
**Some Factors Affecting on stability of Antioxidant Activity of Carnosines
Extracted From Some Animal Sources**

Lena Samer Mohammed** Aum–El–Bashar, H.J AL–Mossawi Rawdha Mahmood. Ali

Food Science Dept – College of Agriculture – University of Basrah

Basrah – Iraq

Abstract

Carnosines were extracted from chicken breast meat, goose breast meat, alkhshni fish , bovine thigh meat and bovine brain, by using alcohol separation, factors influencing the consistency of effective antioxidant carnosines prepared with temperature , pH , sodium chloride salt , light , and sugars, were during examined the consistency of carnosines antioxidants towards different degrees of thermal treatment ranging between 25–121C°, the highest value was 70 C°, with the change in pH of 3–11 carnosines showed an increase in antioxidant effectiveness with increasing pH value down to 11, when different treatment in concentrations of salt NaCl ranged between 2% and 8% were higher effective antioxidant when concentration was 4% and exceed antioxidant effectiveness of carnosines transactions when they were to darkness. More than that were exposed to light, and showed a high susceptibility carnosines interact with the sugars were higher effectiveness with the sugar fructose which is increasing with increasing to a maximum at 400 mg/ml concentration.

بعض العوامل المؤثرة في ثباتية الفعالية المضادة للأكسدة للكارنوسينات المستخلصة من بعض

المصادر الحيوانية

لينا سمير محمد** أم البشر حميد جابر الموسوي روضة محمود علي العلي

قسم علوم الأغذية - كلية الزراعة - جامعة البصرة

البصرة . العراق

الخلاصة

تم إستخلاص الكارنوسينات كحوليا من لحم صدر الدجاج و صدر الوز وسمك الخشني ولحم الفخذ والمخ البقري ، دُرست العوامل المؤثرة في ثباتية الفعالية المضادة للأكسدة للكارنوسينات المُحضرة شملت درجة حرارة ورقم هيدروجيني وكلوريد الصوديوم والضوء والسكريات. عند دراسة ثباتية الكارنوسينات المضادة للأكسدة تجاه المعاملة الحرارية والتي تراوحت بين 121.25 °م فكانت أعلى قيمة لها عند درجة 70 °م ، ومع التغير في الرقم الهيدروجيني من 3 - 11 أظهرت الكارنوسينات زيادة في الفعالية المضادة للأكسدة مع زيادة قيمة الرقم الهيدروجيني 11، وعند المعاملة بتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم (2.8 %) بلغت أعلى فعالية مضادة للأكسدة عند التركيز 4 % ، وكانت فعالية الكارنوسينات المضادة للأكسدة عند المعاملات المُعرضة للظلام هي الأعلى من بين مثيلاتها المعرضة للضوء ، كما أظهرت الكارنوسينات قابلية عالية في التفاعل مع سكر الفركتوز والتي أخذت تتزايد مع زيادة التركيز وصولا إلى حدها الأقصى عند التركيز 400 ملغم/مل .

المقدمة

من الامور التي تطورت في مجال علوم الأغذية دراسة المركبات الفعالة حيويًا Bioactive compounds الموجودة في الأغذية من مصادرها الحيوانية والكشف عن دورها في وقاية خلايا الجسم وأعضائه تجاه الحالات المرضية ، من بين هذه المركبات البيبتيدات الثنائية ، إذ تُعد عضلات اللحوم وبعض البروتينات المصادر الرئيسية لإنتاج البيبتيدات الفعالة حيويًا Bioactive.piptide إذ تُحضر إما من خلال استعمال الطرائق الإنزيمية أو الاستخلاص المباشر بالمذيبات العضوية وتستعمل لتدعيم القيمة الغذائية كما يمكن الإستفادة منها كعامل مساعد في المحافظة على صحة الإنسان (Liu *et al.*, 2016). تتكون البيبتيدات المنخفضة الوزن الجزيئي كيميائيا من حامضين أميين β -alanine و L-Histidine وتوجد في الأغذية الحيوانية وجسم الإنسان وعادة تتواجد في أنسجة اللبائن وخاصة في خلايا

العضلات الهيكلية كما توجد بتركيز عالية في خلايا الكبد والعضلات والدماغ ، يرتبط تركيزها في العضلات بالعمر إذ يتناقص مع تقدم العمر (Boldyrev *et al.*,2013) .

