مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية المجلد (16) العدد (2) – (2016)
ISSN-1813-1646

استخلاص وتنقية وتوصيف مثبطات الألفا–أميليز العفن *A.niger* من صنف الذرة الصفراء *May 70

انوار احمد خلف[1] **وإيثار زكي ناجي**
كلية الزراعة – جامعة تكريت – العراق

الخلاصــة

استخلصت مثبطات أميليز عفن *A.niger* من صنف الذرة الصفراء May 70 باستعمال0.2 مولار دارئ خلات الصوديوم برقم هيدروجيني 6 ، ثم ركزت هذه المثبطات من المستخلص بوساطة ثلاث طرق رئيسة أشتملت على عدة نسب إشباع من كبريتات الأمونيوم للمستخلص ، وإظهرت النتائج إن التركيز بـ 60% كبريتات الأمونيوم كانت الأفضل لأعطائها أفضل قيم للفعالية والفعالية النوعية حيث بلغت 10.62 وحدة/مليلتر و 12.45 وحدة/ملغم بروتين على التوالي . تلاها التنقية بخطوتين اشتملت على كروماتوكرافيا التبادل الايوني بعمود DEAE-Cellulose ، ومن خلالها حددت قمة امتلكت فعالية في تثبيط اميليز *A.niger* ضمن مرحلة الاسترداد وبلغت عدد مرات التنقية لها 5.1 وبحصيلة بلغت35.66% والتي استكمل تنقيتها بالترشيح الهلامي على عمود السيفادكس G-100 ، وكانت عدد مرات التنقية 8.25 وبحصيلة بلغت 28.62% أظهرت نتائج توصيف مثبطات الأميليز أن الوزن الجزيئي للمثبط المنقى بلغ 29500 كيلودالتون عند تقديره بطريقة الترشيح الهلامي . وأظهرت الدراسة أن حضن المثبط المنقى مع الأميليز لمدة 30 دقيقة مهمة للحصول على أعلى نسبة تثبيط في الظروف المستخدمة في هذه الدراسة . وأعطى المثبط أعلى فعالية تثبيطية تجاه أنزيم الألفا– أميليز في درجة حرارة 30˚م ، إذ كانت فعالية الأميليز بدون مثبط 4.55 وحده /مليلتر ، في حين عند حضن الأميليز مع المثبط المنقى عند درجة حرارة 30˚م كانت فعالية التثبيط 3.77 وحدة/مليلتر ، مع حدوث ارتفاع لفعالية الأميليز عند حضنه مع المثبط المنقى بدرجة حرارة 70˚م ، وعند دراسة درجة الثبات للمثبط المنقى بعد الحضن بدرجات الحرارة (30-90)˚م لمدة 30 دقيقة لوحظ احتفاظ المثبط المنقى بفعاليته عند درجات الحرارة (30-50)˚م ، تلاها حدوث انخفاض تدريجي في الفعالية مع ارتفاع درجة الحرارة الى أن وصلت درجة حرارة 90˚م إذ احتفظ المثبط بـ 80% من الفعالية بدرجة 70˚م ، بعدها انخفضت حتى وصلت بدرجة 90˚م الى 60% . وبلغ الرقم الهيدروجيني الأمثل لارتباط المثبط المنقى مع انزيم الفا –اميليز بحدود 6– 9 . وكان أعلى ثبات للمثبط المنقى عند الرقم الهيدروجيني 7 ، إذ أعطى المثبط المنقى أعلى فعالية تثبيطية وكان أكثر ثباتاً باتجاه الارقام القاعدية.

الكلمات المفتاحية :
استخلاص ، تنقية ، توصيف ، مثبطات ، الالفا–اميليز ، الذرة الصفراء .

للمراسلة :
انوار احمد خلف
قسم علوم الاغذية ، كلية الزراعة ، جامعة تكريت ، **العراق** .

Extraction and Purification and Characterization of Fungel Alpha-amylase Inhibitors From Local Maize Variety May 70

Anwer Ahmed Khalaf and Ethar Zeki Naji
Food Science Dep.- College of Agric.- University of Tikrit

ABSTRACT

Fungelα-amylase inhibitors were extracted from May 70 with 0.2 M sodium acetate buffer, pH 6 , then concentrated by using different saturation percentage of ammonium sulfate from extracted . The results showed that precipitation with ammonium sulphate 60% was more suitable, scoring inhibitor units and specific activity amounted to 10.62 units⁄ml, 12.45 units⁄ mg protein respectively .Then purified by ionexchange chromatography using DEAE-Cellulose, which identified peaks possessed effective in the inhibition of amylase *A.niger* in the recovery stage with purification fold of 5.1 , and recovery amounted 35.66% . purification has been completed on a gel filtration Sephadex G-100 column , The obtained purification fold was 8.25 , and recovery amounted 28.62%.Results showed that the characterization of amylase inhibitors molecular weight inhibitor purified

Key Words:
A.niger Alpha-amylase inhibitors , Maize , A.niger amylase.

Correspondence:
Anwar A. Khalaf
Food Science Dep.- College of Agric.- University of Tikrit- **IRAQ**

[1] البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول

reached at 29500 Kiloudalton appreciation manner gel filtration . The study showed that the incubating -amylase inhibitor purified with a 30-minute task to obtain a higher percentage of inhibition in the conditions used in this study .And gave determined highest effective inhibition toward the enzyme alpha - amylase at a temperature of 30 ˚ C where the effectiveness inhibitor 4.55 U / mL , while amylase with purified inhibitor at a temperature of 30 ˚ was effective inhibition 3.77 units / mL , with an incidence rise of the effectiveness of amylase when his incubating with purified inhibitor temperature 70 ˚ C , and when studying the degree of stability purified inhibitor after including temperature (90-30) ˚ C for 30 minutes was observed at the temperatures (50-30) ˚ C followed by a gradual decrease in efficiency with increased temperature , with retention activity for 80% of the inhibitor at degree 70 ˚C followed by decrease until it reached a degree 90 ˚ C to 60% . these the results can reflect higher thermal stability of these inhibitors . Optimum pH for linking of purified inhibitor with amylase is around 9-6 .The higher the stability of the purified inhibitor was at pH 7 , the purified inhibitor gave the highest effective inhibition and were more stable toward the basal numbers .

المقدمة :

تعد الذرة الصفراء *(Zea mays L.)* احد المحاصيل الحبوبية المهمة في العديد من دول العالم ، وهي تحظى باهتمام كثير من الباحثين وذلك للاهمية في تعدد استعمالاتها حيث تدخل في تغذية الإنسان والحيوان كما تستعمل في الصناعات المختلفة مثل صناعة النشا و الكحول وكذلك في تصنيع شراب الذرة وبعض أغذية الإفطار والأغذية الحبوبية السريعة التحضير (منصور،2011). كما يستفاد من المخلفات الثانوية منها في صناعة البلاستيك والورق والفورفورال ، وقد بلغت المساحة المزروعة في العالم سنة 2003 ما يقارب من (142685000) هكتاراً والذي بلغ انتاجه الكلي (638043000) طن (يوسف وآخرون،2006) .

وفي العراق تأتي أهمية الذرة الصفراء باعتبارها واحده من المحاصيل الحبوبية المهمة بجانب الحنطة والرز، إذ تستعمل في صناعة منتجات الذرة مثل رقائق الذرة والشامية ، كما تستعمل في صناعة الزيت والنشأ والأعلاف ، وقد بلغ إنتاجها في العراق لعام 2006 ما يقارب 2.5 طن/هكتار (يوسف وآخرون،2006) .

تتميز حبوبها من الناحية التغذوية باحتوائها على نسبة عالية من مولدات فيتامين A (precaurcer of vitamin A) وبما يعادل ما تحويه حبوب الحنطة عشرين ضعفا أو أكثر، وكذلك احتواء حبوبها على نسبة لا بأس بها من البروتين تصل الى 8– 9% (الساهوكي،1990) .

ان محتوى الحبوب من العناصر الغذائية جعلها عرضة للاصابة بالعديد من الحشرات والطفليات ؛ لذا طورت هذه النباتات مقاومتها عن طريق تكوينها العديد من مركبات الايض الثانوي التي لها القدرة على مقاومة هذه الحشرات والطفيليات لاسيما المعتمدة منها على المواد النشوية مصدراً للطاقه لارتفاع نسبة النشا في الحبوب والتي قد تصل الى 83 % تقريبا عن طريق تثبيط اميليز هذه الحشرات التي تعتمد عليه في تحليل النشا وتحويله الى سكريات بسيطة يمكنها امتصاصها وتمثيلها والافاده منها في تحرير الطاقه لانجاز الفعاليات الحيوية (Franco وآخرون ,2005) .

تحتوي الحبوب ومنها الذرة الصفراء على مثبطات الالفا– اميليز والتي تعد من مركبات الأيض الثانوي (Fontanini وآخرون ،2007) وهي عبارة عن بروتينات غنية بالسستين يصنعها النبات بصورة طبيعية لاغراض دفاعية وقد اظهرت معظم هذه البروتينات فعالية في حماية النبات من الاصابة بالعديد من الحشرات والممرضات (Pelegrini وآخرون،2008) . نالت هذه المثبطات بعض الاهتمام في الاونة الاخيرة لتعدد مجالات الافادة منها ، لكنها عدت في بداية التعرف على وجودها في الحبوب عام 1946 (Sandstedt و Beckord ،1946) كمكونات لاغذائية (Burgos-Hernàndes وآخرون ،1999) ؛ بسبب امتلاكها القدرة على تثبيط اميليزات اللبائن ومنها اميليز الانسان(Friedman, 1987) . ولكن في عام 1980 بعد ان لاحظ

بعض باحثي مجموعة مايو الطبية للبحوث الدوائية ان لهذه المثبطات القدرة على خفض نسبة السكر في الدم عند المرضى المصابين بالسكري و الاشخاص الاصحاء بعد تناولهم وجبة غنية بالمواد النشوية . وقد هدفت هذه الدراسة الى محاولة استخلاص وتنقية هذه المثبطات من الذرة الصفراء ومتابعة تأثيرها في تثبيط ألفا– أميليز الأعفان في محاولة للأستفادة منها كمضافات غذائية في هذا الأتجاه وذلك لعدم وجود مثل هكذا دراسات .

