فصل أجزاء كازين حليب الجاموس ودراسة فعاليتها المضادة للأكسدة

نجلاء حسين صبر
كلية الزراعة- جامعة البصرة

الخلاصه :

اختبرت فعالية ثلاثة اجزاء كازين(α_s وβ و κ) بعد عملية فصلها من حليب الجاموس المحلي كمضادات لاكسدة وبطريقتين هما قياس الفعالية المضادة لاكسدة حامض اللينوليك وبتا . راكيز (2 , 4 , 6 , 8 و 10) (ملغم/م .ل) وقياس فعا . . الية ربط ايون الحديد . ديك وبتراكيز (0.3 , 0.6 , 0.9 , 1.2و 1.5) (ملغم/م .ل) لجزء الكازيني.

تبين زيادة في الفعالية المضادة للاكسدة مع زيادة التراكيز لجميع الاجزاء(α_s وβ وκ) كازين وقد اظهر (α_s) فعالية اعلى مقارنة ب(β) عند جميع التراكيز بينما كانت فعاليته اعلى مقارنة ب(κ) عند التراكيز(4, 6, 8, 10) (ملغم/مل).

كما سجلت جميع الاجزاء قابلية ربط لايون الحديديك مع زيادة التراكيز وسجل (α_s) كازين قابلية ربط اعلى من (βوκ) عند التراكيز (0.9 , 1.2 و 1.5) (ملغم/مل) إذ وصلت إلى 52% في التركيز الاخير.

المقدمه:

تعد اكسدة الدهون من اهم المشاكل التي تواجه تصنيع وخـزن الاغذيـة وخاصة المحتوية منها على الاحماض الدهنية غير المشبعة.

وتنتج من اكسدة الدهون الجذور الحرة التي تتفاعل مع الاوكسجين مكونة البيروكسيدات الحلقية التي تتحلل بدورها الى الالديهايدات وبعض الكيتونات قصيرة السلسلة التي تؤثر بالنكهة والطعم والقيمة الغذائية(7).

وتسبب اكسدة الدهون ايضا الإصابة بالعديد مـن الامـراض السـرطانية وامراض القلب والسكتة الدماغية نتيجة تكـون الجـذور الحـرة كجـذور سوبراوكسايد ($O^{\cdot}_2$) وجذور الهيدروكسيل (OH^-) وغيـر الحـرة مثـل بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) التي تسبب اضـررا للحـامض النـووي DNA (4).

تستخدم حاليا العديد من مضادات لكسدة الدهون وعلى النطـاق التجـاري التي تعمل على ايقاف سلسلة تفاعلات اكسدة الدهون في الاغذية بارتباطهـا مع الجذور الحرة المتكونة التي تعد ضرورية لتكوين البيروكسيدات ويكـون بعض منها طبيعيا مثل التوكوفيرول Tocopherol(فيتامين E) وهي ذات كلفة مادية عالية وبعضها الاخـــر صناعـــيا مثل BHT(Butylated Hedroxy Toluene) وBHA (Butylated Hydroxy Anisole) وPG (Propyl Galate)(13).

وكانت هنالك اشارات من الباحثين في السنوات الاخيرة وهي ان استخدام هذه المضادات ينتج عنها مواد مسرطنة او سمية(12 ;13). لذا كان الاتجاه

نحو إيجاد مضادات اكسدة امينه ورخيصة التكلفة مثل البروتينات المشتقة من الالبان.

وجد (1)ان فعالية كازين حليب الابقار كمضاد اكسدة اعلى من فعالية الشرش وعند تراكيز متشابهه وقد اعزى ذلك الى قيام phosphoryl على مواقع جسيمات الكازين بحجز معادن النحاس والحديد.

واوضح (3)ان بروتينات الشرش تهب الهيدروجين لتختزل بذلك الجذور الحرة اضافة الى ان مجاميع السلفا هايدريل الحرة الموجودة في الحامض الاميني Cysteine ذات فعالية عالية في تثبيط الاكسدة الذاتية للدهون.

