تأثير درجة الحرارة في ثبات الفعالية المضادة للأكسدة للببتيدات المحضرة والمنقاة من مخلفات الروبيان بتقنية الترشيح الهلامي

ام البشر حميد جابر الموسوي عالية زيارة هاشم الحلفي

الملخص

تضمنت الدراسة تحضير متحللات بروتينية من مخلفات الروبيان باستعمال نوعين من الإنزيمات هي: Alcalase وPepsin فصلت ببتيدات المتحللين البروتينيين بالترشيح الفائق بأغشية ذات 5MWCO كيلودالتون أُجريت التنقية بالترشيح الهلامي لببتيدات متحلل الأنزيمين Alcalase وPepsin وتم الحصول على أربع قمم لببتيدات متحلل أنزيم Alcalase وثلاث قمم لببتيدات متحلل أنزيمPepsin واختبرت الفعالية المضادة للأكسدة للقمم الناتجة جميعها، إذ أظهرت ببتيدات القمتين الأولى والثانية من كل متحلل إنزيمي فعالية عالية مضادة للأكسدة بالمقارنة مع القمم الاخرى . درست ثباتية الببتيدات المضادة للأكسدة إتجاه المعاملة الحرارية بدرجات حرارية مختلفة تراوحت بين 25–100م فوجد أن الفعالية المضادة للأكسدة والقوة الإختزالية للببتيدات كانت ثابتة عند 60 م° أما قابلية ربط أيون الحديدوز واقتناص بيروكسيد الهيدروجين وجذر الهيدروكسيل و السوبراوكساید السالب فكانت ثابتة عند الدرجة الحرارية 40 م ثم أخذت هذه الزيادة بالتناقص التدريجي عند رفع درجة الحرارة أعلى من60م و40 م .

المقدمة

يُعد الروبيان من الأطعمة البحرية الأكثر تفضيلاً واستهلاكاً لأنه ذات قيمة تغذوية عالية ، لمحتواه العالي من البروتين والمعادن والفيتامينات والجزيئات الحيوية الأخرى كما بين Huang(10)، وتمثل مخلفات الروبيان مصدراً كامناً للجزيئات الفعالة حيوياً التي تتضمن البروتين والكايتين والكاروتين والاستازانثين (25). هنالك العديد من الدراسات التي تعمل من أجل إيجاد الإستعمال الأمثل لهذه المخلفات كبروتينات غذائية كما بين - Cordova Murueta (5) ، وفي إنتاج الصوصج كما بين Leal (13) ومواد التجميل وفي التطبيقات الصيدلانية وبيئات نمو الأحياء المجهرية كما بين Cheung(4) و Martoneوجماعته (14) وإنتاج الببتيدات المضادة للميكروبات كما بين Rolland (21)،والببتيدات التي تربط كل من المعادن و ايون الحديدوز (9) إذ تمتلك الببتيدات التي توجد في المتحلل الإنزيمي لمخلفات الروبيان خصائص فيزوكيميائية وفعالية حيوية تعتمد على الوزن الجزيئي والأحماض الأمينية كما بينKim (11)، إذ ركزت الأبحاث على فعالية الببتيدات المضادة للأكسدة المعزولة من مصادر غذائية متنوعة وعلى عزل وتشخيص ودراسة العلاقة بين التركيب والخصائص الوظيفية. وهنالك القليل مماهو معروف عن استعمالها في التطبيقات الغذائية كتأثير المضافات الغذائية والتغيير الحاصل في الرقم الهيدروجيني وظروف الخزن من حرارة وضوء على ثبات فعالية الببتيدات المضادة للأكسدة، ونظراً لوجود كميات كبيرة من مخلفات والروبيان التي تُعد مصدرا للجزيئات الفعالة حيوياً والتي يمكن استغلالها في تحضير منتجات مفيدة لذا هدفت الدراسة الى تحضير متحللات بروتينية من مخلفات الروبيان بالتحلل الإنزيمي و فصل وتنقية جزئية للببتيدات الناتجة من التحلل ودراسة ثباتية الببتيدات المضادة للاكسدة إتجاه المعاملة الحرارية بدرجات حرارية مختلفة .

جزء من رسالة ماجستير للباحث الثاني.

كلية الزراعة جامعة البصرة، البصرة، العراق.

المواد وطرائق البحث

المواد الأولية

جمعت قشور ورؤوس الروبيان من السوق المحلية في محافظة البصرة، وغسلت بالماء الجاري وجففت في الفرن الكهربائي تحت التفريغ بدرجة حرارة 40م مع التقليب المستمر، طحنت المخلفات المجففة بالمطحنة الكهربائية وغربلت و أزيل الدهن منها بالهكسان باستعمال جهاز السوكسليت حفظت في عبوات من البولي اثلين بدرجة حرارة – 18 م لحين الاستعمال.

الإنزيمات

استعمل نوعان من الإنزيمات المحللة للبروتينات المجهزة من شركة Sigma-aldrach وهما: –إنزيم Pepsin - إنزيم Alcalase .تم تقدير الفعالية النوعية للإنزيمات حسب طريقة Whitaker(24).

