

## عزل وتنقية بيتا كازين حليب الماعز المحلي ودراسة فعالية متحللاته في تثبيط الإنزيم المَحْوَل للأنجيوتنسين 1

كفاح سعيد عباس\*\*

عمر عادل عبود\*

\*وزارة العلوم والتكنولوجيا/ دائرة البحوث الزراعية - مركز التقنيات الغذائية والإحيائية  
\*\*وزارة التعليم العالي/ جامعة بغداد - كلية علوم الهندسة الزراعية، قسم علوم الأغذية  
بغداد - العراق

### الخلاصة

نُقي بروتين بيتا كازين من الكازين الحامضي لحليب الماعز المحلي بشكل أولي باستعمال تراكيز من محلول يوريا وتغيير الرقم الهيدروجيني pH ثم تنقية نهائية وبمرحلتين باستعمال المُبادِل الأيوني السالب DEAE-Cellulose 52 ثم الترشيح الهلامي باستعمال عمود Sephadex G-75 وتم التأكد من نقاوته بتقنية الترحيل الكهربائي بوجود المواد الماسخة SDS-PAGE وظَهَرَ بيتا كازين على شكل حُزْمَة واحدة وبوزن جزيئي 24.2 ك.د مُقَدَّرَة بطريقة قياس RF للبروتين. أُجريت عملية تحلل بيتا كازين النقي بإنزيمات التربسين وبكليهما معاً بنسبة 1:1 وظهرت عدة ببتيدات في المتحللات تختلف في قابليتها على تثبيط الإنزيم المَحْوَل للأنجيوتنسين 1 وكانت أعلى نسبة تثبيط لفعالية Angiotensin Converting Enzyme 1 (ACE<sub>1</sub>) من الببتيدات الناتجة بالتربسين والتربسين معاً وبالذات بعد مرور 8 ساعات من التحلل المُشار له بالرمز (M8H $\beta$ ) إذ كانت قيمة درجة التحلل Degree of Hydrolysis (DH) هي 54.443% وبنسبة تثبيط هي 67.310% مقارنة بقيمة DH 48.701 و 42.23% وبنسب تثبيط 64.84 و 65.665% لكل من المتحللات الناتجة بفعل التربسين والتربسين على التوالي.

الكلمات المُفتاحية: عزل، تنقية، بيتا كازين، متحللات، تثبيط والإنزيم المَحْوَل للأنجيوتنسين 1

## Separation and Purification of Local Goat Milk $\beta$ -Casein and Studying Effectiveness of Its Hydrolysates in Inhibition of Angiotensin-converting Enzyme 1 (ACE<sub>1</sub>)

\*Omar Adil Abbod

\*\*Kifah Saeed Abbas

\*Ministry of Sciences and Technology/Agricultural Researches Directorate-Food and Biological Technique Center

\*\*Ministry of High Education and scientific research /University of Baghdad - College of Agriculture, Department of Food Sciences  
Baghdad - Iraq

E\_mail: [omarabbodi@yahoo.com](mailto:omarabbodi@yahoo.com)

### Abstract

$\beta$ -Casein ( $\beta$ -CN) protein from the acid casein of local goat milk was purified primarily using concentrations of urea solution and pH change, then purified with negative ion exchanger DEAE-cellulose 52 and gel filtration using column SephadexG-75. Its purity was confirmed by electrophoresis with SDS-PAGE and the  $\beta$ -CN appeared in a single band with MW of 24.2 kDa estimated by the protein RF measurement method. The hydrolysis of pure  $\beta$ -CN with pepsin, trypsin, and both together at a 1:1 ratio several peptides appeared in the hydrolysates that differed in their ability to inhibit the angiotensin-converting enzyme 1 (ACE<sub>1</sub>) and had the highest inhibition of the peptides produced by pepsin and trypsin together, especially after 8 hours of hydrolysis which indicated with symbol ( $\beta$ M8H). Degree of Hydrolysis (DH) was 54.443 % with inhibition rate is 67.310% comparison of DH 48.701 and 42.23% with inhibition rates of 64.84 and 65.665% for both hydrolysates by pepsin and trypsin respectively .

**Keywords:** Separation, Purification,  $\beta$ -CN, Hydrolysates, Inhibition and Angiotensin-converting Enzyme 1

## المقدمة

الدراسات الخاصة بتأثير البيبتيدات وعوامل التخمر الناتجة من تخمر حليب الماعز ولها فعالية تثبيطية تجاه ACE<sub>1</sub> نادرة وتتنحصر الدراسات في إحداث عمليات تخمر باستعمال سلالات مختلفة من بكتريا حامض اللاكتيك في تخمر حليب الماعز واختبار فعاليتها في خفض ضغط الدم (Chen وآخرون 2018). ان أهم ما يميز حليب الماعز بأن بروتينات الكازين وخاصة البيتا كازين تكون سهلة التحلل نسبة التحلل الى 96% فضلاً عن خواص البروتين الأخرى كشكل الجسيمة الكازينية وحجمها وقوة شحناتها ونعومة الخثرة الناتجة شجعت على إجراء تجارب لإنتاج بيبتيدات فعالة حيويًا مضادة للميكروبات والعديد من البيبتيدات منخفضة الوزن الجزيئي لها خصائص علاجية أخرى (Omara، 2018). في دراسة مُنتج كفير الماعز (هو مشروب متخمر ومعتق منشأه جبال القوقاز) بان هذا المنتج يحتوي على عدد من البيبتيدات المتحررة من من متحللات كازين الماعز تمتلك قدرة تثبيط ACE<sub>1</sub> خارج الجسم الحي (Quiros وآخرون 2005). عُرض كازين حليب الماعز إلى عملية تحلل يفعل إنزيم الببسين والتريسين وان هذه المتحللات اظهرت نسبة تثبيط ACE<sub>1</sub> مرتفعة في حين أن البروتيازات الأخرى لم تُظهر متحللاتها نشاطاً تثبيطياً واضحاً على الرغم من أن قيمة DH لها أعلى من قيمتها في الببسين والتريسين وأُسْتَنْتَجَ أنَّ الخصائص التثبيطية لا تحتاج إلى عمليات فصل مُعقّدة وإنَّ عملية تثبيط ACE<sub>1</sub> المسؤول عن رفع ضغط الدم تتناسب طردياً مع DH وبشكل غير خطي (Lee وآخرون 2005). أدت متحللات كازينية الى تثبيط ACE<sub>1</sub> خارج الجسم الحي وخفض ضغط الدم وزيادة وإفراز Na مع البول كمؤشر على مستوى Ang2 المُحَفِّز للمواد الراجعة لضغط الدم في الأوعية الدموية Spontaneously Hypertensive Rats (SHRs) (Sun وآخرون 2014). جُرِّعَت الجرذان

من الأساليب المهمة جداً للسيطرة على إرتفاع ضغط الدم هو محاولة خَفْض فعالية Angiotensin Converting Enzyme (ACE<sub>1</sub>) المسؤول عن إرتفاع ضغط الدم في الإنسان والحيوانات التجريبية ويتم ذلك باستعمال علاجات كيميائية لها أعراض جانبية حَظِرَة (Sica، 2005). في الآونة الأخيرة إتَّجِه العالم الى إستعمال البدائل الطبيعية في الوقاية وعلاج الأمراض وذلك لتلافي الأعراض الجانبية التي تُحدِثها العلاجات الكيميائية في بعض أعضاء الجسم فضلاً عن كونها ذات كلفة مادية عالية (Korhonen و Pihlanto 2013). عدة دراسات وبائية أكدت أنَّ منتجات الألبان المتخمرة والأجبان المنضجة ذات فعالية مخفضة للكوليسترول والدهون الثلاثية وضغط الدم المرتفع وتساهم في تثبيط ACE<sub>1</sub> وذلك نتيجة لعمليات إنتاج البيبتيدات الفعالة حيويًا ومن الواضح إنَّ نوع الأحياء المجهرية المستعملة في التخمر وطريقة تحضير المنتج هي عوامل أساسية في عدد ونوع البيبتيدات وفعاليتها التثبيطية (Tsutsumi و Tsutsumi 2014). تحتوي بروتينات الحليب على العديد من السلاسل البيبتيدية المتخصصة وهي في حالة غير فعالة طالما بقيت مرتبطة باحماض أمينية أخرى ضمن تركيب البروتين وإنَّ معاملة البروتينات بالإنزيم أو مجموعة من الإنزيمات مجتمعة تقود الى التحلل البروتيني وتحرر سلاسل بيبتيدية حرة يمكن ان تستعمل كعلاج ضد أمراض مزمنة تصيب الإنسان مثل Hypertension (Munn، 2013). من المتحللات ذات فعالية تثبيط ACE<sub>1</sub> هي متحلل بروتين سائل شجرة التين (Maruyama وآخرون 1989) ومتحللات خيار البحر (Li وآخرون 2018) والبيبتيدات المفصولة من حليب الأبقار Ile-Pro-Val و Pro-Val و Pro-Val اللتان تمتلكان فعالية حيوية في مجال تثبيط ACE<sub>1</sub> وخَفْض ضغط الدم وخواص علاجية أخرى (Rutella وآخرون 2016). تعد

Otoster بلغاري المنشأ وفُرِّزَ حليب الماعز الكامل باستعمال جهاز نَبْذٍ مركزي مبرد نوع Selecta طراز Modifier BL-S بسرعة  $3000 \times g$  لمد 15 دقيقة وفي درجة حرارة 4 م° (السعدي، 2001).

