزیکوشیمیایی متعددی از خود بروز می‌دهند. این پپتیدها در اندازه‌های ۲ تا ۲۰ اسیدآمینه و جرم مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ دالتون می‌باشند (Sarmadi & Ismail, 2010). در هیدرولیز پروتئین‌ها، روش‌های بیولوژیکی و شیمیایی بیشترین کاربرد را دارند و استفاده از روش هیدرولیز شیمیایی در صنعت متداول‌تر است. هیدرولیز آنزیمی بهتر از هیدرولیز اسیدی یا قلیایی است زیرا هیدرولیز آنزیمی خیلی ملایم‌تر و بدون نابودی اسیدهای آمینه آزاد اتفاق می‌افتد. آلکالاز Alcalase® 2.4 L یک آنزیم قلیایی تولید شده از باکتری *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* (*Bacillus licheniformis*) است که به دلیل عملکرد در pH قلیایی، تولید پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز بالاتر و طول زنجیره پپتیدی کوتاه‌تر، بیشترین توجه را به خود اختصاص داده است (اویسی پور و همکاران، ۱۳۸۹). این هیدرولیز شده‌ها مناسب برای رژیم غذایی بیماران مبتلا به فنیل کتونوری، آلرژی غذایی و بیماری‌های کبدی (Clemente, 2000) همچنین به عنوان رژیم غذایی برای افراد مسن و سالخورده، در تغذیه ورزشکاران و در رژیم غذایی برای کنترل وزن استفاده می‌شوند (Manninem, 2000). آنها همچنین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدانعقادی، ضدسرطانی، ضدفشارخون بالا و چندین فعالیت فیزیولوژیکی دیگر هستند (Sarmadi & Ismail, 2010). آب‌پنیر دارای ارزش بیولوژیکی بالایی است (ترکاشوند، ۱۳۷۱). پروتئین آب‌پنیر دارای غلظت بالایی از اسیدهای آمینه زنجیره‌ای منشعب (BCAAs)[1] لوسین، ایزولوسین و والین است که فاکتورهای مهمی در رشد و ترمیم بافت می‌باشند (Walzem *et al*., 2002). ترکیب α-لاکتوآلبومین از آب‌پنیر نیز فلزات سنگین را شلاته می‌کند و استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد زیرا خاصیت شلاته‌کنندگی یون آهن را داراست (Ha *et al*., 2003)، هدف این تحقیق استفاده از فرایند هیدرولیز آنزیمی، جهت تهیه پروتئین هیدرولیز شده آب‌پنیر و بررسی تاثیر سه فاکتور دما، زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا بر درجه هیدولیز و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در شرایط مورد نظر بوده است.

مواد و روش‌ها

برای فرایند هیدرولیز آنزیمی از آنزیم آلکالاز که یک اندوپروتئیناز[2] گرفته شده از باکتری *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* می‌باشد، استفاده شد. این آنزیم از شرکت سیگما (اسپانیا) تهیه و تا زمان آزمایش در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. کنسانتره پروتئین آب‌پنیر (با ۸۲٪ پروتئین) در آبان ماه ۱۳۹۲ از کارخانه پگاه مشهد تهیه گردید. فروزین[3]، فری‌سیانیدپتاسیم، تری‌کلرواستیک‌اسید، کلریدآهن، اتانول، تریس[4]، اسید هیدروکلریدریک، اسیدآسکوربیک از شرکت مرک، مونوسدیم فسفات و دی‌سدیم فسفات و اسید سولفوریک، هگزان و سود پرک از شرکت‌های معتبر داخلی تهیه گردیدند. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش از درجه‌ی آزمایشگاهی برخوردار بودند.