تحضير المتحللات البروتينية

اتبعت طريقة Huang وجماعته(9)المذكورة من قبل Zhao وجماعته (25) وطريقة Muzaifa وجماعته(15) لتحضير المتحللات البروتينية . وذلك بمزج المادة الأولية المحضرة مع الماء المقطر بنسبة 5:1 وزن/حجم خلطت للمدة من2-3 دقائق لغرض التجانس، عدل الرقم الهيدروجين إلى (2 و8) الملائم لعمل كل من إنزيم Pepsin و إنزيم Alcalase على التوالي، باستعمال هيدروكسيد الصوديوم وحامض الهيدروكلوريك. أجريت عملية التحلل في حمام مائي مثبت على درجتي حرارة (37و50) مئوية الملائمة لعمل كل من إنزيم Pepsin و إنزيم Alcalase على التوالي ،وعند الوصول إلى الدرجة الحرارية المطلوبة أضيف الإنزيم بنسبة 0.1 % من وزن العينة تدريجيا بعد خلطه بكمية قليلة من الماء المقطر استمر التحلل لمدة خمس ساعات مع مراعاة التحريك من مدة لأخرى ومتابعة درجة التحلل كل نصف ساعة وبعد انتهاء مدة التحلل ثبطت فعالية الإنزيمات بدرجة حرارة 90م لمدة 10دقائق ثم أُجري النبذ المركزي بسرعة 5000 دورة/دقيقة وتم جمع الراشح.

الفصل بالترشيح الفائق Ultrafiltration

مرر راشح المتحللات البروتينية المحضرة عبر أغشية الترشيح الفائق ذات حجم مسام MWCO 5 كيلو دالتون جمعت الأجزاء وركزت باستعمال المبخر الدوار بدرجة حرارة 40م ثم أُجريت عملية التجفيد باستعمال Freeze drying وحفظت بعبوات بلاستيكية بالتجميد على درجة 18 م لحين الاستعمال.

التنقية بكروموتوكرافيا الترشيح الهلامي

تحضير الهلام وتعبئة العمود

حضر هلام السيفادكس Sephadex G25 وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة Pharmacia سخن الخليط في حمام مائي بدرجة حرارة 90م لمدة ساعة ،برد الخليط وأضيف إليه 0.02% Sodium azide لمنع نمو الإحياء المجهرية، ثم أجريت عملية إزالة الغازات وصب الهلام في العمود الذي تبلغ أبعاده 2.5×75 سم ثم أجريت الموازنة بالماء المقطر بمقدار ثلاثة أمثال حجم الهلام في العمود بمعدل جريان 60 مل/ساعة حسب طريقة Qian وجماعته (20)التي ذكرها Dattajirao (6) .

تنقية الببتيدات بالترشيح الهلامي Purification Peptides by Gel Filtration

مرر20 غم من المتحلل المجفد على عمود السيفادكس الذي حضر بالخطوة السابقة إذ جمع 2مل في كل أنبوبة وقراءة الامتصاصية له بجهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer عند طول موجي 280 نانوميتراً (6). جمعت الأجزاء وركزت بالمبخر الدوار Rotary evaporator بدرجة حرارة 40م ثم جفدت واختبرت فعاليتها المضادة للأكسدة والقوة الاختزالية وقابلية ربط أيون الحديدوز واقتناص بيروكسيد الهيدروجين وجذر الهيدروكسيل وجذرالسوبراوكساید السالب.

قياس الفعالية المضادة للأكسدة

قدرت الفعالية المضادة للاكسدة باستعمال نظام الحامض الدهني اللينوليك Linolelic acid وفقاً لطريقة كل من Osawa، Namiki (18) الموضحتين من قبل Kudo وجماعته (12) مع بعض التحوير .

القوة الإختزالية Reducing Power

قدُّرت قابلية إختزال آيون الحديديك إلى الحديدوز بإتباع طريقة Zhuوجماعته (26) التي ذكرها Oliveira وجماعته (17)

قابلية ربط أيون الحديدوزChelating ability of Ferrous Ion

أتبعت طريقة Dinis وجماعته (7)المذكورة من قبل Dattajirao(6)مع بعض التحوير،في حساب قابلية ربط أيون الحديدوز.

قابلية إقتناص بيروكسيد الهيدروجين Scavenging Hydrogen Peroxide

قدُّرت قابلية اقتناص بيروكسيد الهيدروجين وفقاً لما ذكره Ruch وجماعته (22) .

اقتناص جذر الهيدروكسيل Hydroxyl Rradical Scavenging

اختبرت قابلية العينات في إقتناص جذر الهيدروكسيل وفقاً لطريقة Girgih وجماعته (8) التي ذكرها Ajibola وجماعته (3) مع بعض التحوير.

قابلية إقتناص جذر السوبراوكساید السالب Superoxide Anion Radical Scavenging

اتبعت طريقة Pownall وجماعته (19) المذكور من قبل Ajibola وجماعته (3) في تقدير قابلية اقتناص جذر السوبراوكساید .

