# استخلاص وتوصيف مضادات الاكسدة من بروتينات شرش حليب الابقار والماعز

**علي خضير جابر الركابي  حيدر ابراهيم علي  بشائر عبد المطلب**

**قسم علوم الاغذية – كلية الزراعة – جامعة البصرة**

## الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لتنقية بروتين الكلايكومايكروببتايد من شرش حليب الماعز والابقار ودراسة بعض صفاته وتأثيره كمضاد للأكسدة ، كما درست قابلية الحليب المبستر وغير المبستر وبروتينات الشرش لكلا نوع الحليب من حيث كفائتهم كمضاد للأكسدة، وقد أظهرت النتائج فصل بروتين الكلايكومايكروببتايد بطريقتين باستخدام محلول الـ TCA والطريقة الثانية باستعمال الغليان و الكحول ، أذ أظهرت ان الطريقة الأولى هي الاكفأ والأكثر انتاجية من البروتين . نقي البروتين في الطريقة الأولى من شرش كلا نوعي الحليب الابقار والماعز بواسطة الترشيح الهلامي بـ Sephadex G–25 ، وتم التأكد من النقاوة باستعمال تقنية الترحيل الكهربائي بهلام الاكريلاميد المتعدد أذ تم الحصول على حزمة واحدة. بلغت النسبة المئوية للمحتوى الكاربوهيدرات والبروتين وحامض السياليك لكلا نوعي الكلايكوماكروببتايد شرش الحليب ٢٧.٥%–٣٢ % و ١٩.٩% –٢٥% و ١٢–١٧%على التوالي. بلغ الوزن الجزيئي لبروتين الكلايكومايكروببتايد لحليب الابقار٢٧ كيلو دالتن اما في حليب الماعز ٢٩ كيلو دالتن . اظهرت نتائج دراسة خواص بروتين الكلايكومايكروببتايد لحليب الابقار والماعز كمضاد أكسدة ، وبروتينات الشرش والحليب المبستر وغير المبستر لكلا نوعي الحليب تفوق بروتين الكلايكومايكروببتايد في حليب الماعز على الابقار في منع أكسدة الحامض الدهني اللينوليك أذ بلغت عند تركيز ٥ملغم/مل ٥٣.٠٧% و ٧٥.٥١٨% للابقار والماعز على التوالي . تفوقت بروتينات الكلايكومايكروببتايد بقابلية اقتناص بيروكسيد الهيدروجين عالية أذ بلغت٩٢.١٤٥% و ٩٥.٦٧٨ عند تركيز ٥ ملغم/مل وتفوقت على مركبي المقارنة حامض الاسكوربيك و الروتين Rutin . كانت القوة اختزالية عالية بلغت ١٣٩.٢١% و ٩٦.١٣% مقارنة مع العينات الأخرى لكن ادنى من مركبي المقارنة الفا–توكوفيرول والـ BHT ١٩٥.٨% و ٢٢٦.٤٨% على التوالي . أبدت بروتينات الكلايكومايكروببتايد قابلية عالية لربط ايون الحديدوز عند نفس التركيز٥ملغم/مل لكن بقيم اعلى من مركب EDTA و حامض الستريك أذ بلغ ٨٩.٦٩٦% و ٩٨.٢٦٩% للماعز والابقار على التوالي بينما مركب EDTA و حامض الستريك ٨١.٨٢% و ٨٠.٣١% .

**الكلمات المفتاحية : مضادات الاكسدة ، حليب الماعز ، الكلايكوماكروبيبتايد**

## المقدمة

يعد الحليب احد اهم المصادر لاحتوائه على البروتينات التي تصل الى ٣.٢% متمثلة ببروتينات الكازين التي تشكل ٨٠% والمتبقي هي بروتينات الشرش فضلا عن محتواه من الدهون والسكريات والاملاح والفيتامينات. يتواجد الشرش بالهيئة السائلة مقارنة ببروتينات الكازين الغروية فهو يحتوي على المواد الصلبة المتمثلة بالكاربوهيدرات والدهون والبروتينات والمعادن والفيتامينات (Shankar and Bansal,.2013).

شهد العالم اهتماما كبيراً في المضادات الاكسدة الطبيعية بعد الشكوك التي أثيرت حول مدى سلامة مضادات الاكسدة الصناعية ، لذا اتجه الباحثون لاستعمال مضادات الاكسدة الطبيعية لاسيما البروتينات والببتيدات لما تمتلكه من فعالية حيوية ووظيفية وتغذوية من ضمنها الكلايكومايكروببتايد ، فقد اثبتت بعض الببتيدات فعاليتها في الحد من الجذور الحرة ومنع حصول الاكسدة كما تستخدم كمضافات غذائية (Sharma *et al* .,2011 ) .تعد السلسلة الببتييدية للكلايكومايكروببتايد هي المنتج الأول الذي نحصل عليه بعد انتاج الجبن الطري بواسطه الانزيم الرنين المحلل للكابا–كازين والمنتج للشرش الحلو واظهر ان ناتج الببتيد من الشرش الحلو يبلغ ١.٥غم / لتر ( Rojas and Torres.,2013) ذات أهمية و وظيفية وحيوية واستعماله في المنتجات الغذائة والأغذية العلاجية فضلاً عن استعماله كمكملات غذائة ومادة رابطه وماسكه للعديد من المعادن المشجعة لحصول الأكسدة في الدهون مما يجعله محض انظار الباحثين (Sharma *et al*.,2015).

ومن خلال ما تقدم، هدفت الدراسة لفصل بروتين الكلايكوماكروببتايد من الشرش الحلو لحليب الماعز والابقار وتنقيته ودراسة خواصه الكيميائية من المحتوى البروتين و المحتوى الكاربوهيدراتي ومحتواه من حامض السياليك.والتأكد من نقاوة بروتينات الكلايكومايكروببتايد المستحصل عليه من حليب الماعز والابقار. وتقدير الفعالية المضادة للأكسدة للحليب الخام والحليب المبستر وبروتينات الشرش وبروتينات الكلايكومايكروببتايد لنوعي الحليب الماعز والابقار ودراسة ميكانيكياتها كمضادات أكسدة وقابليتها على اقتناص بيروكسيد الهيدروجين و ربط ايون الحديدوز والقوة الاختزالية.

## طرائق العمل

**تقدير مكونات الحليب** : قدرت مكونات حليب الابقار والماعز بجهاز Lactoflash الماني الصنع والمجهز من قبل شركة Funke Gerber .

**انتاج الشرش من الحليب** : انتج الشرش حسب الطريقة الموصوفة من قبل الموسوي (2000). بسترة الحليب بدرجة حرارة 63 مْ لمدة 30 دقيقة بعدها برد الى 35 م° ، ثم اضيفت المنفحة من نوع Enzymaks ايرانية المنشأ والحضن بدرجة حرارة 35 م° لمدة 40 دقيقة ، وبعد تكوين الخثرة قطعت طوليا و عرضيا وتركت لمدة ١٠ دقائق بدون تحريك ، ثم وضعت الخثرة المقطعة برفق بقماش ململ لغرض فصل الشرش عن خثرة الجبن. تم اجراء الطرد المركزي لغرض ترسيب بقية الأجزاء الكازينية المتبقية، ثم احتفظ بالشرش الناتج من عملية التجبن بعد ترشيحه بـورق الترشيح (Whatman No.1) للتأكد من عدم وجود أجزاء صغيرة من بروتينات الكازين مع الشرش.

**فصل بروتين الكلايكوماكروببتايد (GMP) من شرش الحليب** : فصل الكلايكومايكروببتايد من الشرش بأتباع الطريقة التي وصفها Morr and Seo.(1988) وذلك بخلط حجمين من الشرش مع حجم واحد من حامض الخليك ثلاثي

الكلور (TCA) Trichloroacetic acid وبتركيز (٣٦%) وترك الخليط لمدة ٢٤ساعة ثم اخذ الجزء الراشح بعد ترشيحه باستعمال ورق (Whatman No.1) بعدها اجري النبذ المركزي 5000 دورة/دقيقة ولمدة 20 دقيقة ورشح للحصول على راشح رائق وبعدها تم تعديل الرقم الهيدروجيني الى (7) بواسطه محلول هيدروكسيد الصوديوم (1 N) و تم الترسيب بواسطة الاسيتون وبحجم 1:2.5 ( اسيتون: الراشح الرائق) على التوالي ثم اجري النبذ المركزي حتى تكون راسب وراشح أذ اهمل الراشح وتم الاحتفاظ بالراسب الحاوي الكلايكومايكروبيتايد بعد تعريضه للهواء لتخلص من الاسيتون.

