تحضير وفصل بولي ببتيدات مضادة للأكسدة من التحلل الأنزيمي للمركز البروتيني لنخالة القمح

منال عبد الواحد صلبوخ　　**مكارم علي موسى**　　**صبري جثير عبود**

كلية الزراعة – جامعة كربلاء　　**كلية الزراعة – جامعة بغداد**　　**كلية الزراعة – جامعة بغداد**

الملخص :

حلل المركز البروتيني لنخالة القمح باستعمال انزيم Trypsin البنكرياسي . اظهرت نتائج التحلل الانزيمي اعلى درجة تحلل انزيمي 17% عند درجة حرارة 37 م ، رقم هيدروجيني 8 ، تركيز الانزيم 2 مل /100 مل محلول بروتيني ولمدة 2 ساعة .تم فصل المتحلل الانزيمي بتقنية الترشيح الهلامي وتم الحصول على ثلاث قمم وكانت بتركيز بلغ (0.234 ، 0.546 ، 0.789) ملغم /مل على التوالي ،نتائج تقنية الترحيل الكهربائي باستخدام SDSاظهرت بولي ببتايدات بوزن جزيئي اقل من 7 كيلو دالتون ، ، قدرت الفعالية المضادة للأكسدة للأجزاءالمفصولة باستعمال عدة فحوصات وهي الفعالية المخلبية لعنصر النحاس وتقدير القوة الاختزالية وتقدير القوة الافتراسية تجاه DPPH خارج جسم الكائن الحي . متحللات بروتين نخالة الحنطة اظهرت فعالية واضحة لاقتناص عنصر النحاس بلغت 67.9% وقوة اختزالية 87.9% واظهرت اعلى قابلية لاختزال DPPH بلغت 75.6% مقارنة مع مضاد الاكسدة التجاري BHT .

Preparation and Separation of Antioxidant Polypeptides from Enzymatic Hydrolysis of Wheat bran protein concentrate

ManalAbdAlwahedSalbok　　**Makarem Ali Musa**　　**SabryChetheerAbod**

Agriculture Collage–Karbala University　　**Agriculture Collage–Baghdad University**　　**Agriculture Collage–Baghdad University**

Abstract

Wheat bran protein concentrate was hydrolyzed using pancreatic Trypsin . The results showed highest enzymatic hydrolysis was 17 % on 37c , PH 8, Enzyme concentration 2ml/100 ml protein suspension for 2h , Enzymed hydrolysate separated using gel filtration technique and three peaks were obtained with peptides concentrate (0.234, 0.546, 0.789) mg/ml receptivity. SDS Electrophoresis results showed polypeptide less than 7 K Da. The antioxidant activity for separated parts was evaluated using different assays, such as Cu ion chelation, reducing power, scavenging power against 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and reactive oxygen species under in vitro conditions . Wheat bran protein hydrolytes exhibited an effective Cu^{+2} chelating activity 67.9% and reducing power 87.9% . It also showed a high DPPH radical scavenging activity (75.6 %), which was comparable to that of the synthetic antioxidant, (butylatedhydroxytoluene).

.

* البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الاول

المقدمة

تعرف المتحللات البروتينية على إنها (خليط من بولي ببتايد ، اوليكوببتايد واحماض امينية تصنع من مواد بروتينية باستعمال التحلل الجزئي) . (Schaafsma , 2009) .

كما تعرف المتحللات على انها المواد الناتجة من تحلل البروتينات بعد معاملتها بحامض خفيف أو قاعدة خفيفة أو إنزيم اذ تتحول البروتينات الخام إلى ببتيدات بحجم أصغر وتشمل عملية التحلل المائي للبروتين إجراء تحوير في تركيبه الكيميائي لغرض تحسين خواصه الوظيفية بهدف إمكانية استعماله في الصناعات الغذائية كبدائل غذائية وتحسين بعض الصفات الحسية والإرتقاء بالإستساغة، وزيادة الثباتيةالخزنية للغذاء المصنع (Adler-Nissen, 1986). اتجهت الأبحاث الحديثة للمتحللات البروتينية ذات المصدر النباتي والتي تكون رخيصة الثمن ومتوفرة كذلك تعتبر نواتج ثانوية لعمليات التصنيع ومنها نخالة الحنطة والاوكارا (منتج ثانوي لفول الصويا) والتي تكون مصدر جيد للبروتين والألياف بنفس الوقت (Aoife et al ., 2013) . وجد Li *et al* ., (2012) امكانية تحضير متحللات بروتينية من سحالة الرز وامكانية تحسين الذوبانية لبروتينات الرز من خلال اجراء التحلل الأنزيمي باستعمال عدد من الانزيمات منها (Trypsin ،Alcalase، Neutrase ،Flavourzyme) وكانت افضل النتائج باستعمال انزيم Trypsin وكانت افضل الظروف الرقم الهيدروجيني 7.6 وتركيز الانزيم الى المادة الاساس (0.89:1000) غم /غم وافضل وقت للتحلل 2.42 ساعة واظهرت المتحللات البروتينية ذوبانية عالية في مدى من رقم هيدروجيني بين (11-2) .وازداد الاهتمام في السنوات الاخيرة والطلب على مضادات الاكسدة الطبيعية بسبب زيادة التاكيد على مضاراستعمال مضادات الاكسدة الصناعية وتأثيرها على الصحة العامة (Ito *et al*., 1985) وعدت مضادات الاكسدة الطبيعية مثل الزيوت والبذور الزيتية والبروتينات والمتحللات البروتينية والفواكه والخضروات وغيرها مأمونة للاستعمال في الاغذية.وتوجد العديد من الدراسات حول متحللات البروتينات النباتيةالتي لها فعالية كمضاد للأكسدة منها متحللات كل من كلوتين الحنطة (Boboev *et al*., 2012) بروتينات جنين الحنطة (Zhu *et al* 2006) وبروتين الشوفان (Tsopmo*et al* ., 2010) ،بروتين الرز (Zhang *et al*, 2010) و بروتين فول الصويا (Chen *et al*., 1996,)) ، و بروتين الذرة (Kong and Xiong, 2006) .

المواد وطرق العمل :

تحضير المتحللات البروتينية بالتحلل الانزيمي :

اجري التحلل الأنزيمي وفق الطريقة المذكورة في . (Chanputet al., ،Adebiyi,et al ., 2008) (2009) : مع بعض التعديلات الطفيفة وكانت ظروف التحلل استخدام المركز البروتيني بتركيز 10/100 (وزن/حجم) مركز بروتيني /ماء مزال الايونات وبرقم هيدروجيني 8 ودرجة حرارة 37 م وتركيز انزيم (2 مل) ولمدة 2 ساعة .

تقدير درجة التحلل للمتحللات البروتينية

Degree of hydrolysis determination

اتبعت طريقة O-Phthaldialdehyde (OPA) في تقدير درجة التحلل للمتحللات البروتينية الناتجة وتم تحضير المحاليل على وفق الطريقة التي وصفها Churchواخرون(1983) :

المحاليل والمواد المستعملة.

كاشف O-Phthaldialdehyde.

حضر بخلط 25 مل من محلول 100 ملي مول من البوراكس(sodium tetra borate) مع 2.5 مل من محلول 20% (وزن/حجم) من مادة دوديسيل كبريتات صوديوم(sodium dodecyl sulfate (SDSمع 40 ملغرام من مادة (OPA) مذاب في1 مل من الميثانول مع 100 مايكروليتر من -mercaptoethanolβ واكمل الحجم الى 50 مل بالماء المقطر الخالي من الايونات deionized water(D.W) ،وحضر الكاشف آنيا(Church et. al., 1983) تم اخذ -50 10مايكروليتر من المتحلل البروتيني واضيف له 2 مل من كاشف OPA ومزج الخليط وحضن ثم قيست الامتصاصية على 340 نانوميتر ثم قدرت درجة التحلل وفقا للمعادلة الاتية (Chanput et al .,2008).