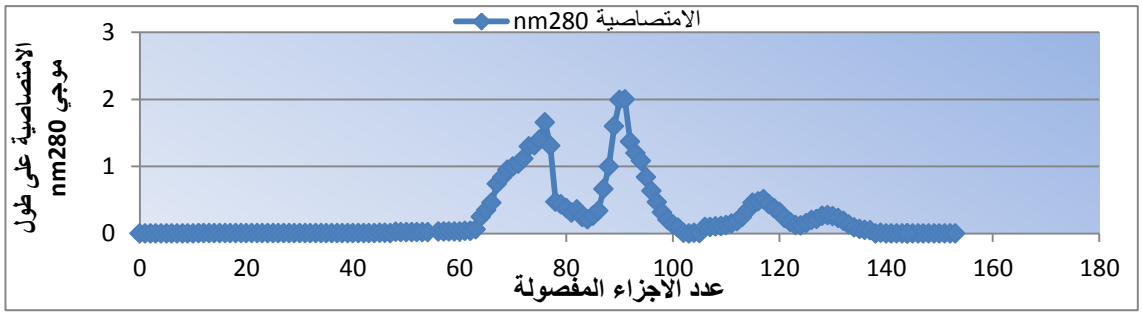
التحليل الإحصائي

حللت النتائج احصائياً باستعمال التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design (CRD) ضمن البرنامج الإحصائي الجاهز PSS وقورنت النتائج باستخدام أقل فرقاً معنوياً معدلاً(RLSD)عند مستوى معنوية(0.05) (1).

النتائج المناقشة

التنقية بالترشيح الهلامي لببتيدات متحلل إنزيم Alcalase مع إختبار تحديد الفعالية المضادة للأكسدة للقمم المفصولة

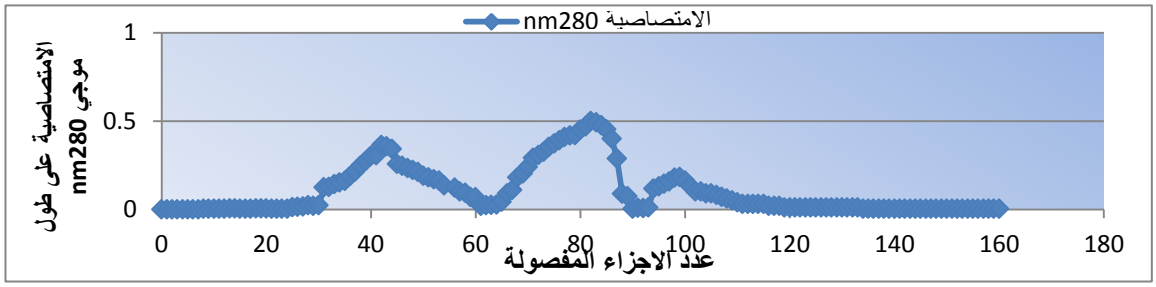
يظهر شكل 1 نتائج الترشيح الهلامي لتنقية ببتيدات المتحلل البروتيني لمخلفات الروبيان المفصولة بأغشية الترشيح الفائق(5كيلو دالتون)، إذ اوضحت النتائج ظهور اربع قمم لمتحلل إنزيم Alcalase واختبرت فعاليتها المضادة لأكسدة حامض اللينوليك،إذ حددت القمتين الأولى والثانية بفعالييتها العالية المضادتين للأكسدة البالغتين.(22.21%و27.53%)لكلتا القمتين على التوالي .



شكل1:مرتسم الترشيح الهلامي لببتيدات متحلل إنزيم Alcalase باستعمال عمود Sephadex G25 بابعاد 2.5×75سم بمعدل جريان 60مل/ساعة

التنقية بالترشيح الهلامي لببتيدات متحلل إنزيم Pepsin مع اختبار تحديد الفعالية المضادة للأكسدة للقمم المفصولة

يوضح الشكل2 نتائج الترشيح الهلامي لتنقية ببتيدات قمم المتحلل البروتيني لمخلفات الروبيان المفصولة باغشية الترشيح الفائق (5 كيلو) دالتون،إذ يلاحظ من النتائج ظهور ثلاث قمم أختبرت فعاليتها المضادة لأكسدة حامض اللينوليك، إذ حددت القمتين الأولى والثانية بفعالييتها العالية المضادتين للأكسدة البالغتين (20.84 %و24.89%) لكلتا القمتين على التوالي.

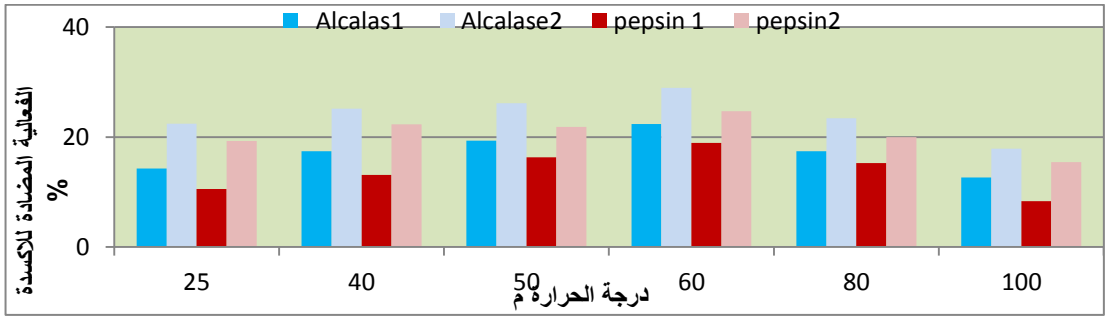


شكل 2 : الترشيح الهلامي لببتيدات متحلل إنزيمPepsin باستعمال عمود SephdexG25 بابعاد 2.5 ×75سم بمعدل جريان 60مل /ساعة.

