تنقية وتوصيف مثبطات ألفا– اميليز لعاب الانسان من محصول الشعير *Hordeum vulgare*

صبري جثير عبود ابتهاج مصطفى حكيم
استاذ مدرس
قسم علوم الاغذية والتقانات الاحيائية– كلية الزراعة– جامعة بغداد
abtehaj@coagri.uoBaghdad.edu.iq

المستخلص

نقي مثبط اميليز اللعاب من بذور الشعير بعدة خطوات متسلسلة اشتملت على التركيز بأستخدام كبريتات الامونيوم بنسب اشباع متدرجة تراوحت بين (0–90)% اذ تبين زيادة الفعالية التثبيطية والفعالية النوعية لمستخلص الشعير بزيادة نسب الاشباع بكبريتات الامونيوم اذ نجد ان افضل نسبه اشباع بكبريتات الامونيوم كانت عند 70%. اذ اعطت اعلى فعالية تثبيطية وفعالية نوعية لمستخلص الشعير(6 وحده/مل ، 8 وحده/ملغم بروتين على التوالي) بالمقارنة مع نسب التشبع الاخرى 60% ثم 50% اذ بلغت الفعالية التثبيطية 5.8 و5.5 وحده/مل والفعالية النوعية (7.7، 7) وحده/ملغم بروتين على التوالي اما نسب الاشباع 40% ، 30% ، 20% فقد اعطت قيماً اقل اذ بلغت الفعالية التثبيطية (5 ،4.8، 4) وحده /مل والفعالية النوعية (6.6، 6، 5.8) وحده/ملغم بروتين على التوالي، وانخفضت ايضاً الفعالية التثبيطية والنوعية عند نسب الاشباع 80% ، 90% اذ بلغت (5 ،4.5) وحده/مل (6.2، 5.1) وحده /ملغم بروتين على التوالي ، واعقب خطوة الترسيب استخدام تقنية كروماتوكرافيا التبادل الآيوني بعمود DEAE-cellulose بأبعاد (3×11)سم تمت الموازنة بأستخدام محلول الترس الداريء بتركيز 0.005 مولار ورقم هيدروجيني 8 استردت الاجزاء المرتبطة بالمبادل بمحلول الموازنة نفسه والمحتوي على تركيز متدرجة من كلوريد الصوديوم واسفرت النتائج عن وجود قمة واحدة في مرحلة الاسترداد امتلكت فعالية في تثبيط فعالية انزيم اميليز اللعاب ، واجريت خطوات تنقية اضافية متمثلة بأستخدام تقنية الترشيح الهلامي على عمود السيفاكريل S–200 بأبعاد (1.5 × 60) سم فكان عدد مرات التنقية 5.59 وبحصيلة مقدارها 46.5 % ، اظهرت نتائج توصيف مثبط الألفا–اميليز المنقى من الشعير ان القمةاعطت حزمة واحدة عند ترحيلها بأستخدام تقنية الترحيل الكهربائي وقد بلغ الوزن الجزيئي حوالي 23.44 كيلودالتون لقمة المثبط من الشعير في حين بلغ الوزن الجزيئي لقمة المثبط بأستخدام تقنية الترشيح الهلامي على عمود السيفاكريل S–200 تقارب 22.9 كيلودالتون.

الكلمات المفتاحية: انزيم، بروتين، ترسيب البروتين.

مستل من اطروحة دكتوراة للباحث الثاني.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences – 47(4):1039-1048, 2016 Abood & Hakeem

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF SALIVARY AMYLASE INHIBITOR EXTRACTED FROM BARLEY

S. C. Abood I. M. Hakeem
Prof. Lecturer
College of Agriculture/Baghdad University

ABSTRACT

Amylase inhibitors were purified by many sequential steps included concentration by gradual addition of ammonium sulfate at saturation ratios. ranged from 0 to 90% . The best ratio of saturation was found to be 70% as the specific activity and inhibition activity toward Human alpha-amylase(HAS) were the highest (8 U/mg and 6 U/ml respectively as compared to those of the rest ratios, the ratio of saturation with ammonium sulfate 60 % and then 50%, (5.8, 5.5)U/ml and(7، 7.7)U/mg respectively for inhibition activity and specific activity and for 40% ,30%20% saturation the inhibition activity and specific activity were(4، 4.8، 5) u/ml (5.8، 6، 6.6) u/mg respectively .The precepitation step was followed by ionic exchange chromatography technique by DEAE-cellulose column(11×3)cm and the results showed that there was one peak with inhibition activity toward (HAS). Further purification steps were conducted using gel filtration on Sephacryl S-200 column (1.5 × 60)cm; the purification folds was5.59 times with outcome of 46.5%.The results of alpha-amylase inhibitors characterization showed that the molecular weight was about 23.44 and 22.9 kDa as determined by electrophoresis and gel filteration respectively.