تهیه پروتئین هیدرولیزشده ایزوله پروتئین آب پنیر

ابتدا نمونه کنسانتره با بافر تریس- اسیدکلریدریک به نسبت وزنی- حجمی ۱ به ۵ و با آب به نسبت ۱ به ۲۰ به حالت سوسپانسیون یکنواخت و با pH مناسب جهت فعالیت آنزیم آلکالاز درآمده (pH = ۸) و سپس در دمای آزمایش، آنزیم بر اساس فعالیت تعریف شده به سوسپانسیون اضافه شد. تمامی واکنش‌ها در فلاسک‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری در انکوباتور شیکردار (ساخت کره جنوبی، شرکت ویژن[5] مدل VS-8480) و با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای مورد نظر برای هر تیمار انجام شدند. در انتهای هر تیمار به منظور حصول اطمینان از غیرفعال شدن آنزیم، واکنش آنزیمی با حرارت دادن سوسپانسیون در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه متوقف گردید. سپس ترکیب هیدرولیز شده، در حمام یخ به سرعت سرد گردید و در انتها در سانتریفیوژ یخچال‌دار

1- Branched Chain Amino Acid

2- Endoproteinase
3- Ferrozine
4- Tris
5- Vision

Archive of SID

www.SID.ir

(ساخت کره جنوبی، شرکت هانیل[1]، مدل Combi - 514R) با دور ۶۷۰۰×g در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه، جهت جمع‌آوری سوپرناتانت قرار گرفت (Ovissipour *et al*., 2009b)، به منظور یافتن دامنه مناسب شرایط هیدرولیز جهت بهینه‌سازی، ابتدا پیش‌تیمارهایی در شرایط مطابق با دماهای ۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد و زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه و فعالیت‌های آنزیمی ۳۰، ۶۰ و ۹۰ واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین (یک واحد آنسون عبارت است از میزان آنزیم مورد نیاز برای آزاد شدن یک میلی‌اکی‌والان اسیدآمینه تیروزین از سوبسترای هموگلوبین در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷/۵ صورت پذیرفت (Aspmo *et al*., 2005).

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی

به منظور تعیین رطوبت، ۵ گرم از نمونه روی ظرف آلومینیومی از قبل وزن شده قرار داده شد. سپس نمونه‌ها در آون در دمای ۱۰۳ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند تا این‌که وزن ظرف ثابت گردید (پروانه، ۱۳۸۵). برای تعیین میزان پروتئین کل در مواد خام اولیه، از دستگاه کلدال (ساخت آلمان، شرکت بهر، مدل S3) و ضریب نیتروژن ۶/۲۵ استفاده شد (AOAC, 2000) و میزان خاکستر نیز با قرار دادن نمونه خام در کوره الکتریکی (ساخت آلمان، شرکت نابرترم[2]، مدل FX118-30) در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد، تعیین گردید (AOAC, 2000).

تعیین درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز یکی از فاکتورهای مهم در تعیین خواص پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌باشد و در واقع میزان شکسته شدن پیوندهای پپتیدی را در محصول هیدرولیز شده بیان می‌کند. به حجم برابری از سوپرناتانت، تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) ۲۰ درصد اضافه گردید و سپس در دور g × ۶۷۰۰ و دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه به منظور جمع‌آوری ترکیبات محلول در تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۰ درصد، سانتریفیوژ گردید. درجهٔ هیدرولیز بر اساس رابطه ۱ محاسبه گردید (Hoyle & Merritt., 1994).

رابطه (۱)

$$\text{درجه هیدرولیز (درصد)} = \frac{\text{میزان نیتروژن در } TCA \text{ 10 درصد}}{\text{کل نیتروژن در نمونه}} \times 100$$

فعالیت مهارکنندگی یون آهن (Fe^{++})

۴/۷ میلی‌لیتر محلول پروتئین هیدرولیزشده با ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول ۲ میلی‌مولار کلرید آهن II و ۰/۲ میلی‌لیتر فروزین ۵ میلی‌مولار، مخلوط گردیده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد. در انتها، جذب در طول موج ۵۶۲ نانومتر خوانده شد. در نمونه شاهد به جای نمونه، از آب مقطر استفاده شد و فعالیت مهارکنندگی از رابطه ۲ بدست آمد (Nalinanon *et al*., 2011).

