المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك

المجلد (8) العدد (1)
لسنة 2016

دراسة تأثير مثبطات الالفا- اميليز المعزولة من مصادر نباتية في نمو بعض الاعفان

صبري جثير عبود **ابتهاج* مصطفى حكيم**

قسم علوم الاغذية والتقانات الاحيائية/ كلية الزراعة- جامعة بغداد

تأريخ استلام البحث: 5/6/ 2015 تأريخ قبول النشر: 14/4/ 2016

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة لتحديد القدرة التثبيطية لنوعين من مثبطات انزيم الالفا اميليز Al1 و Al2 المعزولة من بذور الباقلاء ومثبط الالفا اميليز Al3 المعزول من بذور الشعير تجاه نمو ستة انواع من الاعفان *Penicillium ssp* و *Aspergillus flavus* و *Aspergillus niger* و *Fusarium Solani* و *Fusarium Semitectum* و *Mucor* وبثلاثة تراكيز 0.1 و 0.2 و 0.3 ملغم/ مل، اذ اثبت امتلاك المثبط المنقى من الباقلاء Al2 اعلى فعالية تثبيطية تجاه نمو اعفان الاختبار، كما بلغت نسبة التثبيط 53.75 و 62.5 و 78.5 و76.25 و 84 و18.8 %على التوالي عند تركيز 0.3 ملغم/ مل تلتها في ذلك Al1 للمثبط المنقى من الباقلاء ثم المثبط المنقى من الشعير Al3، اذ كانت نسبة التثبيط 43.75 و 50 و62.96 و 75 و 80 و 12.5 % و25 و 35 و 25.9 و 72.5 و 40 و 0% على التوالي عند تركيز 0.3 ملغم/ مل، وقد اظهر العفن *F. semitectum* حساسية اكبر تجاه المثبطات المختبرية، اذ بلغت نسبة التثبيط 84 و 80 و 40% لكل من المثبط المنقى من الباقلاء Al2 و Al1 والمثبط المنقى من الشعيرAl3 على التوالي عند التركيز 0.3 ملغم/مل، تلاه في ذلك عفن *F.solani* بنسبة تثبيط 76% للمثبط Al2 و 75% للمثبط Al1 ثم المثبط المنقى من الشعيرAl3 بنسبة 66.7% عند التركيز نفسه.

الكلمات المفتاحية: مثبطات انزيمية، مثبطات الالفا اميليز، مثبطات فطرية.

* **بحث مستل من اطروحة دكتوراة للباحث الثاني.**

المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك

المجلد (8) العدد (1)
لسنة 2016

Study The Effect of α-amylase Inhibitors Isolated from Plant Sources on Some Mold.

Abood S. C. **Hakeem I. M.***
Department of Food Science and Biotechnology
College of Agriculture- University of Baghdad

Abstract

Activity test of the inhibitors purified from barley and broad beans crop proved the inhibition activity against 6 **types of** rots ***Pencillium ssp*** **and** ***Aspergellus****flavus* ***and Aspergillus niger*** **and** ***Fusarium solani and Fusarium semitectum*** **and** ***Mucor*** **with three concentrations 0.1 and 0.2 and 0.3 mg/ml, where the inhibitor purified from the second peak of broad beans proved that it had a higher inhibition activity against the growth of test rots which were 53.75 and 62.5 and 78.5 and 76.25 and 84 and 18.8% respectively, at 0.3 mg/ ml followed by the first peak of the inhibitor purified from broad beans the inhibition activity were 43.75 and 50 and 62.96 and 75 and 80 and 12.5 then the inhibitor purified from barley in which the inhibition activity were 25 and 35 and 25.9 and 72.5 and 40 and 0 respectively, at concentration 0.3 mg/ml.**

Key words: enzyme inhibitors, alpha amylase inhibitors ,molds inhibitors

*Part of Ph.D thesis for second author.