– حُصِرَ الكازين الحامضي حسب ما ذكره (السعدي، 2001) ورُسِّبَت كميّات الكازين باستعمال حامض الهيدروكلوريك (1 مولاري) حتى الوصول الى الرقم الهيدروجيني 4.2 وهي نقطة التعادل الكهربائي لكازين حليب الماعز ثم فُصِّلَ الكازين المُترسَّب باستعمال النَبْذِ المركزي بسرعة  $3000 \times g$  ولمدة 15 دقيقة وفي درجة حرارة 4 م° ثم رُسِّحَ المحلول من خلال ورقة الترشيح Whatman. No 45 تحت التفريغ مع إضافة الماء المُقَطَّرَ للتخلص من بقايا مكونات الشرش ثم أُذِيبَ الكازين الناتج في الماء المُقَطَّرَ مع إضافة هيدروكسيد الصوديوم (1 مولاري) لرفع الرقم الهيدروجيني إلى 7 ثم رُسِّبَ الكازين مرةً أُخرى باستعمال حامض الهيدروكلوريك وفُصِّلَ الراسب بالنَبْذِ المركزي وأُعيدَ غسل وإذابة وترسيب الكازين مرةً أُخرى وجُفِّفَ الراسب بالتجفيف وحُفِظَ بدرجة حرارة التجميد تمهيداً لإجراء تنقية بيتا كازين يمرحلتين اولية بالترسيب ونهائية بطرق الكروماتوكرافي.

### التنقية الأولية لبيتا كازين

– أُتِّبَت طريقة (Aschaffenburg, 1963) لإجراء تنقية أولية لبيتا كازين الخام من الكازين الكلي قبل إجراء طرق التنقية بتقنيات الكروماتوكرافي مع تحويل في كمية الكازين الحامضي المستعمل في بداية عملية التنقية إذ استُخِدِمَت كمية كازين 40 غم بدلاً من 30 غم فقد أُذِيبَ 40 غم من الكازين الحامضي المحضر سابقاً 700 مل محلول يوريا 3.3 مولاري وضُبطَ الرقم الهيدروجيني على 7.5 بإضافة هيدروكسيد الصوديوم 1 مولاري وأُكْمِلَ الحجم إلى 900 مل بالماء المقطر ثم حُفِّصَ الرقم الهيدروجيني للمحلول إلى 4.6 باستعمال حامض الهيدروكلوريك 1 مولاري وترُكَّ لحين

بمتحلل كازيني بتركيز 1-2 ملغم/كغم من وزن الجسم عن طريق الفم والحقن الوريدي داخل الصفاق ومن خلال النتائج فقد عاد ضغط الدم إلى مستواه الأصلي بعد ثلاث ساعات من التجريع بالمتحلات (Maruyama وآخرون 1985). تُعد درجة التحلُّل %DH إحدى أهم القياسات المُستعمَلة لمعرفة وفهم تأثير الإنزيمات في عملية تحليل البروتين وكذلك فهم العلاقة بين درجة التحلُّل وتشخيص الخصائص الوظيفية والحيوية والحسية لهذه البروتينات (Cheison وآخرون 2009). تعتمد درجة التحلُّل بطريقة TNBS على التفاعل الحاصل بين Trinitrobenzene Sulphoric Acid (TNBS) ومجاميع الأمين الأولية للأحماض الأمينية الطرفية والذي سوف يؤدي إلى تكون معقد لوني يكون أعلى امتصاص ضوئي له عند الطول الموجي 340 نانومتر، ويُعتمَد على منحنى قياسي للحامض الأميني ليوسين لقياس كمية المجاميع الأمينية الحرة ومن ثم هنالك العديد من المعادلات التي يمكن إستعمالها لقياس درجة التحلُّل (Greyling، 2017).

نظراً للاتجاه العالمي نحو استعمال الأغذية في علاج بعض الأمراض لكون المستحضرات الدوائية ذات تأثيرات جانبية عدة، فقد هدفت هذه الدراسة الى عزل الجزء البروتيني بيتا كازين من كازين حليب الماعز للمَحَلِّي وتحديد الظروف المثلى لتحرير مُتَحَلِّلات منخفضة الوزن الجزيئي منه بالطرائق الإنزيمية والتي لها فاعلية في تثبيط ( $ACE_1$ ) المسؤول المباشر عن ارتفاع ضغط الدم في الإنسان وأغلب الثدييات الأخرى.

### المواد وطرائق العمل

– جُوِّزَ حليب الماعز من موقع أبي غريب/ بغداد ومن السلالة المحلية العراقية والذي يُعدُّ سلالة غير نقية منقولاً من سلالات بلاد الشام وقُدِّرَت نسبة البروتين فيه باستعمال جهاز فحص مكونات الحليب Milk

وغيّس العمود بالمحلول الدائري لازالة البروتينات غير المرتبطة.

– أُزيلت الكازينات المرتبطة ومنها بيتا كازين من العامود باستعمال المحلول الدائري المستعمل لإذابة النموذج والحاوي على كلوريد الصوديوم بتراكيز متصاعدة (0.1 و 0.175 و 0.2 مولاري) وضبطت سرعة الجريان على 50 مل/ساعة وبواقع 5 مل لكل أنبوبة باستعمال جهاز جامع الأجزاء وقراً الأمتصاص الضوئي لمحاليل البروتين على طول موجي 280 نانوميتر بجهاز المطياف الضوئي باستعمال برنامج UV Probe 2.1 المجّهز من شركة SHIMADZU وجمعت الأنابيب الحاوية على كميات من بيتا كازين وغمّلت بالتناذ الغشائي باستعمال أغشية باستعمال أغشية تنافذ نوع F12900، IGS-7.

– زكّزت المحاليل باستعمال سكر مبلور وحفظ النموذج بطريقة التجفيد تمهيداً لأجراء مرحلة التنقية بطريقة الترشيح الهلامي ثم تأكيد النقاوة وتحديد الوزن الجزيئي للبروتين بطريقة الهجرة الكهربائية في الهلام Gel-electrophoresis وبوجود المادة الماسخة SDS.

#### تنقية بيتا كازين باستعمال كروماتوكرافي الترشيح الهلامي

أستعمل هلام السفادكس G-75 في تحضير عمود السفادكس G-75 وحسب الطريقة التي إتبعها (السعدي، 2001) والشركة المجهّزة Fine Pharmacia Chemicals إذ أُذيب 0.5 غم من بيتا كازين المُحصّر حسب الطريقة المذكورة أعلاه والذي نُقي سابقاً بتنقية التبادل الأيوني كما ورد سابقاً في 10 مل من محلول دائري الموازنة وصُب هذا المحلول على عمود السفادكس الذي كوّن حجماً مقداره 158 سم<sup>2</sup> ثم أُشترت الأجزاء من عمود السفادكس الذي ضُبط معدّل جريانه بمعدّل 20

تكون راسب الذي تم التخلص منه بالترشيح باستعمال ورق ترشيح Whatman رقم 45 ليتسب كبا كازين برفقة مواد بروتينية أخرى. خذ الراشح المُتَبقي وضبط الرقم الهيدروجيني على 4.9 أضيف للراشح 2 لتر ماء المُقطّر وحضن في حرارة 30 م° لمدة 24 ساعة، أخذ الراسب بعد الترشيح وأذيب الراسب في 400 مل محلول اليوريا 3.3 مولاري وضبط الرقم الهيدروجيني على 7.5 باستعمال محلول هيدروكسيد الصوديوم 1 مولاري وخض الرقب الهيدروجيني إلى 4.6 وترك بدرجة حرارة 30 م° لحين تكون راسب.

– أُجريت عملية الترشيح للتخلص من الراسب وأخذ الراشح برقم هيدروجيني 4.9 وأضيف له 800 مل ماء مقطر وحضن في درجة حرارة 30 م° لمدة 24 ساعة وجمّع الراسب باستعمال الترشيح والذي يُمتل بيتا كازين وغيّس بالماء المُقطّر عدّة مرات بالماء المُقطّر وجفّف النموذج بطريقة التجفيد.

#### تنقية بيتا كازين النهائية

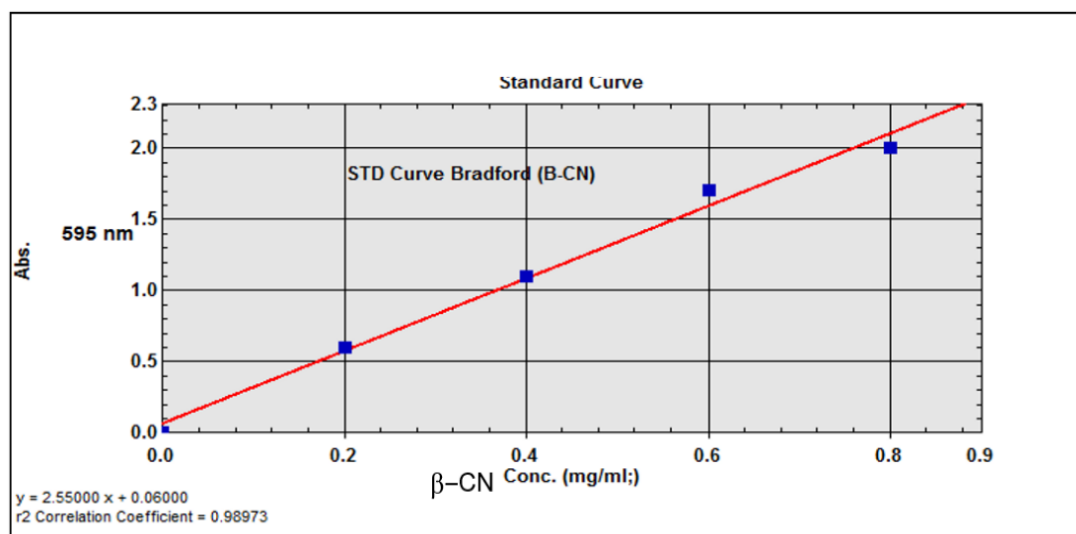
#### تنقية بيتا كازين بطريقة كروماتوكرافي التبادل الأيوني