على الرغم من إكتشاف الكارنوسين المبكر(منذ العام 1900) ، إلا أن دوره الحيوي لم يعرف إلا حديثاً ، إذ أكدت الدراسات التي تناولت وظائفه والمركبات المشتقة منه على أهميته في توفير سعة بفرية عالية وإن له فعالية عالية كمضاد للأكسدة و طارد للجذور الحرة و رابط لأيونات المعادن ودوره المضاد للشيخوخة وفي معالجة العديد من الأمراض ، كذلك معالجة الجروح فضلا عن دوره المحفز للجهاز المناعي ولكن الكل مُجمع على ان الكارنوسين هو أحد مضادات الأكسدة التي تحدث بشكل طبيعي ويحمي من الاكسدة التي تتسببها الجذور الحرة (Boldyrev2001; Aydogan 2012) .

هناك الكثير من العوامل التي تؤثر في ثباتية الفعالية المضادة للأكسدة مثل درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني والضوء والأملاح والسكريات وغيرها، إذ تؤثر درجة الحرارة تأثيراً مباشراً على فعالية الببتيدات في قابليتها على تثبيط عمليات الأكسدة (Zhao *et al.*,2011) كما أن للرقم الهيدروجيني تأثير كبير على النشاط المضاد للأكسدة إذ أن الإنخفاض في الرقم الهيدروجيني يمكن أن يتسبب في إنخفاض النشاط المضاد للأكسدة وبما أن الكارنوسين يعمل كعامل داري بفعل خصائصه الفسيولوجية للحفاظ على الرقم الهيدروجيني رغم الظروف والمتغيرات فهو يتمكن من الحد من عملية الأكسدة في الأنسجة الحيوانية (Kohen *et al.*,1988) .

ويؤثر التعرض للضوء في ثباتية فعالية الببتيدات المضادة للأكسدة لها عند خزن الغذاء بدرجة حرارة الغرفة فهناك إختلافات واضحة بين ثباتية الفعالية المضادة للأكسدة للببتيدات المعرضة للضوء عن تلك التي لم تتعرض للضوء تحت الظروف نفسها (Zhu *et al.*,2014).

إستعملت بعض السكريات مثل الزايلوز والفركتوز والكلوكوز والسكروز في زيادة ثباتية الببتيدات المحضرة في حفظ الزيت المخزن وإختلفت هذه الأنواع فيما بينها في مقدار الثباتية (Kawashima *et al.*,1981) .

المواد وطرائق العمل

تم الحصول على المنتجات الحيوانية من الأسواق المحلية في محافظة البصرة وهي اللحم (لحم صدر الدجاج ، لحم صدر الوز، لحم الفخذ البقري) ومخلفات الأسماك الصغيرة و المخ البقري ، قُطعت اللحوم والأسماك الصغيرة إلى قطع صغيرة و تُرِكَ المخ البقري بدون تقطيع ووضعت العينات في أكياس البولي أثيلين ثم حُفظت جميعها بالتجميد (-18 ± م°) لحين الاستعمال.

الإستخلاص بالكحول Alcoholic Extraction

تم الاستخلاص وفقاً للطريقة المتبعة من قبل Auh *et al.* (2010) وذلك بوضع العينات في الثلجة ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) إلى اليوم التالي ، وذلك بإذابة (250 غم) من العينات المجمدة وبنسبة 1: 2.4 من المحلول الكحولي ذو تركيزين 35% ، 70% حُضنت بعدها على درجة حرارة 25°C مع التحريك مدة 1-3 ساعة ، نُبذ المزيج مركزياً بسرعة 14000× لمدة 30 دقيقة ، أُخذ بعدها 300 مل من الراشح وخلط مع 900 مل من كحول الايثانول البارد وحسب التركيز المستعمل (35% ، 70%) حفظ المزيج في الثلجة ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) مدة 30 دقيقة ، أُجري له بعدها عملية نبذ مركزي ثم الترشيح باستعمال ورق الترشيح Whatman.No.4 .

الفصل بالترشيح الفائق Separation with Ultrafiltration

أجري الفصل باستعمال جهاز الترشيح الفائق Ultrafiltration وذلك بتمرير الرواشح المستخلصة من الخطوة السابقة عبر أغشية حجم مساماتها 5 ، 10 ، 30 كيلو دالتون وتحت ضغط 70Psi أي ما يعادل 4.7 كغم /سم² وباستعمال غاز النتروجين وذلك لمنع حدوث الأكسدة ، جُمع الراشح الجديد وركز باستعمال المُبخّر الفراغي الدوار على درجة 40°C ، ثم جُفد الراشح المركز بجهاز التجفيد.

أختبرت الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات ثم دُرست العوامل المؤثرة عليها وفقاً للطرق المذكورة في (2000) EPO و Zhu *et al.* (2014) ومنها :

درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني وملح كلوريد الصوديوم والضوء والسكريات.