رابطه (۲)

$$\text{فعالیت شلاته کنندگی (درصد)} = \frac{\text{جذب شاهد} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب شاهد}} \times 100$$

آزمون قدرت احیاءکنندگی

اندازه‌گیری قدرت پروتئین‌های هیدرولیز شده در احیای آهن III به روش Bougatef و همکاران (۲۰۰۹)، صورت پذیرفت. برای این منظور ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌ی محلول هر کدام از تیمارها با ۲/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH= ۶/۶) و ۲/۵ میلی‌لیتر از فری سیانیدپتاسیم ۱ درصد مخلوط گردید. مخلوط در ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد و سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد (وزنی- حجمی) به آن اضافه گردید. مخلوط در g× ۱۶۵۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و در نهایت ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول سوپرناتانت با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ درصد (وزنی- حجمی) کلرید آهن مخلوط گشت. بعد از ۱۰ دقیقه واکنش، جذب محلول حاصل در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش، بیانگر افزایش قدرت احیاءکنندگی آن می‌باشد.

1- Hanil
2- Nabertherm

Archive of SID

www.SID.ir

تجزیه و تحلیل آماری

این مطالعه با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایش فاکتوریل انجام شد و بررسی اثر متغیرهای دما (در سطوح ۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد)، زمان (در سطوح ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه) و میزان آنزیم (در سطوح ۳۰، ۶۰ و ۹۰ واحد آنسون) و در دو تکرار صورت پذیرفت. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد صورت گرفت. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS16.0 و رسم نمودارها با نرم افزار Microsoft Excel 2007 انجام گردید.

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی مواد خام اولیه

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی کنسانتره پروتئین آب پنیر

	پروتئین (درصد)	رطوبت (درصد)	خاکستر (درصد)
کنسانتره پروتئین آب پنیر	۸۲ ±۰/۳۹	۱۳ ± ۰/۳۳	۲/۶ ± ۰/۱۸