تأثير المعاملة الحرارية

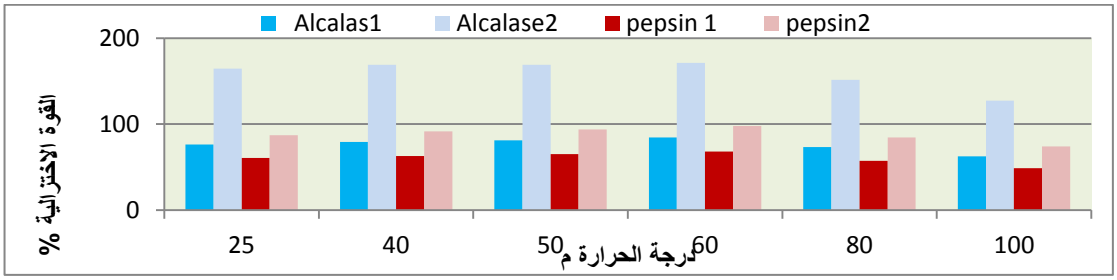
يبين الشكل 3 تأثيرالمعاملة الحرارية في ثبات الفعالية المضادة للأكسدة للببتيدات المحضرة بإنزيمي Alcalase وPepsin المنقاة بالترشيح الهلامي بتركيز 3ملغم/مل، لوحظ من النتائج أن الفعالية المضادة للأكسدة للببتيدات تأثرت في المعاملة الحرارية ،إذ ظهرت فروق معنوية ($P<0.05$) بين فعالية ببتيدات القمتين الأولى والثانية

لكلا الإنزيمين بمختلف الدرجات الحرارية المستعملة ،أن الزيادة التدريجية في درجة الحرارة من 25 الى 60م رافقتها زيادة في فعالية البتيدات المضادة للأكسدة لتعطي أعلى قيمتين لهما عند درجة الحرارة 60م إذ بلغتا 22.36% و 28.94% لبتيدات القمتين الأولى والثانية لإنزيم Alcalase و18.93%و24.71% لبتيدات قمتي إنزيم Pepsinعلى التوالي، ثم اخذت هذه الزيادة بالتناقص التدريجي عند رفع درجتي الحرارة أعلى من60م لتصل الى 12.66%و17.91%لبتيدات قمتي إنزيم Alcalase و8.36%و15.85% لبتيدات القمتين الاولى والثانية لإنزيم Pepsinعلى التوالي عند درجة حرارة 100م مقارنة بفعالية العينتين الضابطتين المحضرتين بدرجة حرارة 25م البالغتين 14.26% و22.42% لبتيدات القمتين الاولى والثانية لإنزيم Alcalase و10.57%و19.32% لبتيدات قمتي إنزيم Pepsinعلى التوالي. اتفقت النتائج المذكورة انفاً مع Zhu وجماعته (26) ،إذ بينوا ان قابلية البتيدات لاقتناص جذر DPPH تزداد بزيادة درجة الحرارة من 25 الى60 م ثم تنخفض عند رفع درجة الحرارة اعلى من 60م . ومع ماوجد Zhao وجماعته(25) من ان فعالية البتيدات المضادة للأكسدة تقل عند ارتفاع درجة الحرارة الى 100 م.



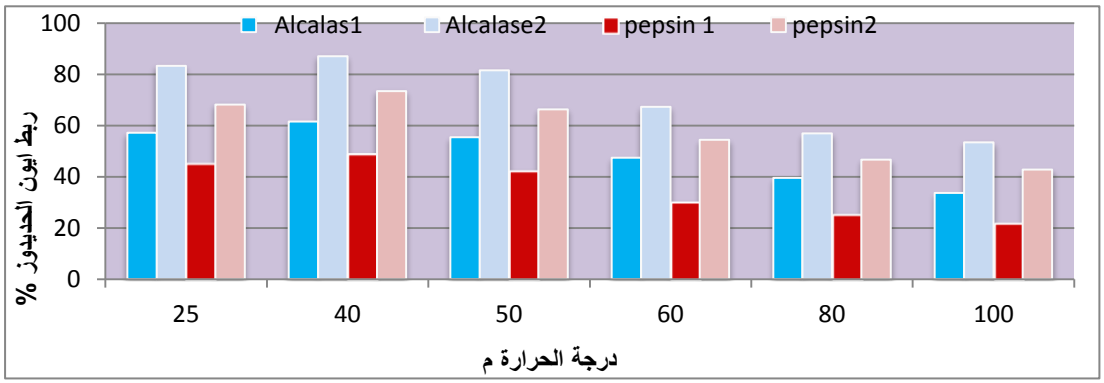
شكل 3 : تأثير المعاملة الحرارية في ثبات الفعالية المضادة للاكسدة للبتيدات