DH (%) = (MW Δ340nm)/ (d.e.p) x 100

Where MW = Average molecular weight of amino acids (120)

Δ340nm = Absorbance at 340 nm

d = Dilution factor

e = Average molar absorption of amino acids (6000 M^{-1} cm^{-1})

P = protein concentration

تقدير الوزن الجزيئي للمتحلل البروتيني.

اتبعت طريقة Laemmle (1970) مع طريقة Schägger (2006) في تحديد الوزن الجزيئي للمتحلل البروتيني باستعمال الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل أمايد بوجود العوامل الماسخة (SDS-PAGE) باستعمال جهاز الترحيل الكهربائي المجهز من شركة Bio-Rad الامريكية.

تم استعمال البروتينات القياسية والموضح بالجدول (1) المجهزة من شركة Sigma وحضرت البروتينات على وفق تعليمات الشركة المجهزة واستخدمت البروتينات القياسية الموضحة في الجدول الاتي:

جدول (1) البروتينات القياسية

البروتينات	الوزن الجزيئي كيلو دالتن
Myosin	200
β-galactosidase	116
phosphorylase b	97
serum albumin	66
Ovalbumin	45
carbonic anhydrase	31
Lysozyme	14
Aprotinin	7

فصل المتحلات باستخدام كروموتوكرافيا الترشيح الهلام.

Gel – filtration chromatography.

المحاليل والمواد المستخدمة.

1.1.12.3 محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.2مولاري وبرقم هيدرجيني7.0.

حضر المحلول على وفق الطريقة التي وصفها Deutscher (1990).

محلول الدكستران الأزرق Blue Dextran- 2000.

حضر محلول الدكستران الأزرق 2000 والمجهز من شركة (Pharmacia Fine Chemicals) بتركيز 4 ملغم/مل باستخدام محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.2مولار ورقم هيدروجيني7 .

تحضير هلام Sephadex G25.

استخدم هلام السيفادكس G25 على وفق تعليمات شركة Sigma الامريكية المجهزة:

1- إذ تم وزن كمية معلومة من السيفادكس وخلطة بالماء المقطرD.W ووضع الخليط على درجة حرارة 90 °م في حمام مائي لمدة ثلاث ساعات .
2- ترك المعلق على درجة حرارة الثلاجة 4°م لمدة 12 ساعة وقبل عملية الصب خلط المزيج وازيلت الغازات منه(Degassing) ومن ثم تم صب المعلق في العمود الخاص المخصص لهذا الغرض والذي تبلغ ابعاده 1.5 X 55 سم
3- تم موازنة العمود بإمرار دارئ فوسفات الصوديوم 0.2 مولار والرقم الهيدروجيني 7وبمعدل مرور30 مل /الساعة.

طريقة العمل

فصل المتحللات باستخدام الترشيح الهلامي.

فصلت المتحللات بأمرار الراشح البروتيني على عمود السيفادكسG-25 الذي سبقت موازنته بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.2مولاري ذات الرقم الهيدروجيني 7 واستردت الأجزاء من العمود باستخدام دارئ فوسفات الصوديوم نفسه المستخدم بعملية الموازنة بسرعة جريان 30 مل /الساعة وبواقع 2مل للجزء الواحد بعدها تم قياس الامتصاص الضوئي على طول موجي280نانوميتر باستخدام spectrophotometer لأجزاء الغسل والاسترداد وجمعت الاجزاء على وفق المنحنيات الظاهرة واحتفظ بالأجزاء الناتجة في المجمدة بدرجة حرارة – 18 م لغرض اجراء التجارب اللاحقة.

تقدير تركيز الببتيدات Peptide content.

اتبعت طريقة O-Phthaldialdehyde الموصوفة من Church واخرون(1983) في تقدير تركيز الببتيدات في الراشح باعتماد المنحنى القياسي للتربتون وفق الطريقة التي ذكرها (Minervini et al,. 2003).

طريقة تقدير تركيز الببتيدات.

لتقدير تركيز الببتيدات المتكونة او المجاميع الامينية الحرة تم أخذ 5 مل من الراشح (القمم) الناتجة من الترشيح الهلامي ويخلط مع 1 مل من الماء D.W و10 مل من TCA 12% مع التحريك ويترك لمدة 10 دقائق

ومن ثم الترشيح بورق واتمان 2 وخزن الراشح بالتجميد حتى حين التقدير حيث تم اضافة 1مل من كاشف OPA المحضر انيا الى 50 مايكروليتر من الراشح. وتم قياس الامتصاصية على طول موجي 340نانوميتر بجهاز spectrophotometer خلال دقيقتين .

التطبيقات للمتحللات البروتينية.

الكشف عن قابلية المتحللات البروتينية كمضاد للاكسدة.

تم من خلال استخدام ثلاث طرق هي :

استخدام مادة DPPH .

المحاليل والمواد المستخدمة .

- حضر المحلول البروتيني المجفد بتركيز 2 ملغم / مل لكل من الاجزاء المفصولة الناتجة بالفصل بالترشيح الهلامي .
- محلول مادة DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical) بتركيز 0.1 ملي مولار.

حضر بوزن 39.44 ملغم من مادة DPPH ذوبت بكمية من إيثانول 95% وأكمل الحجم إلى 100 مل مزج لحين الإذابة التامة يحفظ في مكان مظلم (يحضر انيا قبل عملية التقدير).

تم قيس النشاط الكابح للجذور الحرة كمضاد اكسده لمتحلل بروتين النخالة باستخدام الطريقة الموصوفة من قبل Shimada et al., (1992) وباستخدام مادة (DPPH) مع بعض التعديلات الطفيفة اللازمة وكما يلي: -

طريقة العمل

اخذ الراشح للمحلول البروتيني للمتحللات الناتجة بعد عملية نبذ مركزي بسرعة 6000g لمدة 20 دقيقة لإجراء الاختبار.٠

- أضيف 2 مل من محلول المتحلل البروتيني في أنابيب زجاجية نظيفة جدا.
- أضيف 2 مل من محلول DPPH (0.1 ملي مولار) إلى المتحلل البروتيني ويحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة (30 ,15,45,60) دقيقة وفي مكان مظلم.
- قرأ الامتصاص الضوئي على طول موجي 517 نانومتر ولمكررين لكل نموذج.
- يعمل قراءة أنبوبة السيطرة (Blank) بنفس الخطوات السابقة مع استبدال المحلول المتحلل البروتيني بالإيثانول اي اضيف 2 مل من الايثانول و2 مل من محلول DPPH .
- استخرجت قابلية الكبح للجذور الحرة من المعادلة التالية: -

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = \frac{\text{Control absorbance} - \text{Sample absorbance}}{\text{Control absorbance}} \times 100$$

تقدير القوة الاختزالية Reducing power.

المحاليل والمواد المستخدمة.