المقدمة

تنتج النباتات عدد من البروتينات يكون لبعضها فعالية في تثبيط انزيم الالفا– اميليز، وتعد هذه المركبات وسيلة للحماية تجاه مهاجمة الاحياء المختلفة، اذ تعمل على منع تحطيم الكربوهيدرات بفعل الانزيمات الهاضمة التي تفرزها هذه الاحياء وتثبيط تغذيتها الطبيعية (13)، وقد اثبت فعالية هذه المركبات المستخلصة من مصادر مختلفة من البذور تجاه نمو انواع مختلفة من الفطريات والحد من قدرتها في انتاج السموم، فقد اشار (11) الى فعالية مثبط الالفا– اميليز المنقى من الذرة الصفراء في تثبيط تكوين الكونديا والهايفات لعفن *A.flavus* وتثبيط قدرة العفن على الانتاج الحيوي للسموم وقد فسر عدد من الباحثين هذه الفعالية نتيجة لتثبيط فعالية انزيم الاميليز المفرز من قبل العفن اذ يعتمد العفن في نموه على تحطيم النشا وتحويله الى كلوكوز ومالتوز ومالتوترايوز بوساطة الافراز الخارجي لانزيم الالفا– اميليز (1؛ 8).

اثبت(3) وجود بروتين بوزن جزيئي مقداره 14 كيلودالتون في صنف من اصناف الذرة له القدرة على تثبيط تكوين الكونديا والهايفات لعفن *A.flavus* واثبت فعالية هذا البروتين على تثبيط فعالية انزيم الاميليز المفرز من قبل هذا العفن، وفي دراسة اخرى على صنف آخر من اصناف الذرة الصفراء تم تشخيص بروتين بوزن جزيئي مقداره 36 كيلودالتون له القدرة على تثبيط نمو عفن *A.flavus* عند تنميته على وسط Potato Dextrose Agar واثبتت النتائج ان فعالية هذا البروتين تعتمد على تثبيط انزيم الالفا– اميليز (7)، وفي سلسلة من البحوث التي قام بها (9؛ 10) اثبت فيها فعالية مثبط الالفا– اميليز المنقى من الذرة الصفراء في تثبيط تكوين السبورات لعفن *Fusarium verticillioides* والسيطرة على انتاج السموم الفطرية لهذا العفن فضلاً عن تثبيط فعالية انزيم الاميليز المفرز من قبل هذا العفن، تعد الانواع التابعة لجنس *Fusarium* من الفطريات الاكثر انتشاراً في الحبوب والبقول المختلفة وهي المسؤولة عن انتاج مجموعة من المركبات الايضية تعرف بـ Fumonisins وقد اثبتت كثير من البحوث ان 25% من المنتجات الزراعية في العالم ملوثة بالسموم الفطرية وان كثير من الامراض تحدث نتيجة تناول اغذية ملوثة بهذه السموم اذ ان لها تأثيراً في صحة الانسان وحيواناته الداجنة (12)،

لذا فقد هدفت هذه الدراسة على اختبار فعالية مثبطات الالفا اميليز المعزولة من الشعير والباقلاء في تثبيط نمو مجموعة من الاعفان.

المواد وطرائق العمل

مثبطات الالفا- اميليز:

تم الحصول على مثبطات الالفا- اميليز المجفدة AI1، AI2 المعزول من الباقلاء والمثبط AI3 المعزول من الشعير حيث تم عزلها وتنقيتها وتوصيفها في كلية الزراعة- جامعة بغداد/ قسم علوم الاغذية.

الاعفان المستعملة في الدراسة:

استعملت في هذه الدراسة عزلات اعفان مختلفة منها ما هي منتجة للسموم او مرضية وقد تم الحصول عليها من كلية الزراعة- جامعة بغداد/ قسم وقاية النبات وشملت على:

Mucor و *Aspergillus niger* و *Aspergillus flavus* و *Penicillium spp* و *Fusarium semiten* و *Fusarium solani*

زرعت عزلات الاعفان على سطح الآكار المائل Potato Dextrose Agar وحضنت بدرجة حرارة 28 م° لمدة 7 ايام ثم حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

تحضير عالق السبورات باتباع الطريقة المذكورة في (6):

تم أضافة 5 مل من الماء المقطر المعقم الى كل من عزلات الاعفان النامية على سطح الآكار المائل المتكون وسط PDA وبعمر 7 أيام، ثم فصلت السبورات عن الوسط الزرعي بوساطة الناقل Loop المعقم مع التحريك البسيط ومرر السائل الحاوي على الخيوط الفطرية والسبورات خلال قمع يحتوي قطناً مغلفاً بشاش (تم تعقيمه في المؤصدة) للتخلص من الخيوط الفطرية ووضعت الانابيب الحاوية على الراشح في جهاز النبذ المركزي لمدة 5 دقائق وبسرعة 3000 دورة/ دقيقة، بعدها اهمل الراشح واضيف للراسب 5 مل من الماء المقطر المعقم ومزج بالمازج الكهربائي Vortex لمدة دقيقة واحدة. أُخذت قطرة من العالق السبوري Spore suspension بماصة باستور ووضعت في شريحة عد كريات الدم Haemocytometer لغرض حساب عدد السبورات في العالق السبوري .تم الحصول على عالق سبوري للاعفان بعد التخفيف بحدود $2-8 \times 10^4$ سبور/ مل .