اما تأثير المعاملة الحرارية في ثبات القوة الاختزالية للبتيدات فتوضح النتائج في الشكل 4 وجود فروق معنوية (P<0.05) بين القوة الإختزالية للبتيدات القمتين الاولى والثانية لكلا الإنزيمين بأختلاف المعاملات الحرارية، اذ اظهرت البتيدات زيادة تدريجية بالقوة الإختزالية للبتيدات بزيادة درجة الحرارية من 25 الى60م فكانت أعلى قيمتين لهما 84.45%و68.23% لبتيدات القمة الأولى لإنزيميAlcalase وPepsinو171.32% و 97.64%لبتيدات القمة الثانية لكلا الإنزيمين على التوالي عند درجة حرارة 60م. وعند رفع درجة الحرارة أعلى من 60م حصل انخفاضاً في القوة الإختزالية للبتيدات لتصل عند درجة حرارة 100 م الى 62.51% و48.97% لبتيدات القمة الأولى و127.44%و74.16% لبتيدات القمة الثانية لكلا الإنزيمين على التوالي.بالمقارنة مع العينتين الضابطتين المحضرتين بدرجة حرارة 25م اللتين اعطيتا قوتين إختزاليتين 76.22% و60.84%لبتيدات القمة الأولى و164.38% و87.16% لبتيدات القمة الثانية المحضره بإنزيمي Alcalase وPepsin على التوالي.



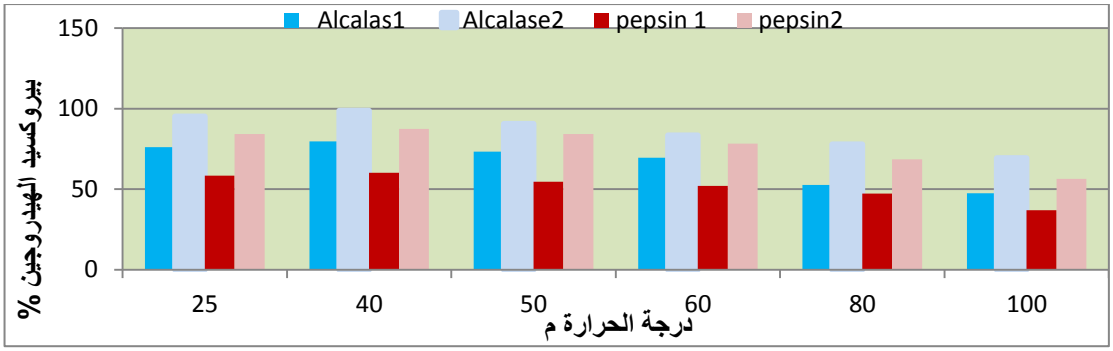
شكل 4 : تأثير المعاملة الحرارية في القوة الإختزالية للبتيدات

يبين الشكل 5 تأثير المعاملة الحرارية في ثبات قابلية البتيدات لربط أيون الحديدوز، تظهر النتائج أن قابلية البتيدات لربط آيون الحديدوز تأثرت في المعاملة الحرارية ،إذ ازدادت قابلية الربط بزيادة درجة الحرارة وقد ابدت هذه الزيادة فروقا معنوية ($P<0.05$) بين قابيلة ربط أيون الحديدوز لبتيدات قمتي الإنزيمين بإختلاف الدرجات الحرارية، إذ سجلت أعلى قابليتين لربط آيون الحديدوز 86.14% و73.42% لبتيدات القمة الثانية لإنزيـمي Alcalase وPepsin اما قابليتين الربط لبتيدات القمة الأولى فكانت 61.54% و48.92%لكلا الإنزيمين على التوالي عند درجة حرارة 40م . انخفضت هذه القيم عند رفع درجة الحرارة الى 60م واستمر الانخفاض لتصل قابلية الربط إلى 33.68%و21.95% لبتيدات القمة الأولى و 53.22% و42.80% لبتيدات القمة الثانية لكلا الإنزيمين على التوالي عند درجة حرارة100 م وهي أقل مقارنة بقابلية البتيدات لربط آيون الحديدوزعند الدرجة الحرارية 25م اللتين بلغتا 57.19% و45.20% لبتيدات القمة الأولى و83.34% و68.27% لبتيدات القمة الثانية لكلا الإنزيمين على التوالي . اتفقت مع Zhu وجماعته (26) الذين وجدوا أن قابلية البتيدات لربط أيون



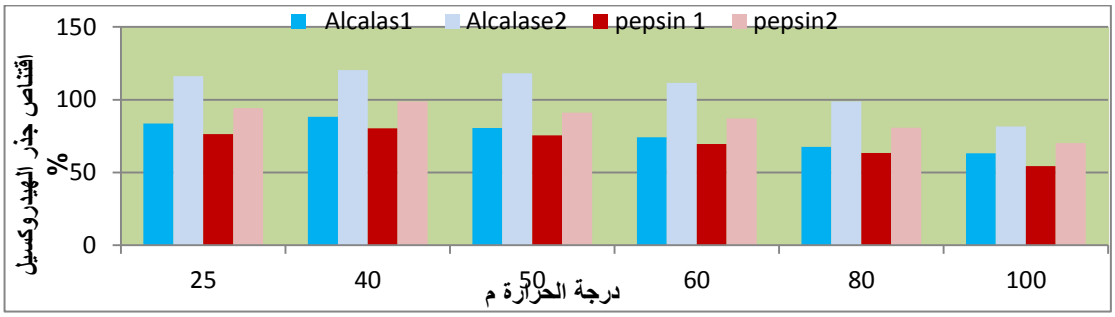
شكل5: تأثير المعاملة الحرارية في ثبات قابلية البتيدات لربط أيون الحديدوز