وبين (17)ان فعالية حليب الخض المجفف Butter Milk Salt كمضاد للاكسدة عند 0.1 و 0.2 تركيز تثبيط لاكسدة الدهون بمقدار 56 % و 61 % على التوالي وتعود إلى زيادة الفعالية النسبية للاختزال لزيادة محتوى السلفا هيدريل.

واستخدمت عدة طرق لمعرفة ميكانيكية مضادات الاكسدة في الانظمة النموذجية منها فعالية المواد لاقتناص الجذور الحرة Free radical scavauging وطريقة سعة امتصاص جذور الاوكسجين Oxygen Radical Absorbance capacity وطريقة اقتناص الجذر الموجب وقابلية ربط العناصر المعدنية مثل ايون الحديديك والنحاسيك (9).

وتهدف الدراسة الحالية بيان فعالية اجزاء كازينات حليب الجاموس (α_s و β و K) كازين كمضادات اكسدة وامكانية استخدامها في التصنيع الغذائي كبديل لمضادات الاكسدة الصناعية.

المواد وطرائق العمل :

المواد Materials:

جهز حليب الجاموس من محطة البحوث الزراعية/ جامعة البصرة ولن جميع المواد المستخدمة من النوع التحليلي وكذلك الماء المقطر.

طرائق العمل Methods:

١- تحضير الكازين Casein preparation

اجريت عملية فصل الكازين من حليب الجاموس حسب الطريقة التي اوردها (10) .

٢- اتبعت طريقة (20)لإجراء التنقية الاولية لبروتين (α_s) كازين من الكازين الحمضي.

٣- تمت التنقية الاولية للبيتا- كازين من الكازين الحامضي باستخدام طريقة (2).

٤- استخدمت طريقة (20) لتنقية الكابا- كازين من الكازين الحامضي.

٥- قياس الفعالية المضادة للاكسدة Measurement of Antioxidative activity اتبعت طريقة (6) لقياس الفعالية المضادة لاكسدة حامض اللينوليك وكما يلي:١- خلط (2 , 4 , 6 , 8 و10) مل من α_sو βو κ كازين و BHT مع 4 مل ايثانول تركيزه (95 %) و 4.1 مل من حامض اللينوليك المجهز من شركة Fluka الالمانية تركيزه (2.5 % في الايثانول) و 8 مل من محلول دارئ الفوسفات (0.5 مولاري pH 7) و 3.5 مل ماء مقطر حضن الخليط في دوارق محكمة بدرجة 40°م في الظلام لمدة 24سـ اعة. ، 2- اضيف 0.1 من هذا

الخليط الى 9.7 مل ايثـــانول (75 %) و 0.1 مـــل مـــن ثايوســـيانات الامونيوم (30 %) تم اضـ . يـ . فـ 0.1 مل من كلوريد الحديـــدوز (20 ملي مولاري يحضر في 35 % حامض الهيـــدروكلوريك) الـــى خليط التفاعل. حضر نموذج العينة الضـــابطة control،3- قيســت الامتصاصية للنماذج عند طول موجي 500 نانومتر باستخدام جهـــاز المطياف الضـــوئي LKB Spectrophotometer ،.4- حســبت الفعالية المضادة للاكسدة حسب المعادلة التالية:-

$$\text{الفعالية المضادة للاكسدة } \% = 100 - \left[\frac{\text{الامتصاصيه للعينه}}{\text{الامتصاصية للعينة الضابطة}} \right] \times 100$$