التحليل الاحصائي :

صُممت التجارب الإحصائية للبيانات بإتباع التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design (CRD) وفقاً لما جاء في الراوي وخلف الله (2000) . وُحُللت النتائج باستعمال البرنامج الحاسوبي SPSS (2009). وأختبرت العوامل المدروسة بالإعتماد على أقل فرق معنوي بين المتوسطات (L.S.D) عند مستوى احتمالية (0.05) .

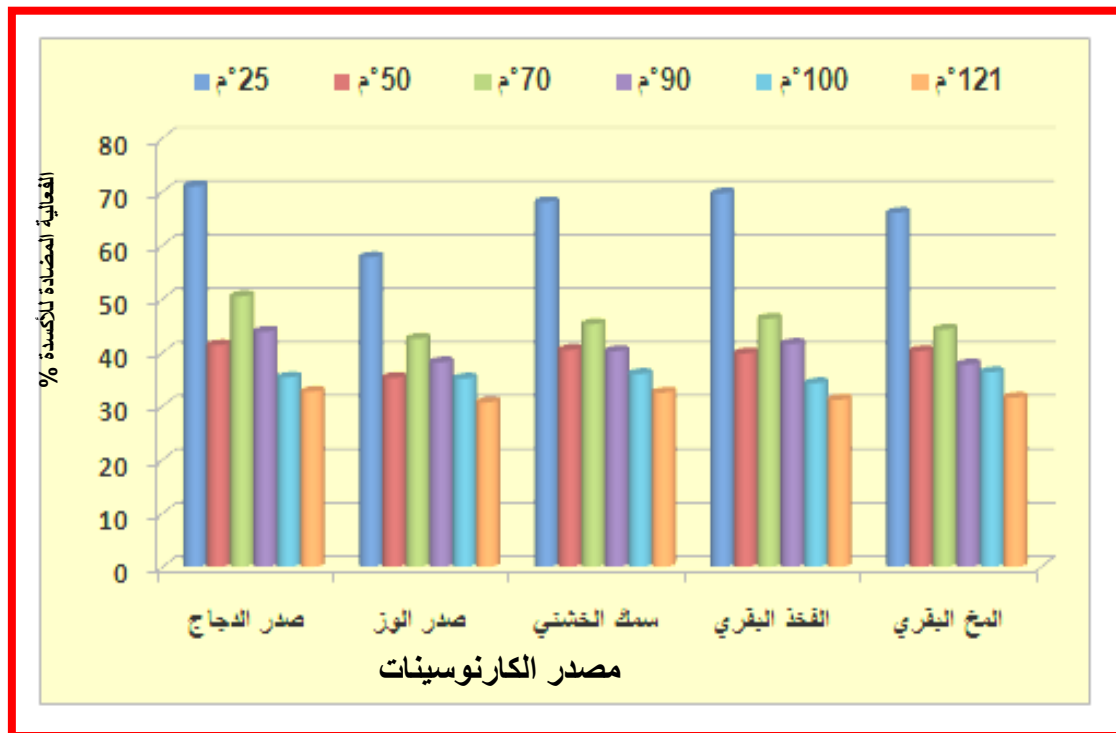
النتائج والمناقشة

العوامل المؤثرة في ثباتية الفعالية المضادة للأكسدة للكارنوسينات

. درجة الحرارة

توضح النتائج في الشكل (1) تأثير درجة الحرارة على الفعالية المضادة للأكسدة للكارنوسينات لكل من لحم صدر الدجاج ولحم صدر الوز وسمك الخشني ولحم الفخذ والمخ البقري عند التركيز 100 ملغم/ مل بعد معاملتها بدرجات حرارة 50°C و 70°C و 90°C و 100°C و 121°C مدة 60 دقيقة و 121°C مدة 15 دقيقة ، إذ أظهرت نتائج