الحديدوز انخفضت من62.7 % عند المعاملة الحرارية 60م ووصلت إلى 31.5 % عند 100 م°.كما درس تأثير المعاملة الحرارية في ثبات قابلية البتيدات لإقتناص بيروكسيد الهيدروجين، إذ لوحظ من النتائج في شكل 6 وجود فروق معنوية ($P<0.05$) بين قابلية بتيدات قمتي الإنزيمين لاقتناص بيروكسيد الهيدروجين بإختلاف الدرجات الحرارية ، فعند متابعة تاثيرالمعاملة الحرارية في قابلية اقتناص البتيدات وجد ان قابلية الاقتناص تزداد بزيادة درجة الحرارة فعند درجة حرارة 25م كانت قابلية الاقتنـــاص 76.14% و95% لبتيـــدات قيمتي إنزيـــم Alcalase و58.46%و84.32% لبتيدات قمتي إنزيم Pepsin ثم ازدادت قابلية الاقتناص عند زيادة درجة الحرارة إلى 40م لتصل إلى أعلى قيمتين لهما 79.62%و98.54% لبتيدات القمتين الأولى والثانية لانزيم Alcalase 60.18%و87.45% لبتيدات القمتين الاولى والثانية لانزيم Pepsin على التوالي، وعند الاستمرار بزيادة درجة الحرارية الى 100م انخفضت قابليتين الاقتناص فكانتا 47.44%و69.38% لبتيدات قمتي إنزيم Alcalase 36.89% و56.43% لبتيدات القمتين الأولى والثانية لإنزيم Pepsinعلى التوالي .



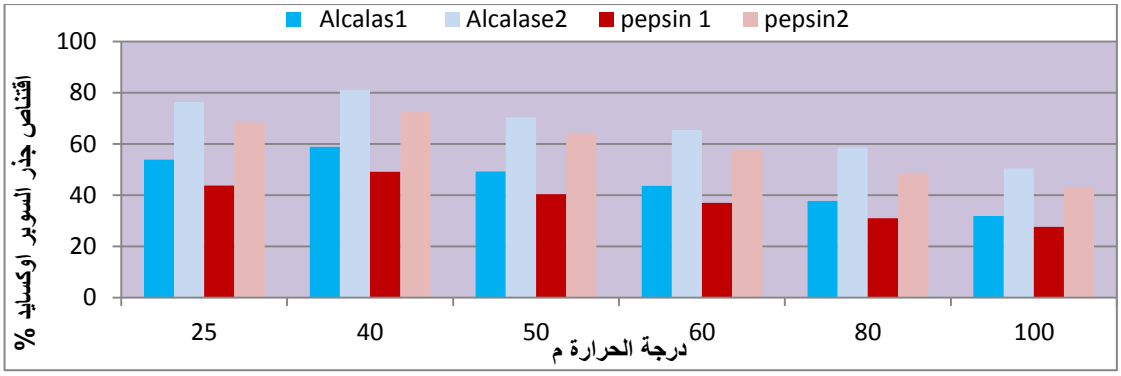
شكل6: تأثير المعاملة الحرارية في ثبات قابلية البتيدات لاقتناص بيروكسيد الهيدروجين

يظهر الشكل 7 تأثير المعاملة الحرارية في ثبات قابلية البتيدات لاقتناص جذر الهيدروكسيل، يتضح من نتائج الشكل أن هنالك فروق معنوية ($P<0.05$) بين قابلية بتيدات قمتي الإنزيمين الأولى والثانية لاقتناص جذرالهيدروكسيل بإختلاف المعاملات الحرارية ، إذ وجد ان قابلية اقتناص جذر الهيدروكسيل تزداد تدريجياً بزيادة درجة الحرارة فكانت أعلى قيمتين لهما عند درجة الحرارية 40م واللتين بلغتا88.29%و80.36% لبتيدات القمة الأولى لإنزيمي Alcalase وPepsin على التوالي، بينما بلغت قابليتي الإقتناص لبتيدات القمة الثانية 120.34%و98.55% لكلا الإنزيمين على التوالي ، وعند رفع درجة الحرارة اعلى من 40 م حصل انخفاضا في قابليتي الإقتناص وصلتا إلى 63.11%و81.73% لبتيدات القمتين الأولى والثانية لإنزيمAlcalase و54.39% و70.18% لبتيدات قمتي إنزيم Pepsinعلى التوالي عند درجة الحرارية 100 م ، بينما امتلكت بتيدات العينة الضابطة المحضرة بدرجة حرارة 25م قابليتي اقتناص 83.56% و76.48% لبتيدات القمة الأولى و116.27%و94.15% لبتيدات القمة الثانية لكلا الإنزيمين على التوالي .