- محلول دارئ الفوسفات تركيز 0.2مولار على رقم هيدروجيني 6.6
- حضر المحلول البروتيني بتراكيز 2 ملغم /مل لكل قمة من القمم الناتجة .
- محلول بوتاسيوم فيريسيانيد ($K_3Fe(CN)_6$) تركيز 10% (وزن /حجم) حيث يحضر بإذابة 4 غم من مادة بوتاسيوم فيريسيانيد في 40 مل ماء مقطر ويحضر انيا
- مادة TCA تركيز 1 % حيث يحضر بإذابة 1غم من ثلاثي كلوريد حامض الخليك في كمية من الماء المقطر ويكمل الحجم الى 100مل
- مادة كلوريد الحديديك .$FeCl_3$ تركيز 1% حيث تحضر بوزن 10 غم من هذه المادة وتخفف مع محلول حامض الهيدروكلوريك بنسبة (1+ 99) ثم يكمل الحجم الى 500 مل بواسطة الماء المقطر .
- قيست القوة الاختزالية للمتحللات البروتينية للنخالة باستخدام الطريقة الموصوفة من قبل Zhu etal (2006c)., مع بعض التعديلات اللازمة وكالاتي :

طريقة العمل :

1- يخلط كمية 2.5 مل من دارئ الفوسفات مع 2.5 مل من بوتاسيوم فيريسيانيد مع 1 مل من المحلول البروتيني .

2- يحضن الخليط على 50 م لمدة 20 دقيقة ثم يبرد بصورة سريعة .

3- اضافة 2.5 مل من مادة TCA ويعرض الى نبذ مركزي على g 10.000 لمدة 10 دقيقة .

4- اخذ 2.5 مل من الراشح الناتج ويضاف له 2.5 مل ماء مقطر مع 0.5 مل من كلوريد الحديديك وتوضع في انبوبة اختبار وبعد مرور 10 دقائق على التفاعل وتقاس الامتصاصية على طول موجي 700 نانوميتر وتقدر القوة الاختزالية وفق المعادلة الاتية :

القوة الاختزالية % = قراءة الامتصاصية للنموذج / قراءة الامتصاصية للعينة الضابطة

قياس الفعالية المخلبية لعنصر النحاس كمضاد للأكسدة Cu2+ chelating activity

قيست الفعالية المخلبية لعنصر النحاس كمضاد اكسده لمتحلل بروتين النخالة باستخدام الطريقة الموصوفة من قبل Zhang etal ., (2011) مع اجراء بعض التعديلات الطفيفة .

المحاليل والمواد المستعملة.

- حضر المحلول البروتيني بتراكيز 2 ملغم /مل لكل قمة من القمم الناتجة .
- كبريتات النحاس CuSo4 تركيز (0.2مولار) ويحضر بوزن 12.48غم منه ويذاب في كمية من الماء المقطر ثم يكمل الحجم الى 250 مل للحصول على التركيز (0.2مولار)
- بايريدين pyridine تركيز (10%) (وزن/حجم)
- بايروكاتيكول pyrocatechol violet تركيز (0.1 %) (وزن/حجم)

طريقة العمل :

- يضاف 1 مل من المحلول البروتيني مع 1مل من كبريتات النحاس و1مل من مادة البايردين و 10مايكروليتر من البايروكاتيكول ويخلط المزيج ويترك لمدة 5 دقيقة لأجل اجراء التفاعل
- يستخدم الماء المقطر بدل نموذج المتحلل البروتيني كنموذج سيطرة لأجل المقارنة
- قياس الامتصاصية للمزيج على طول موجي 632 nm بعدها تستخرج الفعالية بتطبيق المعادلة الاتية :

$$(\%) = \frac{\text{Control absorbance} - \text{Sample absorbance}}{\text{Control absorbance}}$$

x 100.CU^{+2} Chelating activity

قياس فعالية الكبح لجذرABTS.

تقاس كفاء المحلول البروتيني كمضاد للأكسدة من خلال كبح فعل الجذر الحر $ABTS^{+}$(2,2’-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), حيث يعمل كواهب للإلكترون ويحولها الى الصيغة ABTS الاكثر استقرارا وقيس النشاط الكابح حسب الطريقة Re et al. (1999) مع بعض التعديلات الطفيفة عليها :

المواد المستعملة :

1- محلول دارى الفوسفات (PBS) PH (7.4 phosphate buffer saline) ويحضر كالاتي:

وضع 800 مل ماء مقطر منزوع الايونات واضف عليه(8 g NaCl, 0.2 g KCl 1.44 g , Na_2HPO_4 0.25 g, KH_2PO_4 ويمزج بالمازج المغناطيسي لمدة 5-3دقائق ثم يقاس الرقم الهيدروجيني ويعدل الى (7.4 باستعمال حامض الهيدروكلوريك 1M.

بعد تعديل الرقم الهيدروجيني يكمل الحجم الى 1000 بالماء المقطر الخالي من الايونات .

2 – تحضير7mM ABTS محلول خزين Stock solution.

- يذاب 8 ملغم من مادة ABTS في 1مل ماء مقطر (محلول A) .
- اذب 13.2 ملغم من مادة بوتاسيوم بيريسلفات $K_2S_2O_8$في 10مل ماء مقطر (محلول B)
- اخلط 0.5 مل من محلول (A) مع 0.5 مل من محلول (B) في قنينة معتمة ويترك الخليط لمدة 16-12 ساعة قبل الاستعمال .

- لتحضير محلول ABTS حديث يؤخذ من المحلول الخزين ويخفف بدارئ الفوسفات وتتم قراءة الامتصاصية على طول موجي 734 نانوميتر وصولا الى قراءة مقدارها 0.40.

3- تحضير الـ Trolox(1.5 Mm).

(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)

محلول خزين Stock solution

- اذب 7.5 ملغم من Trolox في20 مل من محلول دارئ الفوسفات PH (7.4) ويخلط بالمازج المغناطيسي الى ان تذوب بلورات الـTrolox بصورة تامة ثم يؤخذ 1مل منه ويوضع في انبوبة ابندروف سعة 1.5 مل ويخزن بالمجمدة تحت 80- م ° وممكن حفظه كمحلول خزين لمدة 6 اشهر .

- تحضير منحنى قياسي للTrolox : استخدم محلول Trolox كمحلول قياسي لتقدير تركيز الببتيدات المضادة للأكسدة حيث تم تحضير تراكيز متدرجة من محلول Trolox الخزين تراوحت بين 0.045 - 0.330مايكرومولار بإجراء التخافيف اللازمة لمحلول Trolox الخزين بمحلول دارئ الفوسفات وحسب ما موضح في الجدول (4) .

جدول (2) تخافيف محلول Trolox الخزين

رقم الأنبوبة	1.5 mMTrolox stock solution (µl)	PBS (µl)	Final Concentration (mM)
A	0	1000	0.000
B	30	970	0.045
C	60	940	0.090
D	90	910	0.135
E	120	880	0.180
F	150	830	0.225
G	180	820	0.270
H	220	780	0.330

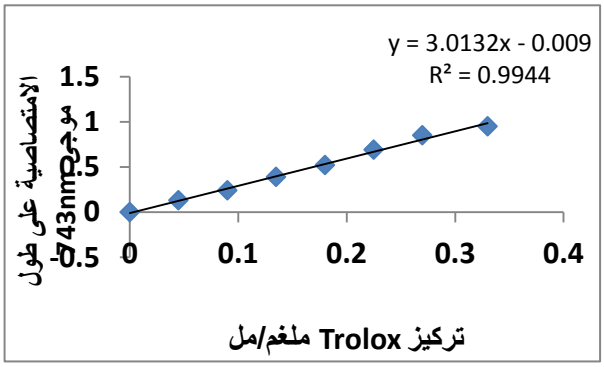
طريقة العمل :

1- يؤخذ 990 (µl) مايكروليتر من محلول $ABTS^{•+}$ المخفف ويضاف له 10(µl) مايكروليتر من الراشح البروتيني بتركيز 2 ملغم /مل او محلول ال Trolox كمحلول للسيطرة وتقرأ الامتصاصية على 734 نانوميتر بعد مرور 6 دقيقة من بدء التفاعل ويقرأ في انابيب معتمة .