٦- قيـــاس قابليـــة ربـــط ايـــون الحديـــديك chelating of ferric ion

استـ خدمـــ ت طريـــ قة Wang et. al., (2003) لقيـ . اس قابـ . لية ربط ايـ ون الحديديك وكما يلي:- خلط (0.3 , 0.6 , 0.9 , 1.2 و 1.5) مل من (α_s و β و K) كازين و EDTA مع 0.2 مل من كبريتات الحديـــديك (0.5 ملـــي مـــولاري) و 0.2 مـــل مـــن الحديدوز (5 ملي مولاري) حضن المزيج على درجـــة حـــرارة 37 م لمدة 10 دقيقة تم اضيف 1.5 مل مـــن المـــاء المقطـــر تـــم قيســت الامتصاصية عند طول موجي 562 نانومتر

حسبت النسبة المئوية لربط ايون الحديديك حسب المعادلة التالية:-

$$\text{قابلية ربط ايون الحديديك \%} = 100 - \left[\frac{\text{الامتصاصية للعينة}}{\text{الامتصاصية للعينة الضابطة}} \right] X\ 100$$

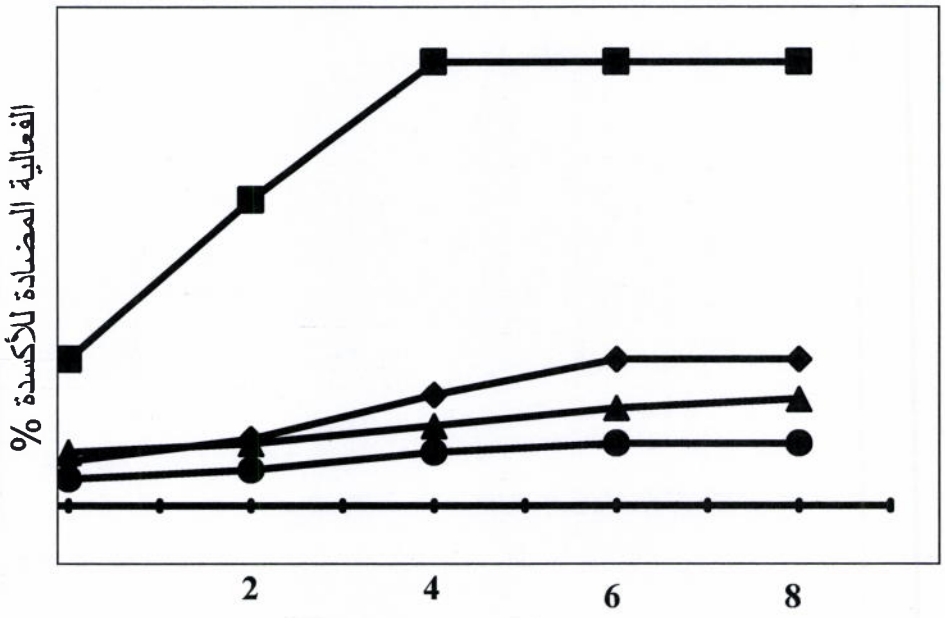
<u>النتائج والمناقشة :</u>

تم الحصول على ثلاث اجزاء لكازين حليب الجاموس وهي (α_s− كازين) و(β - كازين) و (K- كازين) استخدمت هذه الاجزاء كمضادات لاكسدة للدهون وذلك من خلال الفعالية المضادة للاكسدة وقياس فعاليتها لربط ايون الحديديك وكانت النتائج المستحصل عليها كالاتي:-

١- الفعالية المضادة للاكسدة:

يمثل الشكل (1) تطور الفعالية المضادة للاكسدة لحامض اللينوليك بفعل اجزاء الكازين (α_sوβو K) كازين .

BHT



α_s

κ

β

شكل (1): الفعالية المضادة للاكسدة لبروتينات الكازين بالمقارنة مع BHT

يوضح الشكل بشكل عام حصول زيادة في الفعالية المضادة للاكسدة ولجميع اجزاء الكازين (α_s وβ و κ) وقد اظهر الفا- كازين فعالية اعلى مقارنة بالبيتا- كازين وعند جميع التراكيز بينما كانت فعاليته اعلى مقارنة بالكابا- كازين عند التراكيز (4 و6 و8 و10)(ملغم/ مل). وبلغت اقصى فعالية 33 % عند التركيزين (8 و10) (ملغم/ مل) بينما كانت ادنى فعالية عند التركيز(2 ملغم/ مل).