المواد وطرائق العمل:

استخلاص مثبطات الالفا–اميليز:

استخلصت مثبطات الألفا–أميليز من حبوب الذرة الصفراء صنف May 70 التي تم الحصول عليها من قبل الفلاح العراقي ، وطحنها باستخدام المطحنة الكهربائية للحصول على طحين ناعم ومتجانس حسب الطريقة التي اعتمدها كل من Kunkel و Janke,1981)) ، حيث استخلصت باستعمال دارئ الخلات 0.2 مولار ورقم هيدروجيني 6 وبنسبة خلط (10:1) (وزن: حجم) باستعمال التحريك المغناطيسي لمدة 60 دقيقة في درجة حرارة الغرفة، ثم نبذ الخليط مركزيا بسرعة 30000χg لمدة 20 دقيقة ودرجة حرارة 4°م ، بعدها اخذ الرائق الحاوي على المثبط وهو المستخلص الخام لتقدير فعالية التثبيط وقدر أيضا تركيز البروتين ، لحساب الفعالية النوعية في المستخلص الخام .

تقدير الفعالية التثبيطية :

قدرت الفعالية التثبيطية للمستخلص الخام حسب الطريقة التي إعتمدها (Kokiladevi وآخرون،1972) بالاعتماد على تقدير فعالية الألفا–أميليز المتبقية بعد الحضن . قدرت الفعالية الانزيمية على وفق الطريقة التي وصفها Bernaed و Whitaker (1972) واعتمادا على السكريات المختزلة المتحررة نتيجة التحلل المائي للنشا بفعل الانزيم عن طريق حضن 0.1 مليلتر من محلول الفا–أميليز العفن الخام ، مع 0.9 مليلتر من محلول المادة الأساس (2% نشا) لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 37م ، بعدها أوقف التفاعل بإضافة 1.0 مليلتر من كاشف DNSA وسخنت المحتويات في حمام مائي مغلي لمدة 5 دقائق ثم بردت بصورة مباشرة واضيف اليها 10 مل من الماء المقطر ، تلاها المزج وقراءة الامتصاصية على الطول الموجي 540 نانوميتر بالمقارنة مع العينة الكفء المحضرة بالطريقة نفسها ما عدا إضافة محلول الانزيم بعد إضافة كاشف DNSA لمنع حدوث التفاعل .

تعرف وحدة الفعالية الانزيمية Enzymatic activity (وحدة / مليلتر) بانها كمية الانزيم التي تحرر 1.0 مايكرومول من السكريات المختزلة (المالتوز) في الدقيقة الواحدة وتحت ظروف القياس من خلال المنحنى القياسي الذي يمثل العلاقة بين تركيز المالتوز (ملغم/مليلتر) والامتصاصية على الطول الموجي 540 نانوميتر .

قدرت الفعالية التثبيطية عن طريق تقدير الفعالية الانزيمية المتبقية بعد حضن الانزيم مع مستخلصات المثبطات وبنسبة 1:1 بدرجة حرارة 37م ولمدة 30 دقيقة لاتمام تفاعل التثبيط .

تعرف وحدة المثبط (وحدة/ مليلتر) بانها كمية المثبط اللازمة لتثبيط وحدة واحدة من الانزيم . اما النسبة المئوية لفعالية التثبيط Inhibition activity % فيعبر عنها حسب القانون الاتي (Yetterوآخرون،1979) .

$$\text{نسبة التثبيط \%} = \frac{\text{فعالية الاميليز بدون مثبط} _ \text{فعالية الاميليز مع المثبط}}{\text{فعالية الاميليز بدون مثبط}} \times 100$$

وحسبت الفعالية النوعية للمثبط Specific activity التي تعبر عن وحدات الفعالية لكل ملغم بروتين حسب القانون الاتي (Bernaed و Whitaker، 1972):

$$\text{الفعالية النوعية (وحده/ملغم بروتين)} = \frac{\text{الفعالية (وحدة/مليلتر)}}{\text{تركيز البروتين (ملغم / مليلتر)}}$$

تقدير تركيز البروتين في العينات :

استخدمت طريقة برادفورد في تقدير تركيز البروتين في المستخلصات الخام والمنقاة (Bradford1977) بإضافة 0.1 مليلتر من مستخلص النموذج الى 0.4 مليلتر من محلول 0.015 مولار ترس حامض الهيدروكلوريك ذي الرقم الهيدروجيني 7 و 2.5 مليلتر محلول صبغة الكوماسي الزرقاء G-250 تلاها مزج الخليط جيدا وتركه مدة 5 دقائق ثم قراءة الامتصاصية على طول موجي 595 نانوميتر بعد تصفير الجهاز بمحلول الكفء الخالي من النموذج ، وتم حساب تركيز البروتين في المستخلصات بالرجوع الى المنحنى القياسي الذي يمثل العلاقة بين تراكيز متدرجة لبروتين البومين المصل البقري والأمتصاصية على طول موجي 595 نانوميتر .

تعيين الطريقة المثلى لتركيز مثبطات الألفا–أميليز :

التركيز بكبريتات الأمونيوم :

أضيفت أوزان معينة من بلورات كبريتات الأمونيوم بصورة تدريجية الى عدد من الانابيب الحاوية على 10 مليلتر من المستخلص الخام مع التحريك المستمر على المحرك المغناطيسي ولمدة 30 دقيقة وتحت ظروف التبريد (حمام ثلجي) للحصول على نسب إشباع (20 ، 30 ، 40 ، 50 ، 60 ، 70 ، 80 ، 90) % . بعدها اجري النبذ المركزي بسرعة 3000 χg لمدة 15دقيقة . اهمل الرائق وقدرت الفعالية التثبيطية ونسبة البروتين في الراسب لكل نسبة إشباع بعد اذابته في 1 مليلتر من محلول دارئ 0.2 مولار خلات الصوديوم ورقم هيدروجيني 6 لتحديد نسبة الاشباع المثلى لتركيز المثبط .

تنقية مثبطات الألفا–أميليز :

رسبت المثبطات في المستخلص الخام بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 60% ، ثم فصل الراسب في جهاز النبذ المركزي بسرعة 3000 χg لمدة 15 دقيقة . اهمل الرائق واذيب الراسب في كمية من دارئ الخلات بتركيز 0.2 مولار ورقم هيدروجيني 6 . قدرت بعدها الفعالية التثبيطية وتركيز البروتين ، ثم أجريت عملية الديلزة بالماء المقطر لمدة 2 ساعة (Heidari وآخرون، 2005)، بعدها قدرت كل من الفعالية التثبيطية وتركيز البروتين .

كروماتوكرافيا التبادل الأيوني باستخدام المبادل DEAE-Cellulose :

حضر عمود المبادل ليعطي أبعاد (3 x 15) سم واستخدم محلول الترس الدارئ برقم هيدروجيني 8 في موازنة المبادل وبسرعة جريان 30 مليلتر / ساعة على وفق الطريقة التي وصفها (Whitaker 1972) ثم مرر مستخلص المثبط المركز على سطح العمود وغسل العمود بمحلول دارئ الترس ذي التركيز 0.005 مولار لانزال البروتينات غير المرتبطة وجمعت الاجزاء النافذة من العمود بمعدل 3 مليلتر / انبوب وقيس الامتصاص للاجزاء النافذة عند 280 نانومتر ، كما قيست الفعالية التثبيطية (وحده / مليلتر) للاجزاء غير المرتبطة ، ثم استرد المثبط من العمود بواسطة التدرج الخطي للملح باستعمال دارئي الترس الاول بتركيز 0.005 مولار ورقم هيدروجيني 8 والثاني بتركيز 0.005 مولار المحتوي على 1.0مولار من كلوريد الصوديوم NaCl برقم هيدروجيني 8 ، بعدها تم متابعة البروتين في الاجزاء المسترده ورسمت العلاقة بين الامتصاص الضوئي للاجزاء غير المرتبطة والاجزاء المستردة ، وقدرت الفعالية التثبيطية للاجزاء المستردة وعليه حددت القمة الحاوية على الفعالية ، جمعت بعدها الاجزاء الفعالة للقمة وقدرت لها الفعالية التثبيطية وتركيز البروتين لاستخراج الفعالية النوعية .

كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي بهلام السيفادكس G-100 :

أضيف المحلول الحاوي على المثبط المركز الذي تم الحصول عليه بعد خطوة الاسترداد وبعد تركيزه على سطح عمود هلام السيفادكس بابعاد (2 x 45) سم بشكل تدريجي وبالقرب من سطح الهلام . اجريت عملية الاسترداد بوساطة محلول Tris-HCL الدارئ (0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7) وبسرعة جريان 30 مليلتر / ساعة وبواقع 3 مليلتر للجزء الواحد وقرأت الامتصاصية على الطول الموجي 280 نانوميتر للاجزاء المستردة . تمت متابعة الاجزاء الحاوية على الفعالية ضمن القمة وجمعت وقيس حجمها وقدرت الفعالية التثبيطية وتركيز البروتين .