2- تقدر نسبة التثبيط لمادة ال ABTS بتطبيق المعادلة الاتية :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{Control absorbance} - \text{Sample absorbance}}{\text{Control absorbance}} \times 100$$

الشكل (1) (المنحنى القياسي للTrolox



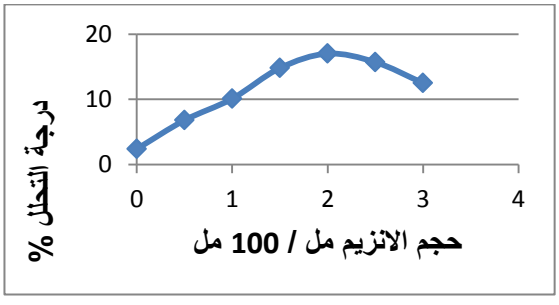
النتائج والمناقشة :

التحلل الأنزيمي Enzymatic Hydrolysis.

1- تحديد الوقت الامثل للتحلل الأنزيمي

درس تأثير تركيز انزيم ال Trypsin والوقت لتحديد أفضل ظروف مؤثرة للتحلل وهو من البروتيزات القاعدة alkaline protease والذي يستعمل لإنتاج متحللات بروتينية ذات خواص وظيفية كذلك استعمل في الدراسات الحديثة لإنتاج الببتيدات النشطة بيولوجيا Bioactive peptides وتوضح النتائج المبينة في الجدول (3) والشكل (2) نتائج التحلل الأنزيمي للمركز البروتيني لنخالة الحنطة باستخدام انزيم Trypsin بتركيز (1 , 0.5 ، 2.5 ,3) 2 مل والذي يحقق فعالية تحللية مقدارها (200 ، 400,600,800) وحدة / مل عند درجة حرارة 37 م° ورقم هيدروجيني 8 لمدة 2 ساعةوهي الظروف المثلى لعمل الانزيم وقد

لوحظت زيادة درجة التحلل مع زيادة تركيز الانزيم وإن أعلى درجة تحلل والبالغة 17.0% كانت عند حجم 2 مل انزيم /100 مل عالق بروتيني ويفسر ذلك بأن الاواصر الببتيدية تتحلل بوجود كمية أعلى من الانزيم خلال وقت التحلل المحدد 2ساعة، وبعد ذلك حدث انخفاض في درجة التحلل 12.5 % مع زيادة الأنزيم المضاف. و يعزى السبب في انخفاض درجة التحلل يعود الى أن درجة تشبع المادة الأساس بالأنزيم قد تنخفض مع زيادة تركيز الناتج ووجود نواتج التحلل ممكن ان تثبط فعالية الانزيم بعمليةFeed backeinhabtion اضافة الى تناقص اعداد الاواصر الببتيدية المتاحة لعمل الانزيم فضلا عن تغير الاس الهيدروجيني لوسط التفاعل Thiansilakul (2007)et al., . وهذه النتائج تتفق مع ما ذكره Taha and (2002), Ibrahim من ان درجة التحلل لبروتينات نخالة الرز عند استخدام انزيم papain ازدادت بزيادة وقت التحلل اذ وصلت درجة التحلل الى 26.7 % بعد مرور 120 دقيقة بينما بلغت 39.7 % عند استخدام انزيم bromelain بنفس ظروف التحلل . ذكر Zhu et al ., 2006a ان اعلى درجة تحلل لبروتينات جنين الحنطة بلغت 25 % بعد مرور360 دقيقة وان درجة التحلل ازدادت بزيادة وقت التحلل . كما ودرس Zhang et al.,(2009) التحلل الانزيمي لبروتينات سويداء الرز وبلغت درجة التحلل 11.7 % بعد وقت تحلل بلغ 360 دقيقة.



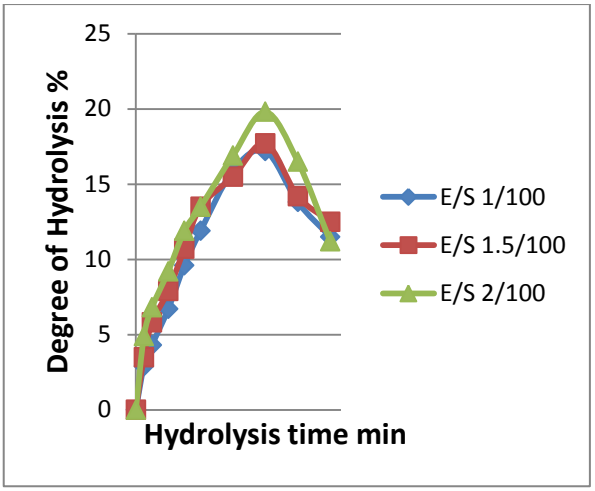
الشكل (2) منحنى التحلل الأنزيمي للمركز البروتيني لنخالة الحنطة باستعمال انزيم الtrypsin بظروف تحلل pH, 8.0; 37° C, وبحجوم انزيمة مختلفة وبوقت تحلل 2 ساعة .

جدول (3) التحلل الأنزيمي للمركز البروتيني لنخالة الحنطة باستعمال انزيم Trypsin ولفترات زمنية مختلفة

وقت التحلل (دقيقة)) (Time min	درجة التحلل % % DH of WBPH
0	0
15	3.5
30	5.9
60	7.9
90	10.5
120	13.7
180	15.8
240	17.0
300	14.8
360	12.5

تحديد التركيز الامثل للانزيم.

يوضح جدول (4) والشكل (3) تأثير اضافة حجوم مختلفة من الانزيم (1 ، 1.5 , 2) مل / 100 مل عالق بروتيني عند اس هيدروجيني 8 وبدرجة حرارة 37°م ونلاحظ ان اعلى درجة تحلل كانت 19.8% بعد مرور 240 دقيقة لجميع التراكيز وان درجة التحلل ازدادت مع زيادة تركيز الانزيم المستخدم واعلى درجة تحلل كانت 19.8% عند حجم 2 مل انزيم / 100 مل عالق بروتيني وجد Duan e etal., (2014) ان افضل زمن للتحلل كان بعد مرور 240 دقيقة حيث سجلت اعلى درجة تحلل للمتحلل البروتيني لبروتينات الشرش باستعمال انزيم الTrypsin وكان افضل تركيز للإنزيم هو w/w 1/100 .كما ودرس et al Silpradit(2010)., تأثير استعمال تراكيز مختلفة من انزيم الAlcalase على درجة التحلل الأنزيمي لبروتين سحالة الرز حيث استخدم تراكيز من الانزيم E/S (%) (v/w) % (0, 0.4, 1, 1.6, 2) وقد سجل اعلى درجة تحلل عند تركيز انزيم الى المادة الاساس 2 % . وفي دراسة مماثلة وجد .Chang, (2010) عند دراسته للتحلل البروتيني للمعزول البروتيني لبروتين الشوفان وبروتين الحمص باستخدام انزيم الTrypsin وعلى رقم هيدروجيني 8 لمدة 3 ساعة وعلى درجة حرارة 37 ان افضل تركيز للإنزيم كان(0.1) % (w/v) .



