مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره سیزدهم/ زمستان ۱۳۸۷/ ۶۸-۶۱

تأثیر عصاره انجیر نارس بر هیدرولیز کازئین شیر گاو

امیرحسین نوروزنژاد[۱]، یدالله شکیبا[۲]، دکتر علی مصطفایی[۳]

۱- دانش‌آموز، دبیرستان شهید بهشتی (تیزهوشان)، سازمان ملی پرورش استعدادهای درخشان، کرمانشاه، ایران

۲- دانشجوی دکترای تخصصی ایمونولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۳- دانشیار ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران، (مؤلف مسؤول) تلفاکس: ۰۸۳۱-۴۲۷۶۴۷۱

amostafaie@kums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: مشکل هضم کازئین در برخی از افراد به خصوص کودکان دیده می‌شود. در این مطالعه با کمک پروتئاز موجود در میوه انجیر نارس (فیسین) هیدرولیز کازئین مورد بررسی قرار گرفت. عدم تحمل کازئین موجود در شیر گاو در تعداد قابل توجهی از شیرخواران دیده شده و در صورت عدم تشخیص و جایگزینی به موقع می‌تواند عوارضی مانند سوء تغذیه و کاهش رشد را در آنها ایجاد نماید. هضم کازئین شیر گاو توسط فرآیندهای شیمیایی و آنزیمی از مهمترین راهکارهای تولید شیر هیدرولیزه جهت استفاده شیرخواران آلرژیک می‌باشد. در این مطالعه تلاش شده است تا از پروتئازهای موجود در عصاره انجیر نارس به عنوان منبعی جدید و ارزان برای هیدرولیز کازئین شیر گاو استفاده گردد.

روش بررسی: با استفاده از بافر فسفات نمکی، عصاره آبی از میوه نارس انجیر تهیه گردید. سپس برای بررسی میزان هیدرولیز کازئین، غلظت‌های مختلفی از آنزیم استخراج شده در چهار سیستم بافری مختلف شامل بافر تریس (pH=۸/۵)، بافر فسفات (pH=۷)، بافر سیترات (pH=۵/۵) و بافر استات (pH=۴/۵) در زمانهای ۱، ۳ و ۶ ساعت روی کازئین خالص تأثیر داده شد. بررسی میزان هیدرولیز کازئین به کمک روش الکتروفورز (SDS-PAGE) و تراکم سنجی باند در مقایسه با شرایط کنترل با کمک نرم افزار Scion lab انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از تأثیر عصاره انجیر بر کازئین نشان داد که در نسبت ۱/۱۰ و ۱/۱۰۰ (آنزیم به سوبسترا) در شرایط بافر فسفات در مدت زمان ۱، ۳ یا ۶ ساعت هیدرولیز کامل کازئین صورت گرفته و در نسبت ۱/۵۰۰، هیدرولیز نسبی صورت گرفت و همچنین ثابت گردید که سیستم بافری فسفات مناسب‌تر از سایر سیستم‌های بافری برای هیدرولیز کازئین است.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که آنزیم فیسین، کاندید مناسبی جهت تولید فرمول‌های شیر خشک حاوی کازئین هیدرولیز شده جهت کاربردهای تغذیه‌ای می‌باشد.

کلید واژه‌ها: فیسین، کازئین، انجیر، هیدرولیز

وصول مقاله: ۸۷/۷/۳ اصلاح نهایی: ۸۷/۸/۲۱ پذیرش مقاله: ۸۷/۸/۲۵

مقدمه

جنس فیکوس (Ficus) به طور تقریبی ۲۰۰ نوع مختلف از درختان مناطق حاره و معتدل را در بر می‌گیرد و یکی از بزرگترین جنس خانوادهٔ موراسه (Moraceae) است. یکی از مهمترین انواع فیکوس که در ایران انجیر تولید می‌کند نوع کاریکا (Carica) است (۱).