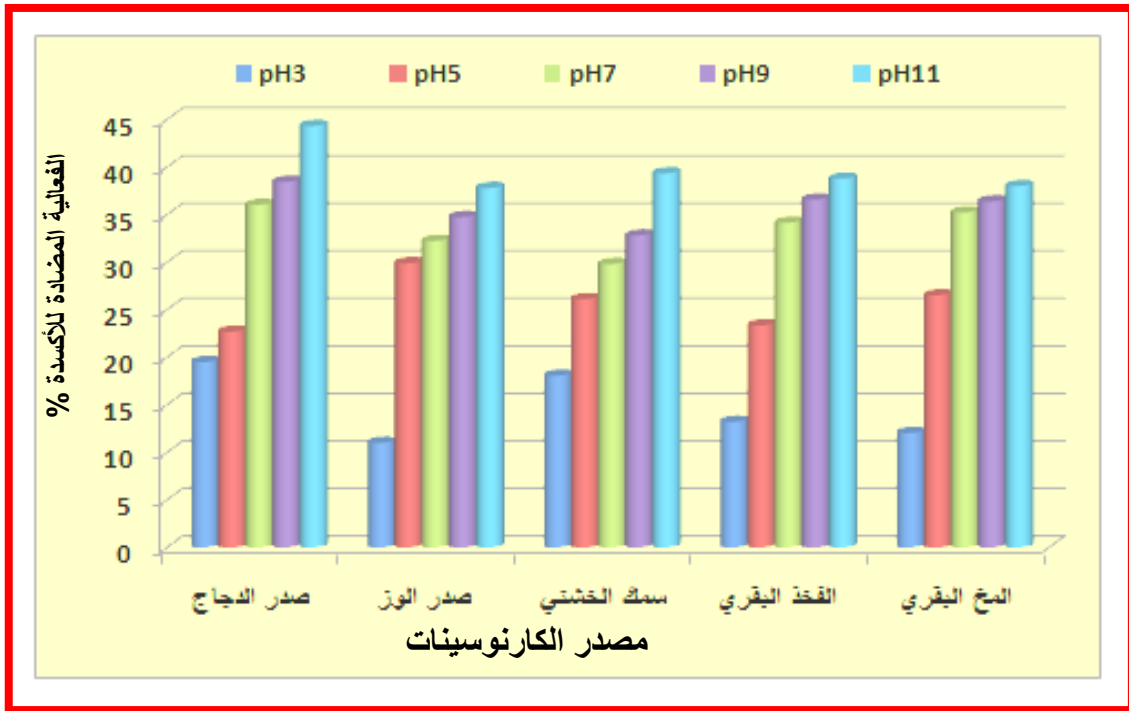
التحليل الإحصائي أن المعاملة الحرارية أثرت معنويا ($P < 0.05$) على الفعالية المضادة للأكسدة لجميع الكارنوسينات ، أن الزيادة التدريجية في درجة الحرارة من 50 °م إلى 70 °م رافقتها زيادة في فعالية الكارنوسينات لتعطي أعلى قيمة لها عند درجة حرارة 70 °م لجميع الكارنوسينات إذ بلغت 50.05 % لحم صدر الدجاج ، وقد إنخفضت الفعالية المضادة للأكسدة للكارنوسينات بارتفاع درجات الحرارة أعلى من 70 °م لتصل إلى 43.92 % عند درجة حرارة 90 °م وإنخفضت الى 35.40 % عند درجة حرارة 100 °م وإستمرت بالإنخفاض حتى وصلت إلى 32.7 % عند درجة 121 °م لكارنوسين لحم صدر الدجاج وهكذا بالنسبة لجميع العينات ، وهذا ينسجم مع ما توصلت اليه الحلفي (2016) من خلال إجراء دراسة حول تأثير المعاملة الحرارية في ثباتية الفعالية المضادة للأكسدة للبيبتيدات المستخلصة من الروبيان ومخلفات الأسماك بإستعمال درجات حرارة 25 °م و 40 °م و 50 °م و 60 °م و 80 °م و 100 °م إذ أخذت الفعالية بالازدياد من 25 °م إلى 60 °م وإنخفضت عند 80 °م ، وهو عائدا الى تحطم بعض التراكيب المسؤولة عنها بفعل التغيرات في درجات الحرارة من خلال إرتفاعها (Nalinanon *et al.* 2011) .



شكل (1): تأثير درجة الحرارة على الفعالية المضادة للأكسدة للكارنوسينات الكحولية

. الرقم الهيدروجيني

توضح النتائج في الشكل (2) تأثير الرقم الهيدروجيني على ثباتية الفعالية المضادة للأوكسدة لكارنوسينات المنتجات الحيوانية قيد الدراسة بتركيز 100 ملغم/ مل بعد معاملتها بمستويات من pH (3-11)، أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن الاختلاف في قيم الـ pH كان له تأثيراً معنوياً ($P < 0.05$) على الفعالية المضادة للأوكسدة لجميع الكارنوسينات ويلاحظ أن الزيادة التدريجية في الـ pH من 3 إلى 11 رافقها زيادة في فعالية الكارنوسينات لتعطي أعلى قيمة لها عند pH 11 لجميع الكارنوسينات إذ بلغت للحم صدر الدجاج 19.50 % و 22.70 % و 36.05 % و 38.46 % عند القيم 3 و 5 و 7 و 9 على التوالي ووصلت إلى 44.34% عند pH 11 وهكذا بالنسبة لجميع العينات.