**فصل بروتين الكلايكومايكروبيتايد باستخدام طريقة الغليان والترسيب بالكحول الأثيلي:** أتبعت الطريقة الموصوفة من قبل *(*1991). Saito *et al* و ذلك بتعديل الرقم الهيدروجيني الى 3.5 باستعمال حامض الستريك (0.1) مولاري ، ثم سخن الى درجة الغليان لمدة 60 دقيقة . وبعدها رشح وبرد الراشح الى درجة حرارة 4م° لمدة 24ساعة ، أضيف اليه الكحول الاثيلي المطلق تركيز(99%) بنسبة (1:1)، وأزيل الراسب بعملية النبذ المركزي 3000دورة/ دقيقة وركز المحلول ، ثم أذيب في محلول دارئ الفوسفات (0.1) مولاري رقمه الهيدروجيني (7.6) وبعدها جفدت وحفظت بالتجميد حتى الاستعمال.

**تنقية الكلايكومايكروبيتايد بتقنية كروموتكرافي الترشيح الهلامي:** أجري عملية التنقية حسب الطريقة الموصوفة Nakano and Ozimek.(2000)بتقنية كروموتوكرافيا الترشيح الهلامي Gel Filtration Chromatography مع التحوير، استعمل هلام Sephadex G-25 وتم تحضير السيفادكس حسب الشركة المجهزة حيث أذيب 56gmمن السيفادكس الجاف في 250ml من الماء المقطر بعدها وضع في حمام مائي لمدة 60 دقيقة وبدرجة حرارة 90م°، ثم اجري تفريغ بواسطة (Vacuum pump) وضع الهلام في العامود الزجاجي ليعطي هلام بأبعاد (74×1.5) سم، وتم غسل العامود بدارئ خلات الصوديوم 0.1 مولاري وبرقم هيدروجيني 7 ، وبمعدل جريان (42 مل/1ساعة). تم استرداد مسحوق الكلايكومايكروبيتايد باستعمال دارئ خلات الصوديوم بتركيز(M 0.1) ورقمه الهيدروجيني7 مرر بالعامود وبنفس سرعة جريان الغسل ثم جمعت الأجزاء المنفصلة في أنابيب اختبار وبحجم ( 3مل /انبوبة) ، وقيست الامتصاصية للأنابيب عند الطولين الموجيين ( 210و280 ) نانوميتر وحسب الفرق بين الطولين الموجيين .ثم رسم منحنى الامتصاصية للأنابيب التي جمعت للأجزاء الممثلة لذروة المنحنى ، وكما اجري عملية النضح الغشائي ( Dialysis) التي تسمح بمرور الجزيئات ذات الاوزان الجزيئية 1000دالتون فما دون وأجريت عملية النضح الغشائي بتبريد وباستبدال الماء المقطر كل 6 ساعات ثم جفد الناتج وحفظ بالتجميد لحين الاستعمال .

**تقدر حامض السياليك :** قدر حامض السياليك في محلول الكلايكومايكروبيتايد. حسب الطريقة الموصوفة من قبل Aminoff(1961)

**تقدير الكاربوهيدرات:** قدر المحتوى الكاربوهيدراتي حسب الطريقة الموصوفة من قبل (1956).Dubois *et al*

**تقدير المحتوى البروتيني :** قدر المحتوى البروتيني حسب الطريقة الموصوفة من قبل (1951) .Lowry *et al*

**اختبار نقاوة بروتين GMP لحليب الماعز والابقار** : أجري الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريلاميد Polyacrylamide gel electrophoresis حسب طريقة Laemmli.(1970) في اختبارنقاوة البروتين والموصوفة من قبل Garfin. (1990) في اختبار نقاوة البروتين.

**تقدير الفعالية المضادة للأكسدة** : قدرت الفعالية المضادة للأكسدة بطريقة الثايوسانات Ferric Thiocyanate Method واتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Li *et al* .(2013). وتضمنت الطريقة أخذ 2مل من منظم الفوسفات 0.05M ورقم هيدروجيني 7ومزج مع 2مل من حامض اللينوليك تركيزه 1.25% مع أضافة 1مل من العينة المراد تقدير فعاليتها. ثم حضن المزيج على درجة حرارة45م° لمدة 24 ساعة. بعد مرور ٢٤ساعة على التحضين أخذ 0.1مل من المزيج المحضن مع أضافة 9.7مل ايثانول تركيزه (75%) و0.1 أمونيوم ثايوسيانات تركيز(30%) و0.1من كلوريد الحديدوز عياريته 0.02 (0.07غم في 20مل من حامض الهيدروكلوريك ذو تركيز3.5% ). ثم يرج برفق ويتم قياس الفعالية المضادة للاكسدة على طول موجي 500 نانوميتر ثم قيست حسب المعادلة التالية:-

$$\text{الفعالية المضادة للأكسدة} = ١٠٠ - \left( \frac{\text{امتصاصية النموذج}}{\text{امتصاصية العينة الضابطة}} \times ١٠٠ \right)$$

**تقدير قابلية ربط ايون الحديدوز** : قدرت قابلية ربط ايون الحديدوز حسب الطريقة الموصوفة من قبل Gűlcin *et al* (2003). أذ تضمنت خلط 0.4مل من العينات وبتراكيز تتراوح بين (5-1ملغم/مل) و0.4مل كلوريد الحديدوز(2ملي مولاري) و0.4 من8-hydroxy quinolone بتركيز 5ملي مولاري والمحضر بالايثانول (98%) .حضن المزيج لمدة 10دقيقة بدرجة حرارة الغرفة في مكان مظلم ثم قيست لامتصاصية على 562نانوميتر كما قدرت قابلية ربط ايون الحديدوز لمركب EDTA وحامض الستريك بنفس الظروف لغرض المقارنة كما تم تحضير العينة الضابطة بنفس الطريقة اعلاها بأستثناء أضافة العينات .وتم حساب القابلية حسب المعادلة التالية :

$$\text{قابلية ربط ايون الحديدوز} = \left( ١ - \frac{\text{قراءة امتصاصية العينة}}{\text{قراءة امتصاصية العينة الضابطة}} \right) \times ١٠٠$$

**قابلية اقتناص بيروكسيد الهيدروجين** : قدرت قابلية اقتناص بيروكسيد الهيدروجين حسب الطريقة الموصوفة من قبل Tűrkoğlu *et al* (2010) . أذ تضمنت خلط 1مل من العينات وبتراكيز ( 5 ملغم /مل) مع 0.6مل من بروكسيد الهيدروجين 2ملي مولاري ، كما حضرت العينة الضابطة من 1مل من محلول منظم الفوسفات بدون أضافة العينات ، فضلا عن استعمل حامض الاسكوربيك ومركب الروتين Rutein للمقارنة مع العينات، بعدها يترك المزيج لمدة 10دقائق ثم تقاس الامتصاصية عند طول موجي مقداره230نانوميتر وتحسب القابلية حسب المعادلة التالية:-

$$\text{قابلية اقتناص بيروكسيد الهيدروجين} = \left( \frac{\text{قراءة امتصاصية النموذج}}{\text{قراءة امتصاصية العينة الضابطة}} \right) \times ١٠٠$$

**قياس القوة الاختزالية** : قدرت القوة الاختزالية حسب الطريقة الموصوفة من قبل Cheng *et al*(2014) . وذلك بمزج 0.3مل من العينات مع 0.3مل من سيانيد البوتاسيوم الحديديكي 1% و 0.3مل من محلول دارئ الفوسفات بتركيز 0.2مولاري عند رقم هيدروجيني 6.6 . بعدها تم تحضين الخليط بدرجة حرارة 50م° لمدة 20دقيقة، ثم من بعدها تمت إضافة 0.3مل من كلوريد حامض الخليك بتركيز 1% ، بعدها أجريت عملية النبذ المركزي بسرعة( 6000دورة /دقيقة) بدرجة حرارة4م° لمدة10دقائق .وبعد انفصال الطبقة العلوية للخليط سحبت وخلطت مع 0.12 مل من كلوريد الحديديك تركيزه 0.1% واضيف 0.6مل من الماء المقطر ورج الخليط وترك لمدة 10دقائق كما تم تحضير العينة الضابطة من جميع المكونات السابقة ماعدا العينة. كما استعمل مضاد الاكسدة الصناعي BHT تحت نفس الظروف والتراكيز لغرض المقارنة . ثم تم قياس الامتصاصية عند طول موجي 700 نانوميتر بجهاز المطياف الضوئي وتم الحساب حسب المعادلة التالية :-