– أستعمل المُبادل الأيوني السالب DEAE-cellulose لفصل أجزاء الكازينات المُستحصّل عليها من خطوة الفصل الأولي عن بعضها اعتماداً على فروقات صافي شحنتها وحسب طريقة (Wei و Whitney 1985) و (Whitney، 1988). أُذيب 1 غم من بيتا كازين المفصول بصورة أولية من الكازين والمُحصّر في الخطوة السابقة في 100 مل من محلول 0.1 مولاري من دائري الفوسفات برقم الهيدروجيني 7.4 والحاوي على يوريا (3.3 مولاري) وميركابتوايثانول (0.010 مولاري) ومزج النموذج مع-Cellulose DEAE المُعامل بنفس الدائري المُستعمل لإذابة النموذج ولمدة 15 دقيقة في حرارة 4 م° بعدها صُبّت مادة التبادل الأيوني لتعطي عمود بأبعاد 250 x سم

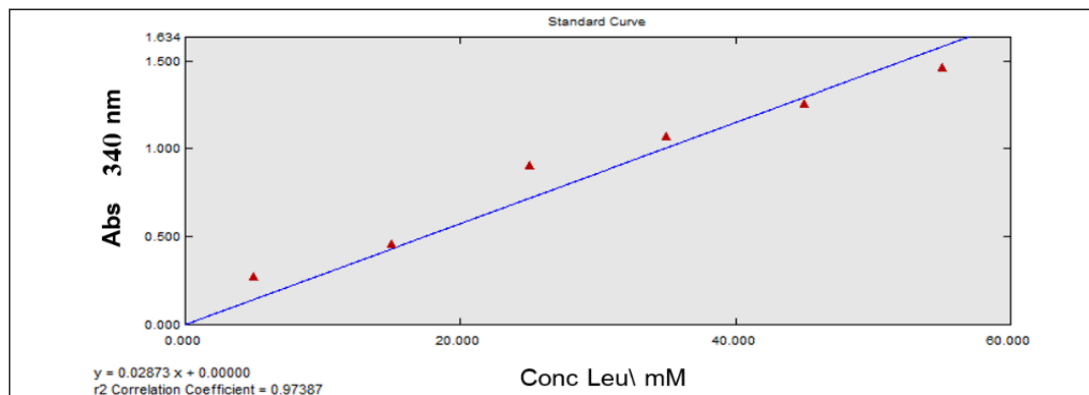
## تأكيد نقاوة بيتا كازين وتقدير وزنه الجزيئي

لتأكيد نقاوة بيتا كازين المفصول سابقاً وتحديد وزنه الجزيئي، استُعملت طريقة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريلامايد بوجود المادة الماسخة Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) وباستخدام جهاز الترحيل الكهربائي العمودي حسب الطريقة التي ذكرها (Laemmli، 1970) والمُحَوَّرَة من قِبَل (Schägger، 2006) إذ خُلِطَت مَكُونَات هُلام الفصل بتركيز 12.5% وهلام التجميع بتركيز 10% Stacking gel حُصِرَ النموذج بوزن 5 ملغم في 1 مل ماء مُقَطَّر وأُخِذَ منه حجم 50 مايكروليتر وخُطِّطَ مع 50 مايكروليتر من دارئ العينة ثم سُخِّنَ في حمام مائي مغلي لمدة ثلاث دقائق.

مل/ساعة وضبط جهاز جامع الأجزاء على جمع حجم 3 مل في كل أنبوبة وفحصت الأنابيب بجهاز المطياف الضوئي لحين ظهور التراكيز الأولية للبروتين وعلى طول موجي 280 نانوميتر بالإستناد الى قراءة المنحنى القياسي (شكل 1) المَحْضَر مُسَبِّقاً لبروتين  $\beta$ -CN القياسي المُذاب في نفس المحلول الدارئ وبصورة مباشرة بجهاز المطياف الضوئي باستعمال برنامج UV Probe 2.1 المُجَهَّز من شركة SHIMADZU وجمعت المحاليل الموجودة في الأنابيب التي تحتوي على البروتين النقي وعومل بالتنافذ العشائي ضد الماء المُقَطَّر لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة التبريد وركَّز باستعمال السكر المتبلور وقدر تركيز البروتين الكلي بطريقة برادفورد ثم جُفِّف بالتجفيد لحين إجراء فحص نقاوته لاحقاً باستعمال الترحيل الكهربائي في الهلام وقبل إجراء التحلُّ البروتيني الببسين والتريسين.



شكل (1) المنحنى القياسي لتقدير  $\beta$ -CN بطريقة برادفورد ويمثل العلاقة بين تركيز البروتين والإمتصاصية على طول موجي 595 نانوميتر



شكل (2) المنحنى القياسي للحامض الأميني ليوسين المُستعمل لتقدير درجة التحلل البروتيني وتركيز الببتيدات المتحررة نتيجة التحلل البروتيني بالإنزيمات المُحلّلة للبروتين

### تحلّل بيتا كازين بالإنزيمات المحللة للبروتين

إتبعَت الطريقة التي أجراها (Adamson Reynolds 1996) مع تطبيق التحويرات التي أجراها (Lee واخرون 2005) في كمية المادة الأساس وعدد الوحدات الإنزيمية المُحلّلة للبروتين بما يتلائم مع كميات البروتين المستحصل عليها من خطوات التنقية إذ حُصِرَ محلول من  $\beta$ -CN بنسبة 100:1 (و/ح) بإذابة 0.1 غم بروتين في 10 مل ماء مقطر وعُدّل الرقم الهيدروجيني الى 2 باستعمال حامض الهيدروكلوريك 0.5 مولاري عند استعمال الببسين والرقم الهيدروجيني الى 8 باستعمال هيدروكسيد الصوديوم 0.5 مولاري عند استعمال التريسين ورقم هيدروجيني 2 أولاً و8 ثانياً عند استعمال الإنزيمين معا بطريقة تآزرية ووضع المحلول في حمام مائي بدرجة 37°م وأضيف إنزيم الببسين الى خليط التفاعل بنسبة 18 وحدة/ 100 ملغم وأضيف إنزيم التريسين الى خليط التفاعل بنسبة 20 وحدة/ 20 ملغم مع الإستمرار مع الإستمرار بتثبيت الرقم الهيدروجيني بعدها أخذت العينات المهضومة بأوقات زمنية (1 و2 و3 و4 و5 و6 و7 و8) ساعة أما عند إستعمال الإنزيمين بطريقة تآزرية فقد استعملت بنفس القوة الإنزيمية للإنزيمين السابقين عند رقم هيدروجيني 2 واستمر التفاعل لمدة 4 ساعات ثم أضيف إنزيم التريسين الى خليط التفاعل ولكن بعد تعديل الرقم

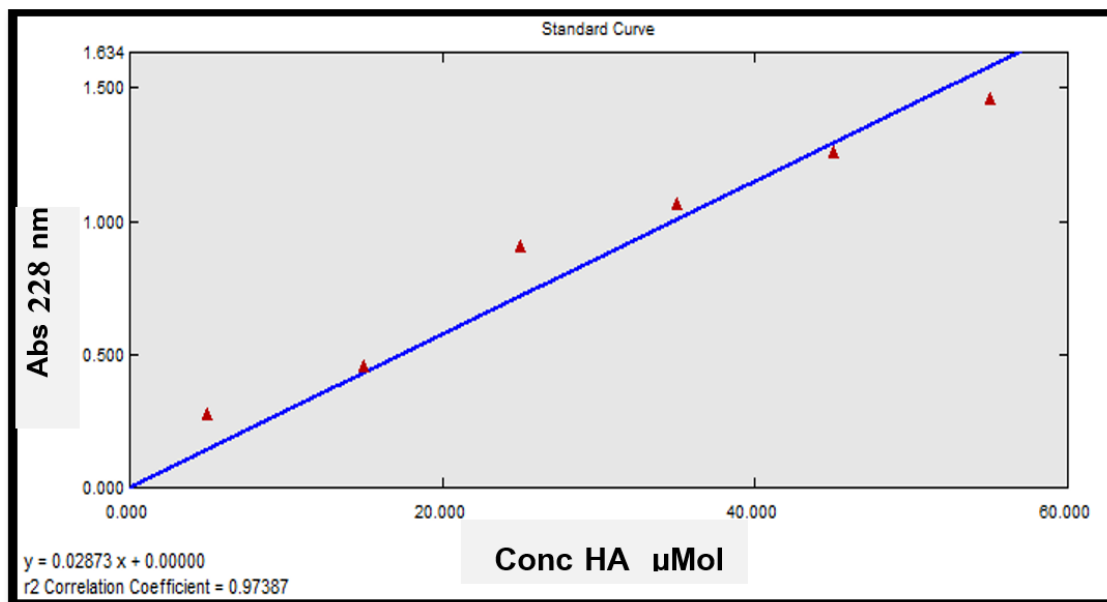
الهيدروجيني الى 8 ولمدة 4 ساعات أخرى أيضاً وأوقف عمل الإنزيمات بتعريض النموذج إلى درجة حرارة الغليان لمدة 5 دقائق وأجريت عملية النبذ المركزي على  $12000 \times g$  لمدة 15 دقيقة وجمع الراشح وجُفِّف بالتجفيد وحفظ في درجة حرارة -18° م لحين الإستعمال.

