فصل أجزاء كازين حليب الجاموس ودراسة فعاليتها

المضادة للأكسدة

نجلاء حسين صبر

كلية الزراعة – جامعة البصرة

الخلاصة:

اختبرت فعالية ثلاثة أجزاء كازين (a_s و ß و k) بعد عملية فصلها من حليب الجاموس المحلي كمضادات أكسدة وبطريقتين هما قياس الفعالية المضادة لأكسدة حامض اللينوليك وبتراكيز (٢،٤،٦،٨،١٠) (ملغم/ مل) وقياس فعالية ربط ايون الحديديك وبتراكيز (٠,٠٣،٠,٠٦،٠,٠٩،٠,٢،١,٥،١,٩) (ملغم / مل) لجزء الكازيني.

تبين زيادة في الفعالية المضادة للأكسدة مع زيادة التراكيز الجميع الأجزاء (a_s و ß و k) كازين وقد اظهر (a_s) فعالية أعلى مقارنة ب (ß) عند جميع التراكيز بينما كانت فعاليته أعلى مقارنة ب (K) عند التراكيز (٤،٦،٨،١٠)(ملغم / مل).

كما سجلت جميع الأجزاء قابلية ربط لايون الحديديك مع زيادة التراكيز وسجل (a_s) كازين قابلية ربط أعلى من (kوß) عند التراكيز (٠,٩،١,٢،١,٥) (ملغم / مل) إذ وصلت إلى ٥٢% في التركيز الأخير.

المقدمة:

تعد أكسدة الدهون من أهم المشاكل التي تواجه تصنيع وخزن الأغذية وخاصة المحتوية منها على الأحماض الدهنية غير المشبعة.

وتنتج من أكسدة الدهون الجذور الحرة التي تتفاعل مع الأوكسجين مكونة البيروكسيدات الحلقية التي تتحلل بدورها الى الالديهايدات وبعض الكيتونات قصيرة السلسلة التي تؤثر بالنكهة والطعم والقيمة الغذائية (٧).

وتسبب أكسدة الدهون أيضاً الإصابة بالعديد من الأمراض السرطانية وأمراض القلب والسكتة الدماغية نتيجة تكون الجذور الحرة كجذور سوبر اوكساید (O_2) وجذور الهيدروكسيل (OH^-) وغير الحرة مثل بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) التي تسبب أضراراً للحامض النووي DNA (٤).

تستخدم حالياً العديد من مضادات أكسدة الدهون وعلى النطاق التجاري التي تعمل على ايقاف سلسلة تفاعلات أكسدة الدهون في الاغذية بارتباطها مع الجذور الحرة المتكونة التي تعد ضرورية لتكوين البيروكسيدات ويكون بعض منها طبيعياً مثل التوكوفيرول Tocopherol (فيتامين E) وهي ذات كلفة مادية عالية وبعضها الآخر صناعياً مثل BHA (Butylated Hydroxy Anisole) BHT(Butylated Hydroxy Toluene) PG (Propyl Galate)(13).

وكانت هنالك اشارات من الباحثين في السنوات الاخيرة وهي أن استخدام هذه المضادات ينتج عنها مواد مسرطنة او سمية (١٢؛١٣).لذا كان الاتجاه

نحو إيجاد مضادات أكسدة أمينه ورخيصة التكلفة مثل البروتينات المشتقة من الالبان.

وجد (١) 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.

وأوضح (٣) ان بروتينات الشرش تهب الهيدروجين لتختزل بذلك الجذور الحرة اضافة الى أن مجاميع السلفا هايدريل الحرة الموجودة في الحامض الاميني Cysteine ذات فعالية عالية في تثبيط الاكسدة الذاتية للدهون.

وبين (١٧) ان فعالية حليب الخض المجفف Butter Milk Salt كمضاد للاكسدة عند ٠,١ و ٠,٢ تركيز تثبيط أكسدة الدهون بمقدار ٥٦ % و ٦١% على التوالي وتعود إلى زيادة الفعالية النسبية للاختزال لزيادة محتوى السلفا هيدريل.

واستخدمت عدة طرق لمعرفة ميكانيكية مضادات الأكسدة في الانظمة النموذجية منها فعالية المواد لاقتناص الجذور الحرة Free radical scavauging وطريقة سعة امتصاص جذور الأوكسجين Oxygen Radical Absorbance capacityوطريقة اقتناص الجذر الموجب وقابلية ربط العناصر المعدنية مثل ايون الحديديك والنحاسيك (٩).

وتهدف الدراسة الحالية بيان فعالية اجزاء كازينات حليب الجاموس (as و ß وk) كازين كمضادات أكسدة وامكانية استخدامها في التصنيع الغذائي كبديل المضادات الأكسدة الصناعية.