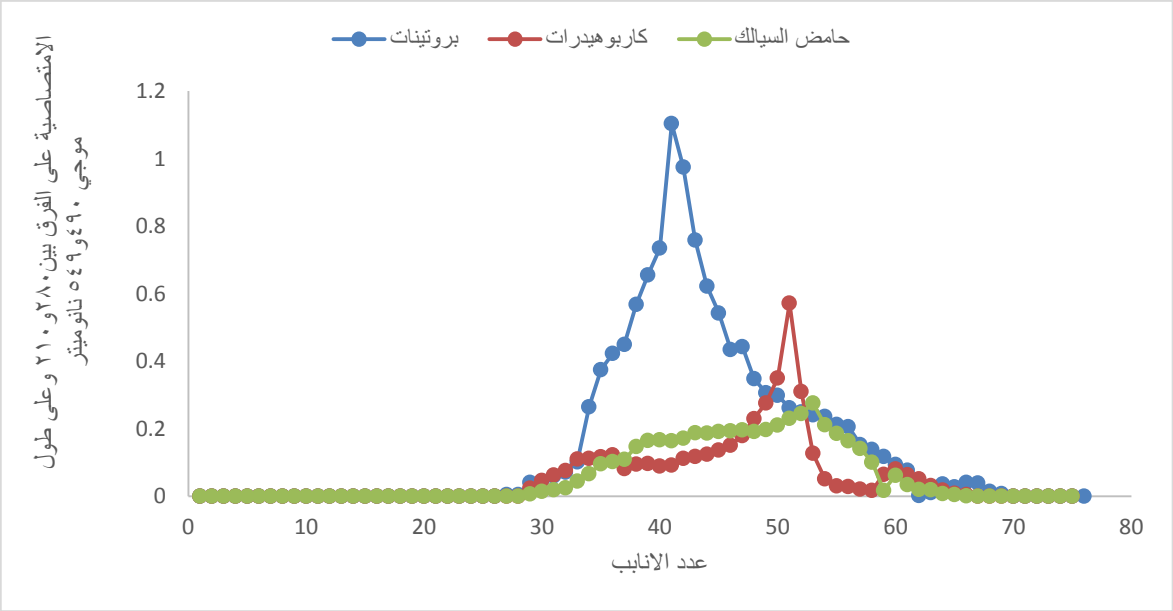
$$\text{\% القوة الاختزالية} = \left(1 - \frac{\text{قراءة امتصاصية العينة}}{\text{قراءة امتصاصية العينة الضابطة}}\right) \times 100$$

## النتائـــج والمناقشـــة

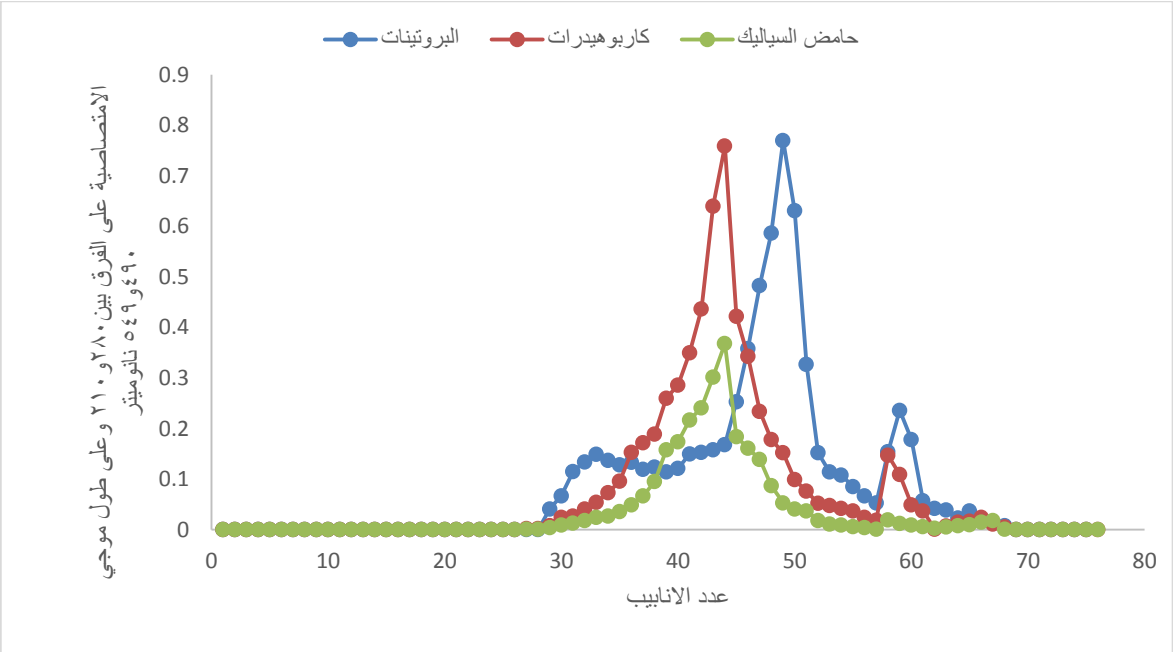
**فصل الكلايكومايكروبتايد بأستعمال حامض الـ TCAوالترسيب بالغليان والكحول** : فصل بروتين الكلايكوماكروبتايد بأستعمال حامض الـ TCA نتيجة لما يمتلك بروتين الكلايكومايكروبتايد من مميزات في تركيبه اذ ان أساس عمل حامض الـ TCA هو الترسيب لجميع بروتينات الشرش عند تركيز ٣٦% من الحامض ماعدا الكلايكومايكروبتايد ويرجع ذلك نتيجة لاحتواء البروتين على الكربوهيدرات . أذ تنفصل جميع بروتينات الشرش مع الراسب في حين يبقى الكلايكومايكروبتايد مع الراشح . اما طريقة الفصل بواسطة الترسيب بالغليان والكحول فتعتمد على خاصية بروتين الكلايكومايكروبتايد وهي استقرار ثباتية البروتين اتجاه الحرارة وتمت عملية الغليان لغرض دنترة البروتينات والترسيب بواسطة الكحول حسب طريقة Saito *et al*. (1991). كما تم استخدم طريقة الإنتاج بالحرارة لبروتينات الشرش المركز بحرارة اعلى من ٨٥ م° لغرض دنترة بروتينات الشرش مع تعديل نقطة التعادل الكهربائي والفصل بالطرد المركزي او الترشيح حسب طريقة Berrocal and Neeser,(1993)

**كروموتوكرافيا الترشح الهلامي** : تم اجراء عملية التنقية لبروتينات للكلايكومايكروبتايد بطريقة بالـ TCA، بأستعمال تقنية الترشيح الهلامي عبر عامود سيفادكس Sephadex G-25 لكل من حليب الماعز والابقار بعد اجراء عملية التنافذ الغشائي وتركيز المحلول البروتيني ، أذ تعد طريقة الترشيح الهلامي أحد طرق فصل وتنقية البروتينات على أساس الوزن الجزيئي، اذ يلاحظ ظهور قمة واحدة لبروتين الكلايكومايكروبتايد للأجزاء المستردة من الهلام وهذا ما يشير الى ان بروتين الكلايكومايكروبتايد يتكون من سلسلة ببتيدية واحدة كما موضحة في الشكلان( ١و٢) وهذا يتفق مع Rojas and Torres(2013) عند فصله لبروتينات الكلايكوماكروبتايد من حليب الابقار. أن وجود حامض

السياليك يعد دليلاً على وجود بروتين الكلايكومايكروبيتايد لذا تم تقدير حامض السياليك ، اذ لوحظ وجود قمة واحدة للحامض عند قياس الامتصاص الضوئي على طول موجي ٥٤٩ نانوميتر وهذه النتيجة تتفق مع ما ذكره Nakano and Ozimek (2000) عند اجراء عملية التنقية الترشيح الهلامي بعمود Sephadex G-75 و Sepharcyl S-200 ،كذلك الدليل الأخر على اثبات وجود بروتينات الكلايكومايكروبيتايد من خلال فحص الكربوهيدرات اذا ظهرت قمه للكاربوهيدرات عند قياس الامتصاصية على طول موجي ٤٩٠ نانوميتر وكذلك قدرت كمية البروتين في محلول الكلايكومايكروبيتايد عند طول موجي ٥٤٩ نانوميتر. استخدمت طريقة الترشيح الهلامي بشكل واسع لغرض التنقية بعد عملية فصل البروتين لغرض الحصول على بروتين عالي النقاوة ويتم اثبات درجة النقاوة العالية للبروتين عن طريق اجراء الترحيل الكهربائي بهلام الاكريلامايد المتعدد .