وسجلت اجزاء الكازين الثلاثة (α_s وβ و κ) اعلى فعاليتها عند التركيزين (8 و10)(ملغم/ مل). ومن جانب اخر فان فعالية المضاد الصناعي BHT(Butylated Hydroxy Toluene) قد فاقت جميع اجزاء الكازين وعند جميع التراكيز المدروسة ولاسيما عند التراكيز(6 و8 و10) (ملغم/ مل) اذ وصلت الى 100 %.

ويعزى الاختلاف في فعالية اجزاء الكازين الى التباين في نسبة المجاميع الفوسفاتية التي تتواجد بشكل phosphormonosters ومرتبطة بالحامض الاميني Serine. اذ تحتوي الفا- كازين على 92% مقارنة بالبيتا- كازين والكابا- كازين 62% و17% على التوالي. اذ تساهم هذه المجاميع باعطاء بروتون الى الجذور الحرة(15 ; 10).

وبالنسبة لتفوق الكابا- كازين على البيتا- كازين في فعالية الاكسدة فيعزى الى احتواء الاول على مجموعة كبيرة من السلفا هيدريل بشكل Cystein التي تساهم في تنشيط الاكسدة الذاتية للدهون(5).

ويتفق هذا مع ما توصل اليه عدد من الباحثين الاخرين (14; 8).

٢-فعالية ربط ايون الحديديك:

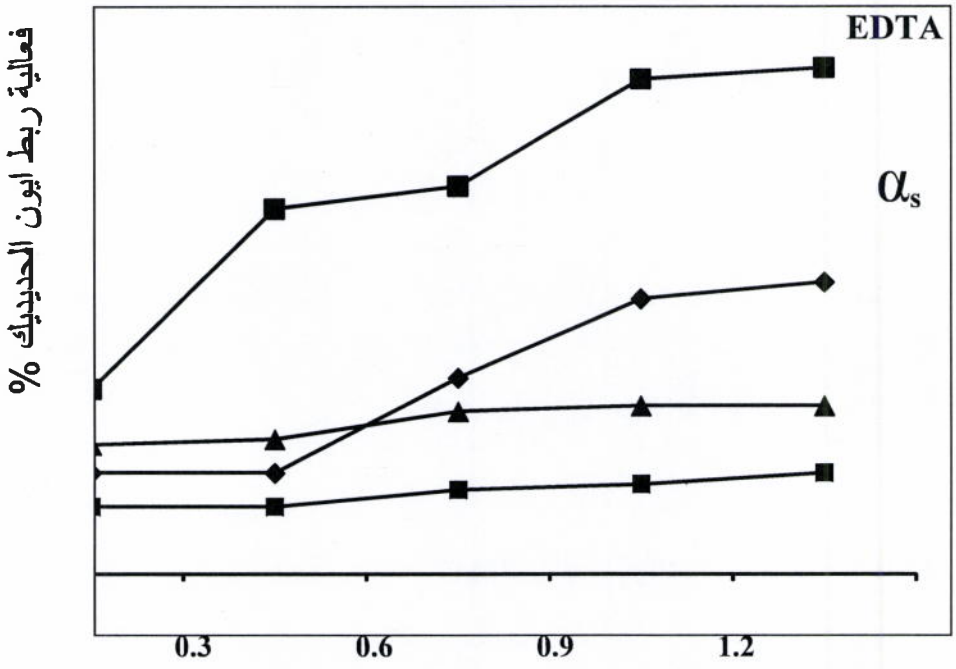
تعمل المستويات الضئيلة للمعادن كالحديد والنحاس في الاغذية كعوامل مساعدة لانتاج جذور الهيدروكسيل التي بدورها تعمل على اكسدة الدهون ويمكن تاخير هذه الاكسدة من خلال حجز تلك المعادن.