فیسین (EC3.4.22.3) به مجموعه آنزیم‌های پروتئولیتیک شیرابه (Latex) و میوه نارس درخت انجیر گفته می‌شود. فیسین دارای وزنی معادل ۲۵ کیلودالتون (۲) حاوی ۱۷۴ اسید آمینه است که ۲۱/۸ درصد آنها اسیدی، ۲/۵ درصد آنها قلیایی و ۷۹/۷

Archive of SID

www.SID.ir

درصد آنها خنثی هستند (۳). تاکنون از این آنزیم حدود ۱۰ ایزوآنزیم شناسایی شده است که تنها در نقطهٔ ایزوالکتریک (pI) با یکدیگر متفاوت‌اند (۴). نام آنزیم فیسین اولین بار توسط Walti A در سال ۱۹۳۸ برای آنزیم‌های جدا شده از شیرابه انجیر به کار رفت (۵). اطلاعات نشان می‌دهد که فیسین از نظر اختصاصی بودن سوبسترا، فعالیت استرازی، واکنشهای ترانس پپتیداسیون و فعال شدن با عوامل کاهنده، دارای خواص بسیار مشابه با سایر سیستئن پروتئازهای گیاهی از جمله پاپایین (EC3.4.22.2) است (۶,۷). فیسین در فرمول‌های برطرف‌کننده زگیل و میخچه و فرمولاسیون کرم‌ها جهت لطیف نمودن پوست (۸)، صنایع گوشت جهت تردکردن گوشت و تهیهٔ سوسیس و کالباس (۹)، تولید کیت‌های تعیین‌کنندهٔ Rh در بانک خون (۱۰) و همچنین صنایع صابون و چسب سازی کاربرد دارد (۱۱).

شیر حاوی مواد مغذی و با اهمیتی همچون پروتئین‌ها، کربوهیدراتها، چربی، نمک و دیگر مواد غذایی است (۱۲). در میان پروتئینهای شیر، کازئین، آلفا لاکتولبومین و بتا لاکتوگلوبولین نقش مهمتری را ایفا می‌کنند. این سه پروتئین به ترتیب حدود ۸۷-۸۰، ۵/۱ و ۸/۵ درصد محتوای پروتئینی شیر را تشکیل می‌دهند (۱۳,۱۴). کازئین نام پروتئینی ناهمگنی از میسل‌های پلی‌پپتیدی با وزن مولکولی ۳۶- ۲۶ کیلو دالتون است که در pH حدود ۴/۶ و در دمای ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد از شیر رسوب داده می‌شود. این پروتئین علاوه بر استفاده از pH اسیدی، به وسیلهٔ آنزیم رنت، تخمیر لاکتیکی به وسیلهٔ فعالیت لاکتیک باکتریها و اشباع نمودن با کلرید سدیم قابل جداسازی است. از میان فرآورده‌های تبدیلی شیر، کازئین جایگاه ویژه‌ای در صنایع دارد و در صنایع گوشتی، داروسازی، صنایع رنگ، پارچه بافی، کاغذ سازی و پلاستیک سازی کاربردهای متنوعی دارد (۱۴,۱۵).

در جوامع امروزی بسیاری از شیرخواران از شیر گاو به عنوان جایگزین شیر مادر استفاده می‌کنند. در جوامع مختلف در ۵ تا ۱۵ درصد از شیرخواران علائم عدم تحمل شیرگاو شامل خونریزیهای گوارشی و کاهش رشد دیده می‌شود. این نوزادان نسبت به پروتئین‌های شیر حساسیت داشته وسیستم ایمنی آنها نسبت به این پروتئین واکنش نشان می‌دهد (۱۶). از آنجایی که کازئین حدود ۸۷-۸۰ درصد وزن پروتئین‌های شیر گاو را تشکیل می‌دهد، بیشترین حساسیت و عدم تحمل نیز علیه این پروتئین دیده می‌شود. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که حساسیت به کازئین با پروتئین کامل و دست نخورده آن در ارتباط است و هیدرولیز این پروتئین می‌تواند میزان واکنش سیستم ایمنی به آن را کم نموده و مصرف آن توسط شیرخواران آلرژیک را امکان‌پذیر سازد. امروزه شیر خشک‌های هیدرولیز شده برای مصرف این افراد ساخته شده‌اند (۱۷). در این مطالعه تلاش شده است تا از پروتئازهای انجیر نارس جهت هیدرولیز کازئین شیرگاو استفاده شود. از آنجایی که کازئین بخش زیادی از پروتئینهای موجود در شیر را تشکیل می‌دهد، هضم کامل آن می‌تواند به تهیه شیر خشک غنی از اسیدهای آمینه‌های ضروری برای شیرخوران حساس به شیرگاو کمک نماید.