تحضر محلول اساس من مثبطات الالفا- اميليز:

تم تحضير محلول اساس من مثبطات الالفا- اميليز ولكل نوع على انفراد بتركيز 10 ملغم/ مل، سحب منه 1، 2، 3 مل وأضيف الى 97، 98، 99 مل من الوسط الغذائي PDA المعقم والمبرد الى 45- 50 °م على التوالي. بحيث امتلك الوسط الغذائي (المزيج النهائي) التراكيز 0.1 ، 0.2 ، 0.3 ملغم/ مل وبالترتيب نفسه، في حين ترك وسط غذائي من دون اضافة كمقارنة وصبت الاوساط في اطباق بتري معقمة وتركت لحين التصلب، ولقح كل طبق بقطرة ملء الناقل المعقم Loop من العالق السبوري لكل عفن في وسط الطبق، وحضنت الاطباق على درجة 28 م، اختبرت فعالية المثبط على النمو الشعاعي لاعفان الاختبار بطريقة التسمم الغذائي Poisoned food technique (4) وقيست اقطار نمو المستعمرات خلال 7 ايام وحسبت لها نسبة التثبيط كما في المعادلة:

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{معدل نمو مستعمرة العفن في المقارنة} - \text{معدل نمو مستعمرة العفن في المعاملة}}{\text{معدل نمو مستعمرة العفن في المقارنة}} \times 100$$

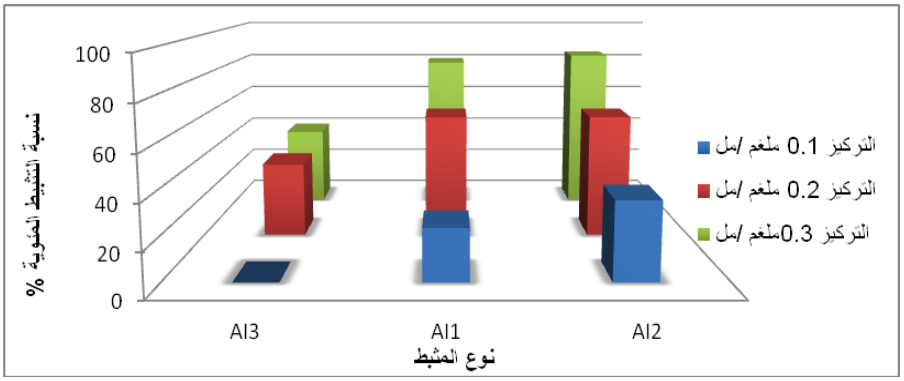
النتائج والمناقشة

دراسة تأثير مثبطات الالفا- اميليز في نمو الاعفان:

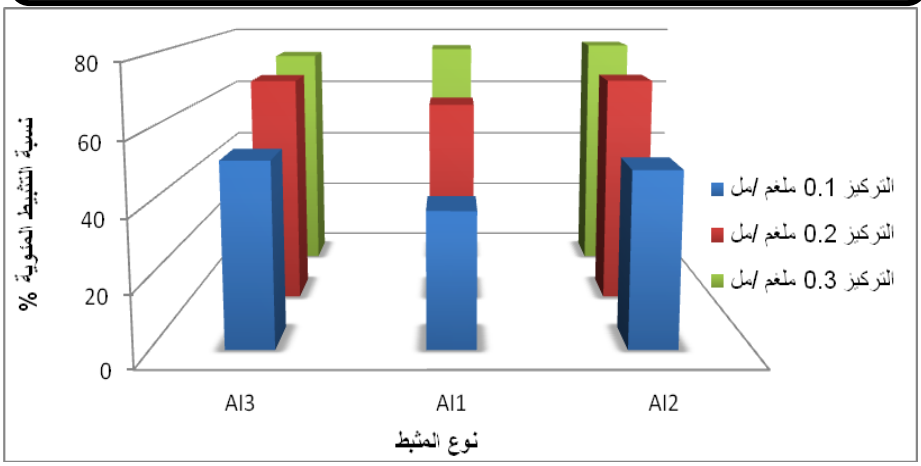
تبين الاشكال (1، 2، 3، 4، 5، 6) نتيجة الدراسة المختبرية للفعالية التثبيطية لمثبطات الالفا- اميليز المنقاة من الشعير والباقلاء، وبثلاثة تراكيز 0.1 و 0.2 و0.3 ملغم/ مل ضد نمو اعفان الاختبار (*Penicillium ssp*، *Aspergillus flavus*، *Aspergillus niger*، *Fusarium solani*، *Fusarium semitectum*، *Mucor*)، وتدل النتائج على امتلاك المثبط AI2 اعلى فعالية تثبيطية في نمو اعفان الاختبار تلته في ذلك AI1 للمثبط المنقى من الباقلاء ثم المثبط المنقى من الشعير AI3 وتزداد هذه الفعالية التثبيطية بزيادة التركيز، اذ تكون الزيادة طردية في الفعل التثبيطي لانواع المثبطات مع تزايد التركيز وانخفاض في معدل نمو مستعمرة اعفان الاختبار، اعلى نسبة تثبيط تظهر عند اعلى تركيز مختبر 0.3 ملغم/ مل، تميز بها مثبط الالفا- اميليز المنقى من الباقلاء AI2 عن

المثبطات الاخرى تلاه في ذلك AI1 ثم المثبط المنقى من الشعير AI3، وقد اظهر العفن *F. semitectum* حساسية اكبر تجاه المثبطات المختبرية، اذ بلغت نسبة التثبيط 84 و 80 و 40% لكل من المثبط المنقى من الباقلاء AI2 و AI1 والمثبط المنقى من الشعير AI3 على التوالي عند التركيز 0.3 ملغم/ مل. تلاه في ذلك عفن *F. solani* بنسبة تثبيط 76% بوساطة AI2 و 75% بوساطة AI1 ثم المثبط المنقى من الشعير AI3 بنسبة 66.7% عند التركيزنفسه (الشكل، 1) و (الشكل، 2).

بينت بعض البحوث الأخرى المقاربة في هذا المجال على نوع من المحاصيل الأخرى (الذرة الصفراء) اذ حصل الباحث (9؛ 10) من خلال سلسلة من البحوث التي اجراها اثبت فيها فعالية مثبط الالفا- اميليز المنقى من الذرة الصفراء في تثبيط تكوين السبورات لعفن *Fusarium verticillioides* والسيطرة على انتاج السموم الفطرية Mycotoxins لهذا العفن فضلاً عن تثبيط فعالية انزيم الاميليز المفرز من قبل هذا العفن.

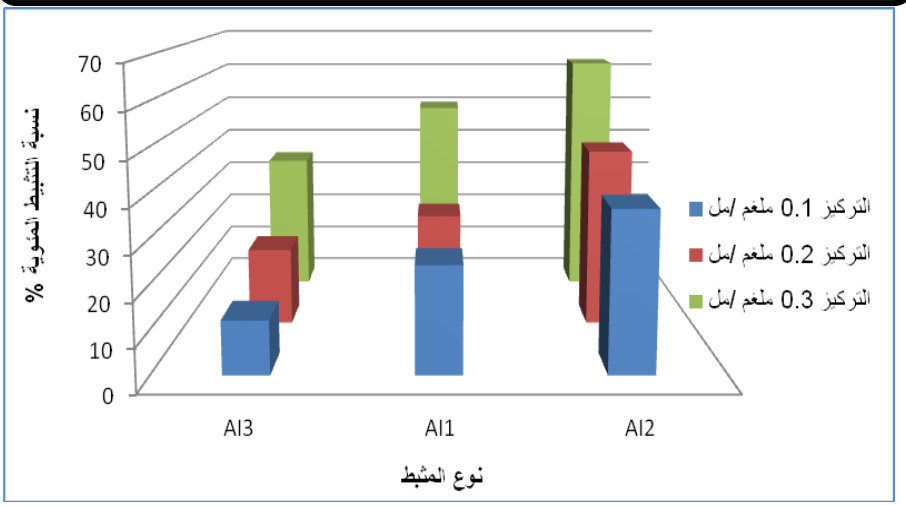


شكل (1): التأثير التثبيطي لمثبطات الالفا- اميليز المنقاة من الشعير والباقلاء في عفن *Fusarium semitectum*.