توصيف مثبطات الألفا–أميليز المنقاة جزئيا :

تعيين الوزن الجزيئي للمثبطات بطريقة الترشيح الهلامي :

تقدير حجم الفراغ للعمود والأسترداد :

قدر حجم الفراغ لعمود الترشيح الهلامي المعبأ بهلام السيفادكس G-100 باستخدام محلول الدكستران الازرق بتركيز 4 ملغم / مليلتر. تم إمرار 1 مليلتر من هذا المحلول على الجدار الداخلي للعمود الزجاجي بالقرب من سطح الهلام وبشكل تدريجي ، واجريت عملية الأسترداد لمحلول الدكستران الازرق بمحلول دارئ Tris-HCL بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7 وبسرعة جريان ثابتة وبواقع 3 مليلتر للجزء الواحد وقرأت الامتصاصية في جهاز المطياف الضوئي للأجزاء المنفصلة على الطول الموجي 600 نانوميتر ، وقدر حجم الفراغ للعمود . وقدر حجم الأسترداد للمثبط المنقى والبروتينات القياسية ، واسترد بنفس المحلول وقرأت الامتصاصية عند الطول الموجي 280 نانوميتر ، بعدها تم تقدير الوزن الجزيئي للمثبط بوساطة رسم المنحنى القياسي من العلاقة بين حجم الاسترداد/ حجم الفراغ (Ve / Vo) ولوغارتم الاوزان الجزيئية للبروتينات القياسية .

تأثير وقت الحضن في فعالية المثبط :

حضن المثبط المنقى جزئيا مع أميليز العفن ، وبنسب متساوية (1:1) في درجة حرارة 37 ˚م ولاوقات مختلفة شملت (0 ،10 ،20 ،30 ،40 ،50) دقيقة بعدها قدرت الفعالية التثبيطية .

تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية المثبط :

لتحديد درجة الحرارة المثلى لفعالية المثبط ، قدرت الفعالية التثبيطية بعد حضن مثبط الاميليز المنقى جزئيا وبنسب متساوية (1:1) (حجم : حجم) مع أميليز العفن في مدى من درجات الحرارة تراوحت بين (30- 70) ˚م ولمدة 30 دقيقة ثم رسمت العلاقة بين درجات الحرارة والفعالية التثبيطية . ولتعيين تأثير درجة الحرارة على فعالية المثبط فقط وبدون تداخل تأثير الحرارة على أميليز العفن قدرت فعالية أميليز العفن لوحده دون المثبط وفي المدى نفسه من درجات الحرارة والمدة نفسها ، بعدها قدرت الفعالية الأنزيمية لغرض متابعة فعالية أميليز العفن بدرجات الحرارة المختلفة ومن ثم تقدير الفعالية التثبيطية .

تعيين الثبات الحراري للمثبط :

لتتعين تأثير درجة الحرارة على ثباتية مثبطات الأميليز حضن المثبط المنقى جزئيا في حمام مائي وبدرجات حرارة مختلفة تراوحت بين (30 – 90) ˚م ولمدة 30 دقيقة وأوقف تأثير الحرارة بنقل الانابيب الحاوية على المثبط وبعد انتهاء الوقت المحدد الى حمام ثلجي ، بعدها حضن حجم متساو من المثبط (1:1) (حجم : حجم) مع أميليز العفن بدرجة حرارة 30 ˚م ولمدة 30 دقيقة ، ثم قدرت الفعالية الانزيمية ورسمت العلاقة بين درجة الحرارة والفعالية المتبقية لإجل تحديد الثبات الحراري للمثبط .

تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية المثبط :

إعتمدت الطريقة التي اقترحها (Figueira وآخرون،2003b) في تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية المثبط وذلك بإضافة 1.0 مليلتر من محاليل الدوارئ المستخدمة الى0.5 مليلتر من محلول المثبط المنقى جزئيا والناتج بعد خطوة الترشيح الهلامي و0.5 مليلتر من محلول الأنزيم . بعدهاحضنت جميع النماذج في درجة حرارة 30 ˚م ولمدة 30 دقيقة . قدرت الفعالية

الانزيمية لكل من النماذج السابقة ذات الأرقام الهيدروجينية المختلفة ثم حساب الفعالية التثبيطية . وفي نفس ظروف التجربة حضن 0.5 مليلتر من أميليز العفن مع 1.0 مليلتر من كل من الدوارئ السابقة وبدون وجود المثبط ثم قدرت الفعالية الانزيمية لمتابعة فعالية أميليز العفن في الأرقام الهيدروجينية المختلفة ، ثم رسمت العلاقة بين الفعالية الأنزيمية والرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية أميليز العفن وكذلك لمثبط الأميليز .

تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات المثبط :

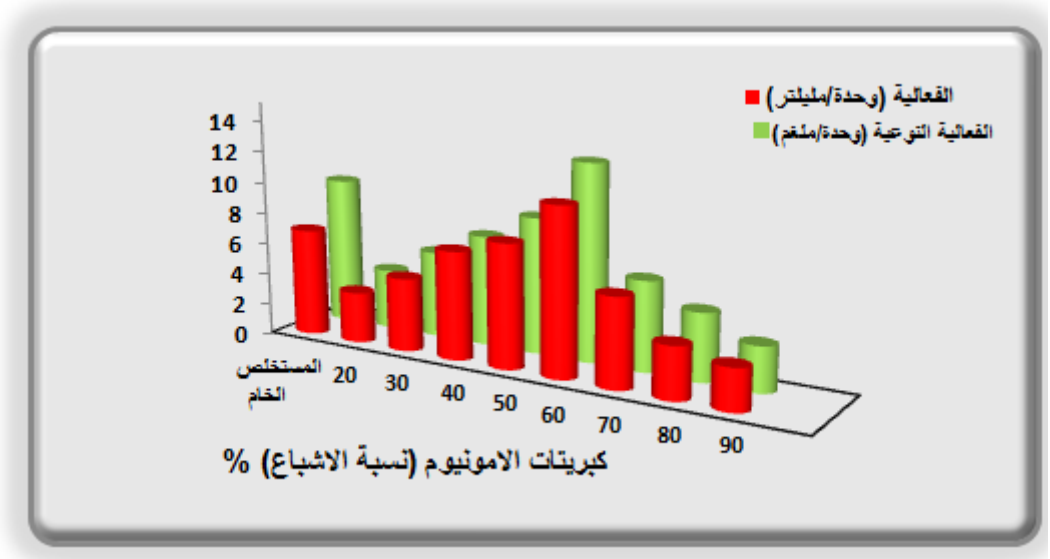
لتعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات المثبط أتبعت الطريقة التي اقترحها (Figueira وآخرون،2003b) عن طريق حضن قمة المثبط لمدة 16 ساعة بمديات مختلفة من الارقام الهيدروجينية بدرجة حرارة 4 °م وذلك بمزج (1:0.5) (حجم : حجم) من مستخلص المثبط مع كل من محاليل الدوارئ ، بعدها قدرت الفعالية التثبيطية المتبقية في كل نموذج . رسمت العلاقة بين الرقم الهيدروجيني والنسبة المئوية للفعالية المتبقية .

النتائج والمناقشة :

تركيز مثبطات الأميليز :

من اجل التوصل الى نسبة الاشباع المناسبة للحصول على افضل تركيز لمثبطات الاميليز في مستخلص طحين الذرة الصفراء May 70 استخدمت املاح كبريتات الامونيوم بنسب اشباع متدرجة تراوحت بين (20 –90)% وبينت النتائج الموضحة في (الشكل-1) ان اعلى فعالية تثبيطية ونوعية كانت عند نسبة اشباع 60% حيث بلغت 10.62 وحدة/ مليلتر و 12.45 وحدة/ ملغم بروتين على التوالي ، تليها نسبة اشباع 50% ثم 40% حيث بلغت الفعالية التثبيطية 7.88و 6.88 وحدة/ مليلتر والنوعية 8.63 و6.99 وحدة/ ملغم بروتين على التوالي . تعد هذه الخطوة من الخطوات المهمة في تنقية مثبطات الاميليز لاجل الحصول على مثبط مهيأ لاجراء عملية التنقية بوساطة الطرائق الكروماتوكرافية . حيث يركز المستخلص للتخلص من اكبر كميه من الماء والحصول على محاليل ذات تركيز عال من البروتين فضلا عن الحصول على اكبر كميه من المثبط من خلال التخلص من اكبر كميه من البروتينات الاخرى في المستخلص الخام والحصول على درجة من النقاوة ، كما ان هذا التقليص في الحجم يسهل من عملية تداول البروتين المطلوب ويقلل الوقت المستغرق في خطوات التنقية اللاحقة . وعاده تستخدم لهذا الغرض الاملاح مثل كبريتات الامونيوم .