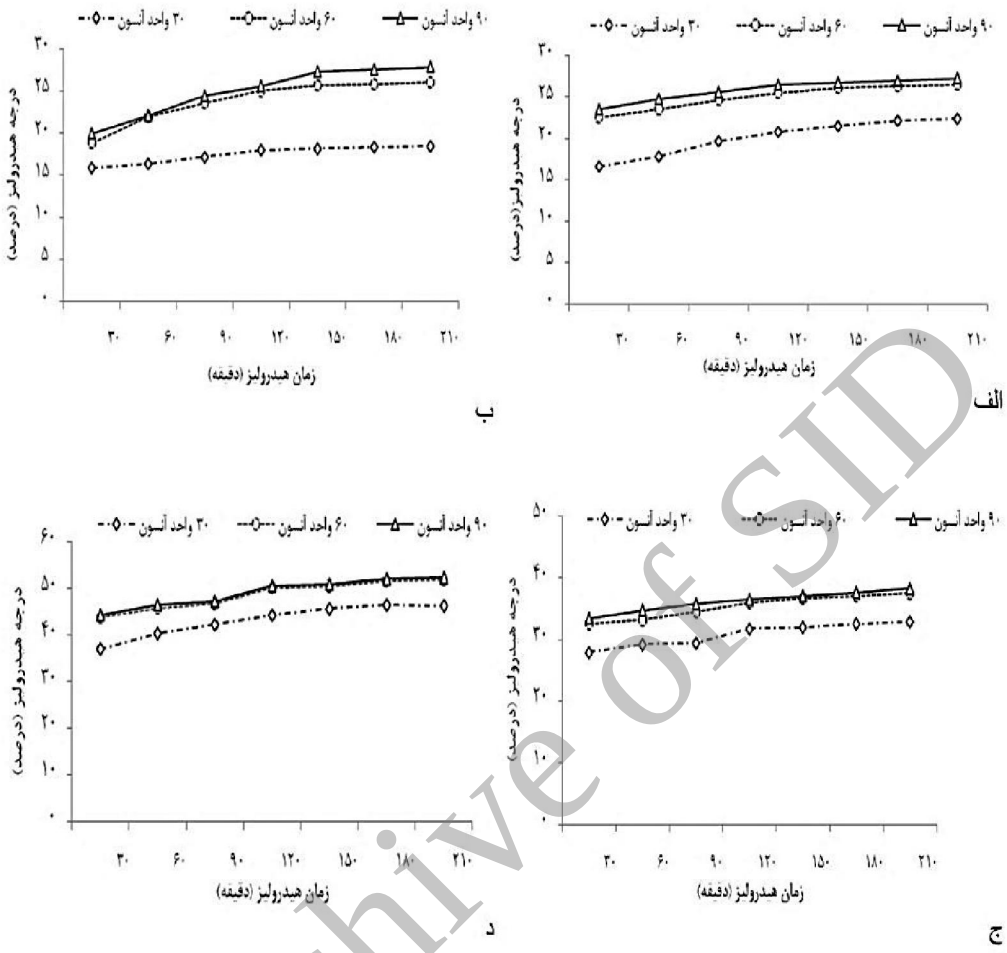
ارزیابی میزان پیشرفت هیدرولیز

کنترل میزان پیشرفت هیدرولیز طی فرآیند هیدرولیز مهم می‌باشد، چرا که بسیاری از خواص پروتئین هیدرولیز شده، از جمله اسیدهای آمینه آزاد، میزان انحلال‌پذیری، وزن مولکولی پپتیدهای حاصل و حتی خواص ضداکسایشی پروتئین تولید شده، وابسته به شدت و میزان درجه هیدرولیز می‌باشد (Slizyte *et al.*, 2005)، اثر زمان، دما و فعالیت آنزیم بر میزان درجه هیدرولیز در شکل‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ نشان داده شده است. عامل زمان، دما و میزان فعالیت آنزیم اثر معنی‌داری بر میزان درجه هیدرولیز داشت ($P<۰/۰۵$). با مقایسه تیمارهای مختلف مشخص شد که بین آنها اختلاف معنی‌داری وجود دارد. به صورت کلی با افزایش زمان هیدرولیز، میزان درجه هیدرولیز افزایش یافت. بیشترین میزان درجه هیدرولیز در تمامی سطوح دما و میزان فعالیت آنزیم، در زمان ۲۱۰ دقیقه و کمترین میزان آن در زمان هیدرولیز ۳۰ دقیقه به دست آمد. افزایش میزان هیدرولیز در بیشتر تیمارها از زمان ۳۰ تا ۱۲۰ دقیقه شدت بیشتری داشت ولی در زمان‌های بالاتر از شدت و نرخ هیدرولیز کاسته شد. Ovissipour و همکاران (۲۰۰۹a) علت این وضعیت را چنین توجیه نمودند که با افزایش زمان هیدرولیز تعداد پیوندهای پپتیدی در دسترس آنزیم کاهش می‌یابد، همچنین از میزان فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم کاسته می‌شود که در مجموع موجب کاهش شدت هیدرولیز می‌شود. از طرفی دیگر شکل‌گیری ترکیباتی که ممانعت کنندهٔ فعالیت آنزیمی هستند نیز می‌تواند در این امر دخیل باشد (Ovissipour *et al.*, 2009a)؛ نتایج، گویای افزایش درجه هیدرولیز با بالابردن فعالیت آنزیمی از ۳۰ به ۹۰ واحد آنسون می‌باشند. اختلاف درجات هیدرولیز بین فعالیت‌های آنزیمی ۶۰ و ۹۰ واحد آنسون کمتر از اختلاف ۳۰ و ۶۰ بود و در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد بین فعالیت‌های آنزیمی ۶۰ و ۹۰ واحد آنسون تفاوت معنی‌داری ملاحظه نشد ($P>۰/۰۵$). به دلیل هزینه‌بر بودن آنزیم، استفاده از مقادیر بالای آنزیم در تولید پروتئین هیدرولیز شده، اقتصادی به نظر نمی‌رسد، لذا فعالیت آنزیمی ۶۰ به عنوان نقطه مناسب برای این منظور لحاظ گردید، همچنین در این دما بین زمان ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه نیز اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، بنابراین با توجه به این‌که میانگین درجه هیدرولیز در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد بیشتر از سایر دماهای مورد آزمایش بود، شرایط بهینه برای دستیابی به بیشترین میزان درجه هیدرولیز دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۸۰ دقیقه و نسبت آنزیم ۶۰ (واحد آنسون برکیلوگرم سوبسترا) به دست آمد، که تحت این شرایط میزان درجه هیدرولیز به ۵۱/۶۲ درصد رسید. طاهری و