**شكل (١) تنقية الكلايكومايكروبيتايد حليب الماعز باستعمال الترشيح الهلامي على عمود Sephadex G-25 .**

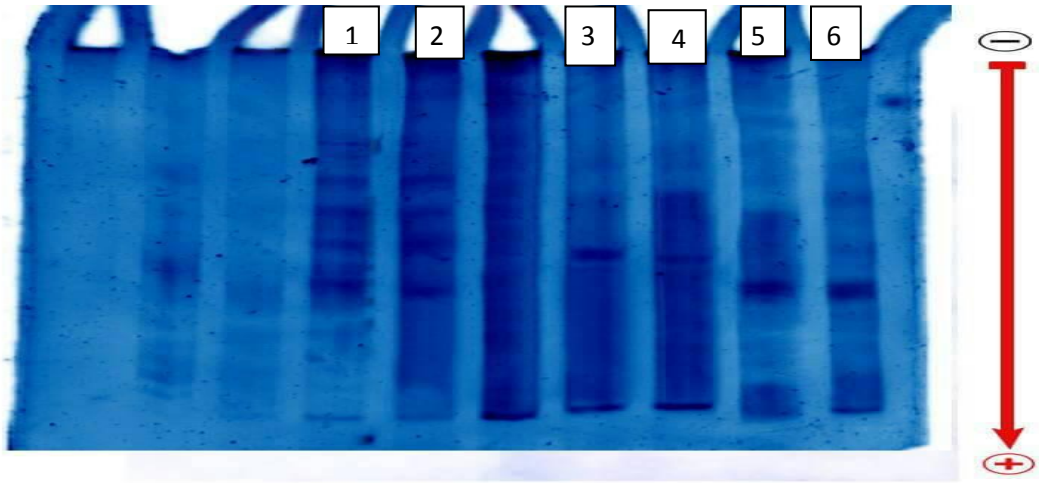



**شكل (٢) تنقية الكلايكومايكروبيتايد حليب الابقار باستعمال الترشيح الهلامي على عمود Sephadex G-25 .**

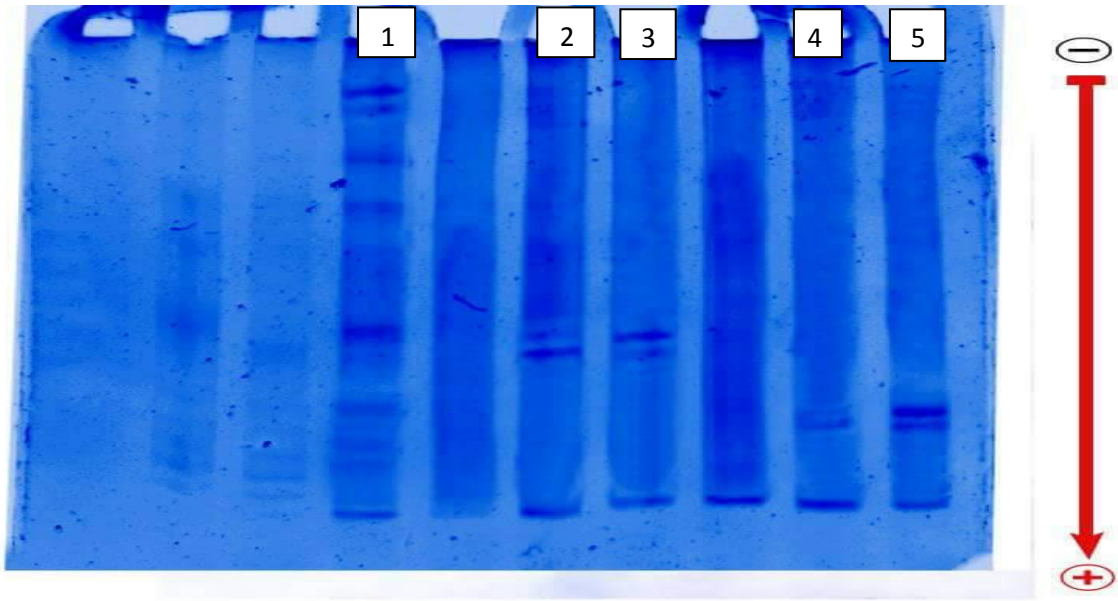
**اختبار نقاوة الكلايكومايكروبيتايد بالترحيل الكهربائي وتحديد الوزن الجزيئي:** اتبعت طريقة الترحيل الكهربائي بهلام الاكريلامايد المتعدد لبروتينات الكلاكومايكروبيتايد الناتج من استعمال TCA وطريقة الترسيب بالغليان والكحول، والمستردة من الترشيح الهلامي بالعامود لغرض التأكد من نقاوة البروتينات وأوضحت النتيجة في شكل (3) ظهور حزمة واحد لبروتينات الكلايكومايكروبيتايد مما يثبت نقاوته وهذا يدل على كفاءة الفصل والترشيح الهلامي وخلو البروتين من اي مواد مرتبطة به مثل الشوائب والببتيدات الأخرى المرتبطة به والبروتينات الأخرى وهذا مايتفق مع Nakano *et al* (2002)) .

بعد استخدم الترشيح الهلامي بعمود SephadexG-25 والترحيل بهلام الاكريلامايد المتعدد والعوامل الماسخة (SDS-PAGE) لتقدير الوزن الجزيئي للبروتينات الكلاكوماكروبيتايد للأبقار والماعز وبوجود بروتينات القياسية لغرض المقارنة وسهولة تحديد الوزن الجزيئي لبروتينات الكلايكومايكروبيتايد لكلا النوعين الابقار و الماعز. واظهر الشكل (٤) أن الوزن الجزيئي لبروتين لكلايكومايكروبيتايد الماعز و الابقار المنقى بالترشح الهلامي بلغ ٢٩ كيلو دالتن و ٢٧ كيلو دالتن على التوالي عند تقديره بتقنية الترحيل الكهربائي. وهذا يتفق مع(2010) .Evelin and Gabriel والذي ذكرا ان الوزن الجزيئي لبروتين لكلايكومايكروبيتايد يتراوح مابين ١٤و٢٠و٤١كيلو دالتن. وأشار sharma et al ,.(2015) الى ان الوزن الجزيئي لبروتينات الكلايكومايكروبيتايد المفصولة من مصادر مختلفة يتراوح بين ١٤كيلو دالتن الى ٣٠كيلودالتن ويعتمد على الصيغ المتجمعة أذ يكون بسبب تجمع الصيغ الأحادية monomer ليشكل تكتلات حيث ان الكلايكومايكروبيتايد هو ببتيد بصيغة بوليمر بالإضافة لذلك ان للرقم الهيدروجيني تأثير كبيراً على الوزن الجزيئي لبروتينات الكلايكومايكروبيتايد أذ ان جزيئة البرزتين عند رقم هيدروجيني ازيد من ٤ تتواجد بشكل

رباعي وخماس التركيب بينما عند رقم هيدروجيني اقل من ٣ تتكون الجزيئية بشكل ثنائي وثلاثي التركيب مما يعطي وزن جزيئي اقل .




**شكل (٣): الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريلامايد لبروتين الكلايكوماكروبتايد المنقى والمستحصل عليه من شرش حليب الماعز والابقار** أذ يمثل:(١و٢): بروتينات الكلايكومايكروبتايد الخام.(٣و٤): بروتينات الكلايكومايكروبتايد المنقاة بالترشيح الهلامي لحليب الماعز .(٥و٦): بروتينات الكلايكومايكروبتايد المنقاة بالترشيح الهلامي لحليب الابقار




**شكل (4): الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريلامايد بوجود SDS لتحديد الوزن الجزيئي لبروتين الكلايكوماكروبتايد المنقى والمستحصل عليه من شرش حليب الماعز والابقار** أذ يمثل:(١): البروتينات القياسية.(٢و٣): بروتينات الكلايكومايكروبتايد المنقاة بالترشيح الهلامي لحليب الماعز
(٤و٥): بروتينات الكلايكومايكروبتايد المنقاة بالترشيح الهلامي لحليب الابقار

**المحتوى البروتيني لبروتينات الكلايكومايكروبيتايد** : بينت طريقة تقدير كمية البروتين في بروتينات الكلايكومايكروبيتايد والمنقات بالترشيح الهلامي ، أذ استخدم البروتين القياسي البومين المصل البقري كمنحنى قياسي لتحديد كمية البروتين وقد اظهر بروتين الكلايكوماكروبيتايد لحليب الابقار احتواءه على كمية بروتين ١٩.٣% ، بينما احتوى بروتين الكلايكوماكروبيتايد لحليب الماعز على كمية بروتين ٢٥% ، وهذا لايتفق مع Neelima *et al* (2013)., والذي حدد ان نسبة البروتين في بروتينات الكلايكومايكروبيتايد تتراوح بين ٧٨-٨٣% في حين اتفق مع Martin- Diana *et al* . (2003) أذ ذكر ان نسبة البروتين في الكلايكومايكروبيتايد تبلغ ٢٠% وهذا مقارب للنتائج أعلاه وتختلف كمية البروتين لاختلاف أنواع الثديات.