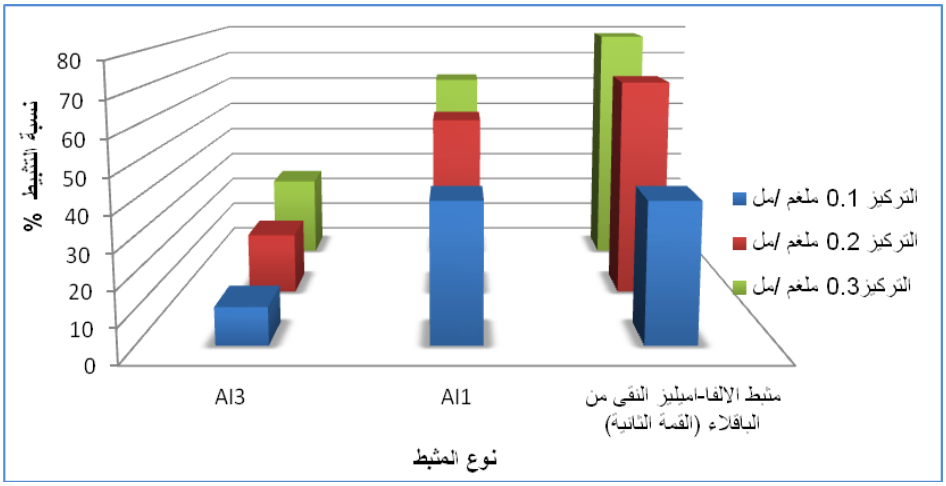


شكل (2): التأثير التثبيطي لمثبطات الالفا- اميليز المنقاة من الشعير والباقلاء في نمو عفن *Fusarium solani*.

يوضح (الشكل، 3 و 4) فعالية مثبطات الالفا- اميليز المنقاة في تثبيط كل من *A.flavus* و *A.niger* ، اذ اظهر مثبط الالفا- اميليز المنقى من الباقلاء Al2 اعلى فعالية تثبيطية بنسبة تثبيط 62.5 و 43.8 و 37.5% عند التراكيز 0.3 و0.2 و 0.1 ملغم/مل على التوالي تجاه عفن *A.flavus* و 78.6 و 67.4 و 40.74% تجاه عفن *A.niger* عند التراكيز نفسها على التوالي، تلاه في ذلك Al1 للمثبط المنقى من الباقلاء، اذ كانت نسبة التثبيط 50 و 27.5 و 25% و 62.96 و 55.55 و 40.74% عند التراكيز 0.3 و 0.2 و 0.1 ملغم/ مل على التوالي في عفني الاختبار *A.flavus* و *A.niger* على التوالي. اما المثبط المنقى من الشعير فأظهر فعالية تثبيطية اقل اذ كانت نسبة التثبيط 35 و 18.75 و 12.5% و25.9 و 18.5 و 11% عند التراكيز 0.3 و 0.2 و 0.1 ملغم/مل على التوالي تجاه كل من *A.flavus* و *A.niger* على التوالي.



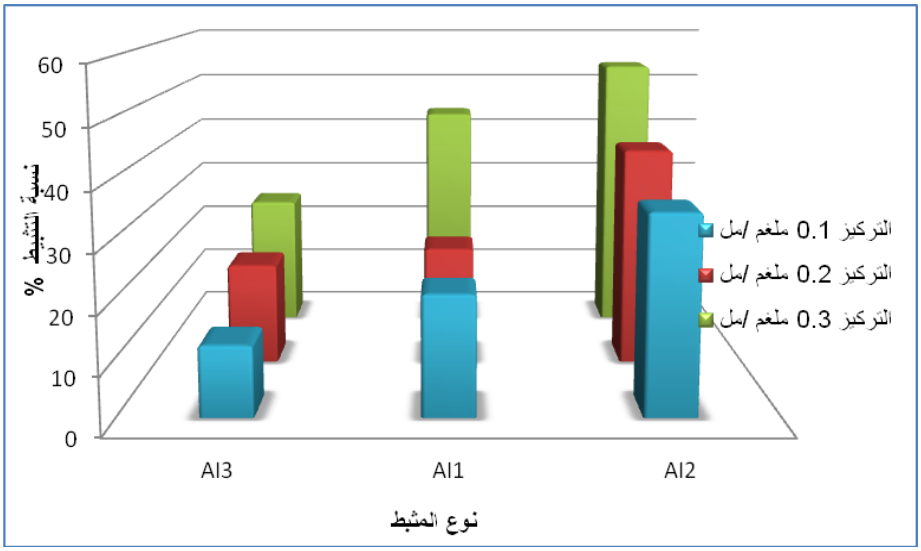
شكل(3): التأثير التثبيطي لمثبطات الالفا– اميليز المنقاة من الشعير والباقلاء في نمو عفن *Aspergillus flavus*.