روش بررسی

عصاره‌گیری انجیر و تهیه سوبسترای کازئین:

انجیر نارس پس از شستشو و توزین، حدود ۵ دقیقه توسط مخلوط کن خرد گردید تا مخلوط همگن و

Archive of SID

www.SID.ir

یکنواختی حاصل شد. به ازای هر ۳۰ گرم انجیر آسیاب شده مقدار ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات نمکی (PBS) اضافه گردید. عصاره حاصل از چند لایه صافی پارچه‌ای عبور داده شد تا محلول شفافی حاصل گردید. محلول در دمای ۵ درجهٔ سانتی‌گراد در ۴۰۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و مایع رویی حاوی آنزیم جهت مراحل بعدی نگهداری گردید. در مواردی که از شیرابهٔ انجیر نیز به عنوان عصاره استفاده شد شیرابه پس از جمع‌آوری، در ۱۴۰۰۰×g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مایع زیرین به عنوان عصاره جمع‌آوری گردید. برای تهیهٔ سوبسترا، کازئین خالص سیگما را در بافرهای تریس ۵۰ میلی مولار (pH=۸/۵)، فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=۷)، سیترات ۵۰ میلی مولار (pH=۵/۵) و استات ۵۰ میلی مولار (pH=۴/۵) حل گردید و در غلظت نهایی یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری غلظت آنزیم و سوبسترا:

برای اندازه‌گیری غلظت عصاره انجیر از روش برادفورد که معرف آن شامل ۰/۱ گرم رنگ کوماسی G-۲۵۰، ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد، ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفوریک ۸۵ درصد در حجم نهایی یک لیتر بود، استفاده شد (۱۸).

برای اندازه‌گیری غلظت کازئین از روش UV (۱۹) به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر(APEL مدل PD303UV) استفاده شد. در این روش جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر، اندازه‌گیری و طبق فرمول زیر غلظت پروتئین محاسبه گردید:

غلظت پروتئین mg/ml:

(۰/۷۶×جذب نور در ۲۶۰ نانو متر) _ (۱/۴۴×جذب نور در ۲۸۰ نانومتر).

بررسی فعالیت پروتئازی فیسین بر کازئین شیر:

پس از مساوی نمودن غلظت آنزیم عصاره انجیر و سوبسترای کازئین، آن دو در نسبتهای حجمی مختلف آنزیم به سوبسترا مانند ۱/۱۰، ۱/۱۰۰، ۱/۵۰۰ و ۱/۱۰۰۰ در چهار سیستم بافری مختلف، شامل بافر تریس (۸/۵-pH=)، بافر فسفات (pH=۷)، بافر سیترات (pH=۵/۵) و بافر استات (pH=۴)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مخلوط شدند. مخلوط آنزیم و سوبسترا در زمانهای ۳، ۱ و ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از گذشت زمان مذکور، نمونه‌ها به روش SDS-PAGE که در بخش بعدی توضیح داده می‌شود، مورد بررسی قرار گرفت.

الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE):

جهت بررسی میزان هیدرولیز کازئین شیر توسط آنزیم فیسین موجود در عصارهٔ انجیر و تعیین وزن مولکولی اجزا از روش الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) در ژل جداکننده ۱۲/۵ درصد و ژل متراکم کنندهٔ ۵ درصد، تحت شرایط احیایی استفاده شد. در این آزمون ۴۰ میکرولیتر از نمونه با ۱۰ میکرولیتر از بافر نمونه (۵x) مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ ×g سانتریفوژ گردید. سپس ۱۵ میکرولیتر از نمونه درون هر چاهک ژل قرار داده شد و در ولتاژ ثابت ۱۵۰ ولت تفکیک پروتئین‌ها صورت گرفت. پس از اتمام الکتروفورز ژل با رنگ کوماسی R-۳۵۰ (فارماسیا) رنگ‌آمیزی شد. برای تعیین وزن مولکولی از پروتئین‌های با وزن مولکولی پایین (فارماسیا) استفاده شد. این پروتئین‌ها شامل فسفریلاز-بی، آلبومین گاوی، آلبومین مرغی، کربنیک

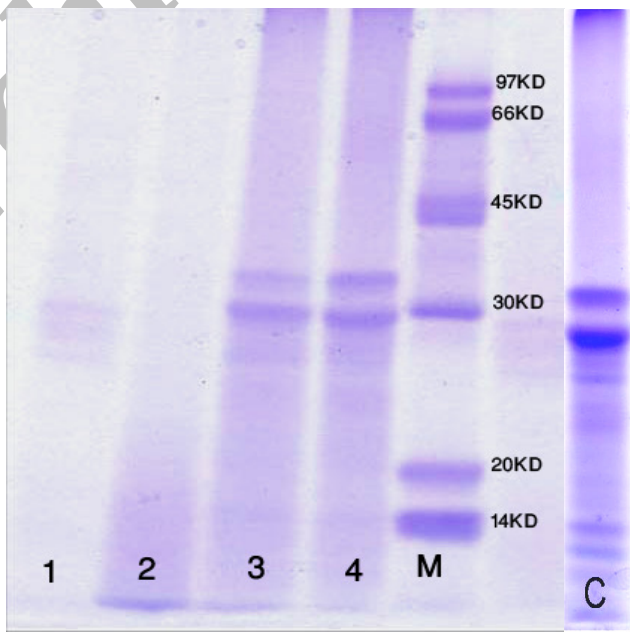
Archive of SID

www.SID.ir

انهیداز، مهارکنندهٔ تریپسین و آلفا لاکتالبومین با اوزان به ترتیب ۹۷، ۶۶، ۴۵، ۳۰، ۲۰/۱ و ۱۴/۴ کیلودالتون بود (۲۰). پس از الکترفورز و رنگ آمیزی ژل، تراکم و درصد باندهای پروتئین با کمک نرم افزار Scion lab مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند.