**المحتوى الكربوهيدراتي لبروتينات الكلايكومايكروبيتايد:** أوضحت طريقة تقدير كمية الكربوهيدرات ان محتوى الكربوهيدرات لبروتينات الكلايكومايكروبيتايد لحليب الابقار هي ٢٧.٥% ، اما كميته في حليب الماعز فبلغت ٣٢% اتفقت هذه النتائج مع ما ذكره الباحثين . (1957); Alais and Jolles(1961)., Nitschmann et al ، أذ وجدوا ان نسبة الكاربوهيدرات في بروتين الكلايكومايكروبيتايد بلغت ٣٠% و ٢٨% وتجدر الإشارة الى أهمية تقدير المحتوى الكاربوهيدراتي لبروتينات الكلايكوماكروبيتايد على اعتبار ان اغلب الأبحاث أظهرت انه بروتين مرتبط بالكربوهيدرات (مرتبط بالسكريات المتعددة والتي تشمل sialic acid, galactose, N-acetyl galactosamine) وبواسطة ذرة اوكسجين رابطة O-Linked في ستة مواقع مختلفة وبلأخص مع الحامض الاميني الثريونين وفي المواقع التالية ١٢١ و ١٤٢ و ١٣٦ و ١٣٣ و ١٣١ و ١٦٥ . كما وضح Rojas and Torres(2013) ارتباط السلسلة الكربوهيدرات بالحامض الاميني السيرين بلاضافة للثريونين وهذا ما أكده(2010) Madureira *et al*

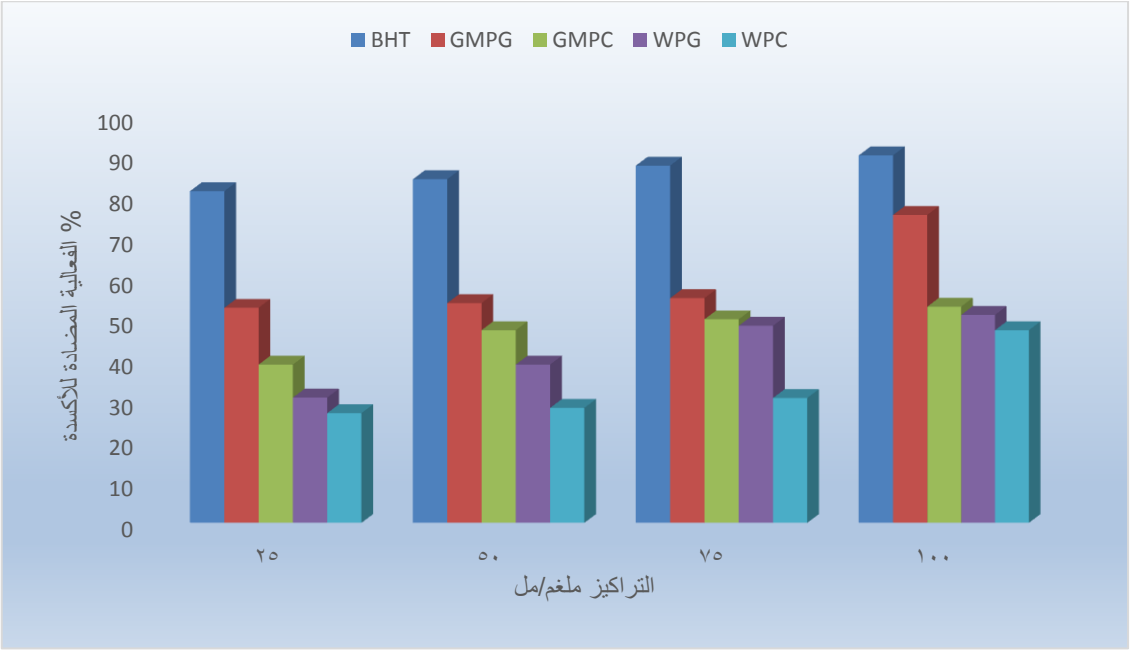
**محتوى البروتين الكلايكومايكروبيتايد من حامض السياليك** : اظهرت النتائج ان الكلايكوماكروبيتايد لحليب الابقار يحتوى ١٢% من حامض السياليك ، في حين أن الكلايكوماكروبيتايد حليب الماعز يحتوي ١٧% من حامض السياليك ، أذ وجد (2013). Neelima *et al* ان محتوى حامض السياليك لبروتين الكلايكوماكروبيتايد تبلغ حوالي ٩% ، وأشار احد الباحثين الى ان كمية السياليك لها أهمية كبيرة أذ يعكس تركيزه كمية او تركيز بروتين الكلايكومايكروبيتايد يؤكد وجوده Furlanetti and Prata(2003) .

**جدول (١) : محتوى البروتين والكاربوهيدرات وحامض السياليك في بروتين الكلايكومايكروبيتايد**

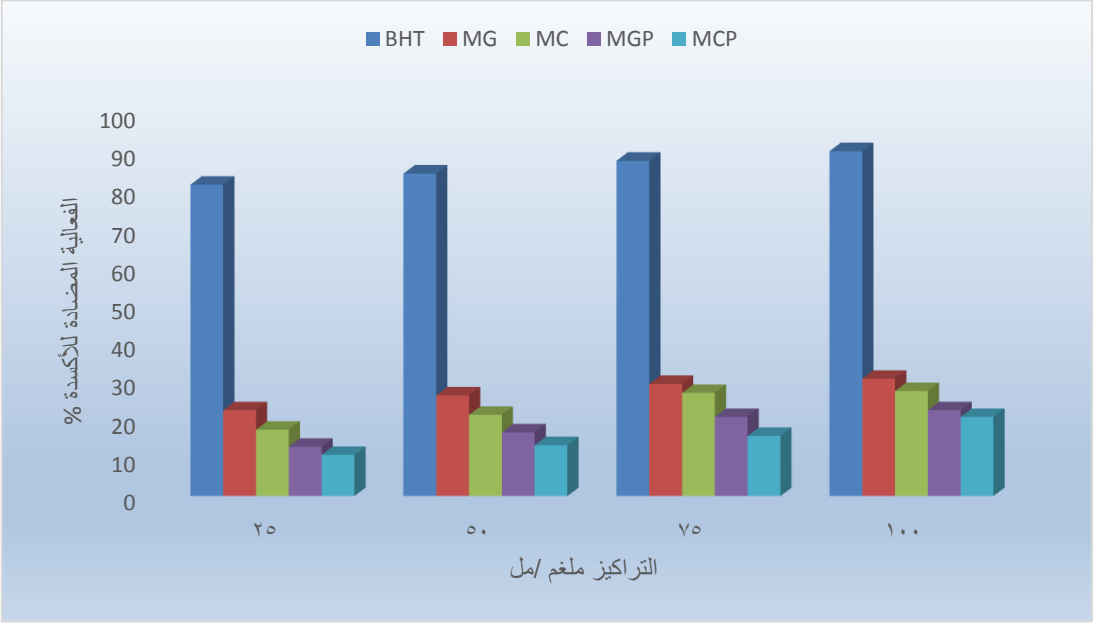
| اسم المادة | التراكيز % | |
|---|---|---|
| | حليب الابقار | حليب الماعز |
| حامض السياليك | ١٢% | ١٧% |
| الكربوهيدرات | ٢٧.٥% | ٣٢% |
| البروتين | ١٩.٣% | ٢٥% |

**الفعالية المضادة للاكسدة للمركبات المضادة للأكسدة :** توضح الاشكال (٣) و (٤) و (٥) ، اذ بينت نتائج قياس الفعالية المضادة للأكسدة لنماذج حليب الابقار والماعز والتي تشمل الحليب الخام والحليب المبستر وبروتينات الشرش وبروتين الكلايكومايكروببتايد المفصول من الشرش كمضادات أكسدة لتثبيط أكسدة الحامض الدهني اللينوليك وقدرت الفعالية المضادة للأكسدة في كل النماذج السابقة ومقارنة الفعالية للنماذج أعلاه مع مضاد الاكسدة الصناعي BHT وبتركيز ٥ ملغم/مل والذي اعطى فعالية مقدارها ٩٠% ، أذ لوحظ من خلال النتائج للعينات قيد الدراسة ان لبروتينات الكلايكومايكروببتايد المستخلصة بطريقة الـ TCA أعطت أعلى فعالية مضادة للأكسدة وهذا يوضح ان عملية التنقية باستخدام طريقة TCA كانت افضل كفاءة من الترسيب بطريقة الغليان والكحول أذ أعطت فعالية بنسبة ١٩% لماعز و ١١.٥% لابقار في حين كانت النسب في طريقة الـ TCA ٥٢.٧٨٠% و ٣٨.٨٧٩% للماعز والابقار على التوالي لذا اعتمدت طريقة الـ TCA في قياس الاختبارات وهذا يتفق مع ما وجده Nakano and Ozimek.(2015) الذي أكد كفاءة طريقة TCA من الترسيب بطريقة الغليان. اذ أظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية P<٠.٠٥ بين بروتينات الكلايكومايكروببتايد وبين باقي العينات. في حين كانت النتائج المستحصل عليه من حليب الماعز وبنسبة٥٢.٧٨٠% بينما المستحصل عليه من حليب الابقاركانت النسبة٣٨.٨٧٩% بوزن ٢٥ملغم/مل وتزداد الفعالية بزيادة التركيز وهذا يتفق مع ما وجده (٢٠١١). Simose *et al* الذي درس تأثير عدة أنواع من حليب حيوانات مختلفة و اوجد ان حليب الماعز يمتلك اعلى فعالية مضادة للأكسدة كما يعزى الارتفاع في قيمة الفعالية المثبطة لأكسدة حامض اللينوليك بالنسبة الى بروتين الكلايكومايكروببتايد الى امتلاك الببتيدات فعاليه مضادة للأكسدة اعلى مقارنة بالبروتينات غير المحللة وهذا يعود لوجود بعض الاحماض الامينية في الببتيدات والتي تكون بشكل غير مرتبط وهذا اتفق مع Ahmed *et al.*(2015) .