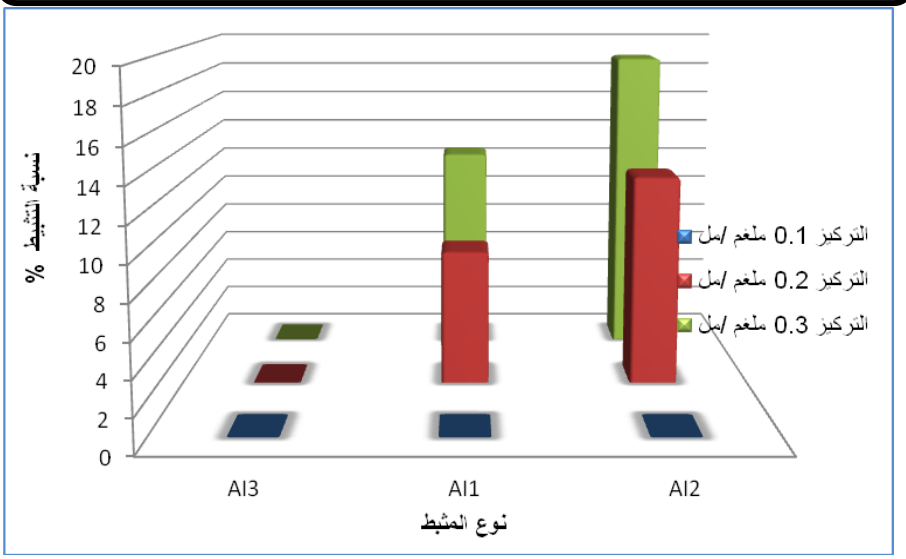
شكل (4): التأثير التثبيطي لمثبطات الالفا– اميليز المنقاة من الشعير والباقلاء في نمو عفن *Aspergillus niger*.

ان الدراسات في هذا المجال محدودة ومركزة على محصول حبوبي آخر هو الذرة الصفراء، اذ اثبت الباحث (11) احتواء صنف من اصناف الذره على بروتين بوزن جزيئي مقداره 28 كيلودالتون له فعالية في تثبيط نمو عفن *A.flavus* وبروتين آخر بوزن جزيئي 100 كيلودالتون يثبط الانتاج الحيوي للافلاتوكسين المفرز من قبل هذا العفن واثبت فعالية هذين البروتينين في تثبيط فعالية انزيم الاميليز المفرز من قبل هذا العفن.

يبين (الشكل، 5 و 6) فعالية مثبطات الالفا- اميليز في تثبيط نمو عفن *Penicillium* و *Mucor*، اذ تظهر النتائج فعالية متوسطة الى ضعيفة اعتماداً على التركيز في تثبيط هذين النوعين من الاعفان، اذ كانت نسبة التثبيط 53.75 و 40.6 و 35% عند التراكيز 0.3 و 0.2 و0.1 ملغم /مل على التوالي للمثبط AI2 المنقى من الباقلاء و 43.75 و21.18 و 21.25% و 35 و 18.7 و 12.5% عند التراكيز السابقة على التوالي للمثبط AI1 المنقى من الباقلاء والمثبط AI3 على التوالي، ولم يظهر التركيز 0.1 ملغم/ مل اي فعالية في تثبيط نمو عفن *Mucor* لكل انواع المثبطات كما لم يظهر المثبط المنقى من الشعير AI3 اي فعالية في تثبيط هذا العفن عند التراكيز المختبرة.