یافته‌ها

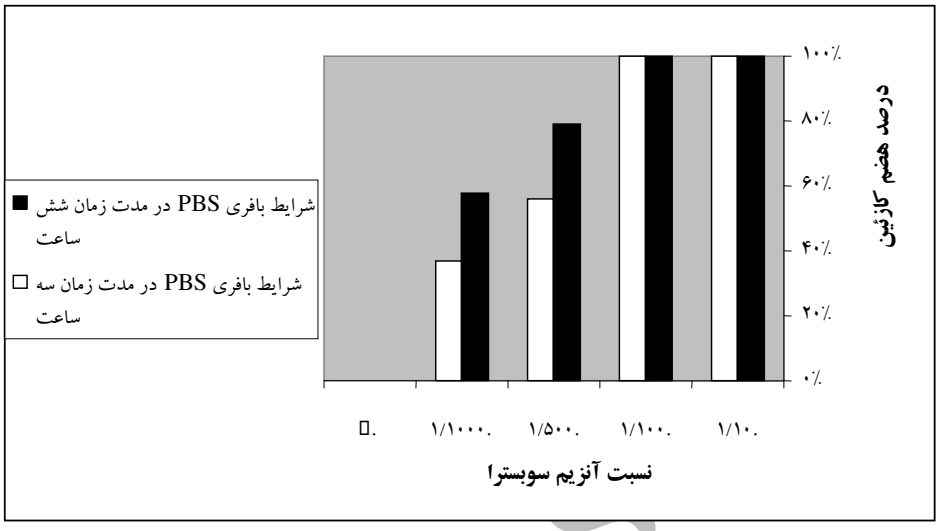
الکتروفورز نمونه‌های کازئین که تحت شرایط مختلف از نظر نسبت آنزیم به سوبسترا، نوع بافر و pH تحت تأثیر پروتئاز انجیر قرار گرفته‌اند در اشکال ۱ و ۲ نشان داده شده است. این نتایج بطور کلی حاکی از هیدرولیز کامل و نسبی کازئین در دو سیستم بافری، شامل بافر تریس (pH=۸/۵)، بافر فسفات (pH=۷)، هیدرلیز نسبی در بافر سیترات (pH=۵/۵) و عدم هیدرولیز کازئین در بافر استات (pH=۴/۵) است. با مقایسهٔ میزان هیدرولیز در دو سیستم بافری تریس (۸/۵-pH=) و بافر فسفات (pH=۷) توسط نرم افزار Scion Lab معلوم گردید مناسب‌ترین نوع بافر برای هیدرولیز کازئین با استفاده از آنزیم فیسین میوه انجیر بافر فسفات است. با تغییر زمان تأثیر آنزیم بر سوبسترا در این سیستم زمانهای ۱، ۳ و ۶ ساعت مورد آزمایش قرار گرفت. با تغییر نسبت آنزیم به سوبسترا در مدت زمان ۶ ساعت در سیستم بافری فسفات معلوم گردید که کازئین در دو نسبت ۱/۱۰ و ۱/۱۰۰ پس از این مدت به طور کامل و در نسبت‌های ۱/۵۰۰ و ۱/۱۰۰۰ به طور نسبی هیدرولیز می‌گردد (شکل ۱ و نمودار ۱). به علاوه، با تأثیر آنزیم فیسین بر کازئین در سیستم بافری فسفات در مدت زمان ۱و ۳ ساعت معلوم گردید که آنزیم در نسبت‌های ۱/۱۰ و ۱/۱۰۰ به سوبسترا، قادر بود کازئین را به طور کامل هضم نماید و در نسبت‌های بالاتر هیدرولیز نسبی صورت گرفت (شکل ۲).



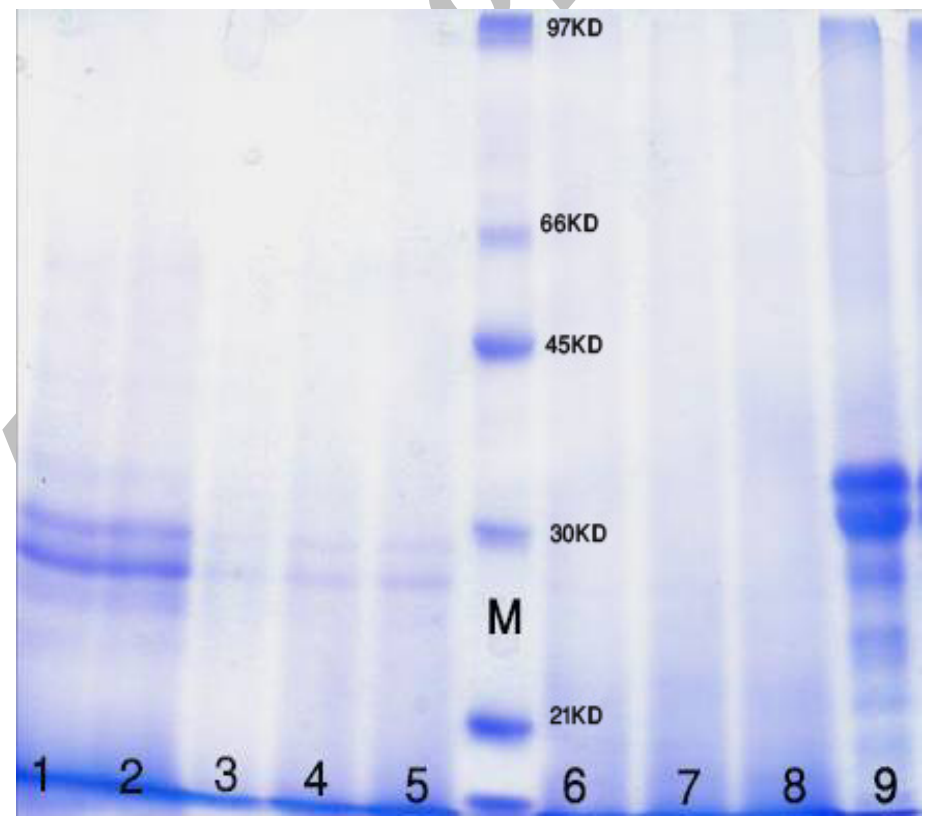
شکل ۱: الکتروفورز حاصل از هیدرولیز کازئین توسط فیسین میوه انجیر در بافر فسفات در مدت زمان ۶ ساعت. ستون ۱: نسبت ۱/۱۰، ستون ۲: نسبت ۱/۱۰۰، ستون ۳: ۱/۵۰۰، ستون ۴: ۱/۱۰۰۰، ستون C کنترل و ستون M نیز مارکرهای وزنی را نشان می‌دهد.