يوضح الشكل (2) قابلية اجزاء الكازين (α_s وβ و K) كازين لربط ايون الحديديك وعند جميع التراكيز المستخدمة مقارنة مع مضاد الاكسدة (الاثيلين ثنائي امين حامض الخليك (Ethylene Diamine (EDTA) Tetra Acetic acid).

سجل الكابا- كازين اعلى قابلية عند التركيزين 0.3 و0.6 (ملغم/ م ل) وبلغت 23% و24% على التوالي مقارنة بالفا- كازين والبيتا- كازين.

كما بين الشكل ايضا ان الالفا- كازين قابلية ربط اعلى من الكابا والبيتا- كازين عند التراكيز 0.9 و 1.2 او 1.5 اذ وصلت الى 52% في التركيز الاخير.

وبالمقابل اظهرت مادة الربط EDTA قابلية ربط اعلى من جميع اجزاء الكازين وعند جميع التراكيز المدروسة.



شكل (2): فعاليه ربط ايون الحديديك لبروتينات الكازين بالمقارنه مع EDTA

اوضح Mc Mahon& Brown(1984) ان لاجزاء الكازين المحتوية على مجاميع Phosphoseryl Serine قدرة على ربط الحديد واضاف Hekmat& Mc Mahon(1998) ان مجموعة الكاربوكسيل في الاحماض الامينية مثل الاسبارجين والكلوتامين لها القابلية على ربط جيد لايون الحديد. كما ويتفاعل ايون الحديدوز مع الاوكسجين لتكوين سوبر اوكسايد (O_2^-) والذي يفقد الكترونا لتكوين جذر الالكوكسايد (O_2) او يكسب بروتونا لتكوين جذر البيروكسيل(HO_2) ثم يتفاعل الاخير مع جزيئة دهن لتكوين الهيدرو بيروكسايد، من خلال اكتساب البيروكسيل بروتوناً ويتحول الى بيروكسيد الهيدروجين (Yen et. al., 1999).

وتعمل مضادات الاكسدة المتمثلة باجزاء الكازينات على تكوين معقدات مع الايونات Fe^{+2} و Fe^{+3} و Cu^{+2} هذه المعقدات ليس لها فعالية لكسدة Proxidative activity ويستدل من ذلك ان لاجزاء الكازين قدرة ربط الايونات المعدنية التي تسهم في التاثير المضاد لاكسدة حامض اللينوليك.

يتضح ان فعالية (α_s-كازين) المضادة للاكسدة اعلى من(κ-كازين) و(β-كازين) ويعود ذلك للفعالية النسبية للاختزال والقدرة على ربط ايون الحديديك واللذان يساهمان في تثبيط الاكسدة الذاتية للدهون وبالتالي يمكن اعتبارها مضادات اكسدة طبيعية بديلة للمضادات الصناعية.

:References

1- Allen, J.C. and Wrieden, W.L., (1982). Influence of milk proteins on lipid oxidation in aqueous emulsion. 1. Casein, whey protein and lactolbumine. J. Dairy Res.; 49: 239-248.

2- Aschaffenburg, R.,(1963). Preparation of β- casein by a modified urea fractionation method. J. Dairy Res.; 30: 359.

3- Colbert, L.B. and Decker E.A., (1991). Antioxidant activity of an ultra filtration permeate from acid Whey. J. Food Sci.; 56: 1248-1250.

4- Halliwel, B.; Antonia, M.; Chirico, S. and Aruoma, O.,(1992). Free radical and Antioxidant in food in viva. Food Sci. Nutr.; 35: 7-20.

5- Hekmat, S. and Mc Mahon D.J., (1998). Distribution of iron between casein sand whey proteins in acidified milk. Lebensm. Wiss. Technol.; 31: 632.