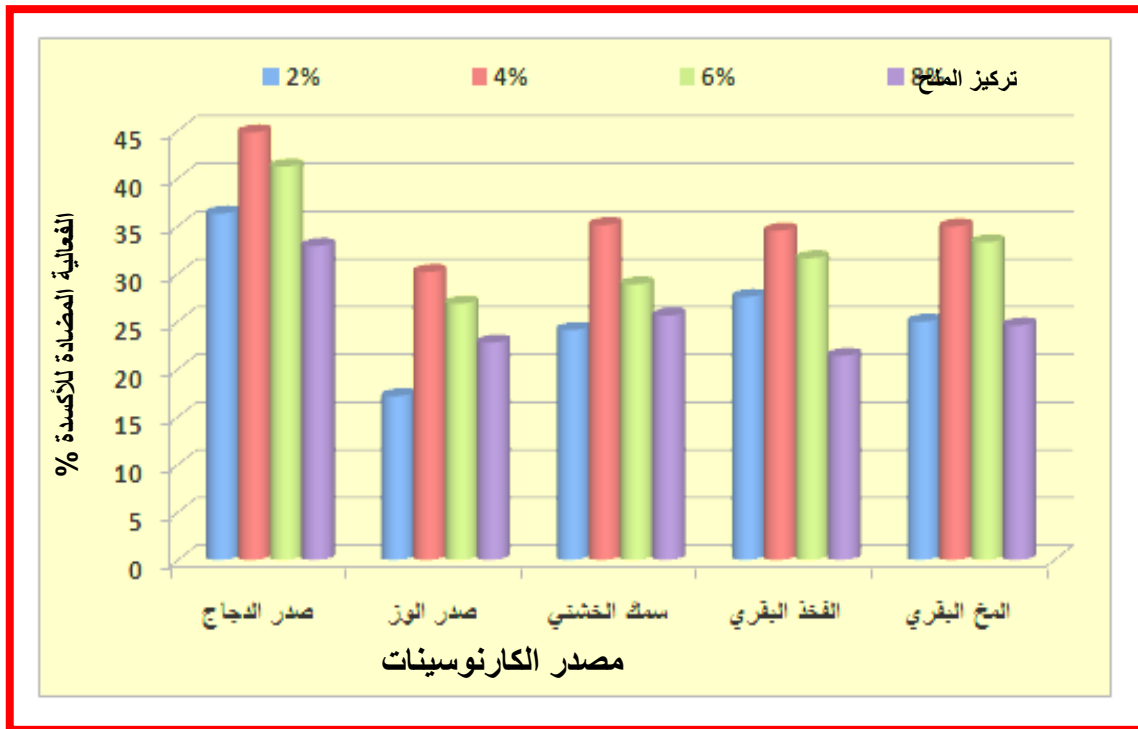


شكل (2): تأثير الرقم الهيدروجيني على الفعالية المضادة للأوكسدة لكارنوسينات

تعتبر البيبتيدات الثنائية مثل الكارنوسين والانسيرين من المواد الامفوتيرية فهي تحتوي على كل من المجاميع الحامضية الكربوكسيلية ($\text{COOH}-$) والمجاميع الأمينية (NH_2) ، وفي المحلول المائي فإنها تميل إلى نقل البروتون من المجموعة الكربوكسيلية إلى المجموعة الأمينية لإحداث حالة من التوازن (Jozanovic. *et al.*, 2015).

. كلوريد الصوديوم

توضح النتائج في الشكل (3) تأثير المعاملة بكلوريد الصوديوم على ثباتية الفعالية المضادة للأكسدة لكارنوسينات المنتجات الحيوانية قيد الدراسة ، أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية ($P<0.05$) بين الفعالية المضادة للأكسدة للكارنوسينات وتركيز كلوريد الصوديوم ، إستعملت التراكيز 2 % و 4 % و 6 % و 8 % ، إذ رافقت الزيادة في التركيز من 2 % إلى 4 % زيادة في فعالية الكارنوسينات لتعطي أعلى قيمة لها عند جميع الكارنوسينات فكانت أعلى فعالية عند كارنوسين لحم صدر الدجاج إذ ارتفعت من 36.33 % إلى 44.84 % ، في حين أحدثت زيادة التركيز إلى 6 % إنخفاض في الفعالية المضادة للأكسدة للكارنوسينات جميعها وإستمر هذا الإنخفاض بزيادة التركيز لتصل عند التركيز 8% إلى 32.95 % لكارنوسين لحم صدر الدجاج وهكذا بالنسبة لجميع العينات .