كما اثبتت التجارب على إمكانية ببتيدات الكلايكومايكروببتايد ولاسيما المتحللة من البروتينات على مسك وامتصاص بعض العناصر المشجعة لحدوث الاكسدة مثل Fe و Zn وغيرها واقتناص الجذور الحرة وبالتالي ثبيط اكسدة الدهون في الأغذية(2003),.Kelleher *et al*.و(2008),.Roberto ، في حين كانت فعالية بروتينات الشرش اقل فعالية مقارنة ببروتينات الكلايكومايكروببتايد وبنسب ٣٠.٧٨٨ و٢٦.٩٧٠ على التوالي للماعز والابقار ،اما الفعالية المضادة للأكسدة للحليب غير المبستر هي ٢٢.٤٤٨ و ١٧.٣٨٥ للماعز والابقار على التوالي وهذا يتفق مع Simos*et al.*( 2011) و AL-Helaly *et al.*(2013) و Alyaqoubi *et al.*(2015)، في حين تناقصت الفعالية عند بسترة الحليب وكما يلي ١٢.٩٠٤ و ١٠.٧٨٨ للماعز والابقار على التوالي أذ اتفقت نتائج الانخفاض عند البسترة مع Alyaqoubi *et al.* (2014) كما يلاحظ ارتفاع الفعالية بزيادة التركز لكل المضادات أعلاه وكلا حسب فعاليته وكما موضح ادناه



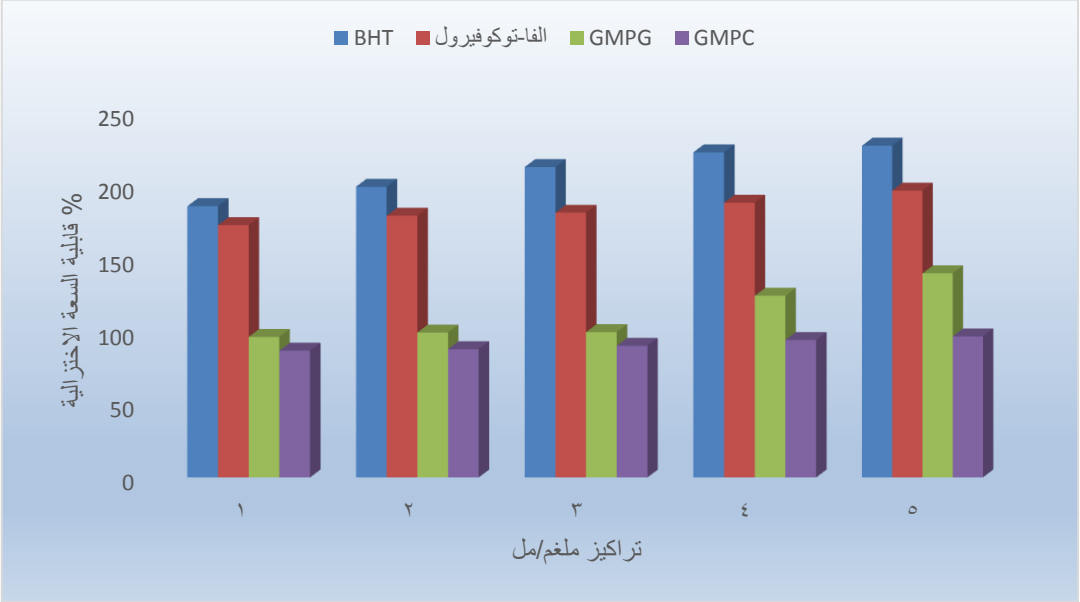

**شكل (٣) الفعالية المضادة للأكسدة للكلايكومايكروبتايد وبروتينات الشرش للماعز و الابقار**



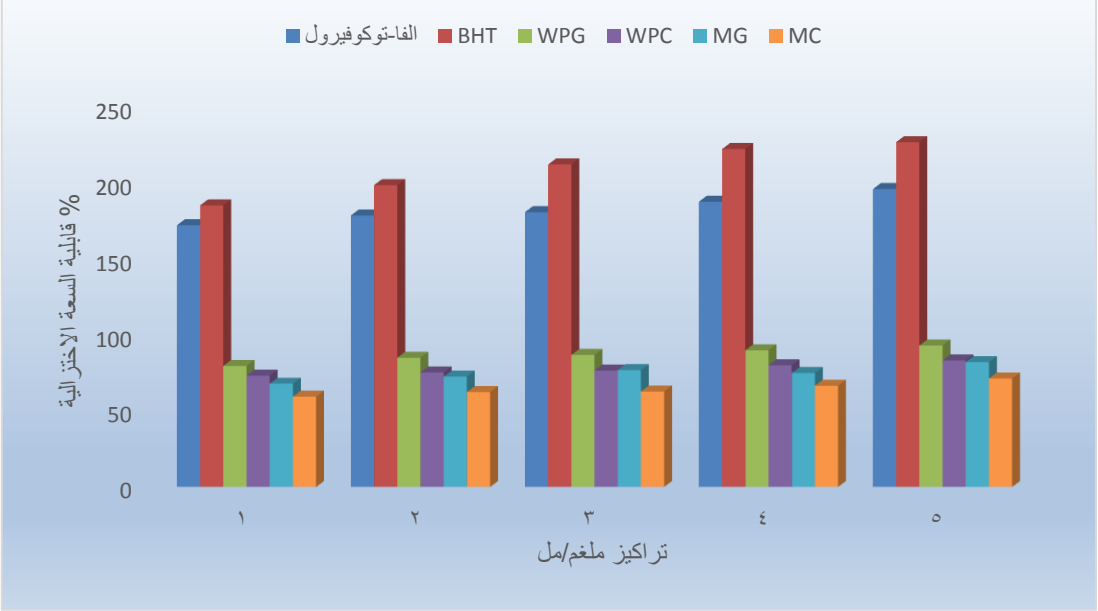

**شكل (٥) الفعالية المضادة للأكسدة للحليب الخام والمبستر للماعز والابقار.**

**القوة الاختزالية للمركبات المضادة للأكسدة:** أظهرت الاشكال (٦ و ٧ و ٨) القوة الاختزالية للعينات المضادة للأكسدة لبروتين GMP المعزول من حليب الماعز والابقار وبروتينات الشرش والحليب الخام والمبستر لكلاً من حليب الماعز والابقار ومقارنتهم مع مضاد الاكسدة الطبيعي الفا–توكوفيرول ومضاد الاكسدة الصناعي BHT و المقاسة على طول موجي ٧٠٠نانوميتر ، أذ يلاحظ من النتائج أن بروتينات الكلايكومايكروبتايد يمتلك اعلى قوة اختزالية عند تركيز ٥ ملغم /مل اذ بلغت النسبة ١٣٩.٢١ و ٩٦.١٣ للماعز والابقار على التوالي وارتفعت القوة الاختزالية بزيادة التركيز لجميع العينات ، في حين بلغت القوة الاختزالية لمركبات الفا–توكوفيرول وال BHT عند تركيز ٥ ملغم/مل ١٩٥.٨ و ٢٢٦.٤٨ على التوالي . كما لوحظ من النتائج ارتفاع القوة الاختزالية لبروتينات الشرش مقارنه بالحليب الخام

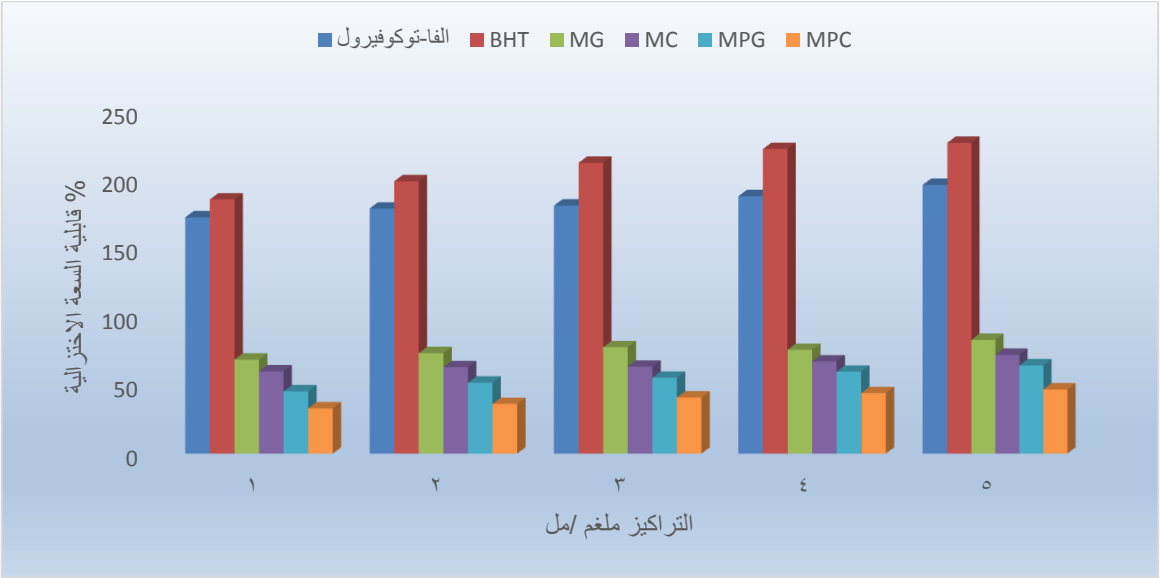
والحليب المبستر أذ بلغت النتائج عند تركيز ٥ ملغم/ مل (٩٣.٥١٤ ، ٨٣.٨٧) و( ٨٢.٧٥ ،٧١.٨٦ ) و ( ٥٩.٥٩٤، ٤٦.٢٢) على التوالي للماعز والابقار. وهذا يتفق مع ما وجدوا Chiang and Chang. (2005) أذ وجدا ارتفاع قابلية القوة الاختزالية لبروتينات الشرش مقارنة ببروتينات الكازينات ، وقد عزي سبب الزيادة في القوة الاختزالية تعود هذه البروتينات لقدرة هذه البروتينات على اختزال ايون الحديديك الى ايون الحديدوز وهذا يشابهه عمل الفاتوكوفيرول وال BHT من خلال اختزال $Fe^{+3}$ الى $Fe^{+2}$ (Perenlei *et al.*,2011)