### تقدير درجة التحلّل البروتيني DH

قُدِّرَت درجة التحلّل لكميات بيتا كازين وفقاً لما ذكره (Liu وChiang 2008) مع بعض التحوير في زيادة تراكيز الحامض ليوسين القياسي وحسب المنحنى القياسي (شكل 2) إذ نُقِلَ حجم 0.250 مل من النماذج قيد الدراسة لكل الفترات الزمنية قبل تجفيدها الى أنبوبة زجاجية وأخضعت إلى خطوات عمل تحضير المنحنى القياسي ووفق التوقيات السابقة المشار إليها، كما أُجريت عملية تحلّل كامل لبيتا-كازين باستعمال حامض الهيدروكلوريك 6 مولاري/ 24 ساعة، وحُسِبَت مجاميع  $NH_3$  الطرفية (تركيز الببتيدات المتحررة) بالإستناد الى المنحنى القياسي للحامض الأميني الليوسين وقُدِّرَت درجة التحلّل بإدخال المعادلة أدناه الى برنامج UV- PROBE 2.1 والمُشار إليها من قبل (Jamdar واخرون 2010):

$$DH = [(L_t - L_0) / (L_{MAX} - L_0)] \times 100$$

اذ ان:



شكل (3) منحنى قياسي يوضح العلاقة بين تراكيز مختلفة من حامض الهيبيوريك القياسي والإمتصاصية مُقدَّرة على طول موجي 228 نانومتر

حُصِنَ حجم 100 مايكروليتر من عينات متحللات بروتين بيتا-كازين ولثلاث فترات (بداية ووسط ونهاية) عملية التحلل للمعاملات الثلاثة البيسين والتريسن وخليطهما 1:1 مع 200 مايكروليتر من محلول المادة الأساس (HHL) Substrate في درجة حرارة 37 °م لمدة 5 دقائق باستعمال حمام مائي، أُضيفَ الى هذا الخليط 20 مايكروليتر من محلول ACE<sub>1</sub> 0.2 وحدة/مل المَحَضَّرُ مُسبقاً واستمرت عملية الحضانة في نفس درجة الحرارة لمدة 30 دقيقة أُخرى وأوقِفَ التفاعل الإنزيمي باستعمال 0.25 مل من حامض الهيدروكلوريك 1 مولاري، إنَّ كمية حامض الهيبيوريك الناتج من التفاعل إسْتُخْلِصَ من الخليط بإضافة خلات الأثيل وعلى مرحلتين بواقع 3 مل في كل مرحلة بحيث كانت الإضافة الأولى بعد فترة 5 دقيقة والثانية بعد 30 دقيقة وعلى درجة حرارة 100 °م باستعمال المبخر الدوار وأضيفَ الى المتبقي حجم 3 مل ماء مقطر. قَدِّرَتِ الإمتصاصية لحامض الهيبيوريك عند طول موجي 228 نانومتر بجهاز المطياف الضوئي بمقارنة كميات حامض HA المتحررة من HHL مع المنحنى

$L_t$  = المجاميع الأمينية الحُرَّة في الوقت (0-8) ساعة  
 $L_0$  = كمية الأحماض الأمينية الموجودة في عينة البروتين الأصلية بدون أي معاملة.  
 $L_{MAX}$  = كمية الأحماض الأمينية الكُلِّيَّة في العينة غير المُتَحَلَّلَة بالإنزيمات والتي أمكن الحصول عليها بعد التحلل الحامضي باستعمال حامض الهيدروكلوريك 6 مولاري على درجة حرارة 120 °م مدة 24 ساعة.

#### تقدير فعالية متحللات بيتا-كازين في تثبيط ACE<sub>1</sub>

قُدِّرَتِ فعالية متحللات بيتا-كازين عند كل درجة تحلل في تثبيط ACE بالطريقة الطيفية والتي أساسها تحويل الببتيد هيبيوريل-هستدين-ليوسين-N (Hippuryl-his-leu Hydrate) (HHL) الى حامض الهيبيوريك (AH) (Hippuric Acid) (Benzoylaminoacetic Acid) بفعل ACE<sub>1</sub> وحسب ما أشار اليه (Cushman و Cheung 1971) والمُحَوَّرَة من قِبَل (Chen وآخرون 2018) (Lee وآخرون 2005) واستعمل المنحنى القياسي لحامض الهيبيوريك شكل (3) لتقدير فعالية ACE<sub>1</sub>.

فضلاً عن عوامل أخرى كالتغذية وعدد الولادات وغيرها من العوامل التي تؤدي إلى تغييرات في نسب البروتين الكلي.

### التنقية الأولية لببنا-كازين

أظهرت النتائج الكمية للفصل الأولي  $\beta$ -CN من كازين حليب الماعز الكلي الحامضي إلى أن مُحصلة التنقية الأولية هي 22 غم  $\beta$ -CN من أصل 40 غم كازين وهي تمثل نسبة 55% وهذه النسبة متوافقة من نسبة  $\beta$ -CN التي حصل عليها كل من (Aschaffenburg، 1963) و (Bramanti، 2003) وهي 56% و 58.5% على التوالي وأقل من النسبة التي حصل عليها (السعدي، 2001) البالغة 68% ولكن جميع تلك النتائج تؤكد أن  $\beta$ -CN هو الجزء الرئيس من كازينات حليب الماعز مع احتمال ان يكون هنالك نوع من التداخل مع الكازينات الأخرى وخاصة  $k$ -CN. ان النسبة  $\beta/as$  بلغت 0.42 وهي متوافقة مع النسبة 0.41 التي حددها كلاً من (Božanić وآخرون 2002) ونسبة 0.412 التي حددها (Bramanti وآخرون 2003).

### تنقية ببنا-كازين النهائية بطريقة المبادل الأيوني السالب

أمرر  $\beta$ -CN على عمود DEAD-cellulose ولكون هذا البروتين يمتلك صافي شحنة سالبة أضعف من  $\alpha$ S-CN وأقوى من K-CN فقد استعملت تراكيز ملحية مختلفة من NaCl لغرض تنقيته من البروتينات المرافقة له ويوضح شكل (4) ظهور أول منحنى لاسترداد البروتين ضمن منطقة إضافة محلول كلوريد الصوديوم 0.1 مولاري في منطقة K-CN في الأنابيب (9-18) فهو يمثل انفصال هذا البروتين عن  $\beta$ -CN إذ أن 0.1 مولاري من محلول كلوريد الصوديوم يُعد هو التركيز المناسب لاسترداد K-CN.

القياسي لحامض الهيبيوريك HA والتي قرأت في نفس الجهاز.

كمية HA المتحررة بغياب المتحللات البروتينية أيضاً أُعْتُبرت كفعالية 100% ACE<sub>1</sub> وأستعملت المعادلة  $(A-B)/A_x100\%$  لحساب فعالية الإنزيمية كنسبة مئوية إذ أن:

$$\% \text{ للتثبيط} = 100x ((A-B) / A) \text{ اذ:}$$

A = تركيز حامض الهيبيوريك = 234.036 مايكروليتر، بغياب أي عامل من عوامل تثبيط فعالية ACE (الفعالية 100%).

B = تركيز حامض الهيبيوريك بوجود مُنْطَبات ACE<sub>1</sub> وهي الببتيدات قيد الدراسة.

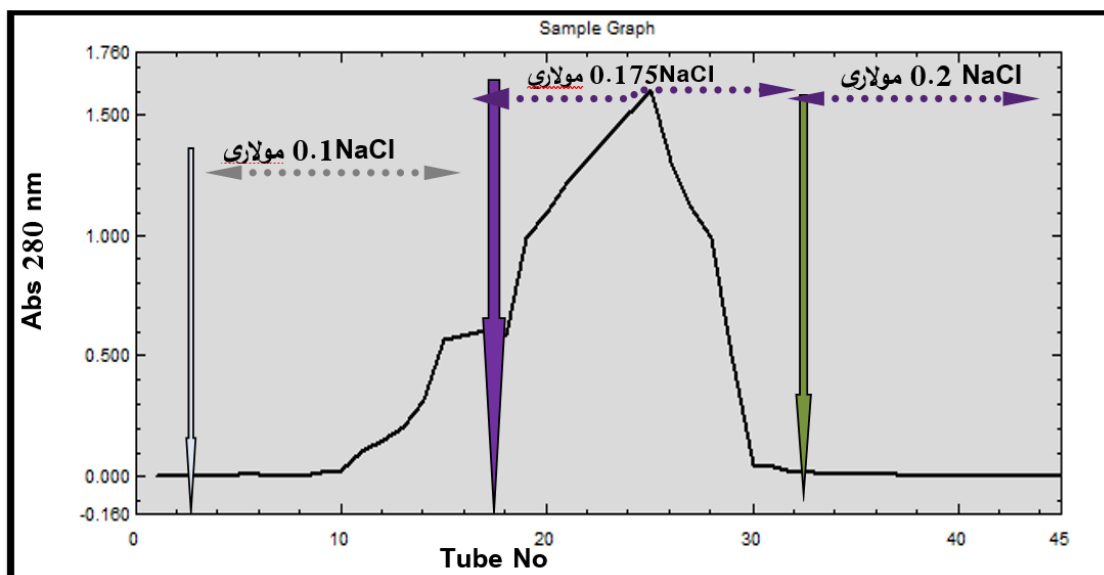
بعد تثبيط ظروف تحلل ببنا-كازين من حيث نوع الإنزيم ووقت التحلل للمتحلل الذي أظهرت سلاسله الببتيدية أعلى فعالية في تثبيط ACE<sub>1</sub>، أُعيدت العملية بنفس الظروف لكميات البروتين المُستحصل عليها من خطوات التنقية السابقة للحصول على أكبر كمية من المتحللات وأطلق عليه  $\beta$ H نسبة إلى متحللات ناتجة من ببنا-كازين.