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۱: نتایج تراکم سنجی الکتروفورز کازئین در شرایط بافری فسفات در زمانهای ۳ و ۶ ساعت



شکل ۲: الکتروفورز حاصل از هیدرولیز کازئین توسط فیسین میوه انجیر بافر فسفات در مدت زمان یک ساعت. ستون۱و۲: الگوی عصاره ی انجیر، ستون های ۳ و ۶: نسبت ۱/۱۰، ستون های ۴ و ۷: نسبت ۱/۵۰، ستونهای ۵ و ۸: ۱/۱۰۰، ستون ۹ کنترل و ستون M نیز مارکرهای وزنی را نشان می‌دهد.

www.SID.ir

بحث

کازئین از فراوان‌ترین پروتئین شیرگاو است که حدود ۸۰ درصد پروتئین‌های آن را تشکیل می‌دهد (۱۴). این گلیکوپروتئین ارزش غذای فراوانی داشته و در صنایع غذایی و دارویی کاربردهای مختلفی دارد (۱۵-۱۲). با توجه به مشکل هضم کازئین در بعضی از افراد به خصوص شیرخواران و بروز واکنشهای آلرژیک به این پروتئین در درصد قابل توجهی از شیرخواران، هیدرولیز کازئین و تهیه فرمول‌های شیرخشک اهمیت خواهد داشت. مطالعات نشان داده است که هیدرولیز کازئین شیر می‌تواند روش مناسبی برای تهیه شیرخشک برای شیرخواران آلرژیک باشد. هیدرولیز کازئین با پروتئازها و مواد شیمیایی مختلف می‌تواند اپی‌توپ‌های آلرژیک کازئین را به قطعات کوچکتر شکسته و از واکنش سیستم ایمنی بدن با آن جلوگیری نماید (۲۱). تاکنون مطالعات مختلفی برای هضم کازئین انجام شده است. در مطالعه‌ای که توسط مدینا و همکاران انجام شده است از تری‌کلرو استیک اسید برای هیدرولیز کازئین استفاده شده است. تری‌کلرو استیک اسید یک ماده شیمیایی محرک بوده و به آسانی نمی‌توان آن را در تولیدِ فرآورده‌های انسانی مورد استفاده قرار داد (۲۲). در این مطالعه از پروتئازهای موجود در انجیر نارس استفاده شده است که به راحتی می‌تواند در فرآورده‌های خوراکی مورد استفاده قرار گیرد. در مطالعات دیگر تلاش شده است تا از آنزیمهای گوارشی تریپسین، کموتریپسین و پپسین به منظور هیدرولیز کازئین استفاده گردد (۲۵-۲۳). از آنجایی که منابع تهیه این پروتئازها محدود بوده و تخلیص آنها نیز زمان بر و پرهزینه است، نمی‌توان در مقیاس وسیع از آنها استفاده کرد. از دیگر مزایای استفاده از پروتئازهای انجیر در مقایسه با پروتئازهای پانکراس، تهیه آسان و ارزان بودن آن است که برای تهیه فرآورده‌های خوراکی از اهمیت فراوانی برخوردار است. در مطالعه اخیری که توسط باربوسا و همکاران انجام شده است از آنزیم پاپائین برای این منظور استفاده شده، که نتایج بهتری نسبت به بقیه داشته است (۲۶). آنزیم پاپائین از دسته سیستئین پروتئازها بوده و از لحاظ ساختاری شباهت زیادی به فیسین دارد. از مزایای پروتئازهای انجیر به پاپائین می‌توان به ارزان بودن و در دسترس بودن آن مخصوصاً در کشور ایران اشاره نمود.