6- Hung, D.J.; Lin, C.D.; Chen, H.J. and Lin, Y.H., (2004). Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (Ipomoea batatas (L.) Lann Tainong 57) constituents. Bot. Bull. Acad. Sin.; 45: 179- 186.

7- Moreno, C.S.; and Larrauri, J.A., (1999). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines grape julces and related poly phenolic constituents. Food Res. Int.; 32: 407- 412.

8- Mc Mahon, D.J. and Brown. J., (1984). Composition structure, and intergrity of casein micelles. A review. J. Dairy Sci.; 67: 492- 512.

9- Moreno, C.S., (2002). A review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. Food Sci. Tech nol. Int.; 8, (3): 121- 137.

10- Nagasawa, T.; Rycki, T.; Kiyosow, T. and Knwahara. K., (1967). Studies on human casein fractionstion of human casein by diethyl amino ethl cellose colum Chromatography, Archives biochemistry and biophysis.; 12: l 12: 16

11- Nagasawa, T.; Kiyosow, T.; Knwahara. K. and Gangali, N.C., (1972). Fractionation of buffalo milk casein by acryl amide gel electrophoreses and DEAE. Cellulose colum chromatography. J. Dairy Sci. ;56: 61- 65.

12- Panichayu pakaranant, P. and Kaewsuwan, S.,(2004). Bioassay- guided isolation of the antioxidant constituent from Cossia alata. J. Sci. Technol.; 26(1): 103- 107.

13- Salvin, J., (2003). Antioxidants and caner. Proc. Nutr. Soc., 62(1): 129- 134.

14- Taylor, M.J.and Richardson T., (1980). Antioxidant activity of skin milk: Effect of heat resultant sulfhy dryl groups. J. Dairy Res.; 63:1783- 1795.

15- Thompkinson, D.K.; and Mathur. B.N., (1989). Effect of butter milk solids and methyl siloxane on the oxidative stability of lipids in a PUFA. Rich infant formula. Ind. J. Dairy Sci.; 42: 391- 393.

16- Wang, L.; Yen, J.; Liang, H. and Wu. M., (2003). Antioxidant effect of methanol extracts from lotus plumule and blossom (Nelumb nicifera Gertn). J. Food and Dairy analysis.; 11: 60- 66.

17- Wong, P.Y.Y. and Kitts. D. D., (2003). Chemistry of Butter milk Solid Antioxidant activity. J. Dairy Sci.; 86: 1541- 1547.

18-Yen, G.C.; Chen, H.Y. and Lee, C.E., (1999). Measurement of antioxidative activities in metal ion.

induced lipid Peroxidation systems. J. Sci. Food Agri.; 79: 1213- 1217.

19- Zittle, C..; Cerbulis J.; Perpper L. and Dellamonica. E.S., (1959). Preparation of calcium sensitive α- casein. J. Dairy Sci.; 42: 1997.

20- Zittle, C. and Custer. J.H., (1963). Indemtification of the κ- casein among the component of Whole goat milk. . J. Dairy Sci.; 4, :49: 788.

Separation of buffalo's milk casein parts and study their antioxidative activity

Najla H. Saper
College of Agriculture
University of Basrah

Abctract:

After separation of Three fraction of casein (α_s , β and κ) from buffalo's milk, testing were taken upon their activity antioxidation by measured the activity of antioxidative to linolic acid with conc.(2,4,6,8 and 10) mg/ml. And measured the link's activity of ferric ion with conc. (0.3, 0.6, 0.9,1.2 and 1.5) mg\ml.

The antioxidants activity showed increased with concentration to all casein fraction (α_s , β and κ). (α_s- casein) was higher than (β- casein) in all concentration and highest than (κ- casein) in conc. (4, 6, 8 and10) mg/ml only.

All the fractions had the ability of chelating of ferric ion when the concentration raised. (α_s- casein) indicated highest ability than (β and κ) at the (0.9, 1.2 and1.5) mg/ml. It was 52% at the last concentration.