### النتائج والمناقشة

#### الكازين الحامضي

أظهرت النتائج إن كمية الكازين التي تم الحصول عليها بعد الترسيب الحامضي لكازين حليب الماعز العراقي بطريقة النبد المركزي المُبرّد هي 2.6% وهي ضمن الحدود الطبيعية لنسبة الكازين في حليب الماعز وأن نسبة البروتين في الحليب هي 3.5% وهي ضمن الحدود الدنيا لنسبة البروتين في حليب الماعز وهي متقاربة جداً مع ما وجدته Yangilar (2013) الذي حدد نسبة البروتين كحد أدنى في حليب الماعز لعدد من السلالات وهي 3.4% ونسبة الكازين الكلي 2.4% علماً أن أعلى نسبة للبروتين في حليب الماعز الإسباني هي 4.6% حددها Park وآخرون (2007) وأشار إلى أنها تعود للاختلافات الجينية ما بين الأنواع





شكل (4) تنقية  $\beta$ -CN حليب الماعز على عمود التبادل الأيوني السالب DAEA-cellulose بأبعاد  $2 \times 50$  سم.

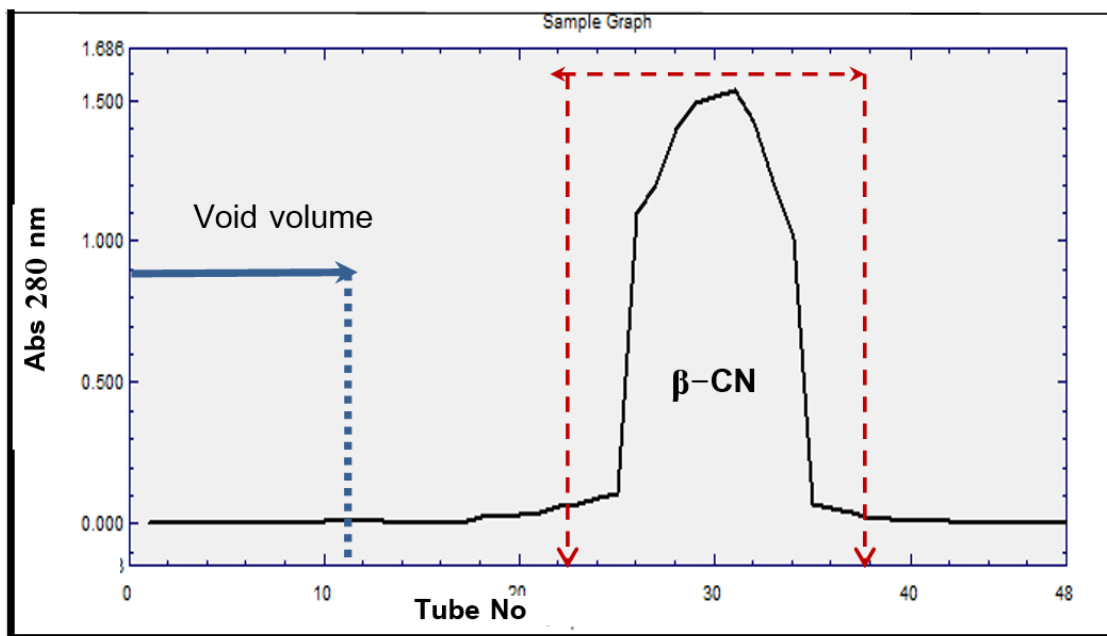
يدل على عدم وجود أي بروتينات ذات صافي شحنة موجبة إذ لو كانت موجودة لظهرت في منطقة الغسل نتيجة لتنافرها مع شحنة العمود وبالتالي عدم ارتباطها.

#### التنقية النهائية لبروتين $\beta$ -CN بطريقة الترشيح الهلامي وباستعمال السيفادكس G-75

أجريت عملية تنقية نهائية بطريقة الترشيح الهلامي لكميات  $\beta$ -CN المُستردّة من عمود التبادل الأيوني وذلك لإزالة جميع الملوثات من البروتينات التي قد تكون مرافقة له وخاصةً بروتين K-CN إذ أشار (Aschaffenburg، 1963) إلى تلوث  $\beta$ -CN بكميات من K-CN بعد إجراء عملية فصل أولي بمحلول اليوريا ومحلول كلوريد الصوديوم إذ أشار (Andrews، 1965) إلى أن فصلاً جيداً يوفره عمود السيفادكس G-75 و G-100 للمواد البيولوجية التي وزنها الجزيئي بين 12-80 ك د.

يظهر الشكل (5) ظهور قمة رئيسة واحدة فقط في الأنابيب رقم (22-35) وهي تُمثل  $\beta$ -CN النقي الذي جُمعت كمياته وركّزت وجُفّفت بطريقة التجفيد.

إن هذا التداخل الموجود بالرغم من إجراء عملية التنقية الأولية التي أُجريت سابقاً كان قد أشار إليه (السعدي، 2001) إذ أوضح إنه يُعزى إلى التقارب الكبير بين بروتين K-CN و  $\beta$ -CN ضمن جزيئة الكازين إضافة إلى وجود الأواصر ثنائية الكبريت غير المتحللة وهذه النتيجة تتوافق أيضاً مع النتائج التي حصل عليها (Davies و Law، 1977). كما يوضح شكل (4) أن استرداد بيتا كازين في القمة الرئيسية في الأنابيب (18-33) وبعد استعمال تركيز 0.175 مولاتي NaCl. إن كمية بروتين  $\beta$ -CN الكليّة المُستردّة جُفّفت بطريقة التجفيد باستخدام Freeze Drier لغرض الاستمرار بتنقيتها إذ بلغ وزنها 859.511 ملغم من وزن 1 غم فيما بلغ تركيز البروتين 11.547 ملغم/مل وهذا يُظهر أهمية عملية الفصل الأولي باليوريا و NaCl في الحصول على كميات كبيرة من بروتين بيتا كازين  $\beta$ -CN وعدم وجود تداخلات كبيرة بين  $\alpha$ S-CN و  $\beta$ -CN. من المهم أيضاً الإشارة إلى أنه لم تظهر أي قمة في منطقة الغسل وبدأ ظهور القمم في منطقة الاسترداد بعد إضافة التركيز الأول من محلول ملح كلوريد الصوديوم مما



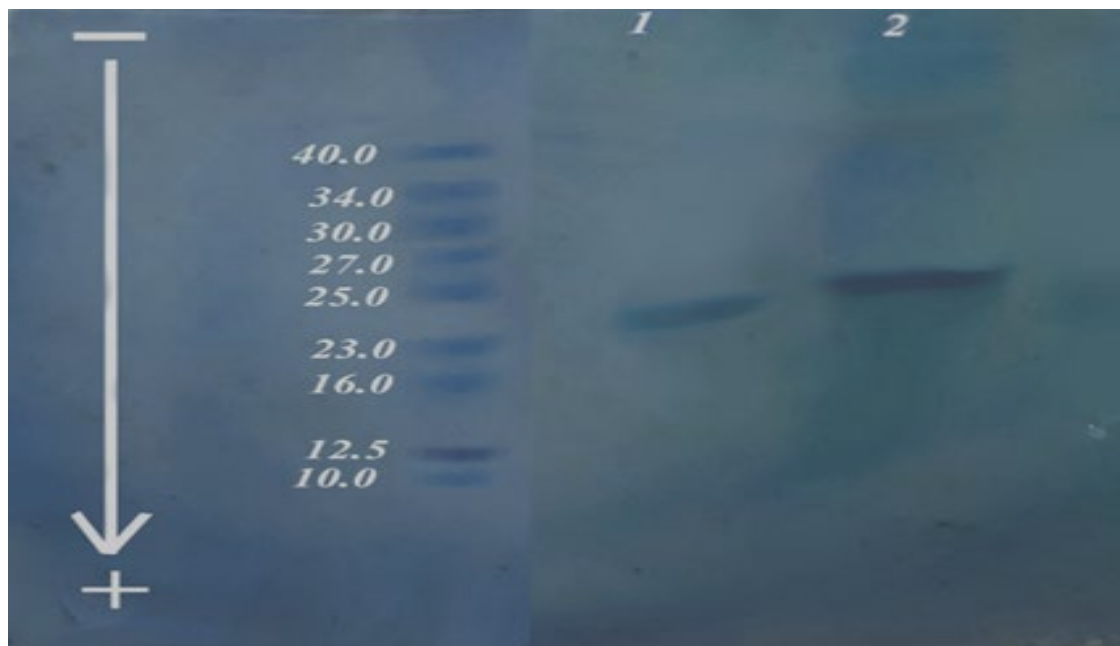
شكل (5) تنقية  $\beta$ -CN حليب الماعز النهائية باستخدام عمود سيفادكس G-75 عمود بأبعاد  $1.5 \times 90$  سم

بروتينات بنقاوة عالية باستعمال تقنيتي التبادل الأيوني ثم الترشيح الهلامي.

#### تأكيد نقاوة $\beta$ -CN بطريقة الهجرة الكهربائبة وتحديد وزنه الجزيئي

أجريت عملية الترحيل الكهربائي على هلام متعدد الأكريلاميد بوجود المادة الماسخة SDS والتي تُعد من أسهل طرائق تأكيد نقاوة البروتينات المعزولة بطرائق الكروماتوغرافي المختلفة إذ يُوَضَّح الشكل (6) ظهور حُرْمَة  $\beta$ -CN المُنقى بصورة نهائية بشكل منفرد مما يُؤكِّد خلوه من التداخل مع أجزاء الكازين إذ قطع مسافة مساوية تقريباً للمسافة التي قطعها البروتين القياسي كما لم تُظْهَر أي حُرْم مُرافقة للبروتين المُنقى كما يوضح ان  $\beta$ -CN ظَهَر بحُرْمَة واحدة أيضاً مع وجود فارق بسيط في المسافة التي قطعها بالمقارنة مع الأبقار القياسي إذ تحرك لمسافة أطول قليلاً وهذا يعني أنَّ وزنه الجزيئي أقل نسبياً من القياسي الذي يعود لحليب الأبقار مع أنه كميّاً يشكل الجزء الأكبر من كازينات حليب الماعز.