در مطالعه حاضر فراکسیونی از عصاره انجیر نارس که غنی از آنزیم فیسین بود، جهت هیدرولیز کازئین در شرایط مختلف مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که اشاره شد آنزیم فیسین عضوی از خانواده سیستئین پروتئازهاست و از نظر ساختمان و عملکرد تشابه فراوانی با پاپائین دارد (۶,۷) ولی تاکنون برای هیدرولیز کازئین از آن استفاده نشده است. نتایج این مطالعه نشان داد که فیسین قادر است در شرایط بافری فسفات، در مدت زمان ۶ ساعت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در دو نسبت ۱/۱۰ و ۱/۱۰۰ کازئین را به طور کامل و در نسبت‌های ۱/۵۰۰ و ۱/۱۰۰۰ به صورت نسبی هیدرولیز کند.

نتیجه‌گیری

مقایسه نتایج حاصل از استفاده از این آنزیم در مطالعه حاضر و دیگر مطالعات مشابه نشان می‌دهد که فیسین گزینه مطلوب‌تری جهت هدف مورد نظر بوده و هضم کازئین با این آنزیم در مقیاس کم یا زیاد امکان‌پذیر است. بعلاوه در این مطالعه مشخص گردید که انجیر نارس به دلیل محتوای بالای فیسین و تشابه الگوی الکتروفورز عصاره آن با فیسین نیمه خالص

Archive of SID

www.SID.ir

شرکت سیگما، به صورت مستقیم و بدون نیاز به تخلیص آنزیم، به هدف هضم کازئین و یا پروتئین‌های دیگر قابل استفاده است. به طور کلی از مزایای استفاده از پروتئازها انجیر نارس می‌توان ارزان بودن، در دسترس بودن، قدرت بالای هضم کازئین و قابل استفاده بودن در فرآورده‌های خوراکی اشاره نمود. در این مطالعه برای اولین بار از پروتئازهای انجیر برای هضم کازئین شیر گاو استفاده شده و در صورت تکمیل اطلاعات می‌تواند گامی مؤثر جهت معرفی یک پروتئاز مناسب گیاهی بدون نیاز به تخلیص و با خطر آلودگی کمتر نسبت به پروتئازهای حیوانی، در تولید فرمول‌های شیر حاوی کازئین هیدرولیز و یا غذاهای مکمل باشد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از آقای شهرام پروانه و خانمها مریم چلبی و فریبا قنبری همکاران محترم مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی به خاطر کمک فنی و علمی در انجام این مطالعه.