Archive of SID

www.SID.ir

همکاران (۲۰۱۱) میزان درجه‌ی هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده ماهی ساردین را با استفاده از آنزیم آلکالاز، در شرایط بهینه در دمای ۴۵/۶۲ درجه سانتی‌گراد، ۳۵/۱۴ درصد گزارش کردند.



شکل ۱- درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده آب پنیر در فعالیت‌های آنزیمی و زمان‌های مختلف الف) در دمای۴۰ ب) دمای ۴۵ ج) دمای ۵۰ د) دمای۵۵ درجه سانتی‌گراد

فعالیت مهارکنندگی یون آهن (Fe^{++})

واکنش‌های هیدرولیز و فعالیت آنتی‌اکسیدانی برای این آزمون در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و فعالیت آنزیمی ۶۰ واحد آنسون (دما و مقدار فعالیت آنزیمی که در آن درجه هیدرولیز به بیشترین مقدار خود رسید) و با سطوح متغیری از زمان انجام گرفت. همان‌گونه که در جدول ۲ مشخص است، بالاترین فعالیت مهارکنندگی، در زمان ۹۰ دقیقه و به میزان ۵۰/۴۱ درصد بدست آمد که در مقایسه با سایر زمان‌های هیدرولیز اختلاف معنی‌داری از خود نشان داد ($P<0/05$). بین زمان ۱۲۰با ۲۱۰ دقیقه اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($P>0/05$). نتایج فعالیت مهارکنندگی یون آهن از روند مشخصی پیروی نکرد و تا زمان هیدرولیز ۹۰ دقیقه افزایش و به بیشترین مقدار خود رسیده و سپس شروع به کاهش نمود و در زمان ۱۸۰دقیقه مجدداً افزایش پیدا کرد. به دلیل ایجاد پپتیدهای با اندازه‌های مولکولی مختلف در هر تیمار زمانی، فعالیت شلاته‌کنندگی متفاوت خواهد بود (Je *et al.*, 2009). Samaranayaka و Li-Chan (۲۰۰۸) در بررسی قدرت مهارکنندگی پروتئین هیدرولیز شده ماهی هیک[1] اقیانوس آرام (*Merluccius productus*)، فعالیت مهارکنندگی ۷ تا ۴۶ درصد را ثبت نمودند. Thiansilakul و همکاران

1- Pacific hake

Archive of SID
www.SID.ir

(۲۰۰۷) فعالیت مهارکنندگی ۶۰ درصد را از پروتئین هیدرولیز شده ماهی اسکاد حلقوی (*Decapterus maruadsi*) حاصل نمودند.