Kay words / enzyme ,protein,protein precipitation

Part of PhD. Dissertation for the second auther

المقدمة

ان الاغذية النشوية كالحبوب والبقول من الاغذية المهمة التي يمكن خزنها لفترات طويلة، وتتميز بكونها مصدراً غذائياً مهماً في كثير من دول العالم حيث انها غنية بالبروتينات والكاربوهيدرات والدهون مما يجعلها عرضة للمهاجمة من كثيرمن الحشرات والفطريات خلال مدة خزنها وهذه تسبب ضياع كميات هائلة من البذور مما يؤثر سلبا في الحالة الانتاجية وحصول خسارة كبيرة تصل احيانا الى اكثر من 40% (12). تعتمد هذه الكائنات في تغذيتها على ما تفرزه من انزيم الاميليز من لعابها فهو مهم لبقائها لذا يعد هذا الانزيم الهدف للحد من تدهور حاصل الحبوب وبذور المحاصيل المختلفة. اهتم الباحثون بوضع محاولات عدة لتقليل الخسارة الناتجة كأستخدام المبيدات الكيمياوية والتي اثبتت اثارها السلبية على البيئة والانسان على حدٍ سواء، فلجأ الآخرون الى استخدام اسلوب المكافحة الحيوية كأسلوب بديل عن المكافحة الكيميائية والتي اثبتت فعاليتها في معظم بلدان العالم (11). تمتلك النباتات ستراتيجية خاصة للدفاع تجاه مهاجمة الكائنات المختلفة حيث تبدأ بتكوين كثير من مركبات الآيض الثانوية التي تتراكم في انسجة النبات المختلفة خلال مراحل نموه ومن بين هذه المركبات المثبطات الانزيمية، تتواجد المثبطات الانزيمية في العديد من البذور ويتميز دورها في اعاقة عملية هضم المواد النشوية عن طريق تثبيط فعالية انزيم الألفا – اميليز المسؤول عن ايض الكاربوهيدرات(16). وقد تم التعرف على مثبطات الألفا –اميليز في كثير من النباتات منذ عام 1933 وبدأ البحث عن هذه المثبطات في البذور المختلفة حيث اثبتت فعاليتها في تثبيط انزيم الاميليز المفرز من قبل انواع مختلفة من الحشرات التي تتغذى على البذور (11) واثبتت فعاليتها ايضا تجاه انزيم الاميليز المفرز من قبل انواع مختلفة من الاعفان (9)، كما عرفت مثبطات الألفا اميليز المعزولة من الحبوب بفعاليتها في السيطرة على زيادة الوزن وعلى ارتفاع مستوى السكر في الدم وذلك لقدرتها على تثبيط اميليز لعاب وبنكرياس الانسان المسؤول عن ايض الكاربوهيدرات، فتوجهت الانظار نحو استخدام هذه المثبطات كعلاجات بديلة لمرضى السمنة والسكري (24) ونظراً لأهمية المثبطات الانزيمة اجريت هذه الدراسة التي هدفت الى استخلاص مثبطات الألفا اميليز من محصول الشعير واتباع عدد من الخطوات المتسلسلة لغرض تنقيته ومن ثم توصيف المثبط بالاعتماد على عدد من طرائق الكروماتوغرافيا.

المواد والطرائق مصادر البذور

تم الحصول على بذور الشعير صنف اباء 99 من الهيئة العامة للبحوث الزراعية في ابي غريب، نظفت البذور يدوياً من الشوائب والاتربة، ثم خزنت في أكياس من البولي اثلين المغلقة بصورة محكمة بدرجة حرارة الثلاجة لحين الاستخدام.

طحن البذور

طحنت البذور الكاملة Whole seed باستخدام المطحنة الكهربائية المنزلية للحصول على طحين ناعم ومتجانس، ثم خزنت باكياس من البولي اثلين واغلقت بصورة محكمة وخزنت بدرجة حرارة الثلاجة.

استخلاص مثبطات الألفا–اميليز

استخلص مثبط الألفا–اميليز من طحين البذورالكاملة بحسب الطريقة التي اعتمدها Heidari وآخرون (14)، حيث استخلصت باضافة الماء المقطر الى الطحين الناعم المتجانس وبنسب خلط (11:1) (وزن : حجم) باستعمال التحريك المغناطيسي لمدة 60 دقيقة في درجة حرارة 25°م، ثم نبذ الخليط مركزيا بسرعة 2500 xg لمدة 30 دقيقة ودرجة حرارة 4°م، بعدها اخذ الرائق الحاوي على المثبط وهو المستخلص الخام لتقدير فعالية التثبيط بالاعتماد على تقدير فعالية الألفا–اميليز المتبقية بعد حضن المثبط مع محلول الانزيم وقدر ايضا تركيز البروتين، لحساب الفعالية النوعية في المستخلص الخام وكما مبين في الفقرات اللاحقة.