الشكل (3) منحنى يمثل التغير في درجة التحلل DHالأنزيمي للمركز البروتيني لنخالة الحنطة باستخدام انزيم ال trypsin بتراكيز مختلفة من المادة الاساس E/S ratios (1:100, 1.5:100 , 2:100). v/v

جدول(4) التحلل الأنزيمي للمركز البروتيني لنخالة الحنطة باستعمال انزيم Trypsin بتراكيز مختلفة من الانزيم ولفترات زمنية مختلفة

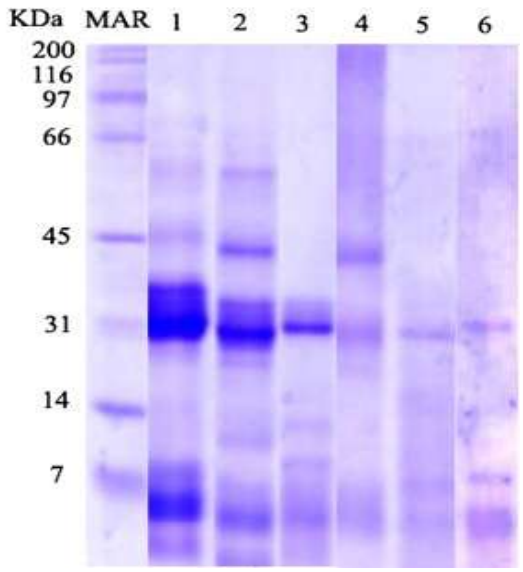
تركيز الانزيم المادة الاساس/ (E/S)	وقت التحلل (دقيقة) ((Time min)	درجة التحلل % DH of % WBPH
1/100 w/v	0	0
	15	2.9
	30	4.3
	60	6.7
	90	9.6
	120	11.9
	180	15.9
	240	17.2
	300	13.8
	360	11.5
1.5/100 w/v	0	0
	15	3.5
	30	5.8
	30	7.9
	90	10.7
	120	13.5
	180	15.5
	240	17.7
	300	14.2
	360	12.5
2/100 w/v	0	0
	15	4.9
	30	6.8
	60	9.2
	90	11.9
	120	13.5
	180	16.9
	240	19.8
	300	16.5
	360	11.2

تقدير الوزن الجزيئي لمتحللات بروتين نخالة الحنطة :

Molecular weight of wheat bran protein hydrolysates.

يلاحظ من شكل (4) نتائج الترحيل الكهربائي لمحلول بروتين نخالة الحنطة منزوع الدهن بنسبة (10%) والمتحللات الناتجة من تحلله بأنزيم Trypsin، حيث تضمن الشكل كل من المسارات التالية Markerوالذي يمثل مسار البروتينات القياسية معلومة الوزن الجزيئي تراوحت بين (7-200) كيلو دالتون بينما ضم مسار(1) بروتين المقارنة control بروتينات نخالة الحنطة قبل تحلله بالأنزيم في حين تمثل المسارات من (2 ، 3 ، 4 ، 5 ، 6) فترات التحلل بالأنزيم وهي (0.5 ، 1 ، 2 ، 3 ، 4) ساعة ويتضح من خلال لمسار (1) ان معظم الاوزان الجزيئية للبروتينات الموجودة في المركز البروتيني للنخالة كانت بين (66-96) كيلو دالتون وان الجزء الاعظم منها هو ضمن (35-41) ويلاحظ ظهور بولي ببتايد ضمن التحلل الانزيمي ضمن مدى وزن جزيئي (5-10) كيلو دالتون وهذا يتفق مع ما ذكره Jack (2011) حيث امكن فصل ببتيدات نشطة بيولوجيا تتراوح اوزانها الجزيئية بين (5-10) كيلو دالتون من بروتينات النخالة اظهرت كفائتها البيولوجية كمضاد اكسدة ولها فعالية مناعية . واجريت العديد من الدراسات المماثلة لفصل متحللات بروتينية نشطة بيولوجيا حيث قام ,.et al Tsopmo (2012) بفصل ببتيدات من التحلل الانزيمي

لبروتين الشوفان باستعمال انزيم ال Trypsin تراوحت اوزانها الجزيئية بين (2-10) كيلو دالتون واخرى بوزن اقل من 2 كيلو دالتون تمتلك فعالية كمضاد للأكسدة . وتمكنMohamed(2009a) ., etal من فصل بولي ببتايدات من التحلل الانزيمي لبروتينات الدخن باستعمال انزيم ال Trypsin تراوحت اوزانها الجزيئية بين (14.4-66.2) كيلو دالتون امتازت بخواص وظيفية عالية مقارنة مع المركز البروتيني الغير متحلل . وحضر Kannan et al., (2009).ببتيدات من التحلل الانزيمي لبروتينات نخالة الرز باستعمال انزيم Alcalase وكانت باوزان مختلفة تراوحت بين (5-50) كيلو دالتون واختبرت فعاليتها واهميتها الحيوية في تثبيط خلايا مسرطنة للانسان ووجد من خلال التجربة ان الببتيدات ذات الوزن الجزيئي 5كيلودالتون اظهرت فعالية حيوية في تثبيط الخلايا المسرطنة .



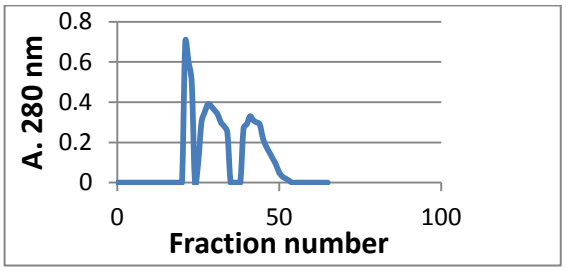
شكل (4) درجة التحلل ل (10) % محلول بروتين نخالة الحنطة باستخدام انزيم trypsin بدرجة حرارة حضن 37 م• ورقم هيدروجيني 8 ولفترات زمنية مختلفة MAR البروتينات القياسية .

الفصل بتقنية بالترشيح الهلامي :

يوضح الشكل (5) الفصل بتقنية الترشيح الهلامي لمتحلل بروتينات نخالة الحنطة والذي تم تحلله باستخدام انزيم Trypsin ولمدة 4 ساعة باستخدام عمود السيفادكسG-25 وتم الحصول على ثلاث قمم ظهرت في الانابيب (21-24) و (25-34) و (39-53) وقدرت تراكيز الببتيدات المفصولة وكان اعلى تركيز للقمة رقم 3 اذ بلغ (0.789) ملغم/مل تليها القمة رقم 2 اذ بلغت (0.546) ثم القمة رقم 1 التي بلغ تركيزها (0.234) ملغم/ مل . حصل Hu et al ., (2012) عند فصله متحلل بروتينات جنين الحنطة خلال عمود السيفادكسG-25 على خمس قمم وبعد تقدير تركيز الببتيدات وكانت تراكيزها اعلى مما حصلنا عليه في هذه الدراسة اذ كانت (12.93 ، 16.32، 16.60 46.40 ، 7.75) % على التوالي.

وفي دراسة مماثلة قام بها Mohamed et al.,(2012) لفصل ببتيدات ذات فعالية مضادة للأكسدة من المتحلل البروتيني لبروتين الدخن باستخدامه عمود السيفادكسG25 وتم الحصول على اربع قمم . حصل الباحث Abu-Salem واخرون (2013) عند فصل المتحلل الأنزيمي للمعزول البروتيني لفول الصويا على عمود السيفادكسG-25 على 18 جزء fraction ووجد ان اعلى محتوى من الببتيدات كان (0.1 - 1.45) ملغم /مل .وفي دراسة مماثلة فصل Yu et al ., (2013)ببتيدات ذات فعل مضاد للتأكسد من المتحلل البروتيني لألبومين بذور السلجم حيث استخدم عمود السيفادكسG-25 وحصل على ببتيدات بأوزان جزيئية مختلفة وفصلت اربع قمم منه

الشكل (5) الببتيدات الناتجة من كروموتوغرافي الترشيح الهلامي عبر عمود السيفادكسG-25 بأبعاد(55 X 1.5) سم باستعمال دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز 0.2مولاري وبرقم هيدرجيني7.0 بسرعة جريان بسرعة جريان (30 مل/ساعة) وبمعدل (2مل /انبوبة).