شكل 7 : تأثير المعاملة الحرارية في ثبات قابلية البتيدات لاقتناص جذر الهيدروكسيل

تشير نتائج الشكل 8 إلى تأثير المعاملة الحرارية في ثبات قابلية البتيدات لاقتناص جذر السوبراوكساید السالب. يتضح من نتائج التحليل وجود فروق معنوية ($P<0.05$) بين قابلية بتيدات قمتي الإنزيمين لاقتناص جذر السوبراوكساید بإختلاف المعاملات الحرارية ، فعند درجة الحرارة 25م كانت قابليتي الاقتناص53.87% و76.40% لبتيدات قمتي إنزيم Alcalase 43.69%و68.32% لبتيدات قمتي إنزيم Pepsinعلى التوالي، اما عند رفع درجة الحرارة إلى 40م فقد حصلت زيادة في قابلية اقتناص جذر السوبراوكساید لبتيدات القمتين الأولى والثانية لإنزيم Alcalase كانت 58.92%و81.27% و لبتيدات القمة الأولى و الثانية لإنزيم49.16% Pepsin و72.64% على التوالي ، وعند الاستمرار برفع درجة الحرارية الى 100م انخفضت قابليتي الاقتناص إلى 31.80%و50.45% لبتيدات القمتين الأولى والثانية لإنزيمAlcalase 27.60% و 42.93% لبتيدات قمتي إنزيم Pepsin على التوالي وان هذه القيم أقل مقارنة بالعينة الضابطة .



شكل8: تأثير المعاملة الحرارية في ثبات قابلية البتيدات لاقتناص جذر السوبراوكساید السالب .

قد يعود الانخفاض الحاصل في الفعالية المضادة للأكسدة إلى تحطم التراكيب المسؤولة عن الفعالية المضادة للأكسدة، فقد لاحظ **Nalinanon** وجماعته (**16**) أن الفقدان في فعالية البتيدات المضادة للأكسدة يعود إلى تكسر البتيدات المضادة للأكسدة عند حصول تغيير في درجات الحرارة . واوضح **Zhu** وجماعته (**26**) أن ثبات الفعالية المضادة للأكسدة البتيدات ترتبط بطول السلسلة البتيدية والوزن الجزيئي للبتيد ، فالبتيدات المنخفضة الوزن الجزيئي تمتلك التركيب الثانوي وهو من العوامل المؤثرة في الفعالية المضادة للأكسدة وان درجة الحرارة العالية تؤثر في التركيب الثانوي، إذ تقل ثباتية **α-helix** عند رفع درجة الحرارة من **40** الى**60**م ويبدأ تكسر الأواصر الهيدروجينية والأواصر الآيونية وتحصل الدنترة التي تؤدي إلى عدم ثبات الفعالية المضادة للأكسدة كما بين **Scheraga** (**23**). أو قد تحدث بعض التفاعلات الكيميائية اثناء المعاملة الحرارية تؤدي الى أكسدة بعض الأحماض الأمينية كالسستين والمثيونين وتتكون مركبات حلقية من تفاعل حامض الاسبارتيك والكلوتاميك مع الثريونين (**2**).

المصادر

1- الراوي ، خاشع محمود و عبد العزيز محمد خلف الله (**2000**) . تصميم وتحليل التجارب الزراعية . الطبعة الثانية دارالكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل

2- جمال، مرسي خالد و عبد المنعم ،ابراهيم شامه(**2004**).كيمياء بروتين.دار الكتب العلمية للنشروالتوزيع رقم الابداع **8546**

3- **Ajibola, C. F.; J. B. Fashakin ; T. N. Fagbemi and R. E. Aluko (2011). Effect of peptide size on antioxidant properties of african yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. Int.J. Mol. Sci.,12(10):6685-6702.**

4- **Cheung, I.W.Y. and E.C.Y. Li-Chan (2010). Angiotensin -I- Converting enzyme inhibitory activity and bitterness of enzymatcally-produced hydrolysates of shrimp (*Pandalopsis dispar*) processingby products investigated by Taguchidesign.FoodChem.,122:1003-012**

5- **Cordova -Murueta, J. H. and F. L. Garcia-Carreno (2002) . Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed . Aquaculture , 210 : 371-384.**

6- **Dattajirao, P.V.(2011).Extraction, purification and characterization of antioxidant peptides from marine gastropod,ficusvariegata (RÖDING,1798).Thesis of master of Department Biotechnology School of Bioengineering Faculty of Engineering and Technology SRM University.**

7- Dinis, T. P.; V.M .C. Madeira and L .M .Almeida (1994). Action of phenolic derivates (acetaminophen, salycilate,and 5-aminosalycilate) . as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers . Biochemistry. and Biophysics, 315:161-169 Cited from-Dattajirao,P.V.(2011).Extraction ,purification and characterization of antioxidanrt peptides from marine gastropod,ficusvariegata (RÖDING,1798). Thesis of master of Department Biotechnology School of Bioengineering Faculty of Engineering and Technology SRM University .

8- Girgih , A . T.; C. C. Udenigwe and R. E. Aluko (2011). Invitro antioxidant properties of hemp seed protein hydrolysate fractions . J . Am . Oil Chem . SOC ., 88 : 381-389 .Cited from Ajibola et al.(2011).