**شكل(٦) القوة الاختزالية لبروتينات الكلايكومايكروبيتايد مقارنة مع الفا–توكوفيرول والBHT**

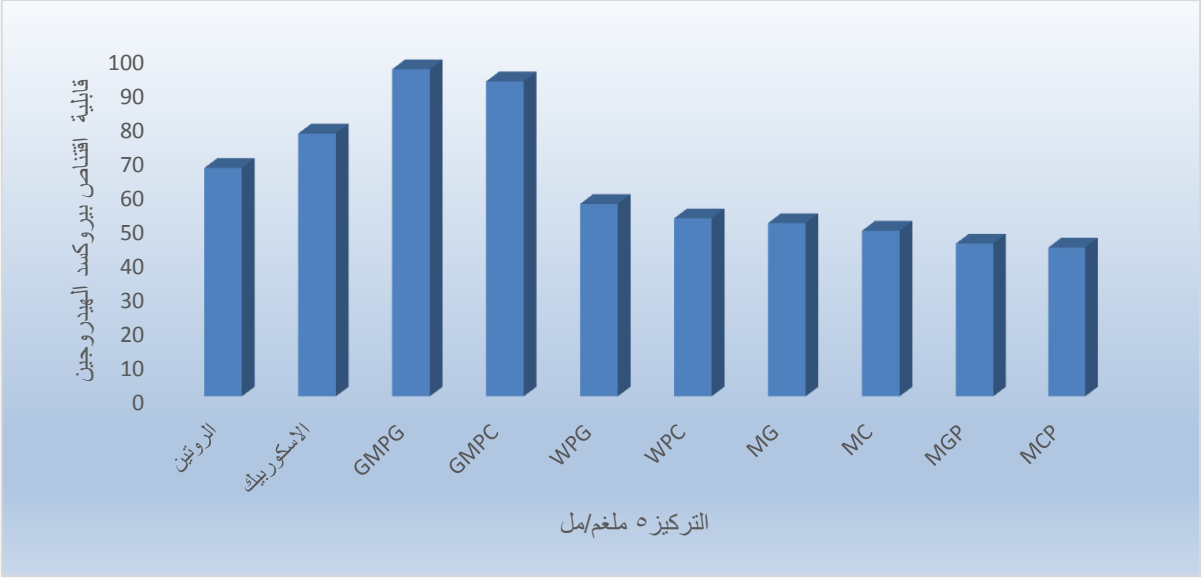



**شكل (٧) القوة الاختزالية لبروتينات الشرش والحليب الخام مقارنة مع الفا–توكوفيرول والBHT**



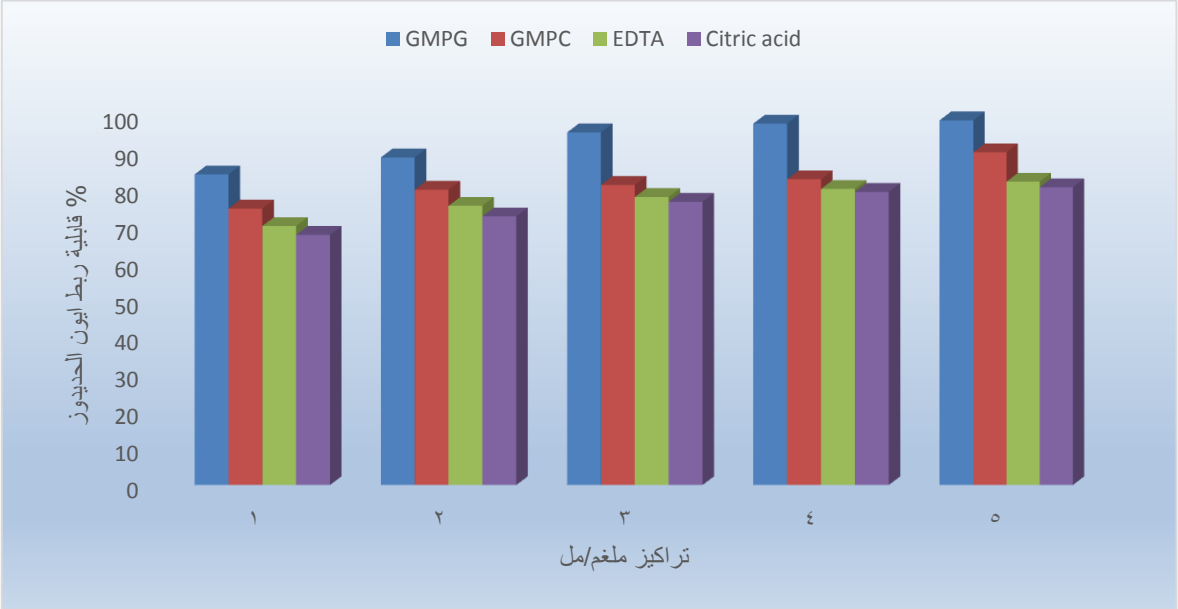

**شكل (٨) القوة الاختزالية للحليب الخام والمبستر مقارنة مع الفا–توكوفيرول والـBHT**

**قابلية اقتناص بيروكسيد الهيدروجين للمركبات المضادة للأكسدة** : يوضح الشكل (٩) قابلية GMP وبروتينات الشرش والحليب غير مبستر والحليب المبستر لحليب الماعز والابقار لاقتناص بيروكسيد الهيدروجين والمحضرة بتركيز ٥ ملغم/ مل ومقارنتهم مع حامض الاسكوربيك ومركب الفلافونيدي Rutin وبتركيز ٥ملغم/ مل، اذ أظهرت بروتينات الكلايكومايكروببتايد اعلى قابلية اقتناص بيروكسيد الهيدروجين من بروتينات الشرش والحليب المبستر وغير المبستر لكلا نوعي حليب الماعز والابقار، أذ بلغت نسبة الاقتناص لبروتين الكلايكومايكروبتايد لحليب للماعز ٩٥.٦٧٨ ولبروتينات الكلايكومايكروببتايد لحليب الابقار ٩٢.١٤٥ ، كما أظهرت النتائج تفوق بروتين الكلايكومايكروببتايد لكلا نوعي الحليب المستعمل في الدراسة على المركبين حامض الاسكوربيك والروتين ٧٦.٩٥٥ و ٦٦.٩٢٠ على التوالي ، في حين بلغت ادنى نسبة اقتناص الحليب المبستر للماعز والابقار ٤٤.٩١٣ و ٤٣.٧٣٧ على التوالي .