المواد وطرائق العمل:

المواد Materials:

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

طرائق العملMethods :

١-تحضير الكازينCasein preparation

أجريت عملية فصل الكازين من حليب الجاموس حسب الطريقة التي أوردها (١٠).

٢-اتبعت طريقة (٢٠) لإجراء التنقية الأولية لبروتين (a_s) كازين من الكازين الحمضي.

٣-تمت التنقية الأولية للبيتا - كازين من الكازين الحامضي باستخدام طريقة (٢).

٤ -استخدمت طريقة (٢٠) لتنقية الكابا - كازين من الكازين الحامضي.

٥- قياس الفعالية المضادة للأكسدةactivity Measurement of Antioxidative اتبعت طريقة (٦) لقياس الفعالية المضادة لأكسدة حامض اللينوليك وكما يلي: ١- خلط ٢،٤،٦،٨ و ١٠ مل من و(K كازين و BHT مع ٤ مل أيثانول تركيزه (٩٥%) و ٤,١ مل من حامض اللينوليك المجهز من شركة Fluka الألمانية تركيزه (٢,٥% في الايثانول) و ٨ مل من محلول دارئ الفوسفات (٠,٥) مولاري (٧ pH و ٣,٥ مل ماء مقطر حضن الخليط في دوارق محكمة بدرجة ٤٠ م في الظلام لمدة ٢٤ ساعة ، -٢ اضف ٠,١ من هذا

الخليط الى ٩,٧ مل ايثانول (٧٥%) و ٠,١ مل من ثايوسيانات الأمونيوم (٣٠) ثم اضيف ٠,١ مل من كلوريد الحديدوز (٢٠) ملي مولاري يحضر في ٣٥% حامض الهيدروكلوريك الى خليط التفاعل. حضر نموذج العينة الضابطة control قيست الامتصاصية للنماذج عند طول موجي ٥٠٠ نانومتر باستخدام جهاز LKB Spectrophotometer المطياف الضوئي الفعالية المضادة للأكسدة حسب المعادلة التالية: -٤

الفعالية المضادة للاكسدة %= ١٠٠-(الامتصاصية للعينة) X (١٠٠)

الامتصاصية للعينة الضابطة

٦ - قياس قابلية ربط ايون الحديديك chelating of ferric ion استخدمت طريقة (٢٠٠٣). Wang et al لقياس ، ٠,٦، ٠,٣) قابلية ربط أيون الحديديك وكما يلي: خلط ٠,٩، ١,٢ و ١,٥ مل من (as) و (و) كازين و EDTA مع ٠,٢ مل من كبريتات الحديديك (٠,٥ملي مولاري) و ٠,٢ مل من الحديدوز (٥) ملي مولاري حضن المزيج على درجة حرارة ٣٧ م لمدة ١٠ دقيقة ثم اضيف ١,٥ مل من الماء المقطر ثم قيست الامتصاصية عند طول موجي ٥٦٢ نانومتر

حسبت النسبة المئوية لربط ايون الحديديك حسب المعادلة التالية:-

قابلية ربط أيون الحديديك %= ١٠٠- (الامتصاصية للعينة) ١٠٠ ×

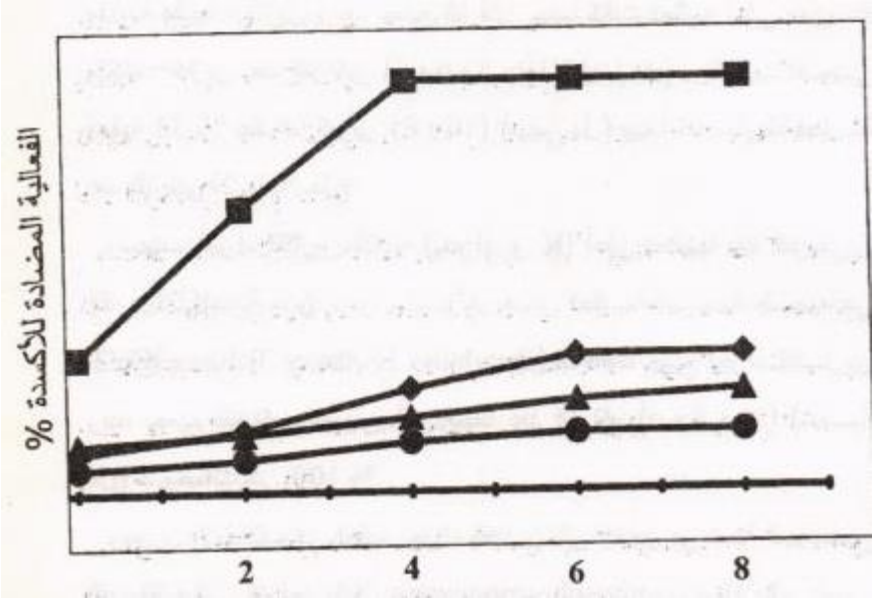
الامتصاصية للعينة الضابطة

النتائج والمناقشة:

تم الحصول على ثلاث اجزاء لكازين حليب الجاموس وهي (a_s كازين) و (ß - كازين) و (k-كازين) استخدمت هذه الاجزاء كمضادات أكسدة للدهون وذلك من خلال الفعالية المضادة للأكسدة وقياس فعاليتها لربط ايون الحديديك وكانت النتائج المستحصل عليها كالاتي:

١-الفعالية المضادة للأكسدة:

يمثل الشكل (١) تطور الفعالية المضادة للأكسدة لحامض الينوليك بفعل أجزاء الكازين (as و ß وk)كازين .



التركيز (ملغم مل)

شكل (١): الفعالية المضادة للاكسدة لبروتينات الكازين بالمقارنة مع BHT

يوضح الشكل بشكل عام حصول زيادة في الفعالية المضادة للأكسدة ولجميع أجزاء الكازين (a_s و ß و k) وقد اظهر الفا – كازين فعالية أعلى مقارنة بالبيتا – كازين وعند جميع التراكيز بينما كانت فعاليته أعلى مقارنة بالكابا – كازين عند التراكيز (٤ و٦ و٨ و١٠) (ملغم / مل). وبلغت أقصى فعالية ٣٣% عند التركيزين (٨ و١٠) (ملغم/مل) بينما كانت أوطأ فعالية عند التركيز (٢ ملغم/ مل).

وسجلت أجزاء الكازين الثلاثة(a_s و ß و k)أعلى فعاليتها عند التركيزين(٨ و١٠) (ملغم / مل) ومن جانب آخر فإن فعالية المضاد الصناعي قد فاقت جميع اجزاء الكازين BHT(Butylated Hydroxy Toluene وعند جميع التراكيز المدروسة ولاسيما عند التراكيز (٦و ٨ و١٠) (ملغم/ مل) اذ وصلت الى ١٠٠%.

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 ٩٢% مقارنة بالبيتا – كازين والكابا – كازين ٦٢% و ١٧% على التوالي. اذ تساهم هذه المجاميع باعطاء بروتون الى الجذور الحرة (١٠،١٥).

وبالنسبة لتفوق الكابا – كازين على البيتا – كازين في فعالية الأكسدة فيعزى الى احتواء الأول على مجموعة كبيرة من السلفا هيدريل بشكل Cystein التي تساهم في تثبيط الاكسدة الذاتية للدهون (٥).

ويتفق هذا مع ما توصل اليه عدد من الباحثين الآخرين(١٤؛ ٨).

٢-فعالية ربط أيون الحديديك:

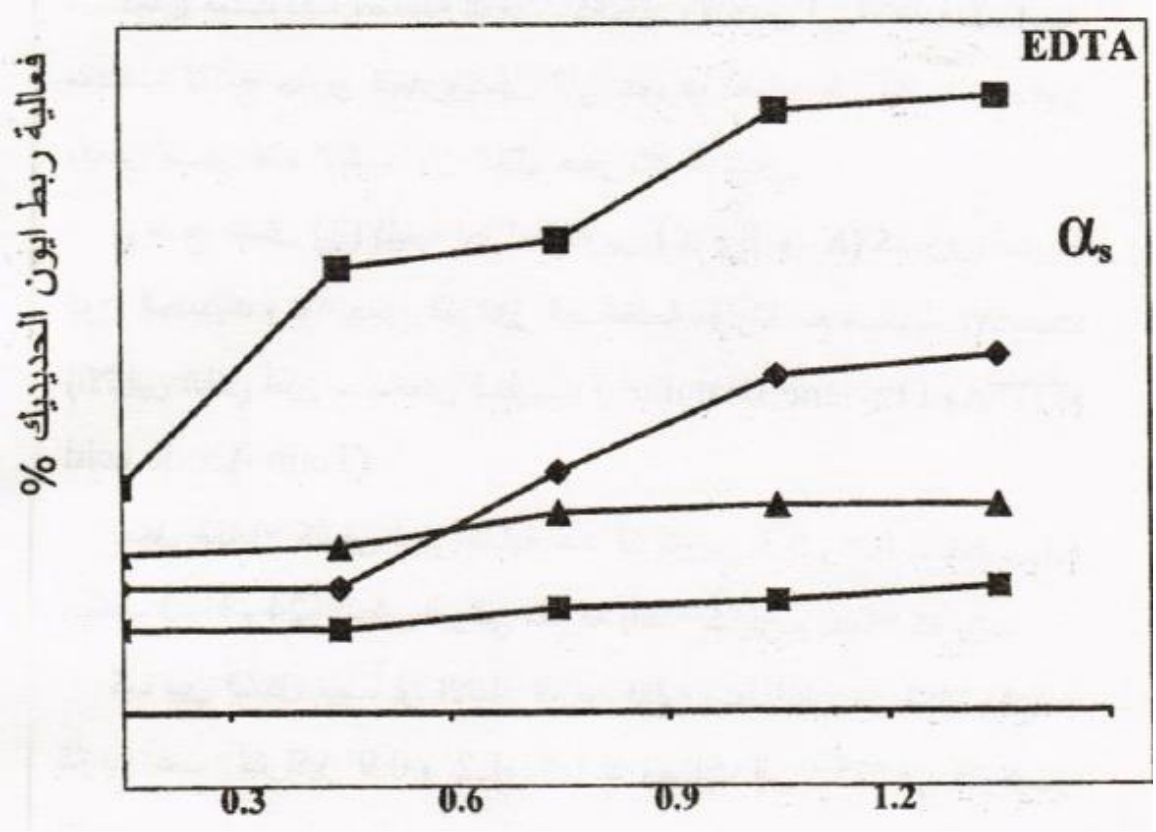
تعمل المستويات الضئيلة للمعادن كالحديد والنحاس في الاغذية كعوامل مساعدة لانتاج جذور الهيدروكسيل التي بدورها تعمل على اكسدة الدهون ويمكن تاخير هذه الأكسدة من خلال حجز تلك المعادن.