References

1. Rajabi O, Varasteh AR, Danaye Baghaki J, Baratian A, Jahangiri L. Extraction and discrimination between four Proteases from Khorasan's native fig tree “Ficus Carica”. Journal of Birjand University of Medical Sciences, 2004; 11: 11-20.
2. Ryan CA, Simmons MW. Stumpf PK, Conn EE. A comprehensive treatise proteins and nucleic acids. Biochemistry of plants, 1981; 5: 321-323.
3. Pyoung KJ, Sin SJ, Sook KJ. Isolation and purification from fig latex. Han 'guk Sikp 'um Kwahakhoechi.1986; 18: 270-70.
4. Mamoru S, Masanori S. Proteinases from Ficus Carica var Horaishi V Purification and properties of a sugar containing Protein (Ficin S). Biochem and Biophys; 1974; 350: 38-47.
5. Englund PT, King TP, Craig LC. walti A. Ficin (I); It's isolation and characterization. Biochemistry 1968; 7: 163-175.
6. Glazer AN, Smith EL. In Boyer PD. (ed). The Enzymes, 3rd. New York: Academic Press, 1971; 502-546.
7. Smith EL, Kimmel JR. In Boyer PD, Lordy H, Myrback K. The Enzymes, New York; Academic Press. 1960; p. 133.
8. Judd WJ, Steiner EA, Knafl PC, Masterc C. The gel test: use in identification of unexpected antibodies to blood group antigens. J Immunohematol. 1998; 14: pp. 59-62.
9. Solvey VI, Korsakov VZ. Enzyme activity of ficin from different sources and their effect meat. Biochimestry Microbiol. 1974; 7: 189-95.
10. Hemmatzade F, Fatemi A, Amini F. Therapeutic effect of fig Tree latex on Bovin papilomatosis. J Vet Med. 2003 ; 50: 473-76.
11. Mamoru N, Akikatsu K. Blending vinyl chloride resin, past dispersion comprising such blending vinyl chloride resin and molded articles prepared from it. Eur Pat Apppl. 1980; 19: 404-406.
12. Mier MP, Ibanez R, Ortiz I. Influence of process variables on the production of bovine milk casein by electrodialysis with bipolar membranes. Bioche Engine J. 2008; 40: 304-311.
13. Poorpak Z, Mostafaie A, Hasan ZM and Kardar Gh. A laboratory method for purification of major cow's milk allergens. J Immuonoass Immunoch 2004; 25: 385-397.
14. Fox PF, Brodkorb A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. Int Dairy J. 2008; 18: 677-684.
15. Mier MP, Ibanez R, Ortiz I. Influence of process variables on the production of bovine milk casein by electrodialysis with bipolar membranes. Biochem Engine J. 2008; 40: 304-311.
16. Host A. Frequency of cow's milk allergy in childhood. An Allergy Asthma Immunol. 2002; 89:33-37.
17. Chirico G, Gasparoni A, Ciardelli L, De Amici M, Colombo A, Rondini G. Immunogenicity and

Archive of SID
www.SID.ir

antigenicity of a partially hydrolyzed cow's milk infant formula. Allergy. 1997; 52:82-88.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248-254.
19. Roe S. Protein Purification Techniques (2nd ed), Weimer, Texas. Oxford University Press 2001; p. 28-32.
20. Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**.** Nature 1970; 227: 680-685.
21. Sampson HA, Somalainen H. Development of Cow's milk allergy in breast-fed infants. Clin Exp Allergy. 2001; 31: 978-987.
22. Medina P, Baresi L. Rapid identification of gelatin and casein hydrolysis using TCA. J Microbiol Methods. 2007; 69: 391-393.
23. Rongxin Su, Zhimin He, Wei Qi. Pancreatic Hydrolysis of bovine casein Changes in the aggregate size and molecular weight distribution. Food Chemistry. 2008; 107: 151-157.
24. Sharma SH, Teotia S, Gupta MN. Bioconversion in an aqueous two-phase system using a smart biocatalyst: casein hydrolysis by alpha- chymotrypsin derivative. Enzyme Microbial Technol. 2003; 32: 337-339.
25. Spies JR, Ann Stevan M, Stein WJ, Coulson EJ. The chemistry of allergens XX. New antigens generated by pepsin hydrolysis of bovine milk proteins. Journal of Allergy. 1970; 45: 208-219.
26. Barbosa CMS, Morais HA, Delvivo FM, Mansur HS, De Oliveira MC, Silvestre MPC. Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres. J Sci Food Agric. 2004; 84: 1891-1900.

Archive of SID

www.SID.ir