إذ بلغ معدل الكمية 402.135 ملغم من 0.5 غم بروتين أستخدم في عملية التنقية وتركيز البروتين بلغ 9.574 ملغم/مل. ان ظهور قمة رئيسية واحدة يدل على كفاءة عملية التنقية في التخلص من كل الآثار المُنتَبِية من البروتينات الأخرى وأن الكميات التي جُمِعت من عملية التنقية السابقة بالمُبادِل الأيوني السالب أحتوت على  $\beta$ -CN بشكل نقي ولكن عملية الترشيح الهلامي أسهمت في الحصول على البروتين بدرجة نقاوة عالية وهذا يتفق مع النتائج التي حصل عليها (Salem وآخرون 2009) عند مقارنته لأجزاء كازينات حليب الماعز ومقارنته مع حليب الأبقار والأنسان وتتفق هذه النتائج مع (السعدي، 2001) إذ حصل على  $\beta$ -CN حليب الماعز بصورة نقية عند إستعماله تقنية الترشيح الهلامي. يُستنتج مما تقدم إنّه من الممكن الحصول على  $\beta$ -CN نقي بأستعمال طريقتي التبادل الأيوني ثم الترشيح الهلامي إذ أنّ إجراء التنقية بتقنية واحدة فقط غير كافية للحصول على بروتين عالي النقاوة وبكميات كبيرة النقاوة وهذا ما أشارت اليه (دوش، 2007) عندما حصلت على



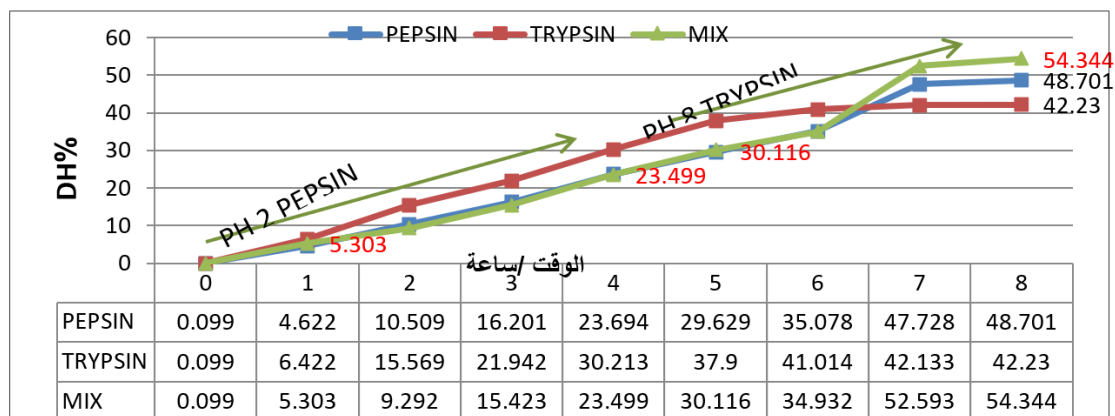
شكل (6) ترحيل  $\beta$ -CN المنقى مع البروتين القياسي و ladder القياسي بمدى 10-40 KD في  $\beta$ -CN 12.5 % SDS-PAGE حليب الماعز المنقى (2)  $\beta$ -CN القياسي

الذي إستعمله (Salem وآخرون 2009) وتركيز 12.5 % في الدراسة التي أجراها (العاني، 2013).

درجة تحلل بيتا كازين بفعل إنزيمات الببسين والتربسين وخليطهما

فُدرت درجة تحلل  $\beta$ -CN بتأثير إنزيم الببسين وتربسين وخليطهما بنسبة 1:1 ولمدة 8 ساعات إذ أُخذت القراءات كل ساعة وقورنت القراءات مع منحنى قياسي للحامض الأميني ليوسين المُتحد مع المُركب (Trinitrobenzenesulphoric Acid) (TNBS) إذ يُتحد هذا المُركب مع مجموعة الأمين الطرفية الحرة للأحماض الأمينية المُرتبطة بذرة الكربون ألفا لينتج لون أصفر باهت جداً يُقرأ على طول موجي 340 نانوميتر وإن شدة اللون تتناسب طردياً مع تركيز البيبتيدات المُتحررة في المحلول. يتضح من النتائج المعروضة في شكل (7) إن درجة التحلل DH تزداد بتقدم وقت الحضانة لنوع الإنزيمات وخليطهما بنسبة 1:1

فُدر الوزن الجزيئي للبروتين النقي اعتماداً على المسافة التي قطعها البروتين بالمقارنة مع المسافة التي قطعها البروتينات القياسية من جهة وبالمقارنة مع الوزن الجزيئي للبروتين المقابل لها في Ladder من جهة أخرى وذلك باستعمال برنامج تحليل المسافة في الصور Photocapt الذي يُحدّد الوزن الجزيئي لحزم البروتين و DNA بدقة أكبر من القياس بالمسطرة إذ بلغ وزن  $\beta$ -CN الجزيئي 24.2 KD وهذا الوزن الجزيئي يتوافق مع ما وجدته (Raak وآخرون 2018) عند ترحيل الكازينات بطريقة SDS-PAGE فوجدها أقل 26.8 KD إذ كانت الوزن الجزيئي مُقارب جداً لهذه النتائج مما يؤكد نقاوة البروتين. إن وجود الاختلافات في الأوزان الجزيئية لأجزاء الكازينات في حليب حيوانات مُختلفة الأنواع يعود الى عوامل جينية بالدرجة الأساس ولوجود بعض الارتباطات بأواصر ثنائية الكبريت بين تلك الأجزاء لم تتأثر بالعوامل المُختزلة بدرجة كافية مما يُظهرها بأوزان جزيئية أكبر فضلاً عن درجة الفسفرة لأنواع الكازينات وكذلك تأثير تركيز هلام الفصل الذي يمكن أن يكون 16.5% وهو



شكل (7) النسبة المئوية لتحلل  $\beta$ -Casein بفعل الببسين والتريسين وخليطهما بنسبة 1:1 أثناء الحضان على حرارة 37 م° ولمدة 8 ساعات

التريسين له فعالية منخفضة باتجاه تحليل  $\beta$ -CN مقارنة بالببسين (Rodriguez واخرون 2007). تقارير هذه النتيجة مع ما توصل إليه (Wang واخرون 2013) من أن قيمة DH بيتا كازين بفعل إنزيم التريسين هي 45.2% خلال 90 دقيقة وهذه الفروقات البسيطة تعود استعمال تراكيز إنزيمية أعلى كما أن نتيجة هذه الدراسة غير متوافقة مع قيمة DH التي حصل عليها (Lee واخرون 2005) البالغة 59.5% وهذا يعود إلى طول فترة الحضان التي أستعملها الباحث والبالغة 72 ساعة. أما فيما يتعلق بالفعل التآزري لتحليل  $\beta$ -CN بالببسين والتريسين فتشير النتائج في شكل (7) إلى ارتفاع قيمة DH وهي 54.344% وهذا يدل على كفاءة الفعل التآزري للإنزيمين في الحصول على درجة تحلل عالية وهذه النتائج متفق مع نتائج (Sun واخرون 2014) إذ استعمل التريسين في التحلل بعد إنزيمات مختلفة محللة للبروتين لترتفع قيمة DH للكازين من 44.5 إلى 72%. إن نسب التحلل المرتفعة لبروتينات كازين حليب الماعز المفصولة والمُنقاة بأوقات قصيرة يدل على أن الحصول على ببتيدات بأوزان جزيئية منخفضة يمكن الحصول عليه عند استعمال كازينات نقية منفصلة عن بعضها أفضل وأسرع مما هو عليه في الكازين الكامل أو أي بروتين آخر وأن التباينات

ويظهر هذا واضحاً من خلال الإرتفاع في الأمتصاصية على طول موجي 340 نانوميتر بتقدم وقت الحضان مما يعني تحراً مُتزايداً للبتيدات peptides ومتعدد الببتيد poly peptides بسبب الفعل التحللي المُتخصص بالإنزيمات المذكورة ويُوضّح الشكل أيضاً تشابه الأطار العام لسلوك المعاملات الثلاثة في كونها بلغت أعلى نسب تحلل لها بعد مرور 8 ساعات من الحضان لكن بنسب تحلل مختلفة هي 48.701 و 42.23 و 54.344% للببسين والتريسين وخليطهما على التوالي، إلا أن قيمة درجة التحلل بفعل إنزيم الببسين بلغت 48.701% وهذه النتيجة متوافقة مع النتيجة التي توصل إليها Lee واخرون (2005) البالغة 48% في كازين حليب الماعز وهذا يدل على ارتفاع كفاءة تحلل بيتا كازين بفعل إنزيم الببسين وهذا يعود إلى توفر المادة الأساس من أحماض أمينية حلقيه وملائمة التركيب الفراغي لهذه البروتينات لتحفيز المواقع الفعالة في الببسين. أما بالنسبة إلى قيم DH لبروتين  $\beta$ -CN بفعل إنزيم التريسين كانت 42.23% بعد مرور 8 ساعات وهي منخفضة نسبياً وهذا يعود بالدرجة الأساس لاختلاف الهيئة التركيبية الخاصة لكل بروتين ومحتواه من الأحماض الأمينية المناسبة ومدى توافر الأحماض Arg و Lys التي يهاجمها التريسين مما يدل على أن