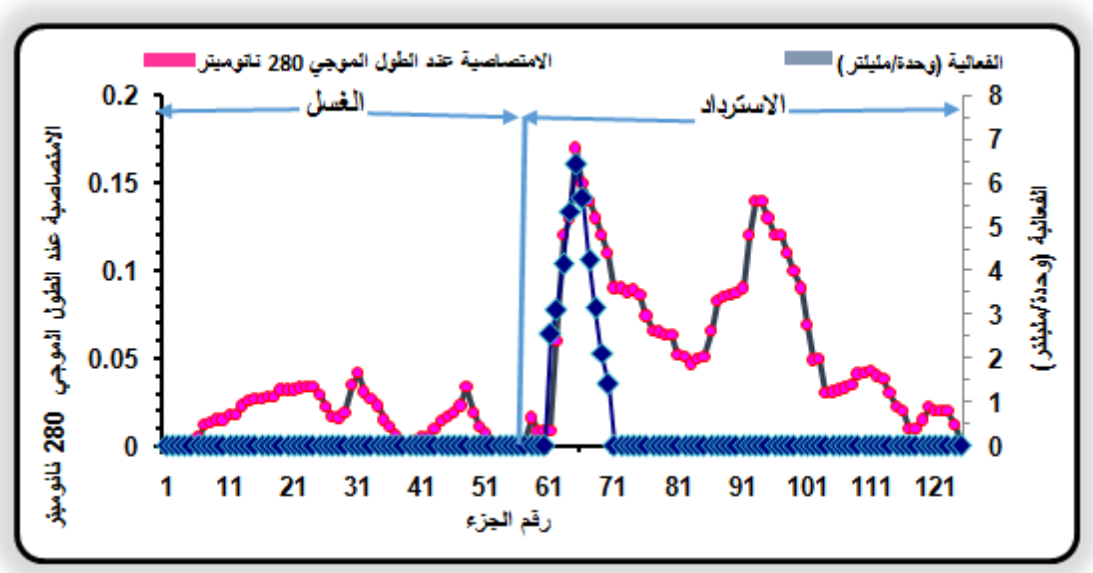
ويعود سبب استخدام كبريتات الامونيوم بشكل واسع في تركيز البروتينات الى ما تمتلكه من صفات ايجابيه مثل كثافتها الواطئة ، وذائبيتها العالية في الماء بحيث لا تتداخل مع معظم البروتينات عند ترسيبها ونبذها ، ورخص ثمنها كما انها لا تسبب مسخا لكثير من البروتينات عند ترسيبها . ان ميكانيكيه تركيز البروتينات بوساطة كبريتات الامونيوم تعتمد على طبيعة توزيع المجاميع الوظيفية (الايونية والقطبية والكارهة للماء) ، وكثافة توزيع الشحنات على سطح جزيئة البروتين فضلا عن تاثير حجم جزيئة البروتين وشكلها ووجود مركبات اخرى في الوسط حيث يعمل الملح على معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين والأخلال بطبقة الماء المحيطيه بجزيئة البروتين مما يؤدي الى انخفاض ذائبيته وترسيبه بتاثير مايعرف بالتملح الخارجي (Salting out) (Bonner 2007) . استخدمت كبريتات الامونيوم في تركيز مثبطات الاميليز من مستخلصات الحبوب بوصفها خطوة اولى في عملية التنقية في العديد من الدراسات ، وقد تتفق هذه النتيجة مع بعض الدراسات في هذا المجال ، فقد استخدم Gerage وآخرون (2003) نسبة اشباع 60 % لتركيز مثبطات الاميليز المستخلصة من الذرة الصفراء ، واستخدمت كبريتات الامونيوم في تركيز المثبطات من مستخلصات الذرة الصفراء بنسبة اشباع 50%(Blanco وآخرون ،1981) . تلت خطوة الترسيب اعادة الاذابة في محلول 0.2 مولار دارئ الخلات ورقم هيدروجيني 6 ثم ديلزة المحلول للتخلص من املاح الكبريتات اعقبها التركيز باستعمال السكر وكما يلاحظ من (الجدول -1) إن عدد مرات التنقية بلغت 2.57 مره مع حصيلة 50.36% .



(الشكل -1) : مقارنة الفعالية التثبيطية والنوعية لمثبطات الالفا–اميليز في مستخلص الذرة الصفراء صنف May 70 بعد تركيزه بنسب اشباع مختلفة من كبريتات الامونيوم

كروماتوكرافيا التبادل الايوني :

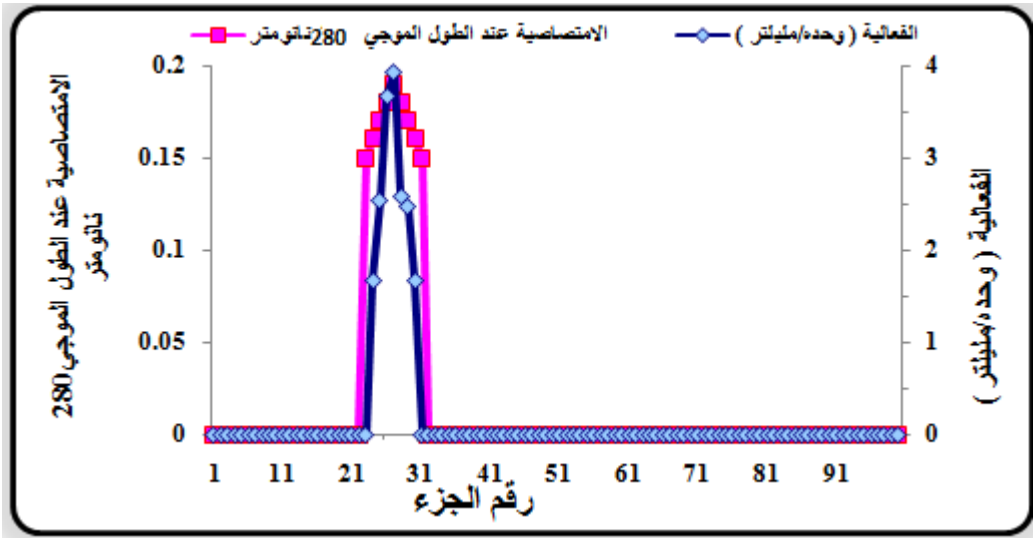
مرر المستخلص الحاوي على المثبط بعد الديلزة خلال عمود المبادل الايوني DEAE-cellulose الذي سبق موازنته بمحلول دارئ الترس بتركيز 0.005 مولار ورقم هيدروجيني 8 ، وتم قياس الامتصاصية لاجزاء الغسل على طول موجي 280 نانومتر فلوحظ انفصال 3 قمم بروتينيه في هذه المرحلة تعود للبروتينات غير المرتبطة والتي تحمل شحنة مشابهة لشحنة المبادل (البروتينات الموجبة) كما يظهر في (الشكل-2) بعدها تم استرداد البروتينات المرتبطة والتي تحمل شحنة مخالفة لشحنة المبادل (البروتينات السالبة) باستخدام تدرج ملحي خطي من كلوريد الصوديوم (0-1) مولار ، حيث لوحظ ظهور عدة قمم مختلفة الاحجام في مرحلة الاسترداد . يمكن لهذا المبادل استبدال كمية كبيرة من البروتينات المرتبطة واستردادها بوساطة ايونات الكلوريد السالبة ، وعند تقدير الفعالية لجميع قمم مرحلتي الغسل والاسترداد ، تبين ان قمم مرحلة الغسل خالية من الفعالية في تثبيط اميليز الفطر *A.niger* مع قمة للفعالية في مرحلة الاسترداد ، وقد تركزت القمة في الاجزاء المنفصلة 61 –70، وهذا يعني ان المثبط يحمل شحنه سالبة تحت الظروف المستخدمة في التجربة ما ساعده على الارتباط بمادة العمود . بعدها جمعت هذه الاجزاء الفعالة وركزت وقدرت فعاليتها التثبيطية ، فقد بلغت عدد مرات التنقية لهذه الخطوة5.1 وبحصيلة مقدرها 35.66% (جدول –1) . ثم استعملت هذه الاجزاء الفعالة في استكمال المراحل اللاحقة من التنقية . تعد كروماتوكرافيا التبادل الايوني من الطرائق الشائعة الاستعمال في عمليات التنقية ; لما تمتلكه من قوة فصل عالية وسعة عالية لربط البروتينات ، كما يمكن بسهولة فصل البروتينات المرتبطة واسترداد البروتين الفعال ، فضلا عن تعدد استعمالاتها وسهولة انجازها . اذ ان مبدأ الفصل في هذه الطريقة دقيق ومباشر ، حيث تتم عملية التداخل بين البروتين والمبادل الايوني بالاعتماد على صافي الشحنة والقوة الايونية ، وتوزيع الشحنة على سطح البروتين ، وكذلك على الرقم الهيدروجيني . وقد استخدمت المبادلات الايونية الطبيعية التي هي عبارة عن مشتقات السليلوز بسبب ملاءمتها لفصل البروتينات فضلا عن الاحتمالات القليله لمسخ البروتين حيث يحتفظ البروتين بعد استرداده من المبادل بفعاليته (Bonner2007) . استعملت المبادلات الايونية المختلفة كخطوة تنقية رئيسية وبصوره واسعة في تنقية مثبطات الاميليز من المصادر الحبوبيه المختلفة ، وقد اشار Wilsonواَخرون (2000) الى استعمال كروماتوكرافيا التبادل الايوني كخطوة اولى في مراحل تنقية مثبطات الاميليز من الذرة الصفراء . كما استخدم (Mcewan واَخرون ،2010) كروماتوكرافيا التبادل الايوني في تنقية مثبطات الاميليز من البقوليات كما تمكن Edson واَخرون (2003) من تنقية المثبط المستخلص من الذرة الصفراء .



(الشكل-2) : كروماتوكرافيا التبادل الايوني لتنقية مثبطات الالفا–اميليز من الذرة الصفراء صنف May 70 باستعمال العمود الايوني (DEAE –Cellulose) بابعاد (3×15) سم الموازن بمحلول 0.005 مولار دارئ الترس Tris-Hcl برقم هيدروجيني 8 ، وتم الاسترداد بمحلول كلوريد الصوديوم NaCl بتدرج ملحي (0 – 1.0) مولار وبسرعة جريان 30 مليلتر/ ساعة وبواقع 3 مليلتر/ جزء .

كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي :

اعقبت خطوة التبادل الايوني خطوة الترشيح الهلامي باستعمال هلام السيفادكس G-100 فهو يمتاز بالفصل الجيد والسريع فضلا عن سهولة الاستخدام والتحضير (Ahmed 2005) . مررت قمة المثبط التي تم الحصول عليها من مرحلة التبادل الايوني التي سبقت هذه الخطوة وبعد تركيزها خلال عمود هلام السيفادكس . عند تمرير القمة لوحظ انفصال قمة بروتينية تركزت فيها الفعالية في الاجزاء (24 - 30) (شكل-3) مع الحصول على عدد مرات تنقية بلغت 8.25 وحصيلة مقدارها 28.62%حيث اعطى الجزء 27 اعلى امتصاصية عند 280 نانوميتر . هنالك العديد من الطرائق المستعملة في تنقية انواع مثبطات الالفا–اميليز من النباتات المختلفة ويعود ذلك الى التنوع الواسع للمثبطات الموجودة في النباتات المختلفة وحتى في النبات الواحد ، لذا تعتمد هذه الطرائق على نوع المثبط المراد تنقيته وكذلك درجة التجانس المطلوبة اعتمادا على اختلاف طبيعة الدراسة المقامة . تشير العديد من البحوث العلمية الى استخدام طريقة الترشيح الهلامي كاحدى خطوات التنقية لمثبطات الاميليز بعد خطوة التبادل الايوني ؛ لغرض التأكيد من زيادة النقاوة . فقد استخدم Abe وآخرون (1993) خطوة الترشيح الهلامي في تنقية المثبط من الشعير ، وان اهم دراسة عززت نتائج الدراسة الحالية قام بها(Gerage وآخرون، 2003) حول مثبطات الاميليز المستخلصة من الذرة الصفراء ، كما اشار Kokiladevi وآخرون (2005) الى استخدام خطوة الترشيح الهلامي في تنقية المثبط من البقوليات . تختلف عدد مرات التنقية والحصيلة للمثبطات المنقاة ، ويعود ذلك الى اختلاف نوع المثبط المنقى والمصدر النباتي المعتمد وكذلك اختلاف الخطوات المستعملة عند التنقية في عددها ونوعها ومصدر الاميليز الذي يستعمل في تقدير الفعالية .