شكل (5): التأثير التثبيطي لمثبطات الالفا-اميليز المنقاة من الشعير والباقلاء في عفن *Penicillium ssp.*.



شكل (6): التأثير التثبيطي لمثبطات الالفا- اميليز المنقاة من الشعير والباقلاء في عفن *Mucor*.

تعتمد قدرة العفن على النمو في البذور المختلفة يعتمد بالدرجة الاولى على افراز انزيم الالفا- اميليز (2)، اذ ان لهذا الانزيم دوراً مهماً في التفاعلات الايضية اللازمه لنمو انواع مختلفة من الفطريات (5)، اذ يعتمد العفن في نموه على النشا كمصدر للكاربون، اذ يعمل على تحطيم النشا الموجود في البذور وتحويله الى سكريات بسيطة عن طريق الافراز الخارجي لانزيم الالفا- اميليز(8)، نستنتج من هذه الدراسة قدرة مثبطات الالفا- اميليز المنقاة من الشعير والباقلاء على الحد من نمو انواع عديدة من الاعفان.

المصادر

1. Chen, M.; Feng, G.; Zen, K. C.; Richardson, M.; Valdes-Rodriguez, S.; Reeck, G. R. and Kramer, K. J. (1992). α-amylases from three species of stored grain Coleoptera and their inhibition by wheat and corn proteinaceous inhibitors. Insect Biochem. 22: 261-268 .

2. Chen, Z.-Y.; Brown, R. L.; Russin, J. S; Lax, A. R. and Cleveland, T. E.(1999) A corn trypsin inhibitor with antifungal activity inhibits *Aspergillus flavus* α-amylase. Phytopathology 89:902-907.

3. Chen, Z.-Y.; Brown, R. L.; Lax, A. R.; Guo, B. Z.; Cleveland, T. E. and Russin, J. (1998). Resistance to *Aspergillus flavus* in corn kernels is associated with a 14-kDa protein. Phytopathology 88:276-281.

4. Dixit, S. N.; Tripathi, S. C. and Upadhyay, R. R. (1976). The antifungal of rose flowers Rosa indica. Economics Botany 30: 371-374.

5. Dohroo, N. P.; Bhardwaj, S. S. and Shyram, K. R.(1987) Amylase and invertase activity as influenced by Pythium pleroticum causing rhizome rot of ginger. Plant Dis. Res. 2:106-107.

6. El-Ghaouth, A.; Joseph,A.; Jean, G. and Alain, A.(1991) Glucanohydrolases and inhibitory activity to Botrytis cinerea. Canadian J. Plant Pathol. 13:315-320.

7. Fakhoury, A. M. and Woloshuk, C. P. (2001). Inhibition of Growth of Aspergillus flavus and Fungal α-Amylases by a Lectin- Like Protein from *Lablab purpure* The American Phytopathological Society 14(8) 955–961.

8. Fakhoury, A. M. and Woloshuk, C. P. (1999) *Amy1*, the α-amylase gene of *Aspergillus flavus*: Involvement in aflatoxin biosynthesis in maiz kernels. Phytopathology 89:908-914.

9. Figueira , E. L. Z.; Blanco- Labra, A.; Gerage, A. C.; Ono, E. Y. S.; Mendiola- Olaya, E.; Ueno, Y. and Hirooka, E. Y. (2003) New amylase inhibitor present in corn seeds active in vitro against amylase from *Fusarium verticilliodes*. Plant Dis. 87 (3): 233-240.

10. Figueira, E. L.; Hirooka, E. Y.; Mendiola- Olaya, E. and Blanco-Labra, A. (2002). Characterization of a Hydrophobic amylase

inhibitor from Corn (*Zea mays*) seeds with activity against amylase from *Fusarium verticillioides*. Phytopathology .93 (8): 917-922 .

11. Huang, Z. Y.; White, D. G. and Payne, G. A. (1997). Corn seed proteins inhibitory to *Aspergillus flavus* and aflatoxin biosynthesis. Phytopathology 87:622-627.

12. Mukanga, M.; Derera J.; Tongoona P. and Laing, M. D. (2010). A survey of pre- harvest ear rot diseases of maize and associated mycotoxins in south and central Zambia. Int. J. Food Microbiol. 141(3): 213- 221.

13. Nair, S. S; Kavrekar, V. and Mishra, A. (2013). *In vitro* studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts . European Journal of Experimental Biology 3(1):128-132