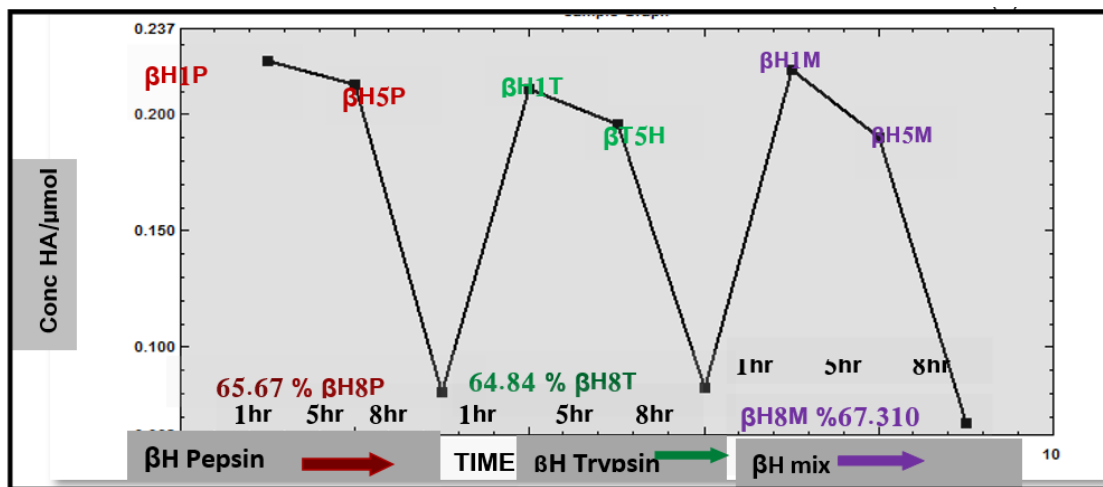
والتريسين فالنتائج تُعدّ مؤشراً على أن الزيادة في درجة التحلل مهمة جداً لرفع الفعالية التثبيطية وهذا ناتج لظهور سلاسل ببتيدية جديدة بأوزان جزيئية منخفضة ذات فعالية تثبيطية عالية نتيجة استمرار عملية التحلل. أما فيما يتعلق بتأثير المُتَحَلِّلات الناتجة عن الفعل التآزري لإنزيم الببسين والتريسين معاً فإن النتائج تُشير الى أهمية استعمال خليط من الإنزيمين في عملية التحلل للحصول على أعلى نسبة لتثبيط  $ACE_1$  حيث سجلت المُعاملة  $\beta H8M$  أعلى فعالية تثبيطية بين المعاملات حيث بلغت 67.310% وبتكريز ببتيديات 46.104 مليمولار وتركيز حامض HA 0.076 مايكرومولار. جاءت هذه النتائج مُقارِبة إلى ما ذكره (Lee و اخرون 2005) من إنَّ أعلى نسبة تثبيط  $ACE_1$  بلغت 67.6% عند تحليله كازين الماعز بالتريسين وهي أقل مما وجده (Chobert و اخرون 2005) في تحليله لبروتين بيتا لاكتوكلوبولين بالتريسين وهو 85% وأعلى مما وجده (Otte و اخرون 2007) في مُتَحَلِّلات بيتا كازين بالتريسين بعد مرور 3 ساعات ونسبة تثبيط 58%.

بشكل عام فإن متحللات  $\beta$ -CN أظهرت كفاءة عالية في تثبيط فعالية  $ACE_1$  مقدارها (67.31%) وقيمة DH هي (54.344%) باستعمال خليط الإنزيمين وبنفس وقت التحلل مما يدل على أنَّ نوعية الببتيديات المُتَحَرِّرة هي عامل مؤثّر في كفاءة تثبيط  $ACE_1$  وهذا يتفق مع استنتاج (Ferreira و اخرون 2007) الذي أثبت أن متحللات الشرش بفعل إنزيم التريسين عند استعماله مع انزيمات اخرى تمتلك فعالية أقوى من متحللات الشرش بأنزيمات منفردة لانتاج ببتيديات ذات فعالية في تثبيط  $ACE_1$  ولكن (Munn، 2013) إعتَبَر أنَّ عاملين هما قيمة DH ونوع الببتيديات في المُتَحَلِّل الكازيني يُساهمان معاً في ظهور فعالية عالية في تثبيط  $ACE_1$  مع التأكيد على أهمية الفعل التآزري في تحرر لببتيديات فعالة حيوياً ومُنخَفِضة الوزن الجزيئي.

في درجة تحلُّل كازين حليب الماعز وغيرها من الكازينات والبروتينات يعود الى الهيئة الفراغية الخاصة بكل بروتين ومكوناته من الأحماض الأمينية وتسلسلها فضلاً عن نوع الإنزيمات المُستعملة في التحليل وتركيزها وزيادة متحلُّلات بيتا كازين بفعل الببسين والتريسين في حليب الماعز والأنسان مقارنة بكازينات نوعين من الأبقار والفرس يعود الى توافر بيتا كازين كميّاً فيهما (Jasińska، 1995).

### فعالية مُتَحَلِّلات بيتا كازين ( $\beta H$ ) في تثبيط $ACE_1$

قُدِّرَت فعالية تثبيط المُتَحَلِّلات الناتجة من بيتا كازين والتي أُصْطَلِحَ عليه  $\beta H$  ولثلاث فترات 1، 5 و 8 ساعة من عملية التحلل بالببسين والتريسين وخليطهما بنسبة 1:1 إعتِمالاً على تحرر HA ويوضح شكل (8) تأثير متحللات ثلاث فترات زمنية ناتجة من فعل إنزيم الببسين في  $\beta$ -CN الناتجة بعد مرور 1 و 5 و 8 ساعات من الحضان مع  $ACE_1$  والمشار إليها  $\beta H1P$  و  $\beta H5P$  و  $\beta H8P$  وكذلك ثلاث متحللات لنفس القراءات السابقة ولكن بفعل إنزيم التريسين والمشار إليها  $\beta H1T$  و  $\beta H5T$  و  $\beta H8T$  وخليطهما المشار لها  $\beta H1M$  و  $\beta H5M$  و  $\beta H8M$  على فعالية  $ACE_1$  إذ يُظهِر شكل (8) تناسباً عكسياً بين تركيز HA والنسبة المئوية لتثبيط  $ACE_1$  ويُلاحَظ من جدول (1) إن أعلى درجات التثبيط هي للمتحللات الناتجة بعد مرور 8 ساعة إذ بلغت 65.665 و 64.84 و 67.310% وبتكريز HA هو 0.08 و 0.082 و 0.076 مايكرومولار للمتحللات  $\beta H8P$  و  $\beta H8T$  و  $\beta H8M$  على التوالي ويلاحَظ أيضاً ارتفاع الفعالية التثبيطية بعد مرور 5 ساعة من 4.783 الى 8.896% بالببسين ومن 7.719 الى 0016.3% بالتريسين ومن 6.428 الى 018.77% بخليطهما مُقارِنة بارتفاعه الى 65.665 و 64.84 و 67.310% بعد مرور 8 ساعة على التوالي وبتناسب طردياً مع DH. فيما يتعلق بالتحلل بالببسين



شكل (8) دراسة تأثير مُتَحَلَّلات بيتا كازين (Hβ) الناتجة بفعل إنزيم الببسين والتربسين وخليطهما بنسبة 1:1 في تثبيط فعالية (ACE<sub>1</sub>)

جدول (1) علاقة نسبة DH وقيم تراكيز متحللات β-CN مع تركيز HA وفعالية تثبيط ACE<sub>1</sub>

*βh8M	βH5M	βH1M	βh8T	βH5T	βH1T	βH8p	βH5p	βH1p	متحللات α <sup>s2</sup> -CN
67.310*	18.770	6.428	64.84	16.300	7.719	65.665	8.896	4.783	الفعالية التثبيطية %
0.076	0.190	0.219	0.082	0.196	0.211	0.080	0.213	0.223	تركيز حامض الهيبيوريك HA μmol
54.344	30.116	5.303	42.23	30.230	6.400	48.701	29.629	4.600	درجة تحلل البروتين %
46.104	25.593	0.588	35.848	25.625	5.535	41.326	20.157	4.012	تركيز الببتيدات mmol مجموعة NH3 الطرفية

من تحلل أجزاء كازين الماعز α و s و CN-K كما ان عمليات التنقية للمتحللات تعمل على زيادة الفعالية التثبيطية وخاصة عند الحصول على ببتيدات منفردة وليس ضمن أجزاء متحللات وتمتلك وزناً جزيئياً منخفضاً وعندئذ من الممكن اجراء تجارب داخل الجسم الحي لبيان تأثير تلك الببتيدات في ACE<sub>1</sub> وخفض ضغط الدم الانبساطي والانقباضي فضلاً عن استخدام إنزيمات أخرى محللة للبروتين غير الببسين والتربسين

#### الإستنتاجات والتوصيات

بيتا كازين حليب الماعز المحلي يمكن تنقيته بطرائق الكروماتوغرافي ووزنه الجزيئي بحدود 24.2 ك د وان متحللاته الببسينية والتربسينية تمتلك كفاءة في خفض فعالية الإنزيم المَحْوَل للإنجيوتنسين I خارج الجسم الحي مع تأثير ملحوظ لزيادة درجة التحلل البروتيني على رفع الكفاءة التثبيطية. من الممكن الحصول على سلاسل ببتيديّة منخفضة الوزن الجزيئي

Unaprjedenje Proizvodnje I Prerade Mlijeka, 52(3), 207-237.

**Bramanti, E.;** Sortino, C.; Onor, M.; Beni, F., and Raspi, G. (2003). Separation and Determination of Denatured  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-,  $\beta$ -and K-caseins by Hydrophobic Interaction Chromatography in Cows', Ewes' and Goats' Milk, Milk Mixtures and Cheeses. *Journal of Chromatography A*, 994(1-2), 59-74.