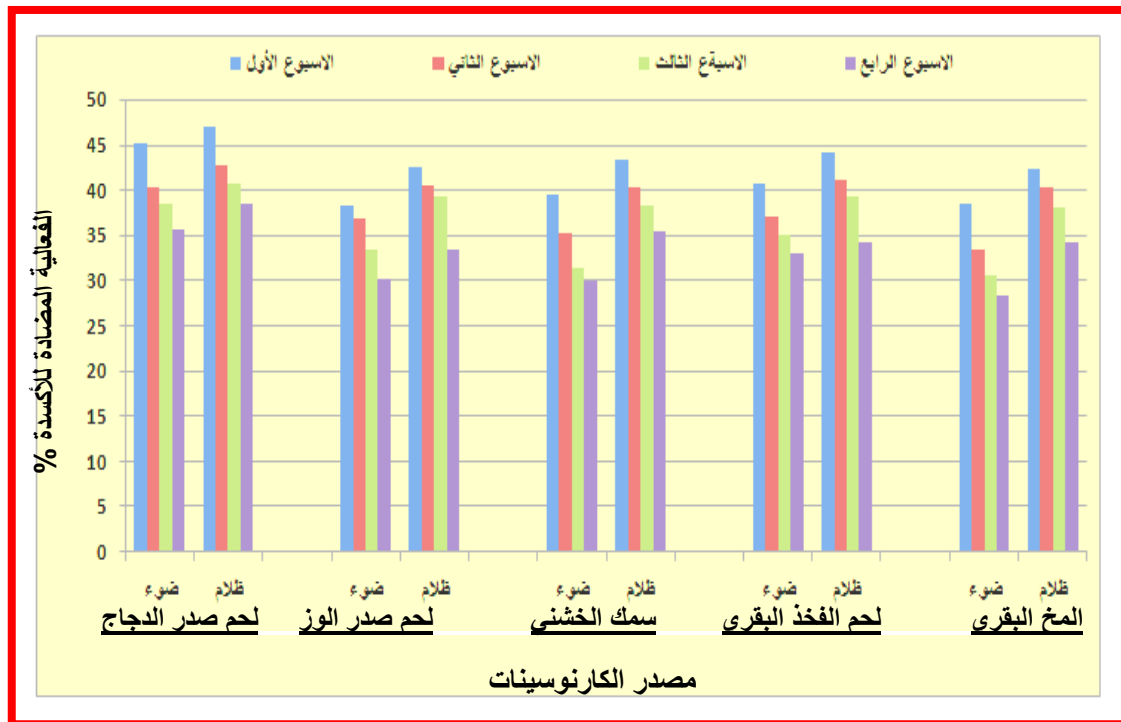
شكل (3) تأثير ملح كلوريد الصوديوم على الفعالية المضادة للأكسدة للكارنوسينات الكحولية

تتفق النتائج مع توصل اليه كل من (Zhu et al.2014) والحلفي (2016) إذ وجدوا أن فعالية البيبتيدات المضادة للأكسدة تزداد بزيادة التركيز الملحي الى حد 4% ثم تتخفص بتقدمه إلى 8%. وقد يعزى هذا الإنخفاض المرتبط بزيادة التراكيز الى حدوث دننرة للبيبتيدات وتكوين سلاسل بيتيدية ذات إلتواءات عشوائية تتشابك معا وتتجمع فيزيائيا أو كيميائيا ، من جهة أخرى تعمل التراكيز الملحية المنخفضة على تثبيت المجاميع السطحية المشحونة وتزيد من حدة

التنافر بين السلاسل الببتيدية مما يجعلها تتباعد عن بعضها ولا تتجمع أو تترسب كما أن التراكيز العالية تعمل على تقليل قوى التنافر بين السلاسل ، أو قد يحدث تنافس بين أيونات الاملاح وجزئيات الماء مما يشجع تكوين الروابط الهيدروجينية بين المجاميع القطبية السطحية الأمر الذي يجعل من الببتيدات تميل نحو التجمع أو الترسيب (مرسى وشامة، 2004) .