جدول ۲- میزان فعالیت مهارکنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده آب‌پنیر در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و فعالیت آنزیمی ۶۰ واحد آنسون بر کیلوگرم

زمان هیدرولیز (دقیقه)	فعالیت مهارکنندگی یون آهن (درصد)
۳۰	۴۱/۶ ± ۰/۵۶ [c]
۶۰	۴۲/۵۴ ± ۰/۶۵ [b]
۹۰	۵۰/۴۱ ± ۰/۵۴ [a]
۱۲۰	۳۹/۲۴ ± ۰/۴ [d]
۱۵۰	۱۵/۱۹ ± ۰/۴۵ [f]
۱۸۰	۳۶/۳۳ ± ۰/۴۳ [e]
۲۱۰	۳۸/۸۰ ± ۰/۲۷ [d]

انحراف معیار ± میانگین (۲تکرار)

بین حروف مشابه اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری وجود ندارد (P<۰/۰۵).

قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیزشده

روند تغییرات مربوط به قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیزشده آب‌پنیر، نیز در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و فعالیت آنزیمی ۶۰ واحد آنسون (دما و مقدار فعالیت آنزیمی که در آن درجه هیدرولیز به بیشترین مقدار خود رسید) و با سطوح متغیری از زمان انجام گرفت. همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، روند افزایشی قدرت احیاءکنندگی تا زمان۶۰ دقیقه‌ی هیدرولیز ادامه یافته و در زمان ۹۰ دقیقه دستخوش کاهش شده و دوباره در زمان ۱۲۰ دقیقه افزایش یافته و تا زمان ۲۱۰ دقیقه میزان تغییر بسیار کم و روند تقریباً ثابتی داشت. جهت مقایسه قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیزشده، از محلول اسیدآسکوربیک با غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام به‌عنوان یک عامل احیاءکننده استفاده شد که جذب نمونه مربوط به آن در طول موج ۷۰۰ نانومتر، ۰/۷۶۲ به‌دست آمد (Jayaprakasha *et al*., 2001). بین میانگین جذب تمامی نمونه‌ها و جذب نمونه‌ها با تیمار اسیدآسکوربیک تفاوت معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۵) و بالاترین قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده در این تیمار، زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه، با میزان جذب ۰/۱۵۶ بدست آمد که در مقایسه با اسیدآسکوربیک ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ۲۰/۴۷ درصد قدرت احیاءکنندگی از خود نشان‌داد. Samaranayaka و Li-Chan (۲۰۰۸) در بررسی قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیز شده ماهی هیک اقیانوس آرام به مقادیر ۰/۲۲۷ تا ۰/۶۰۳ دست یافتند.

جدول ۳- میزان قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیز شده آب‌پنیر در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و فعالیت آنزیمی ۶۰ واحد آنسون بر کیلوگرم

زمان هیدرولیز (دقیقه)	قدرت احیاءکنندگی (جذب در ۷۰۰ نانومتر)
۳۰	۰/۱۰۸ ± ۰/۰۰۱ [d]
۶۰	۰/۱۵۶ ± ۰/۰۰۱ [a]
۹۰	۰/۱۲۰ ± ۰/۰۰۲ [c]
۱۲۰	۰/۱۳۴ ± ۰/۰۰۱ [b]
۱۵۰	۰/۱۳۲ ± ۰/۰۰۲ [b]
۱۸۰	۰/۱۳۵ ± ۰/۰۰۲ [b]
۲۱۰	۰/۱۳۳ ± ۰/۰۰۱ [b]

انحراف معیار ± میانگین (۲تکرار)

بین حروف مشابه اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری وجود ندارد (P<۰/۰۵).