**Cheison, S. C.;** Zhang, S. B.; Wang, Z., and Xu, S. Y. (2009). Comparison of a Modified Spectrophotometric and the Ph-stat Methods for Determination of The Degree of Hydrolysis of Whey Proteins Hydrolysed in a Tangential-flow Filter Membrane Reactor. *Food Research International*, 42(1), 91-97.

**Chen, Li;** Qihong Zhang; Zhe Ji; Guowei Shu, and He Chen. (2018). Production and Fermentation Characteristics of Angiotensin-I-converting Enzyme Inhibitory Peptides of Goat Milk Fermented by a Novel Wild *Lactobacillus Plantarum* 69." *LWT* 91: 532-540.

**Chobert, J. M.;** El-Zahar, K.; Sitohy, M.; Dalgalarondo, M.; Métro, F.; Choiset, Y., and Haertlé, T. (2005). Angiotensin I-converting-enzyme (ACE)-inhibitory Activity of Tryptic Peptides of Ovine beta -lactoglobulin and of Milk Yoghurts Obtained by Using Different Starters. *Le Lait*, 85(3), 141-152.

**Cushman, D. W.,** and Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric Assay and Properties of the Angiotensin-converting Enzyme of Rabbit Lung. *Biochemical Pharmacology*, 20(7), 1637-1648.

**Davies, D. T.** and Law, A. J. R. (1977). An Improved Method for the Quantitative Fractionation of Casein Mixtures Using Ion-exchange

يمكن أن تحرر بببتيدات متنوعة لها تأثير تثبيطي كما يمكن اجراء نفس الدراسة ولكن باستعمال الكازين الكامل او تخمر حليب الماعز الكامل باستعمال بكتريا الخمير اللاكتيكي للحصول على منتجات ذات خاصية علاجية.

#### المصادر

دوش، كفاح سعيد عباس (2007) أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة/ جامعة بغداد. تنقية وتوصيف بعض بروتينات خلايا الدم البيضاء المتعددة الأشكال النووية المعزولة من حليب الأبقار المصابة بالتهاب الصرع ودراسة دورها في إنضاج جبن الشدر.

السعدي، جاسم محمد صالح (2001) رسالة ماجستير. كلية الزراعة/ جامعة بغداد. دراسة بروتينات حليب الماعز والبقر وعلاقتها بفطر الحساسية.

العاني، محمد قيس (2013) عزل وتنقية بروتين الكازئين من حليب الإبل العراقية Camels dromedaries وتقييم فعاليته ضد انواع من الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي. المجلة العراقية للسرطان والوراثة الطبية، مجلد6 عدد (1)، (93-100).

**Adamson, N. J.,** and Reynolds, E. C. (1996). Characterization of Casein Phosphopeptides Prepared Using Alcalase: Determination of Enzyme Specificity. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(3), 202-207.

**Andrews, P.** (1965). The Gel-filtration Behaviour of Proteins Related to Their Molecular Weights Over a Wide Range. *Biochemical Journal*, 96(3), 595-606.

**Aschaffenburg, R.** (1963). Preparation of  $\beta$ -casein by a Modified Urea Fractionation Method. *Journal of Dairy Research*, 30(2), 259-260.

**Božanić, R.;** Tratnik, L., and Drgalić, I. (2002a). Goat's Milk: Characteristics and Possibility. *Mljekarstvo: Časopis Za*

Chromatography. *Journal of Dairy Research*, 44(2), 213-221.

**Ferreira, I. M. P. L. V. O.;** Pinho, O.; Mota, M. V.; Tavares, P.; Pereira, A.; Goncalves, M. P. and Teixeira, J. A. (2007). Preparation of Ingredients Containing an ACE-inhibitory Peptide by Tryptic Hydrolysis of Whey Protein Concentrates. *International Dairy Journal*, 17(5), 481-487.

**Greyling, N.** (2017). Optimisation of Enzymatic Hydrolysis of Monkfish Heads for Preparing Protein Hydrolysates as Animal Feed Ingredient (Doctoral Dissertation, Stellenbosch: Stellenbosch University)

**Jamdar, S. N.;** Rajalakshmi, V.; Pednekar, M. D.; Juan, F.; Yardi, V., and Sharma, A. (2010). Influence of Degree of Hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE Inhibitory Activity of Peanut Protein Hydrolysate. *Food Chemistry*, 121(1), 178-184.

**Jasińska, B.** (1995). The Comparison of Pepsin and Trypsin Action on Goat, Cow, Mare and Human Caseins. *Roczniki Akademii Medycznej w. Białymstoku* (1995), 40(3), 486-493.

**Korhonen, H. and Pihlanto, A.,** (2003). Food-derived Bioactive Peptides-opportunities for Designing Future Foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1297-1308.

**Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680 -685.

**Lee, K. J.;** Kim, S. B.; Ryu, J. S., Shin; H. S., and Lim, J. W., (2005). Separation and Purification of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Goat's Milk Casein Hydrolysates. *Asian-australasian Journal of Animal Sciences*, 18(5), pp.741-746.

**Li, J.;** Liu, Z.; Zhao, Y.; Zhu, X.; Yu, R.; Dong, S., and Wu, H. (2018). Novel natural angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides derived from sea cucumber-modified hydrolysates by adding exogenous proline and a Study of their Structure-activity Relationship. *Marine drugs*, 16(8), 271.

**Liu, B. L.,** and Chiang, P. S. (2008). Production of Hydrolysate with Antioxidative Activity and Functional Properties by Enzymatic Hydrolysis of Defatted Sesame (*Sesamum indicum* L.). *International Journal of Applied Science and Engineering*, 6(2), 73-83.

**Maruyama, S.;** Miyoshi, S., and Tanaka, H. (1989). Angiotensin I-converting Enzyme Inhibitors Derived from *Ficus Carica*. *Agricultural and biological chemistry*, 53(10), 2763-2767.

**Maruyama, S.;** Nakagomi, K.; Tomizuka, N., and Suzuki, H. (1985). Angiotensin 1-converting Enzyme Inhibitor Derived from an Enzymatic Hydrolysate of Casein. Ii. Isolation and Bradykinin-potentiating Activity on the Uterus and the Ileum of Rats. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(5), 1405-1409.

**Munn, S. M.** (2013). Dairy and Soy Derived Bioactive Peptide and the Renin-angiotensin-aldosterone System. A Thesis Submitted to the Faculty of the Graduate School of the University of Minnesota for the Degree of Master of Science.

**Omara, T.** (2018). Antibacterial Activity of Papain Hydrolysates of 2 Isoelectrically-Isolated Casein and Thermoprecipitated 3 Alpha-lactalbumin From Bovine and Caprine Milk on 4 Diarrheagenic Bacteria 5.

**Otte, J.;** Shalaby, S. M.; Zakora, M., and Nielsen, M. S. (2007). Fractionation and



Identification of ACE-inhibitory Peptides from  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -casein Produced by Thermolysin-catalysed Hydrolysis, *International Dairy Journal*, 17(12), 1460-1472.

**Park**, Y.W.; Juárez, M.; Ramos, M. and Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical Characteristics of Goat and Sheep Milk. *Milk. Small Ruminant Research*, 68(1-2), 88-113.

**Quirós**, A.; Hernández-ledesma, B.; Ramos, M.; Amigo, L. and Recio, I. (2005). Angiotensin-converting Enzyme Inhibitory Activity of Peptides Derived from Caprine Kefir. *Journal of Dairy Science*, 88(10), 3480-3487.

**Raak**, N.; Abbate, R.; Lederer, A.; Rohm, H., and Jaros, D. (2018). Size Separation Techniques for the Characterisation of Cross-linked Casein: A Review of Methods and Their Applications. *Separations*, 5(1), 14.

**Rodriguez**, J.; Gupta, N.; Smith, R. D., and Pevzner, P. A. (2007). Does trypsin cut before proline? *Journal of Proteome Research*, 7(01), 300-305.

**Rutella**, G. S.; Solieri, L.; Martini, S.; and Tagliazucchi, D. (2016). Release of the Antihypertensive Tripeptides Valine-proline-proline and Isoleucine-proline-Proline from Bovine Milk Caseins During In Vitro Gastrointestinal Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(45), 8509-8515.

**Salem**, S.A.; Elagamy, E. I.; Salama, F. and Abosoliman, N. H. (2009). Isolation, Molecular and Biochemical Characterization of Goat Milk Casein and its Fractions. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 11(1), 29-35.

**Schägger**, H. (2006). Tricine-sds-page. *Nature protocols*, 1(1), 16.

**Sica**, D. A. (2005). Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors' Side Effects-physiologic and Non-physiologic Considerations. *The Journal of Clinical Hypertension*, 7, 17-23.

**Sun**, H.; Li, T. J., and Zhao, X. H. (2014). Ace Inhibition and Enzymatic Resistance In Vitro of a Casein Hydrolysate Subjected to Plastein Reaction in the Presence of Extrinsic Proline and Ethanol-or Methanol-water Fractionation. *International journal of food properties*, 17(2), 386-398.

**Tsutsumi**, R. and Tsutsumi, Y. M., (2014). Peptides and Proteins in Whey and Their Benefits for Human Health. *Austin J Nutri Food Sci*, 1(1), 1002.

**Wang**, J.; Su, Y.; Jia, F. and Jin, H., (2013). Characterization of Casein Hydrolysates Derived from Enzymatic Hydrolysis. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 62.

**Wei**, T. M. and Whitney, R. M., (1985). Batch Fractionation of Bovine Caseins with Diethylaminoethyl Cellulose1, 2. *Journal of Dairy Science*, 68(7), 1630-1636.

**Whitney**, R. M. (1988). Proteins of Milk in *Fundamentals of Dairy Chemistry* pp.81-169. Springer, Boston, MA.

**Yangilar**, F., (2013). As a Potentially Functional Food: Goats Milk and Products. *J. Food Nutr. Res*, 1(4), 68-81.