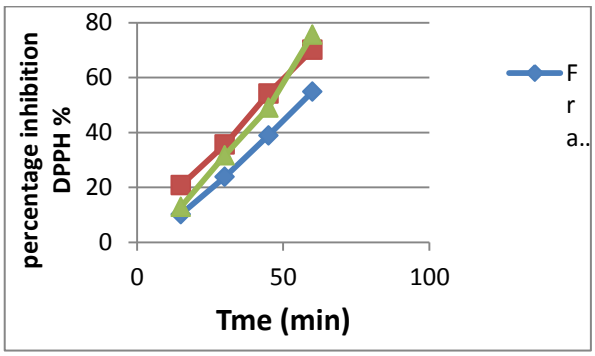
تقدير فعالية الببتيدات كمضادات اكسدة .

1- طريقة ال DPPH .

يلاحظ من النتائج المبينة في الشكل (6) والجدول (5)قدرة المتحللات المستحصل عليها والمقدرة باستخدام طريقة الـ DPPH والتي تمثل جذر حر يكبح نشاطها من خلال فعل الببتيدات التي لها صفة مضاد الأكسدة وقد

نتج عنها النسب المئوية التالية (10.2 ، 23.8 ، 38.9 ، 54.8) % للقمة الاولى و (20.8 ، 35.6 ، 54.2 ، 70.1) % للقمة الثانية و(12.9، 31.7 ، 49 ،75.6) % للقمة الثالثة كمضاد أكسدة بتركيز 2 ملغم/مل بالمقارنة مع مضادة أكسدة تجاري (BHA) والذي أعطى نسبة 80.61 %. يلاحظ ان طول السلسلة البروتينية بدوره يعتمد على درجة التحلل البروتيني لكون الصفة الوظيفية يعكسها الحامض الأميني الطرفي للببتيدات إضافة إلى المجاميع الفعالة داخل السلسة الببتيدية حيث تتميز بكونها ذات تركيب أولي بسيط مجاميعها الفعالة غير مشغولة وتضم نسبة من أحماض أمينية كاره للماء أي لها Hydrophobicity عالي وتشمل هذه الأحماض كل من الفالين واللايسين في الطرف الأميني للببتيد (Sarmadi& Ismail, 2010;Singh, 2011). وكانت النتائج مقاربة لما وجده Cheng(2006), عند تقديره للفعالية الاختزالية للمتحلل البروتيني لبروتين جنين الحنطة بتركيز 1.6 غم/لتر اظهر فعالية تقدر ب81.11 % .

وكانت نتائج البحث اقل قليلا مما توصل له Wang et al., (2009) حيث قدرت الفعالية التأكسدية للمتحلل لنخالة الحنطة التي حضرت بالتحلل الأنزيمي للنخالة بخليط من الانزيمات (Xylanase ، a-amylase ، Alcalase 2.4 L، Amyloglucosidase) وجفدت المتحللات وحضرت بتراكيز (5, 2, 3, 1, 0.2,0.5) ملغم /مل وبلغت الفعالية لها(23.5 ، 58.3 ، 83.5 ، 85.8 ، 87.9 ، 88.7 ، 89.4) % على التوالي حيث نلاحظ عند تركيز 2 ملغم /مل للبحث بلغت 75.6 % بينما القيمة التي وجدها الباحث هي 85.8 % ويعزى الفرق بالنتائج لظروف التحلل وظروف التجربة ونوع الانزيم المستعمل في عملية التحلل .



الشكل (6) الAntioxidant activity للمتحللات البروتينية (3,2,1) بطريقة الDPPH

جدول (5) تقدير الفعالية المضادة للأكسدة Antioxidant activity بطريقة ال DPPH

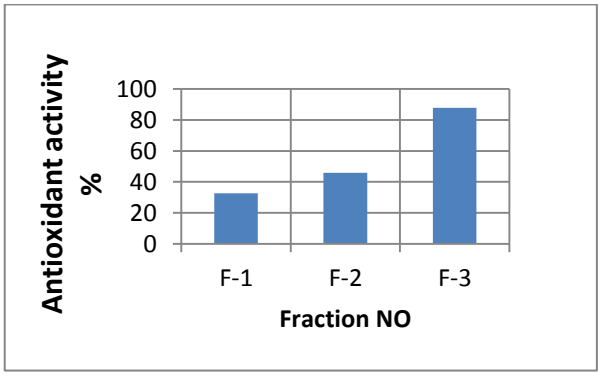
المتحللات	وقت الحضن (Min)	مضاد الاكسدة % DPPH %	BHA % محلول قياسي بتركيز 100 P.P.M
1	0	0	80.61
	15	10.2	
	30	23.8	
	45	38.9	
	60	54.8	
2	0	0	
	15	20.8	
	30	35.6	
	45	54.2	
	60	70.1	
3	0	0	
	15	12.9	
	30	31.7	
	45	49	
	60	75.6	

2-طريقة القوة الاختزالية Reducing Power .

يلاحظ من النتائج المبينة في الجدول (6) والشكل (7) قيم الفعالية للقمم الثلاث حيث بلغت القيم (32.6 ، 45.9 ، 87.9) % لكل من القمم (F-1 ، F-2 ، F-3) على التوالي وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره Wang et al ., (2009) حيث قدر نسبة الفعالية بقياس الامتصاصية على 700 nm وبلغت (0.82) اعلى قيمة للامتصاصية لمتحللات بروتينات النخالة عند تركيز 2.5 ملغم/ مل متحلل بروتيني بينما بلغت اعلى قيمة للامتصاصية للباحث عند تركيز 2 ملغم/ مل (0.75) . ويستعمل هذا الفحص لتقدير قابلية مضادات الاكسدة الطبيعية لمنح او وهب الكترون او هيدروجين (Dorman et al.,2003) وتعتبر نتائج البحث جيدة مقارنة مع ما وجده et al., Cheng (2006) عند تقديرهم للفعالية الاختزالية لأيون الحديد كالببتيدات المحضرة من التحلل الأنزيمي لبروتين جنين الحنطة بتركيز 0.5 غم/لتر حيث كانت قيمة اعلى فعالية 63.35 % وهي اقل من القيمة التي توصل لها الباحث والتي بلغت 87.9 % وهنا ممكن

القول ان نوعية المتحللات البروتينية المفصولة من نخالة الحنطة تمتلك فعالية اعلى من تلك المفصولة من جنين الحنطة وهذا يعود الى تركيب هذه الاحماض من الاحماض الامينية ونوع المجاميع الفعالة الداخلة في تركيبها . وفي دراسة مماثلة قام بها Yichen (2012) لتقدير القوة الاختزالية للببتيدات الناتجة من التحلل الأنزيمي لبروتين الشعير بتركيز 2 ملغم/ مل باستعمال انزيمي ال Alcalase وانزيم Flavourzyme حيث تراوحت قيمة الامتصاصية للببتيدات الناتجة بين (0.1- 0.4) وهي اقل مقارنة مع القيمة التي حصل الباحث عليها

الشكل (7) ال Antioxidant activity للمتحللات البروتينية (1,2,3) بطريقة Fe3+ Reducing power



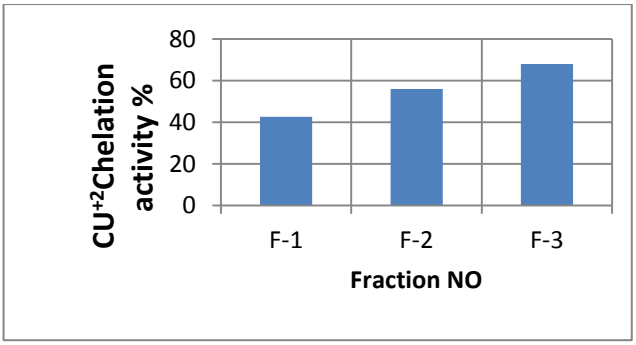
جدول (6) تقدير الفعالية المضادة للأكسدة Antioxidant activity بطريقة ال Reducing power