. الضوء

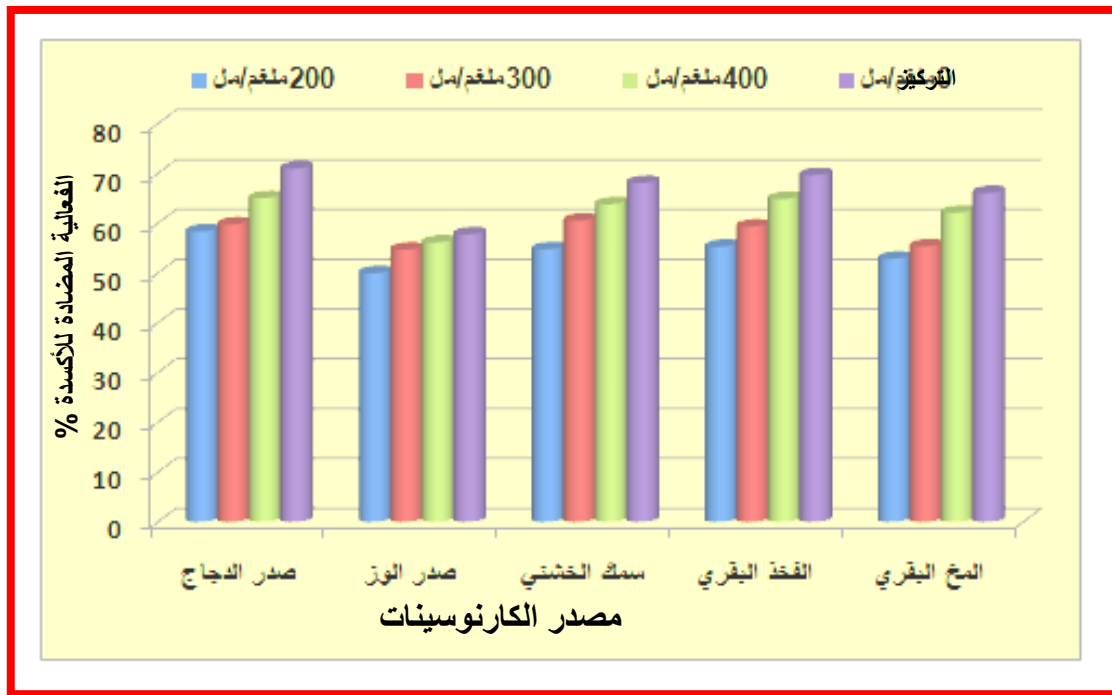
تُظهر النتائج في الشكل (4) تأثير الضوء والظلام على الفعالية المضادة للأكسدة لكارنوسينات المنتجات الحيوانية قيد الدراسة ، أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية ($P < 0.05$) للثباتية بين الفترات الزمنية لجميع أنواع الكارنوسينات المحضرة كما تفوقت معنويا المعاملات التي تعرضت للظلام على مثيلاتها التي تعرضت للضوء ، إن الفعالية المضادة للأكسدة للكارنوسينات بدأت تتخفف مع الوقت حيث كانت أعلى قيمة لها في الاسبوع الأول 45.09 % و 46.96 % عند كارنوسين لحم صدر الدجاج للضوء والظلام على التوالي ، إن تعريض الغذاء للضوء لفترات ممتدة من شأنه أن يعمل على تشجيع عملية الأكسدة كما لا يبعد أن يساعد في تطويرها وإلحاق المزيد من الضرر فيها الأمر الذي يجعل منه عامل مهم من العوامل المساعدة في الأكسدة. جاءت النتائج متقاربة لما توصل إليه *Zhu et al.*(2014) إذ بينوا أن الفعالية المضادة للاكسدة للببتيدات المعاملة بالضوء أعلى منها في الظلام وكذلك فإن هذه الفعالية قلت بتقادم الوقت .



شكل (4): تأثير الضوء والظلام على الفعالية المضادة للأكسدة للكارنوسينات

. الفركتوز

تشير النتائج في الشكل (5) تأثير سكر الفركتوز على الفعالية المضادة للأكسدة لكارنوسينات المنتجات الحيوانية قيد الدراسة ، تظهر نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية ($P<0.05$) للفعالية بين التراكيز لجميع أنواع الكارنوسينات المحضرة ، ويلاحظ أن مع زيادة التركيز تزداد هذه الفعالية ، و تظهر أعلى قيمة للفعالية عند كارنوسين لحم صدر الدجاج حيث بلغت 57.36 % عند التركيز 200 ملغم/ مل وإزدادت عند التركيز 300 ملغم/مل إلى 59.78 % وعند التركيز 400 ملغم/مل بلغت 65.07 % .



شكل (5): تأثير سكر الفركتوز على الفعالية المضادة للأكسدة للكارنوسينات

إتفقت النتائج مع ماتوصل إليه Kawashima *et al.*(1981) عند دراستهم لتأثير بعض السكريات على الفعالية المضادة للأكسدة لبعض الببتيدات فقد تدرجت من الفركتوز ثم الكلوكوز ثم السكروز وبينوا أن الفعالية المضادة للأكسدة للبيبتيدات تتأثر إيجابيا بوجود السكريات وتزداد بزيادة التركيز ، كما يمكن أن يعود السبب إلى إحتواء الببتيدات إلى الاحماض الامينية ذات السلاسل الفرعية ومع وجود السكريات تعمل على كبح عملية الاكسدة من خلال إيقاف تكوين الجذور الحرة كما إن للكارنوسين المستخلص بالكحول والماء دورا في تثبيط تفاعل البروتينات مع السكريات المختزلة والالديهيدات والكيونات الضارة والتي تحدث يوميا في مختلف خلايا الجسم فتنتج عنها مركبات كاربونيلية

خطرة ، إذ بإمكان الكارنوسين التفاعل مع العوامل المشجعة لهذه التفاعلات بالإضافة لذلك فإن تفاعل الكارنوسين مع السكريات ينتج عنه مركبات غير سامة (Hpkiss and Brownson, 2000; Wang *et al.*, 2000; Ukedat *et al.*, 2002).