(الشكل-3) : كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي لمثبط الالفا–اميليز المستخلص من الذرة الصفراء صنف May 70 باستخدام عمود السيفادكسG-100 بابعاد (2×45) سم والذي تمت موازنته بمحلول 0.1 مولار دارئ الترس Tris-Hcl برقم هيدروجيني 7 وبسرعة جريان 15 مليلتر / ساعة وبواقع 3 مليلتر / جزء .

(جدول–1) : خطوات تنقية مثبطات الالفا–اميليز المستخلصة من الذرة الصفراء صنف May 70

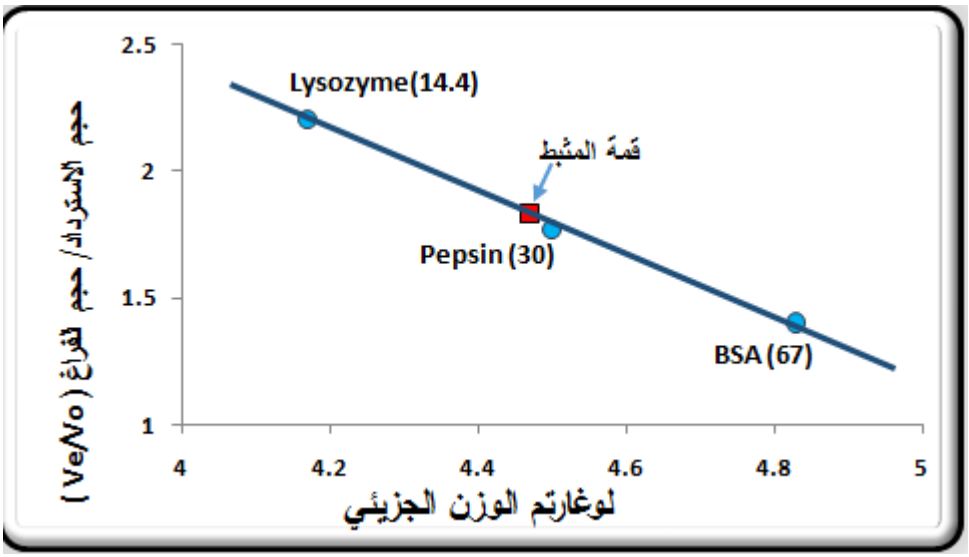
خطوة التنقية	الحجم مليلتر	الفعالية (وحده/مليلتر)	تركيز البروتين (ملغم/مليلتر)	الفعالية النوعية (وحده/ملغم)	الفعالية الكلية(وحده)	عدد مرات التنقية	الحصيلة %
المستخلص الخام	100	6.19	1.67	9.66	274.60	1.00	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم 60%	10	10.62	1.02	12.45	123.10	1.06	70.42
الديلزة	12	16.73	1.95	19.69	99.13	2.57	50.36
التبادل الايوني بعمود DEAE Cellulose بعد التركيز	8	7.91	1.19	26.43	73.99	5.1	35.66
الترشيح الهلامي باستعمال الهلام Sephadex G-100	50	3.92	1.33	35.77	62.85	8.25	28.62

توصيف مثبطات الألفا–أميليزالمنقاة جزئيا:

تعيين الوزن الجزيئي للمثبطات باستخدام الترشيح الهلامي :

استخدمت طريقة الترشيح الهلامي على عمود السيفادكسG-100 في تقدير الوزن الجزيئي لمثبطات الأميليز المنقاة من حبوب الذرة الصفراء صنف May 70 قيد الدراسة وقد أظهرت النتائج المبينة في (الشكل–4) أن الوزن الجزيئي للمثبط المنقى يقارب 29500 كيلودالتون ، أن نتائج هذه الدراسة قريبة لما ذكره Blanco وآخرون (1981) من أن الوزن الجزيئي للمثبط

المعزول من الذرة الصفراء مساوياً لـ 29600 كيلودالتون عند تقديره بطريقة الترشيح الهلامي ، في حين ذكر Edson وآخرون (2003) أن الوزن الجزيئي لمثبط الأميليز المستخلص من الذرة الصفراء هو 19.7 كيلودالتون عند استعمال الترشيح الهلامي ، كما أشار Chen وآخرون (1999) الى أن الوزن الجزيئي للمثبطTI المعزول من الذرة الصفراء الفعال تجاه *Aspergillus niger* هو 14 كيلودالتون . وقد اشارت الدراسات السابقة التي صنفت مثبطات الاميليز الى ان مثبطات الاميليز الموجودة في الذرة الصفراء تتكون من سلسلة بروتينية تتكون من 173 – 235 ثمالة حامض اميني (Franco وآخرون، 2000) .



(الشكل–4) : تعيين الوزن الجزيئي لمثبطات الألفا–أميليزالمنقاة من الذرة الصفراء صنف May 70 بطريقة الترشيح الهلامي باستخدام عمود السيفادكس (Sephadex-G-100)

تأثير وقت الحضن في فعالية مثبطات الألفا–أميليز:

أن كفاءة التثبيط بوساطة مثبطات الالفا–اميليز المستخلصة من الذرة الصفراء تعتمد على ظروف الحضن للمثبط مع الانزيم التي تشتمل على وقت الحضن ، والرقم الهيدروجيني ، إضافة الى درجة الحرارة ، وإن تتابع اضافة الانزيم والمادة الخاضعة تمثل خطوة حرجة في الحصول على الحد الاعلى من التثبيط ، فالمثبط يجب أن يرتبط أولا مع الأنزيم لتكوين معقد المثبط – الانزيم قبل إضافة المادة الخاضعة ، لان إضافة المثبط الى المادة الخاضعة مباشرة وقبل إضافة الانزيم يؤدي الى خفض كفاءة التثبيط ؛ بسبب تكوين معقد بين المثبط والمادة الخاضعة (McGeeney و O'Conner، 1981) كما قد تعود الحاجة الى الحضن المسبق للمثبط مع الأميليز الى طبيعة تفاعلات التثبيط التي هي من النوع العكسي والتي تكون سرعتها اقل من سرعة تحلل النشا بوساطة الاميليز ، لذا اردنا في هذه الدراسة تقدير الوقت اللازم لحضن قمة المثبط المنقى من صنف الذرة الصفراء للوصول الى أعلى فعالية تثبيط ، لأنه وكما ورد في العديد من البحوث العلميه أن المثبطات المختلفة تتباين في الوقت المطلوب لحضنها تبعا لمصدرها ونوعها وكذلك مصدر ونوع الاميليز الذي يتم تثبيطه . عليه حضن المثبط المنقى مع أميليز الفطر *A.niger* لاوقات مختلفة تراوحت بين (0 – 50) دقيقه في درجة حرارة 37°م وكما يظهر من (الشكل–5) عدم حدوث أي تثبيط عند الوقت 0 دقيقة . كما يلاحظ من الشكل أيضا أن كفاءة التثبيط تزداد بزيادة وقت الحضن وتكون الزيادة سريعة ومتدرجة خلال الـ 30 دقيقة الأولى من الحضن مع ملاحظة انخفاض نسبة التثبيط مع استمرار وقت الحضن والذي يتضح من فعالية المثبط عند الوقت 40 و 50 دقيقة . لذا عُدَّ الوقت 30 دقيقه مهما لحضن المثبط المنقى مع مصدر الاميليز المعتمد في هذه الدراسة للحصول على اعلى نسبة تثبيط تحت الظروف المستخدمة في هذه الدراسة .

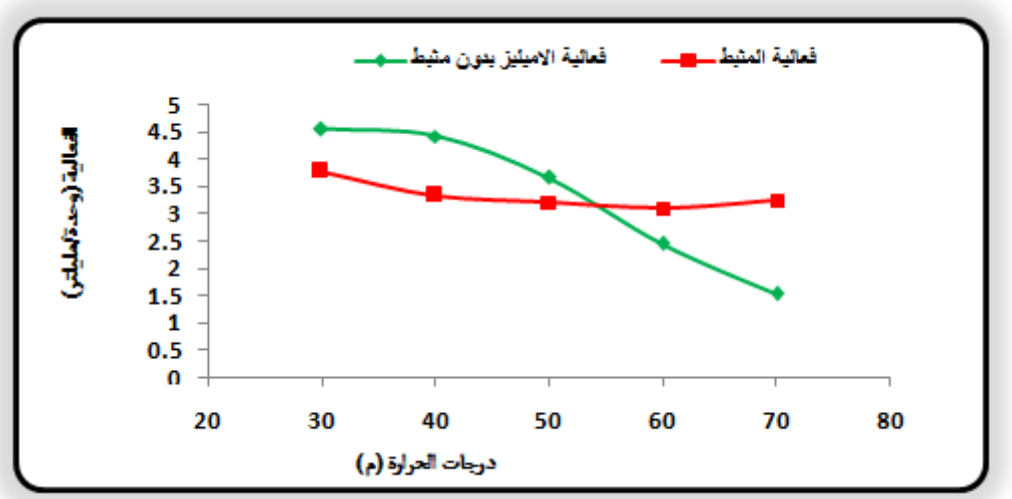
(الشكل–5) : تأثير وقت الحضن لاميليز الفطر *A.niger* مع مثبطات الألفا–أميليزالمنقاة من صنف الذرة الصفراء May 70 في درجة حرارة 37°م

إن ما تم التوصل اليه في هذه الدراسة يتطابق مع ما ذكر في العديد من الدراسات السابقة ، فقد أشار Rebecca وآخرون (2001) الى مدة حضن مقدارها 30 دقيقة للمثبط المعزول من الذرة الصفراء والفعال تجاه *Aspergills niger* ، كما إستعمل Figueira وآخرون (2003a) مدة حضن مقدارها 30 دقيقة للمثبط المستخلص من الذرة الصفراء مع أميليز *Fusarium verticillioides* ، في حين أشار Ida و Kondo (1995) الى مدة حضن مقدارها 20 دقيقة للمثبط المنقى من أحد اصناف الحنطة مع اميليز لعاب الانسان . يتضح من ذلك أن مدة الحضن تختلف باختلاف نوع المثبط ومصدره .

تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية مثبطات الألفا–أميليز :

لغرض تحديد درجة الحرارة المثلى لفعالية مثبطات الاميليزالمنقاة من الذرة الصفراء صنف May- 70 في تثبيط أميليز الفطر *A.niger* حضنت هذه المثبطات مع الأميليز الخام في درجات حرارة تراوحت بين (30 – 70)°م لمدة 30 دقيقة ، وكما يلاحظ من (الشكل– 6) . إن درجة الحرارة المثلى لفعالية المثبط هي 30°م يلاحظ أيضا من الشكل ذاته حصول زيادة واضحة في فعالية التثبيط بارتفاع درجة الحرارة الى أن وصلت درجة 70. ويمكن تفسير ذلك الى تأثير درجات الحرارة العالية على الاميليز والتسبب في دنترته فيظهر المثبط كانما أعطى زيادة في نسبة التثبيط ، فقد يعود تأثير التثبيط الإضافي للحرارة المستعملة وليس لتأثير المثبط . فقد ورد في العديد من البحوث العلمية أن المثبطات المختلفة تتباين في درجات الحرارة المطلوبة تبعاً لمصدرها ونوعها وكذلك مصدر ونوع الاميليز الذي يتم تثبيطه ، فقد أشار Edson وآخرون (2003) الى زيادة مقدارها 47.6% في فعالية المثبط المنقى من الذرة الصفراء عند حضنه بمدى من درجات الحرارة تراوح بين 0– 94°م مع أميليز الفطر *Fusarium verticillioides* ولمدة 60 دقيقة ، كما اوضح كل من Lauda و Marshall (1975) أن لدرجة الحرارة تأثير على فعالية إرتباط المثبط المنقى من الفاصوليا مع أميليز بنكرياس الخنزير حيث اعتمدا حضن الاثنين بدرجتين حرارتين اشتملت على 25°م و37°م نتج عنه زيادة في الفعالية التثبيطية بلغت 3% و 56% على التوالي دليلا لزيادة الفعالية بزيادة درجة حرارة الحضن . لقد عُدت مثبطات الاميليز عند اكتشافها من المكونات اللاتغذوية بالنسبة للانسان لذا درست الصفات الكيموحيوية للعديد منها ومن مصادرها المختلفة في العديد من المختبرات العلمية منذ 1945 ووجد ان معظم هذه المثبطات تحتفظ بفعاليتها عند المعاملة بالحرارة بسبب بنائها التركيبي (Chrispeels 2005) . يلاحظ ايضا من الشكل ذاته من متابعة فعالية الاميليز الخام نجد ان درجة الحرارة المثلى لفعاليته تراوحت بين (30 – 40)°م وكانت اقصاها بدرجة 30°م عندها تبدأ الفعالية بالانخفاض الى ان تصل درجة الحرارة الى 70°م بعدها يفقد الانزيم فعاليته ويمكن تفسير ذلك الى تأثير درجات الحرارة العالية على الانزيم والتسبب في دنترته فيؤدي الى انخفاض فعالية الانزيم بسبب تأثيرها في مسخ الانزيم نتيجة التأثير على تركيب الانزيم وتغير في المواقع الحفزية مما يؤدي الى فقدان فعاليته ، هذه النتيجة تتفق مع ماذكره كل من Varalakshmi وآخرون (2009) و Monga وآخرون

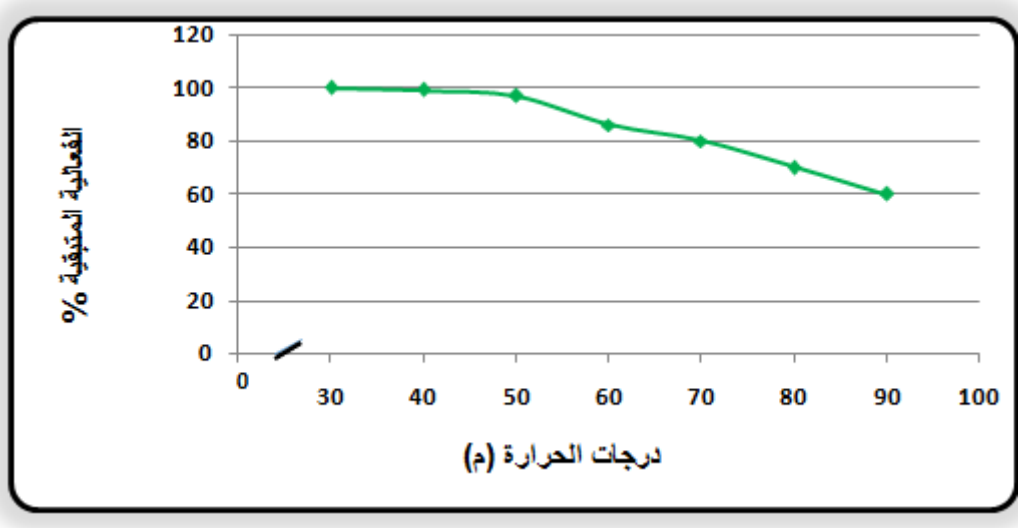
(2011) التي اثبت فيها دنترة اميليز *A.niger* كلما ارتفعت درجات الحرارة . كما ذكر في دراسات أخرى كالدراسة التي قام بها Alva وآخرون (2007) ان اميليز *A.niger* تبدأ فعاليته بالانخفاض عند درجة حرارة 40°م الى ان تصل درجة الحرارة الى 70°م .



(الشكل–6): تأثير درجة الحرارة في فعالية مثبطات الالفا–اميليزالمنقاة من الذرة الصفراء صنف May 70عند حضنها مع اميليز الفطر *A.niger* لمدة 30 دقيقة .

الثبات الحراري لمثبطات الالفا–اميليز:

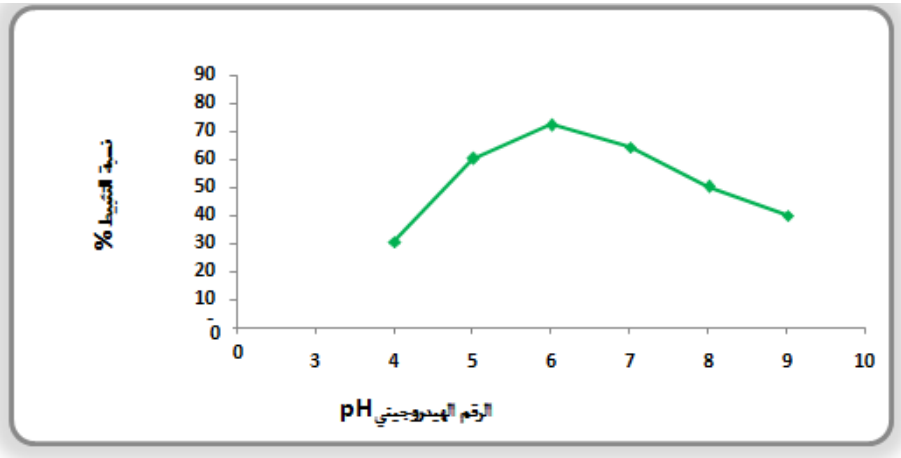
يلاحظ من النتائج المبينة في (الشكل–7) ان حضن المثبط المنقى من الذرة الصفراء May 70 بدرجات حرارة تراوحت بين (30 – 90)°م لمدة 30 دقيقة اوضح احتفاظ المثبط المنقى بفعاليته عند درجة الحرارة (30–50)°م ، تلاها حدوث انخفاض تدريجي في الفعالية مع ارتفاع درجة الحرارة الى ان وصلت درجة الحرارة 90°م . كما يلاحظ من الشكل المذكور ان المثبط احتفظ بـ 80% من الفعالية بدرجة 70°م ، بعدها انخفضت حتى وصلت بدرجة 90°م الى 60% تقريبا . قد تتفق النتائج التي توصلت اليها هذه الدراسة مع بعض ما ورد في الدراسات الاخرى والتي اشارت الى ان بعض هذه المثبطات تتمتع بثباتية عالية عند المعاملة بالحرارة (Chrispeels 2005) ، فقد احتفظ المثبط المنقى من الذرة الصفراء بكامل فعاليته بعد حضنه على درجة 100°م لمدة 30 دقيقة ، وبحوالي 52 % من فعاليته بعد معاملته بدرجة 94°م لمدة 60 دقيقة (Figueira وآخرون، 2003a b) ، كما ذكر Burgos- Hernandez وآخرون،(1999)عند معاملة المثبط المنقى من الشيلم حراريا بدرجة 70°م لمدة 15 دقيقة جعلته يحتفظ بـ 30 % من فعاليته . تعد مثبطات الاميليز من المركبات الثابتة تجاه التغيرات في درجات الحرارة ، وقد ذكر العديد من الباحثين وجود مثبطات ذات ثبات حراري عال في الذرة الصفراء (Furusov و Islamov، 2007) ويرجع سبب تحمل المثبط الى الدرجات الحرارة العالية الى وجود الاواصر الكبريتية المكونة لتركيبه حيث تحوي معظم افراد عائلة المثبطات الموجودة في الحبوب على خمس اواصر ثنائية الكبريت ، في حين تحتوي المثبطات الموجودة في الذرة الصفراء على 5 – 8 أواصر ثنائية الكبريت (Franco وآخرون،2000) ، مما يسهم في ثبات التركيب الثلاثي ، حيث تحتاج الاواصر S – S bond الى طاقة اعلى من بقية الاواصر لغرض كسرها وتحطيم التركيب الثلاثي (دنترة البروتين) لذا فان انخفاض الثبات الحراري لبعضها قد يعزى الى احتوائها على عدد اقل من هذه الاواصر التي تسهم في اضافة الثباتية على هذه المثبطات (Simonato وآخرون، 2001) .