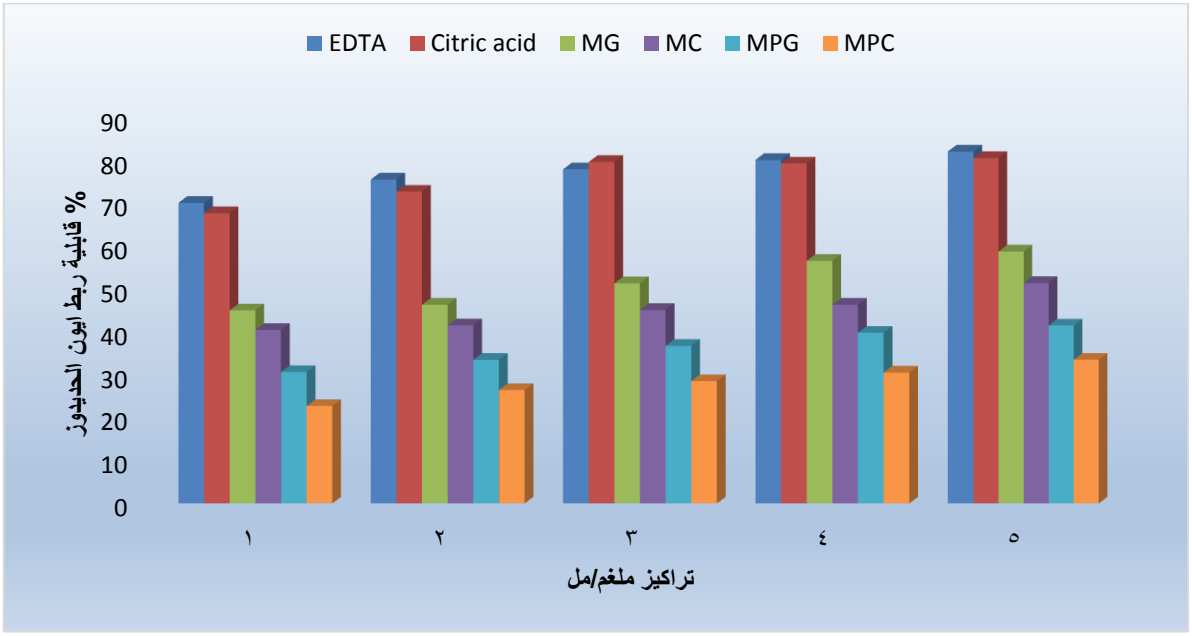



**شكل (٩) قابلية GMP وبروتينات الشرش والحليب غير مبستر والحليب المبستر للماعز والابقار لاقتناص بيروكسيد الهيدروجين ومقارنتها مع الروتينRutin وحامض الاسكوربيك**

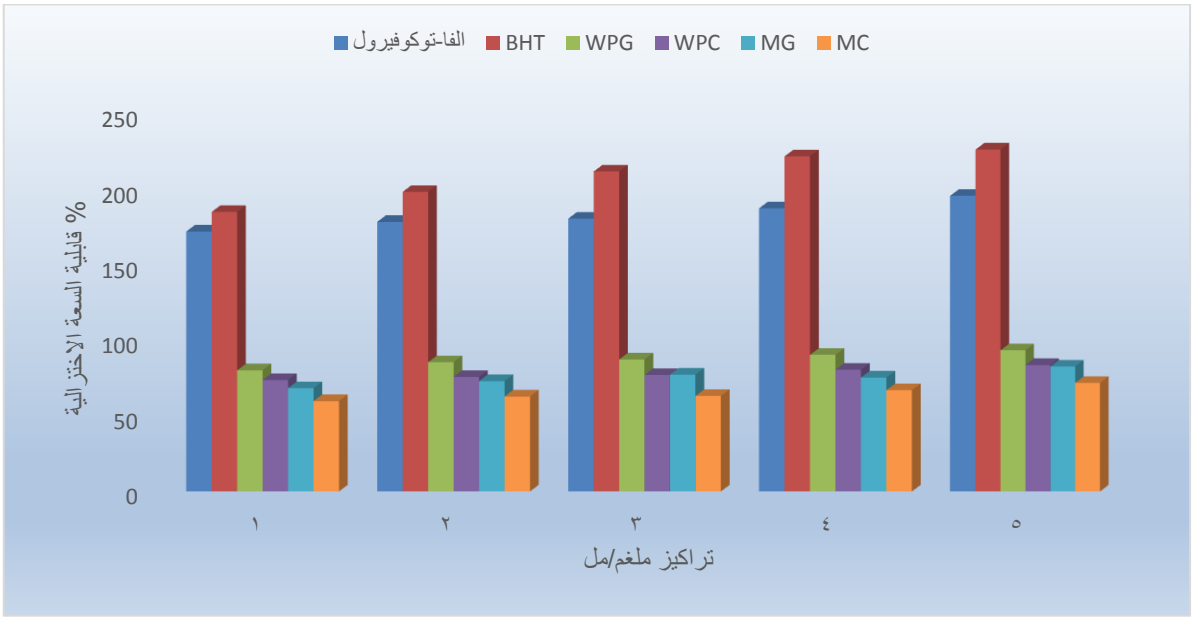
**قابلية ربط ايون الحديدوز للمركبات المضادة للأكسدة :** توضح الاشكال (١٠ و١١ و١٢) النسب المئوية لقابلية GMP وبروتينات الشرش والحليب غير مبستر والحليب المبستر لحليب الماعز والابقار لربط ايون الحديدوز ومقارنتها مع مركب الاثيلين ثنائي امين رباعي حامض الخليك (EDTA) وحامض الستريك ، أذ أظهرت النتائج تفوق بروتينات الكلايكومايكروببتايد المعزول من حليب الماعز بقابلية في ربط ايون الحديدوز مقارنةً GMP لحليب الابقارفأظهرت النسبة عند تركيز٥ملغم / مل ٩٨.٢٦٩ و ٨٩.٦٩٦ على التوالي. أما النسبة ١ملغم / مل فأظهرت نبة ربط بلغت ٨٣.٧٦ و ٧٤.٦٠ على التوالي. وقد تفوقت البروتينات في نسبة الربط على المركب EDTA وحامض الستريك و اللذان يمتلكان نسبة ربط عند التركيز ٥ملغم / مل ٨١.٨٢ و ٨٠.٣١ على التوالي ، كما أ تفوقت مركبات المقارنة على بروتينات الشرش والحليب الخام والحليب المبستر لكل من حليب الماعز و الابقار، لكن أظهرت بروتينات الشرش تفوق على نوعين الحليب الخام والمبستر في قدرته على الربط أذ كانت نسبة ربط بروتينات الشرش عند تركيز ٥ملغم / مل ٧٩.٢٢ و ٧٢.٢٩ للماعز والابقار على التوالي ، في حين كانت نسبة الربط في الحليب عند تركيز ٥ملغم / مل ٤٥.٠٢ و٤٠.٤٧ الماعز والابقار على التوالي . وهذا يتفق مع Chiang and Chang (2005) عند مقارنتهم لبروتينات الشرش والكازينات وبوجود مركب المقارنة EDTA أذ أظهرت نتائجهم تفوق قابلية ربط ايون الحديدوز لبروتينات الشرش مقارنة ببروتينات الكازينات هذا يعزى لقابلية البروتينات الشرش على مسك المعادن وبالتالي تقليل من عملية الاكسدة .




**شكل (١٠) قابلية الكلايكومايكروببتايد على ربط ايون الحديدوز ومقارنه بـ EDTA وحامض الستريك**




**شكل (١١) قابلية الحليب الخام والمبستر على ربط ايون الحديدوز ومقارنه مع EDTA وحامض الستريك**




**شكل (١٢) قابلية بروتينات الشرش والحليب الخام على ربط ايون الحديدوز ومقارنه مع EDTA وحامض الستريك**

**Ali Khudhair Jabir Alrikabi** **Haider Ibrahim Ali Bashaer Abd AlMutalib**

Department of Food Science, College of Agriculture

University of Basrah.

## Abstract

This study was conducted in order to purify glycomacropeptide from both whey goat and cow. Thereafter, The molecular properties of purified glycomacropeptide and its effects as antioxidant were studied. Furthermore, the ability of pasteurized milk, unpasteurized milk, and whey protein for each used milk were studied to measure their effects as antioxidants. The results were Glycomacropeptide protein was separated using TCA method and boiling temperature method with alcohol. The TCA method showed sufficient results by giving more production with high activity for isolated protein compared to temperature method with alcohol, thus TCA method was used in this study. Sephadex G-25 was used to purify both whey goat and cow. After that, electrophoresis technique was assigned by using polyacrylamide gel in order to be sure about the purity of isolated protein (one band).The percentage of carbohydrate, protein, sialic acid of glycomacropeptide from both whey goat and cow were 27.5%, 32 %, 19.9%, 25%, 12% and 17 %, respectively.The molecular weight of glycomacropeptide protein was 27 kDa and 29 kDa for both cow milk and goat milk, respectively.The ability of pasteurized milk, unpasteurized milk, and whey protein for each used milk were studied to measure their effects as antioxidants. The results were as follow: The antioxidant activity of glycomacropeptide protein from goat milk was more effective to prevent linoleic acid oxidation compared to cow milk, while whey protein had less antioxidant activity compared to glycomacropeptide.Glycomacropeptide protein exhibited high values of H2O2 scavenging activity. The scavenging activity was 92.145 % and 95.678 % at concentration 5 mg/ml compared to ascorbic acid and rutin, which were 76.955 % and 66.920%, respectively. The reducing power was 139.21 % and 96.13 % compared to others

samples, while the reducing power was less than tocopherol and BHT, which were 195.8 % and 226.48 %, respectively.Glycomacropeptide protein exhibited higher ferric-reducing activity at 5 mg/ml, while ferric-reducing activities of goat and cow milk were 89.696 % and 98.269 % for EDTA and citric acid, respectively.