9- Huang, G.; Z. Ren and J.X. Jiang (2011) . Separaion of iron –binding peptides from shrimp processing by products hydrolysates . Food Biopro. Technol ., 4(8) : 1527-1532 . Cited from- Zhao , J .; G . R . Huang ; M . N . Zhang ; W . W . Chen and J . X . Jiang (2011) . Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant stability of shrimp processing by product hydrolysate . Am. J. Food Technol.,6 (10) :904-913 .

10- Huang, G.R.; Z.Y. Ren and J.X. Jiang (2013). Optimization of hydrolysis conditions for lron binding peptides production from shrimp processing by products. Am. J. Food Technol.,4 : 1-7 .

11- Kim, S. and I. Wijesekara (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. J. Fun. Food, 2:1-9.

12- Kudo, K.; S. Onodera; Y. Takeda; N. Benkeblia and N. Shiomi (2009). Antioxidative activities of some peptides isolated from hydrolyzed potato protein extract .J. Funct. Food ,1:170-176

13- Leal, A.; P. Castro; J. Lima; E. Correoa and R. Benxerra (2009).Use of shrimp protein hydrolysate in nile tilapia (*Oreochromis niuloticus L*.) feeds . Aquacult . Int .,18 (4) :635- 646 .

14- Martone, C.B.; O. P. Borla and J. J Sanches (2005). Fishery by -product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media . Bioresour . Technol ., 96 : 383 – 387.

15- Muzaifa, M.; N. Safriani and F. Zakaria (2012). Production of protein hydrolysates from fish by product prepared by enzymatic hydrolysis . International J. of the Bioflux Soeiety , 5 : 36 – 39 .

16- Nalinanon, S.; S. Benjakul; H. Kishimura and F. Shahidi (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.

17- Oliveira, C.F.; D. Coletto; A.P.F. Correa; D.J. Daroit; R. Toniolo; F. Cladera-Olivera and A. Brandelli (2014).Antioxidant activity and inhibition of meat lipid oxidation by soy protein hydrolysates obtained with amicrobial protease .Int. Food Res. J. 21(2): 775-781.

18- Osawa ,T . and M. Namiki (1981) .A novel type of antioxidant is olated from leaf wax of (*Eucalyptus leaves*) .Agric. and Biolog. Chem. , 45 : 735-739.

19- Pownall, T.L.; C.C. Udenigwe and R. E. Aluko (2010). Amino acid compositition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum L*.) . enzymatic protein hydrolysate fractions . J . Agric . Food .Chem ., 58: 4712 – 4718

20- Qian, Z. L.; W. K. Jung and S. K. Kim (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, Rana catesbeiana Shaw. Bioreso. Technol.,99:1690-1698.

21- Rolland, J .; M. Abdelouahab; J. Dupont; F. Lefevre; E. Bachera and B. Romestand (2010) . Stylicins , a new family of antimicrobial peptides from the pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). Mol. Immunol ., 47(6):1269 – 1277.

22- Ruch, R. J.; S. J. Cheng and J. E. Klainig (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular, communication by antioxidant catechins isolated from chinese green tea. Carcinogen, 10: 1003-1008.

23- Scheraga, H. A.; G .Nemehy and I . Z . Stenberg (1962) . The contribution of hydrophobic bonds to the thermal stability of protein conformations. J . Bio. Chem. , 237 (8) : 2506 – 2508 .

24- Whitaker, J.R. (1958).Properties of the proteolytic enzymes of commercial ficin .Food Res.,22:483-493.

25- Zhao, J.; G. R. Huang ; M . N . Zhang; W. W. Chen and J. X. Jiang (2011).Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant stability of shrimp processing by product hydrolysate . Am. J. Food Technol.,6 (10) :904-913

26- Zhu, C.; W . Zhang ; Z .Kang ; G . Zhou and X . Xu (2014) . Stability of an antioxidant peptide extracted from Jinhua ham . J . Meat Sci. , 96 : 783– 789

EFFECT OF THERMAL TREATMENT ON STABILITY OF ANTIOXIDANT PEPTIDES PREPARATION FROM SHRIMP AND PURIFICATION BY GEL FILTRATION

A .H .J . Almosawi **A . Z. H. AL-Hilfi**

ABSTRACT

The study was interested in the preparation of protein hydrolysates from shrimp waste by products by using two types of proteolytic enzymes, Alcalase and Pepsin. The peptides of both protein hydrolysates were isolated by using Ultrafiltration membranes of 5 MWCO KDa. purification of peptides by gel filtration was showed four peaks of peptides hydrolysat enzyme Alcalase and three peaks for peptides of hydrolysate Pepsin enzyme and tested The antioxidation activity of all peaks,were examind The first and second peaks of two enzyme, have higher antioxidant activity. The stability of antioxidant peptides towards thermal treatment at different temperatures ranged between 25-100 C° found that the antioxidant activity of peptides and reducing power stable at 60C° .The ability to binding ion ferrous ,hydrogen peroxide , hydroxyl radical scavenging and superoxide anion scavenging appeared stable at thermal 40C°, but decreases when tempera are rised ouer 40 and 60 .

Part of M.Sc. Thesis the second author
College of Agric., Basrah Univ., Basrah, Iraq.