(الشكل –7) : الثبات الحراري لمثبطات الالفا–اميليزالمنقاة من الذرة الصفراء صنف May 70 بعد حضنه بدرجات حرارية تراوحت بين (30- 90)°م لمدة 30 دقيقة

الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية مثبطات الاميليز:

درس تأثير ارقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين (4–9) في فعالية التثبيط للمثبط المنقى من الذرة الصفراء صنف May 70 لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لارتباط هذه المثبطات مع اميليز الفطر *A.niger* عند حضنهما معا عند درجة حرارة 30°م ولمدة 30 دقيقه . وتظهر النتائج المبينة في (الشكل–8) وجود تأثير للرقم الهيدروجيني على قابلية تداخل المثبط مع اميليز الفطر *A.niger* ، ويلاحظ من الشكل المذكور ان الرقم الامثل لارتباط المثبط مع اميليز الفطر هو بحدود 6 ، حيث يكون الارتباط بينهما قويا في هذا الرقم ، كما لوحظ انخفاض بسيط وتدريجي في الفعالية مع ارتفاع الرقم الهيدروجيني ، ايضا نلاحظ من الشكل ذاته صورة التأثير تكون اكثر انحدارا في الارقام الهيدروجينية الحامضية لان الاميليز هو نفسه يتثبط في هذه الاوساط وهذا ما اشاراليه Edson وآخرون (2003) حيث لاحظ عدم امكانية تقدير فعالية الارتباط للمثبط المنقى من الذرة الصفراء مع اميليز الفطر *Fusarium verticillioides* عند الارقام الهيدروجينية الحامضية ويعود ذلك الى الدنترة التي تسببها هذه الارقام للاميليز .

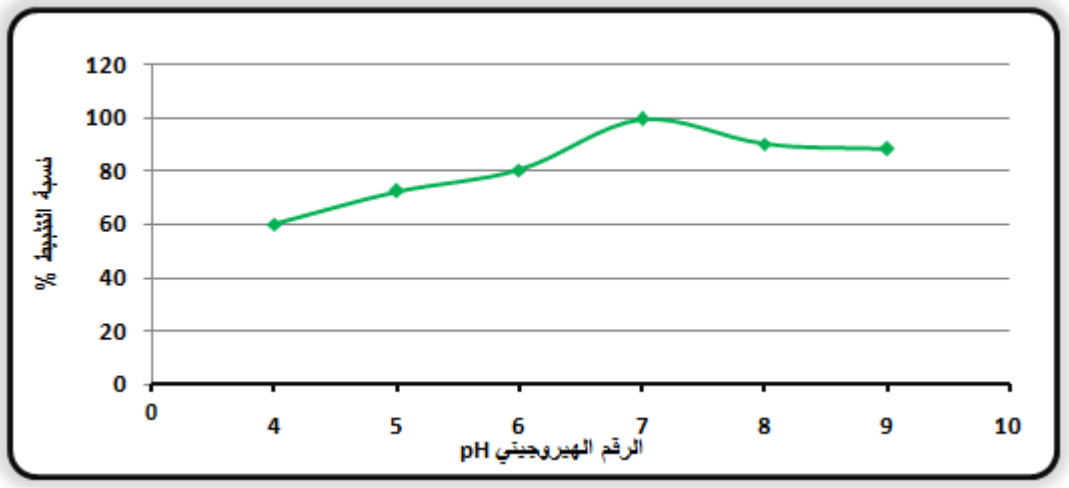


(الشكل - 8) : تأثير الرقم الهيدروجيني في تداخل مثبط الاميليز المنقى من الذرة الصفراء صنف May 70 مع اميليز الفطر *A.niger* عند الحضن بدرجة حرارة 30°م لمدة 30 دقيقة

يعتمد المعقد المتكون بين المثبط والانزيم بدرجة كبيرة على الرقم الهيدروجيني (Chrispeels،2005) ، كما وتعتمد كفاءة ارتباط المثبط مع الاميليز عند اي رقم هيدروجيني بالاساس على نوع كل من المثبط والانزيم ومدى الالفة بينهما (De ponte وآخرون ، 1976). وتقع حدود الرقم الامثل لفعالية المثبطات قيد الدراسة ضمن مدى الارقام الهيدروجينية لعدد من الدراسات ، وهذا يتفق مع ما أورده Edson وآخرون (2003) الذي ذكر ان المثبط المعزول من الذرة الصفراء يحتاج الى رقم هيدروجيني بحدود 6 عند حضنه مع اميليز الفطر *Fusarium verticillioides* لاعطاء اعلى فعالية تثبيطية مقدارها 70% ، كما وردت دراسات اخرى اشير فيها الى اختلاف الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية المثبط نوعا ما تبعا لمصدره ونوعه ، فقد يكون الرقم الامثل لفعالية المثبط المعزول من الشعيرفي تثبيط الاميليزات الداخلية للشعير والشيلم هو بحدود الارقام القاعدية وفي الارقام اعلى من 8 (1983 bWeselakeوآخرون ؛ Torronenوآخرون،1992) . كما اشار Blanco وآخرون (2007) الى ان اعلى نسبة تثبيط كانت عند رقم هيدروجيني 6.8 بدرجة حرارة 80°م وبوقت 10 دقائق من المثبط المستخلص من الذرة الصفراء تجاه اميليز *Sitophilus zeamias* وهو اعلى كنسبة تثبيط مقارنة بالمثبط المعزول من الذرة الصفراء والذي كان عند رقم هيدروجيني بحدود 7 لتثبيط الانزيم نفسه .

الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات مثبطات الألفا–أميليز:

اظهرت مثبطات الاميليزالمنقاة من الذرة الصفراء صنف May 70 ثباتية متدرجة عند جميع الارقام المستعملة في هذه الدراسة والتي تراوحت بين (4 – 9) كما يوضحه (الشكل-9) واحتفظ المثبط بكامل فعاليته في الرقم الهيدروجيني 7 .



(الشكل-9) : تأثير ارقام هيدروجينية مختلفة (4 -9) في ثبات مثبطات الالفا–اميليز المنقاة من الذرة الصفراء صنف May 70

وكما يلاحظ من الشكل ان المثبط المنقى يكون اكثر ثباتا في الارقام القاعدية منها في الاوساط الحامضية ويعود ذلك الى بنائها التركيبي . تناولت العديد من الدراسات مثبطات الالفا–اميليز من المصادر النباتية المختلفة واجمعت هذه الدراسات على ان مثبطات الاميليز هي مركبات تتصف بالثباتية تجاه التغيرات في الارقام الهيدروجينية والعوامل المحلله ، وتعتبر هذه الصفة ذات اهمية تقنية وغذائية . وبمقارنة النتائج التي تم التوصل اليها يلاحظ انها تتفق مع ما ورد في هذه الدراسات ، حيث اثبتت دراسة تاثير الرقم الهيدروجيني ثباتية المثبط المستخلص من الذرة الصفراء بعد حضنه في مدى من الارقام الهيدروجينية تراوحت بين 4-9 لمدة 16 ساعة وبدرجة 4°م (Edson وآخرون, 2003) . كما اشارت دراسات اخرى مع وجود بعض الاختلافات في مدى ارقام الثبات للمثبطات المختلفة ، حيث اثبت المثبط المستخلص من دخن الـ proso بعد حضنه في مدى من الارقام الهيدروجينية تراوحت بين 1-12 لمدة 18ساعة بدرجة 4°م ، ان الارقام الهيدروجينية الحامضية هي الافضل في المحافظة على ثباتيته مع

حصول انخفاض تدريجي في الفعالية عند حضنه في الارقام القاعدية (Pattabiraman و Nagaraj،1985) ، في حين ان حضن المثبط (I-1) المنقى من دخن الـ Ragi بمدى من الارقام الهيدروجينية تراوحت بين 1-10 لمدة 16 ساعة ودرجة 4°م ، لم يسبب فقدان كبير في الفعالية ووجد انه يمتاز بثباتية عالية في هذا المدى من الارقام الهيدروجينية ولكن لوحظ فقدان 30% من الفعالية في الرقم الهيدروجيني(Pattabiraman 12.6 و ,Shivaraj1981) .

المصادر :

الساهوكي، مدحت مجيد (1990) . الذرة الصفراء إنتاجها وتحسينها. مطابع التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة بغداد (مترجم) .

منصور، تيسير منصور، ومحمد زاهر عرفة (2011). الوصف النباتي والمتطلبات البيئية لزراعة الذرة الصفراء . دليل زراعة محصول الذرة الصفراء. العدد (15): ص21–56.