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه‌گیری

یکی از مهم‌ترین پارامترهای بررسی خواص پروتئین‌های هیدرولیز شده، درجه هیدرولیز می‌باشد که میزان شکسته شدن پیوندهای پپتیدی را بیان می‌کند. کنترل میزان آن بسیار مهم است، زیرا بسیاری از خواص پروتئین هیدرولیز شده از جمله میزان اسیدهای آمینه آزاد، میزان انحلال‌پذیری و وزن مولکولی پروتئین تولید شده، وابسته به شدت و درجه هیدرولیز می‌باشد. نتایج حاصل از تولید پروتئین هیدرولیز شده آب‌پنیر، نشان داد که تولید این محصول به طور مؤثری تحت تاثیر شرایط واکنش یعنی دما، زمان هیدرولیز و فعالیت آنزیمی آنزیم آلکالاز قراردارد. در واقع هر یک از این فاکتورها تاثیر کاملاً معناداری (در سطح اطمینان ۹۵ درصد) بر کیفیت محصول داشت و بیشترین میزان درجه هیدرولیز در ۵۵ درجه سانتی‌گراد، زمان هیدرولیز ۱۸۰دقیقه و نسبت آنزیم ۶۰ (واحد آنسون برکیلوگرم سوبسترا) حاصل شد که تحت این شرایط میزان درجه هیدرولیز به ۵۱/۶۲ درصد رسید.

منابع

۱. اویسی‌پور، م.، عابدیان کناری، ع.، معتمدزادگان، ع.، و نظری، ر. ۱۳۸۹. بررسی خواص پروتئین‌های هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تون زرد باله با استفاده از آنزیم‌های تجاری. نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران. جلد ۶، شماره ۱. صفحات ۶۸-۷۶.

۲. پروانه، و. ۱۳۸۵. کنترل کیفی و آزمایش های شیمیایی مواد غذایی. چاپ سوم. موسسه چاپ و انتشارات دانشگاه تهران. صفحه۳۳۲.

۳. ترکاشوند، ی. ۱۳۷۱. استفاده از آب‌پنیر جهت تهیه لاکتوز. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس.

4. Aluko, R. E. & Monu, E. 2003. Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates. Journal of Food Science, 68: 1254–1258.

5. AOAC. Official methods of analysis (18th ed.). 2000. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.

6. Aspmo, S. I., Horn, S. J. & Eijsink, V. G. H. 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua L.*) viscera. Journal of Process Biochemistry, 40: 1957–196.

7. Blanca, H. L., Ana, Q., Lourdes, A. & Isidra, R. 2007. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. Journal of International Dairy, 17: 42–49.

8. Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. & Nasri, M. 2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. Journal of Food Chemistry, 114: 1198–1205.

9. Clemente, A. 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. Journal of Trends in Food Science and Technology, 11: 254-262.

10. Cumby, N., Zhong, Y., Naczk, M. & Shahidi, F. 2008. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. Journal of Food Chemistry, 109: 144–148.

11. Ha, E. & Zeniel, M. B. 2003. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). The Journal of Nutritional Biochemistry, 14: 251-258.

12. Hoyle, N. T. & Merritt, J. H. 1994. Quality of fish protein hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). Journal of Food Science, 59: 76-79.

Archive of SID

www.SID.ir

13. Ito, N., Hirose, M., Fukushima, S., Tsuda, H., Shirai, T. & Tatematsu, M. 1986. Studies on antioxidants: The carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenic. Journal of Food and Chemical Toxicology, 24: 1099–1102.

14. Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P. & Sakariah, K. K. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. Journal of Food Chemistry, 73: 285-290.

15. Je, J. Y., Lee, K. H., Lee, M. H. & Ahn, C. B. 2009. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. Journal of Food Research International, 42: 1266-1272.

16. Kristinsson, H. G. & Rasco, B. A. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. Journal of Food Science and Nutrition, 40: 43-81.

17. Lahl, W. J., & Grindstaff, D. A. 1989. Spices and seasonings: hydrolyzes proteins. Proceedings of the sixth SIFST. Symposium on Food Ingredients-Applications. Journal of Food Science and Technology, Singapore, 51- 65.

18. Manninem, A. H. 2009. Review: protein hydrolysates in sports nutrition. Journal of Nutrition and Metabolism, 6: 38–42.

19. Mullaly, M. M., O'Callaghan, D. M., Fitzgerald, R. J., Donnelly, W. J. & Dalton, J. P. 1995. Zymogen activation in pancreatic endoproteolytic preparations and influence on some whey protein characteristics. Journal of Food Science, 60 (2): 227–233.