References

الحاجي ، ضحى داود سلمان .(2006).إستخلاصالكارنوسين من صدر الدجاج وتحضيره مختبريا ودراسة بعض خصائصه الوظيفية . أطروحة دكتوراه ، كلية الزراعة ، جامعة بغداد .
الحلبي ، عالية زيارة هاشم .(2016).إستخلاص وتنقية وتوصيف متحلات بروتينية من مخلفات الأسماك والروبيان وإختبار كفاءتها في حفظ أقراص اللحم البقري المفروم. أطروحة دكتوراه ، كلية الزراعة ، جامعة البصرة .
الراوي ، خاشع محمود و خلف الله ، عبد العزيز محمد . (2000). تصميم وتحليل التجارب الزراعية ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، جامعة الموصل ، مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر .
مرسي ، جمال خالد و شامة ، عبد المنعم إبراهيم .(2004). كيمياء بروتين . دار الكتب العلمية للنشر والتوزيع رقم الإيداع 8546 .

Auh, J. H.; Namgung, N.; Shin, K. S.; Park, S. W. and Paik I. K. (2010). Effects of supplementary blood meal on the content of carnosine and .anserine. .in. .broiler. .meat .. J.. Poult. .Sci..47:302–309.

Aydogan ,S.(2012). The importance of carnosine to erythrocyte rheology, Series on Biomechanics. I:27: 93–99.

Boldyrev A. (2001).Carnosine as a modulator of endogenous Zn² effects. TrendsPharmacolSci22: 112–113.

Boldyrev, A.; Aldini , G. and Derave, W .(2013) . Paphysiology and pathophysiology of carnosine. Physiol. Rev., 93: 1803–1845.

Escalante, A. S.; Torrescano, G.; Djenane, D.; Antonio Beltrán, J; Giménez B and Roncalés P.(2011). Effect of antioxidants and lighting conditions on color and lipid stability of beef patties packaged in high–oxygen modified atmosphere. CyTA – Journal of Food.9(1) 6337 –6345.

(EPO) European Patients Office. (2000). Corrected european patent specification printed by Jouve, 75001 Paris.

Hpkiss, A. R.; and Brownson, C. (2000). A possible new role for the anti–ageing peptide carnosine. Cellular and Molecular Life Sciences. 57(5): 747–753.

Jozanović, M.; Medvidović–Kosanović, M. and Sak–Bosnar, M.(2015). Voltammetric Characterization and Determination of Histidine Dipeptides – Carnosine and Anserine, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 10 : 6548 – 6557.

Kawashima, K.; Itoh, H. and Chibata, I.(1981). Antioxidant Effect of Peptide in Combination with Sugar on Autoxidation of Edible Oils. *Agric. Bioi. Chern.*,45 (4) 987–992.

Kohen, R.; Yamamoto, Y.; Cundy, K. C. and Ames, B. N. (1988). Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 85(9) 3175–3179.

Liu ,R.; Xing ,L.; Fu ,Q.; Zhou ,G.; and Zhang ,W .(2016). A Review of Antioxidant Peptides Derived from Meat Muscle and By–Products Antioxidants,5 (32),1–14.

Nalinanon, S.; Benjakul ,S.; Kishimura, H.andShahidi , F. (2011). Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chem.* 124:1354–1362.

SPSS. (2009). Statistical Package for Windows. ver.17.0., Chicago, spss, Inc.

Ukeda , H.; Hasegawa ,Y.; Harada ,Y.; Sawamura , M. 2002. Effect of carnosine and related compounds on the inactivation of human Cu,Zn–superoxide dismutase by modification of fructose and glycolaldehyde *Biosci Biotechnol Biochem.*,66(1) 36–43.

Wang ,A. M.; Ma. C. ; Xie, Z. H. ; and Shen1, F.(2000) . Use of Carnosine as a Natural Anti–senescence Drug for Human Beings *Biochemistry (Moscow):* 65 (7) 869–871.

Zhao, J.; Huang, G. R.; Zhang, M. N.; Chen, W. W. and Jiang, J. X .(2011). Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant stability of shrimp processing byproduct hydrolysate. *Am J. Food. Tech.*, 6(10) 904–913.

Zhu, C.Z.; Zhang, W.G.; Kang, Z.L.; Zhou G.H. and Xu, X.L.(2014). Stability of an antioxidant peptide extracted from Jinhua ham. *Meat Science*, 96(1)783–789.