يوسف، ضياء بطرس، وموفق سعيد نعوم، وعباس خضير عباس، ولمياء إسماعيل محمد (2006) . إنتاج وتقييم بعض الهجن الزوجية الفردية المدخلة من الذرة الصفراء . مجلة دراسات ، العلوم الزراعية . 33 (2): 59–70

Abe , J. I. ; Sidenius , U. ; and Svensson , B. (1993) . Arginine is essential for the alpha-amylase inhibitory activity of the alpha- amylase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds.Biochem J., 239 (1) : 151-155.

Ahmed , H. (2005) . Principles and **reactions** of protein extraction , purification and characterization .CRC PRESS **,**Boca Raton London New York Washington, D.C.

Alva, S.J . ; Anupama, J. ;Savla, Y.Y. ; Chiu, P. ; Vyshali, M. ; Shruti, B. S. ; and Bhavya, J. (2007) . Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus sp*. JGI 12 in solid state culture . Afr. J. Biotechnol. , 6 (5) : 576-581

Blanco-Labra , A. and Iturbe-Chiñas , F. A. (1981) . Purification and characterization of an α-amylase inhibitor from **maize** (*Zea mays*). J. Food Biochem. , 5 (1) : 1-17 .

Bonner , P. L. R. (2007). Protein purification .The Basic. Nottingham Trent University Published by : Taylor & Francis Group.

Bradford , M. (1977) . A rapid and sensitive method for the quantitation of macroorganisms quantities of protein using the principles of protein dye binding . Anal . Biochem., Vol. (72) : 248-254.

Burgos- Hernández , A. ; Rosas- **Burgos , C. ; Ramírez ,Wong , B. ; Carbonell- Barrachina , A.A. and Cinco- Moroyoqui , F. J. (1999) .** Identification of α-amylase inhibitors in triticale grain . J. Sci. Food Agric., 79 : 1671-1675.

Chen, Z.Y. ; Brown, R. L. ; Russin, J.S. ; Lax, A.R. and Cleveland, TE .(1999) . A corn Trypsin inhibitor with Antifungal Activity inhibits *Aspergillus flavus*alpha-Amylase. Phytopathology , 89 : 10-902.

Chrispeels ,M. J.(2005) . Genetic engineering of a grain legume with amylase inhibitors for bruchid resistance. Seed Science Research, 8 : 257-263.

De Ponte , R. ; Parlamenti , R. ; Petrucci , T. ; Silano , V. and Tomasi , M. (1976) . Albumin α- amylase inhibitor families from Wheat flour . Cereal Chem. , 53 : 805-820 .

Edson, Z. ; White, D. G. and payne, G. A. (2003) . Corn seed proteins inhibitory to *Fusarium verticillioides* and aflatoxin **biosynthesis**. Phytopathology, 87: 622-627 .

Fontanini , D. ; Capocchi , A. ; Muccilli , V. ; Saviozzi , F. ; Cunsolo , V. ; Saletti , R. ; Foti , S. and Galleschi , L. (2007) . Dimeric inhibitors of human salivary alpha-amylase from emmer (*Triticum dicoccon* Schrank) seeds .J. Agric. Food Chem. , Des 12 ; 55 (25) : 10452-60 .

Franco , O. L. ; Rigden , D. J. ; Melo , F. R. ; Bloch C. Jr. ; Silva , C. P. and Grossi- de- Sá , M. F. (2000) . Activity of wheat **alpha**- amylase inhibitors towards bruchid alpha- amylases and structural explanation of observed specificities . Eur. J. Biochem. , 267 (8) : 2166-73 .

Franco , O. L. ; Francislete , R. M. ; Paulo , A. M. ; Paes , N. S.; Yokoyama , M. ; Coutinho, M. V. ; Bloch , C. Jr. and **Grossi-de – Sá , M. F. (2005) .** Characterization of two

Acanthoscelidesobtectus alpha-amylases and their inactivation by wheat inhibitors . Comp. Biochem. Physiol. ,Biochem Mol. Biol. , 140 : 313-9 .

Friedman, M. (1987) . Nutritional and toxicological significance of enzyme inhibitors in foods , Advances in Experimental Medicine and Biology , Plenum Press New York . pp 199-483 .

Figueira, E. L. Z. ;Blanco-Labra, A. ;Gerage, A. C. ;Ono, E. Y. S. ;Mendiola-Olaya, E. ;Ueno, Y. and Hirooka, E. Y. (2003a). New amylase inhibitor present in corn seeds active in vitro against amylase from *Fusarium verticillioides*. Plant Dis. 87:233-240.

Figueira, E.L.Z. A. ; Blanco-Labra, A.C. ;Gerage, E.Y.S. ;Ono, E. ;Mendiola-Olaya, Y. ;Ueno & E.Y. ;Hirooka. (2003b). Amylase inhibitor present in corn seeds active in vitro against amylase from *Fusarium verticillioides*. Plant Dis. 87: 233-240.

Gerage, A .C. ; Ono EYS. And Mendiola-Olaya E. (2003) . New amylase inhibitor present in corn seeds active in vitro against amylase from *A. niger*. Plant Dis. **,**87:233-240 .

Heidari, R. ; Zareae , S. and Heidarizadeh , M. (2005) . Extraction , purification , and inhibitory effect of alpha- amylase inhibitor from Wheat (*Triticum aestivum* Var. Zarrin) . Pakistan Journal of Nutrition , 4 (2) : 101-105 .

Islamov, R. A. and Furusov , O. V. (2007) . Bifunctional inhibitor of alpha-amylase/trypsin from wheat grain .Prikl Biokhim Mikrobiol. , 43 (4) : 419-23 .

Kokiladevi, E. ;Manickam, A. and Thayumanavan, B. (1972) . Characterization of Alpha-amylase inhibitor in *Vignasublobata*. Bott. Bull. Acad. Sun. , 46: 186-189.

Kokiladevi , E. ; Manickam , A. and Thayumanavan , B. (2005) . Chara-cterization of alpha-amylase inhibitor in *Vignasublobata* . Bot. Bull. Acad. Sin. , 46 : 189-196 .

Kondo , N. K. and Ida, E. I. (1995) . Extraction , purification and some partial characterization of alpha - amylase inhibitors from wheat lapar 28- lgapó.Arch LatinoamNutr. , 45 (4) : 310-316.

Marshall , J. J. and Lauda , C. M. (1975) . Purification and properties of Phaseolamine , an inhibitor of α- amylase , from the kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) The Journal of Biological Chemistry , : 250 (20) : 8030-8037 .

McEwan, R. (2010). Anti-Nutritional content of *Colocasiaesculenta* (Amadumbe) a traditional crop food in Kwazulu-Natal, pp 59-74. PhDthesis, University of Zululand, Empangeni, South Africa .

Monga, M. ;Goyal, M. ;Kalra, K. L. and Soni, G. (2011) . Production and stabilization of amylase from *Aspergillus niger* Mycosphere . 2 (2) : 129-134 .

Nagaraj, R.H. and Pattabiraman , T. N. (1985) . Purification and properties of an α- amylase inhibitor specific for human pancreatic amylase from proso(*Panicium miliaceum*) seeds . J. Biosci., 7 (3& 4) : 257-2

O'Connor , C. M. and McGeeney K. F. (1981) . Isolation an characterization of four inhibitors from wheat flour which display differential inhibition specificities for human salivary and human pancreatic alpha-amylases. Biochim. Biophys. Acta. , 658 (2) : 387-396 .

Pelegrini , P. B. ; Lay , F. T. ; Murad , A. M. ; Anderson , M. A. and Franco , O. L. (2008) . Novel insights on the mechanism of action of alpha- amylase inhibitors from the plant defensin family.Proteins , 22 .

Rebecca ,L. ; Schimoler, O. ; Rourke, S. ; Michael Richardson , z. and Selitrennikoff, P. (2001) . Zeamatin inhibits Trypsin and α-amylase Activities, Appl. Environ. Microbiol. , 67 (5) : 2365-2366.

Sandstedt , R. M. and Beckord , O. C. (1946) . Photomicrographic studies of wheat starch . II. Amylolytic enzymes and the amylase inhibitor of the developing wheat kernel. Cereal Chem. , 23 : 548-558 .

Simonato , B. ; Pasini , G. Giannattasio , M. ; Peruffo , A. D. ; De Lazzari , F. and Curioni , A. (2001) . Food allergy to wheat products: the effect of bread baking and in vitro digestion on wheat allergenic proteins. A study with bread dough, crumb, and crust . J Agric Food Chem., 49 (11) : 5668-5673 .

Törrönen , A. ; Mattileisola and Haarasilta , S. (1992) . Inhibition of rye α- amylase activity by barley α-amylase inhibitor . Cereal Chem. , 69 (4) : 355-358 .

Varalakshmi, K.N. ;Kumudini, B. S. ;Nandini, B.N. ; Solomon, J. ; Suhas, R. and Mahesh, B. (2009) . Production and characterization of alpha-amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 isolated in Bangalore . Polish J Microbiol. , 58 (1) : 29-36 .

Weselake , R. J. ; McGregor , A. W. ; Hill , R. D. and Duckworth , H. W. (1983 b) . Purification and characteristics of an endogenous α- amylase inhibitor from Barely kernels . Plant Physiol. , 73 : 1008-1012.

Whitaker , J. R. and Bernard , R. A. (1972) . Experiment for introduction to Enzymology . The Wiber Press Davis .

Whitaker , J. R. (1972) . Principles of enzymology for the food science .Mercel Dekker. Inc. , New York , USA .

Wilson, S. ;Mahiou, B. ;Reiger, R. ;Tentler, S. ;Schimoler, R. ;Orndorff, S. ;Selitrennikoff, C P. and Pilot-scale (2000) . Purification of zeamatin, an antifungal protein from maize. Biotechnol Prog. ,16:38–43.

Yetter ,M. A. ; Saunders , R. M. and Boles , H. P. (1979) . α- Amylase inhibitors from wheat kernels as factors in resistance to postharvest insects . Cereal Chem. , 56 (4) : 243-244