المتحللات	مضاد الاكسدة % Fe3+ Reducing power
1	32.6
2	45.9
3	87.9

3 تقدير الفعالية المخلبية لعنصر النحاس CU^{+2} :

تشير النتائج المبينة في الجدول (7) والشكل (8) قيم الفعالية المخلبية لعنصر النحاس للقمم الثلاث حيث بلغت (42.6 ، 55.9 ، 67.9) % على التوالي وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره Hu et al., (2012) عند قياس الفعالية المخلبية للببتيدات المشتقة من جنين الحنطة عند تركيز 1 ملغم /مل بببتيد ان اعلى قيمة بلغت 65 % وقد وضح Suetsuna et al., (2000) ان تواجد الاحماض الامينية القاعدية Basic amino acids والاحماض الامينية الحامضية Acidic amino acids تلعب دور مهم في اقتناص الايونات المعدنية من خلال مجاميعها الامينية والكاربوكسيلسية المتواجدة في سلاسلها الجانبية كذلك لوحظ من خلال تكرار البحوث تواجد الحامض الاميني الهستدين من دراسة التتابع للأحماض الامينية لببتيدة ثلاثية الهستدين اعطت قابلية عالية لاقتناص الايونات المعدنية . وبمقارنة النتائج مع ما توصل له(2010) Issoufou et al., عند دراستهم قابلية الببتيدات المنتجة من بروتين الصويا المخلبية لمسك ايونات النحاس حيث ظهرت 6 انواع من الببتيدات سجلت اعلى فعالية مخلبية للقمة رقم 6 حيث بلغت فعاليتها 47.92 % واقل فعالية للبتيدة رقم 4 بلغت 11.4 % نجد ان المفصولة من بروتين نخالة الحنطة اعطى فعالية مخلبية عالية لعنصر النحاس وهذا يعود الى نوع المجاميع الفعالة وقدرتها على ربط العنصر وبالتالي التقليل من دوره في تشجيع حدوث عملية الاكسدة

الشكل (8) ال Antioxidant activity للمتحللات البروتينية (1,2,3) بطريقة CU2+ Chelating

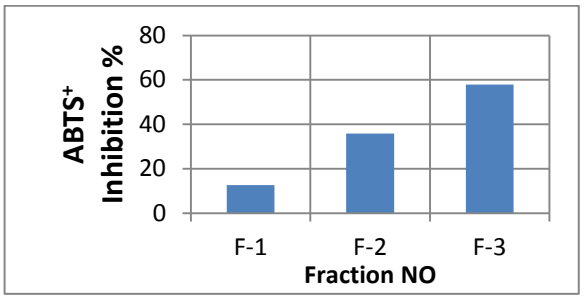


جدول (7) تقدير الفعالية المضادة للأكسدة Antioxidant activity بطريقة ال CU^{+2} Chelating

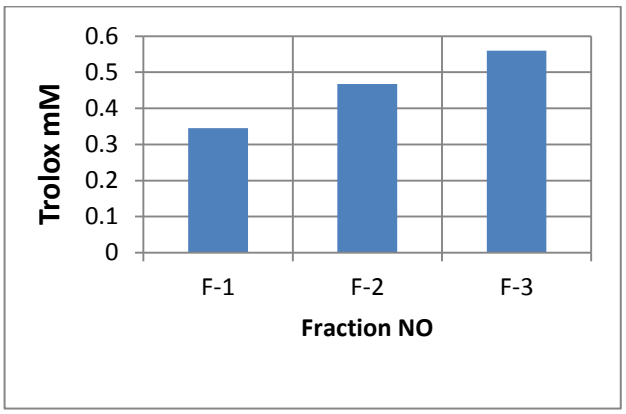
المتحللات	مضاد الاكسدة % CU^{+2} Chelating
1	42.6
2	55.9
3	67.9

4 تقدير الفعالية لكبح جذر ال $ABTS^{+}$:

تظهر النتائج المبينة في الجدول (8) والموضحة بالشكلين (9) و (10) تأثير المتحللات البروتينية 1F و F2 و F3 في تثبيط الجذر الحر $ABTS^{+}$وتحويله للحالة المستقرة ABTS الاكثر استقرارية من خلال دورها كواهب للإلكترون حيث كانت الفعالية (12.6 ، 35.9 ، 57.9 % على التوالي وقدرت قيمها مع المحلول القياسي لمادة Trolox وكانت قيمها (0.345 ، 0.467 ، 0.560) مايكرومول /ملغم وبمقارنة النتائج مع ما توصل له Mohamed et al., (2012) عند تقدير الفعالية المضادة للأكسدة للمتحللات البروتينية المستحصل عليها من التحلل الأنزيمي لبروتينات الدخن حيث حصلوا على اربع انواع من المتحللات وكانت النسب التثبيطية لها (62 ، 57 ، 74.6 ، 83.2) % للمتحللات (FI ،IIF ، FIII ، FIV) على التوالي حيث كانت اعلى قيمة لها 83.2 % وهي من القيمة التي وجدت من قبل الباحث والتي بلغت 57.9 % وقد يعود الاختلاف لنوع البروتين وتسلسل الاحماض الامينية ونوع المجموعة الطرفية الفعالة . كذلك قدر Ine واخرون (2010) الفعالية المضادة للأكسدة للمتحللات البروتينية لبروتين العدس حيث قدرت الفعالية التثبيطية لجذر ال$ABTS^{+}$ بما يعادل مكافئ ال Trolox وكانت القيم المستحصل عليها هي 0.53مايكرومول /ملغم من Trolox عند اوقات تحلل مختلفة وهي قيمة مقاربة لما وجده الباحث . كما ودرس Wang(a) etal., (2014) فعالية المتحلل الأنزيمي لمستخلص سحالة الرز المتحلل بانزيم على حيوانات التجارب (الفئران) خارج الجسم In Vitro بهذه الطريقة وقد استخدم كل من حامض الاسكوربيك ومادة BHT التجارية كمواد للسيطرة والمقارنة وقد سجلت اعلى فعالية لمستخلص سحالة الرز اذ بلغت 103.83 ملغم /مل مقارنة مع 17.95 ملغم /مل لحامض الاسكوربيك و 6.19 ملغم /مل لمادة BHT لذلك نلاحظ ان مضادات الاكسدة الطبيعية المستخلصة اعطت فعالية اعلى من المواد التجارية المصنعة بالإضافة الى كونها ليس لها اضرار جانبية وامنة في نفس الوقت لاستعمالها كمضافات غذائية .



الشكل (9) ال Antioxidant activity للمتحللات البروتينية (1,2,3) بطريقة Inhibition of ABTS



الشكل (10) تراكيز المتحللات البروتينية (1,2,3) من مادة Trolox

جدول (8) تقدير الفعالية المضادة للأكسدة Antioxidant activity بطريقة ال Inhibition of ABTS

المتحللات	Inhibition of ABTS %	Trolox concentration(mM)
1	12.6	0.345
2	35.9	0.467
3	57.9	0.560

المصادر :

Abu- Salem, M., Mahmoud, H., El-Kalyoub, M. H. and AzzaAbou-Arab, A. Yl. (2013) Characterization of Antioxidant Peptides of Soybean Protein Hydrolysate . World Academy of Science, J. of Engineering &Technology :pp. 1-5.

Adler- Nissen, J.(1986). Enzymic hydrolysis of food protein . Elsevier Applied Science Puplishers , New York : p . 2-29.