20. Nalinanon, S. T., Benjakul, S., Kishimura, H. & Shahidi, F. 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. Journal of Food Chemistry, 124: 1354-1362.

21. Ovissipour, M., Abedian, A. M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R. & Shahiri, H. 2009a. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. Journal of Food Chemistry, 115: 238–242.

22. Ovissipour, M., Taghiof, M., Motamedzadegan, A., Rasco, B. & Esmaeili Mulla, A. 2009b. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga sturgeons *(Huso huso)* using Alcalase. Journal of International Aquatic Research, 1: 31-38.

23. Parrado, J., Miramontes, E., Jover, M., Gutierrez, J. F., de Teran, L. C. & Bautista, J. 2006. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. Journal of Food Chemistry, 4: 742–748.

24. Petersen, B. R. 1981. The impact of the enzymatic hydrolysis process on recovery and use of proteins, in enzymes and food Processing, Elsevier Applied Science Publishers, London, UK, 149–175.

25. Recio, I. & Visser, S. 1999 Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine alpha (s2)-casein. Journal of Biochimica et Biophysica Acta, 1428: 314-326.

26. Saiga, A., Tanabe, S. & Nishimura, T. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 3661–3667.

27. Sarmadi, B.H. & Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. Peptides, 31: 1949- 1956.

Archive of SID

www.SID.ir

28. Samaranayaka, A. G. P. & Li-Chan, E. C. Y. 2008. Autolysis-assisted production of protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (*Merluccius productus*). Journal of Food Chemistry, 107: 768-776.

29. Slizyte, R., Dauksas, E., Falch, E., Storro, I. & Rustad, T. 2005. Characteristics of protein fractions generated from cod (*Gadus morhua*) by-products. Journal of Process Biochemistry, 40: 2021-2033.

30. Taheri, A., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A. & Habibi-Rezaei, M. 2011. Poultry by-products and enzymatic hydrolysis: optimization by response surface methodology using Alcalase® 2.4L. International Journal of Food Engineering, 7: 1556-3758.

31. Thiansilakul, Y., Benjakul, S. & F, Shahidi. 2007. Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using Alcalase and flavourzyme. Journal of Food Biochemistry, 31: 266–287.

32. Walzem, R. L., DiUard, C. J. & German, J. B. 2002. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be over looking. Journal of Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 42: 353-375.

.

Archive of SID

www.SID.ir

Effects of temperature, time and enzyme to substrate ratio on preparation of whey protein hydrolysate

Shima Piri[1], Ali Reza Sadeghi Mahoonak[2], Mohamad Ghorbani[2], Mehran Alami[2].

1. MSc. Graduated Student, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

* Corresponding author (shima_piri1366@yahoo.com)

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

Abstract

In present study, whey protein hydrolysate was prepared using Alcalase 2.4L from whey protein concentrate. The effect of temperature (40, 45, 50 and 55°C), time (30, 60, 90, 120, 150, 180 and 210 m) and enzyme/substrate ratio (30, 60 and 90 Anson unit/kg protein), on degree of hydrolysis and antioxidant activity of product were investigated in a completely randomized design. The highest degree of hydrolysis was observed at 55°C, hydrolysis time of 180 minutes and enzyme/substrate ratio of 60 Anson unit/kg substrate. Under these conditions, degree of hydrolysis was 51.62%. The antioxidant activity of protein hydrolysate was studied using reducing power and Fe^{2+} chelating activity. At maximum degree of hydrolysis, Fe^{2+} chelating activity were obtained 50.41%. As well as under this condition reducing-power of protein hydrolysate was 0.156 which showed 20.47% reducing-power compared to 100 ppm ascorbic acid.

Keywords: Antioxidant activity, Enzymatic hydrolysis, Protein hydrolysate, Whey protein concentrate

Archive of SID

www.SID.ir