يوضح الشكل (٢) قابلية اجزاء الكازين (a_s وß وk)كازين الربط ايون الحديديك وعند جميع التراكيز المستخدمة مقارنة مع مضاد الاكسدة (EDTA) Ethylene Diamine الاثيلين ثنائي أمين حامض الخليك (Tetra Acetic acid).

سجل الكابا – كازين اعلى قابلية عند التركيزين ٠,٣ و ٠,٦ (ملغم / مل) وبلغت ٢٣ و ٢٤% على التوالي مقارنة بالفا – كازين والبيتا – كازين.

كما بين الشكل ايضاً ان الالفا – كازين قابلية ربط اعلى من الكابا والبيتا كازين عند التراكيز ٠,٩ و ١,٢ و ١,٥ اذ وصلت الى ٥٢% في التركيز الاخير.

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



شكل (٢) فعالية ربط ايون الحديديك لبروتينات الكازين بالمقارنة مع EDTA

أوضح (١٩٨٤) Mc Mahon Brown ان لاجزاء الكازين المحتوية على مجاميع Phosphoseryl Serineقدرة على ربط الحديد واضاف أن مجموعة الكاربوكسيل في الاحماض Hekmat& Mc (1998) Mahon الامينية مثل الاسبارجين والكلوتامين لها القابلية على ربط جيد لايون الحديد.

كما ويتفاعل ايون الحديدوز مع الأوكسجين لتكوين سوبر اوكسايد (O_2) والذي يفقد الكتروناً لتكوين جذر الالكوكسايد(O_2) أو يكسب بروتوناً لتكوين جذر البيروكسيل (HO_2) ثم يتفاعل الاخير مع جزيئة دهن لتكوين الهيدرو بيروكساید 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 اكسدة Proxidative activity ويستدل من ذلك ان لاجزاء الكازين قدرة ربط الايونات المعدنية التي تسهم في التاثير المضاد لأكسدة حامض الينوليك.

يتضح أن فعالية (a_s–كازين) المضادة للاكسدة اعلى من (k –كازين) و (ß– كازين) ويعود ذلك للفعالية النسبية للاختزال والقدرة على ربط ايون الحديديك واللذان يساهمان في تثبيط الاكسدة الذاتية للدهون وبالتالي يمكن اعتبارها مضادات أكسدة 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 ß- 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.

Food Science and Technology; 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.-i

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.;

12:1 12:16

11- Married, T.; Kiyosow, T.; Knwahara. K. and Gangali, N.C., (1972). Fractionation of buffalo milk casein by acrylic amide gel electrophoresis and DEAE. Cellulose column chromatography. J. Dairy Sci. ;56:61-6.

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 a- casein.

J. Dairy Sci.; 42: 1997,99

20- Zittle, C. and Custer. J.H., (1963). Indemtification of the K- 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

Abtract:

After separation of Three fraction of casein (as, ß and x) 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 (As, ß and κ). (ας-casein) was higher than (B- 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. (as casein) indicated highest ability than (ß and x) at the (0.9, 1.2 and1.5) mg/ml. It was 52% at the last concentration.