Adebiyi, A., Adebiyi, A., Ogawa, T. and Muramoto, K. (2008). Purification and characterization of antioxidative peptides from unfractionated rice bran protein hydrolysates., J. Food Technol., 43, 35-43.

Aoife, L., McCarthy, Yvonne C. O'Callaghan and Nora M. O'Brien (2013) . Protein Hydrolysates from agricultural crops—Bioactivity and potential for functional food development ., Agriculture, 3, 112-130.

Boboev A, Hasanov A, Yotova L, Hasanov H. 2012. Antioxidant activity of peptides obtained from wheat and cottonseed proteins. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*,**18**,103-111.

Chanput, W., Theerakulkait, C. and Nakai, S. (2009). Antioxidative properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. J. Sci Food Agric., 84,66-74.

Church, F. C.; Swaisgood, H. E.; Porter, D. H. &Catignani ,G. L. (1983). Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. Journal Dairy Science, 66: 1219–1227.

Chen, H., K. Muramoto, F. Yamauchi and K. Nokihara, (1996). Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein . J .Agric . Food Chem , 449(9) : 2619 – 2623.

Cheng, Y.H., Wang, Z., Xu, S. (2006) .Antioxidant properties of wheat germ protein hydrolysates evaluated in vitro . J. CENT. SOUTH. UNIV,TECHNOL. Vol (13) No, (2) pp: 160-165.

Deutscher, M. P. (1990). Guide to protein purification. In "Methods in Enzymology". Academic Press., Vol. 182 p. 24.

Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., &Tikkanen, M. J.(2003). Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. Food Chemistry., 83, 255–262.

Hu, L., Song, R., and Gu, Z. (2012) . An antioxidant peptide produced by autolysis reactions from wheat germ. Afr. J. Biotechnol.3640-3648.

Issoufou, A., Olasunkanmi, S., Yong, H.S., Mohamed , T., and Gou, W.L. (2010). Ideiadntification of Antioxidative peptides from Lactobacillus Plantarum LP6 fermented soybean meal ., Res. J. Microbial., 5(5) :372-380.

Ine, M., Maira, R., Luis, A., and David A. (2010). Antihypertensive and Antioxidant Effects of Functional Foods Containing Chia (Salvia hispanica) Protein Hydrolysate . J. OF Scientific, Health and Social Aspects 382 of the Food Industry. 381-397.

Ito, N., Fukushimas, S., and Tsuda, H. (1985). Carcinogenicity and Modification of the carcinogenic response by BHA, BHT and other antioxidants . CRC. Crit&RreToxicol. 15: 109-50.

Jack, I. (2011). Studied on preparation and biological activity of wheat bran bran peptides .(abstr) . medical research .

Kannan , A., Hettiarachchy, N., and Satya, N. (2009). Colon and Breast Anti-cancer Effects of Peptide Hydrolysates

cationdecolorization assay Free Radical Biology and Medicine 26: 1231–1237.
Sarmadi, B. H., and Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. Peptides, 31, 1949–1956.
Schaafsma, G.(2009) . Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition .Eur . J . Clin . Nutr., 63, 1161-1168.
Schägger ,H.(2006). Tricine–SDS-PAGE. Nature Protocols 1, 16–22.
Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of Xanthan on the antioxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. J. Agric. Food Chem., 40, 945-948.
Singh, P . (2011). Antioxidant activity of food proteins and food protein hydrolysates, MSc. Thesis, McGill University.

Suetsuna K, Ukeda H, Ochi H (2000). Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. J. Nutr. Biochem. 11: 128-131.
Taha, F.S., and Ibrahim, M.A. (2002) .Effect of degree of hydrolysis on the functional properties of some Oilseed proteins. Grasas. y . Aceites
Vol. 53. Fasc.3, 273-281.
Tang, CH., Peng, J., Zhen, DW., and Chen, Z. (2009). Physicochemical and antioxidant properties of buckwheat (FagopyrumesculentumMoench) protein hydrolysates.Food Chem.,115: 672-678.

Thiansilakul.Y;S.BenjakulandF.Shahidi.(2007). Antioxidantive activity of protein hydrolysate from Scad Muscle using Alcalase and Flavourzyme .Journal of Food .Bio chemistry .p:266-287.
Tsompo, A. , Cooper, A., Jodayree, S. (2010) . Enzymatic Hydrolysis of Oat Derived from Rice Bran. The Open Bioactive Compounds Journal, , Vol 2. 17-20.

Kong, B. and Xiong, Y. L. (2006). Antioxidant activity of zeinhydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. J. Agric. Food Chem., 54, 6059-6068.
Laemmli, U. K.(1970) . Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature .227: 680 – 690.
Li, Z., Xiong, H., Yang, K., Peng, D., Peng , H., and Zhao,Q. (2012).Optimization of the biological processing of rice dregs into nutritional peptides with the aid of trypsin. J Food SciTechnol, 49(5):537–546.

Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C. G., Fox, P. F., Monnet, V. &Gobbetti, M. (2003).Angiotensin I-converting-enzyme inhibitory and antibacterial peptides fromLactobacillus helveticus PR4 proteinase hydrolyzed caseins of milk from sixspecies. Applied and Environmental Microbiology, 69: 5297-5305.
Mohamed, T. K., Kexue Z, . Amadou I, . Tarawalie F. and Huiming, Z.(2009a). Functionality in vitro digestibility and physicochemical properties of two varieties of defatted foxtail millet protein concentrates. Int. J. Mol Sci. 10: 5224-5238.
Mohamed, T. K., Issoufou, A. and Zhou, H. (2012). Antioxidant activity of fractionated foxtail millet protein hydrolysate , International Food Research Journal 19(1): 207-213.
Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M and Rice-Evans C.(1999) . Antioxidant activity applying an improved ABTS radical

composition and physicochemical properties of defatted wheat germ flour and its protein isolate. J. Food Biochem., 30(3): 329-341.

protein isolates to enhance antioxidative properties . Advance Journal of Food Science and Technology 2(4): 206-212.

Wang, J., Yuan, X., Sun, B., Tian, Y., and Cao, Y. (2009). Scavenging Activity of Enzymatic Hydrolysates from Wheat Bran. Food Technol. Biotechnol. 47 (1) 39–46 .

Wang, C., Li D., Xu,F., Hao,T and Zhang,T. (2014) Comparison of two Methods for the Extraction of Fractionated Rice bran protein. Journal of Chemistry , Vol 14 p:1-10.

Yu, W., Gaob, J., Xueb, Z., Kou, X., Wang, Y., and Zhai, L. (2013) Radical-scavenging activity, ACE-inhibiting capability and identification of rapeseed albumin hydrolysate. Food Science and Human Wellness , 93–98.

Yichen, X . (2012). Antioxidant Peptides and Biodegradable Films Derived from Barley Proteins. MSc. Thesis, Edmonton, Alberta.

Zhang, J., Zhang, H., Wang L., Guo X., Wang X. and Yao H. (2009). Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: identification of the active peptide. Eur. Food Res Technol., 229, 709-719.

Zhang, H.J.; Zhang, H.; Wang, L.; Guo, X.N (2010) . Preparation and functional properties of rice bran proteins from heat-stabilized defatted rice bran. Food Res. Technol., 233-239.

Zhang T, Yanhong L, Ming M, Bo Jiang (2011). Purification and characterisation of a new antioxidant peptide from chickpea (Cicerarietium L.) protein hydrolysates Food Chem. 128: 28-33 nt., 47, 359–363.

Zhu, K. X. ; Zhou, H. M. and Qian, H. F. (2006a). Protein extracted from defatted wheat germ: Nutritional and structural properties. Cereal Chem., 83: 69-75.

Zhu, K. X. ; Zhou, H. M. and Qian, H. F. (2006c). Comparative study of chemical