تقدير فعالية الألفا–اميليز:

اعداد المنحنى القياسي للمالتوز:

المواد والمحاليل المستخدمة محلول هيدروكسيد الصوديوم 2 مولار *NaOH*

محلول المالتوز الخزين (2 ملغم/مليلتر)

كاشف 5,3 حامض ثنائي نيتروسلسليك *3,5 Dinitrosalicylic acid (DNSA)*

حضر بحسب الطريقة الموصوفة من قبل(29) باذابة 1 غم من كاشف DNSA في 50 مل ماء مقطر وبعد انتشار المادة بالماء المقطر أضيف 20 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 2 مولار لغرض الاذابة ثم أضيف 30 غم

ملح روشل (ترترات الصوديوم – بوتاسيوم) وبشكل تدريجي على خلاط مغناطيسي لحين الاذابة واكمل الحجم إلى 100 مل بواسطة الماء المقطر بعد ذلك مزج المحلول وحفظ بقنينة معتمة لحين الاستخدام.

المواد والطرائق

1.تم تحضير تراكيز متدرجة من محلول المالتوز القياسي 2 (ملغم/ مليلتر) من (0–2) ملغم /مل في انابيب اختبار، ثم اضيف اليها الحجوم المناسبة من الماء المقطر

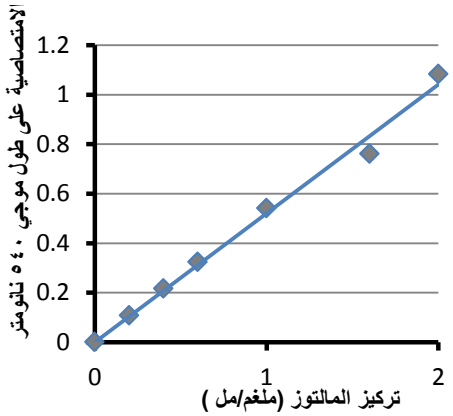
2 .اضيف 1.0 مليلتر من كاشف DNSA لكل انبوبة

3. وضعت الانابيب في حمام مائي بدرجة الغليان لمدة 5 دقائق.

4. بردت الانابيب مباشرة بماء الحنفية.اضيف 10 مليلترماء مقطر الى كل انبوبة ومزجت المحتويات جيدا باستعمال المازج Vortex.

5. قرئت الامتصاصية على طول موجي 540 نانومتر، وصفر الجهاز باستخدام الانبوبة الاولى الكفء (Blank).

6. رسم المنحنى القياسي لكمية المالتوز (ملغم/مليلتر) مقابل الامتصاص عند الطول الموجي 540 نانومتر.



شكل 1 .المنحنى القياسي للمالتوز باستخدام تراكيز مختلفة من المالتوز(0– 2) ملغم/مل وبأستخدام كاشف 5,3 حامض ثنائي نيتروسلسليك وقراءة الامتصاصية عند طول موجي 540 نانومتر.

تقدير الفعالية الانزيمية : المواد والمحاليل المستعملة

1. محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 0.02 مولار ورقم هيدروجيني 2.6

2. محلول المادة الاساس (1 % النشا الذائب) اضيف 1.0 غرام من النشا الى 25 مليلتراً من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ ثم اضيف الى الخليط 50 مليلتراً من الدارئ نفسه مع الاستمرار بالغليان لمدة دقيقة واحدة، بعدها ترك المحلول ليبرد ثم اكمل الحجم الى 100 مليلتر باستخدام المحلول نفسه.

2.طريقة التقدير

قدرت الفعالية الانزيمية على وفق الطريقة التي وصفها Whitaker وجماعته(29) واعتمادا على السكريات المختزلة المتحررة نتيجة التحلل المائي للنشا بفعل الانزيم وقدرت الفعالية الانزيمية على وفق الخطوات الاتية وبواقع ثلاثة مكررات لكل نموذج:

1. وضع 0.9 مليلتر من محلول المادة الاساس (1% نشا) في انبوبة اختبار وحضن في حمام مائي بدرجة حرارة 37°م لمدة 5 دقائق.

2. اضيف 0.1 مليلتر من محلول الفا–اميليز اللعاب الخام الى الانابيب وترك التفاعل لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 37°م

3. اوقف التفاعل باضافة 1.0 مليلترمن محلول DNSA.

4.وضعت الانابيب في حمام مائي مغلي لمدة 5 دقائق .

5.بردت الانابيب مباشرة تحت ماء الحنفية واضيف 10 مليلتر ماء مقطر لكل انبوبة ومزجت جيدا باستعمال المازج Vortex.

6. قيست الامتصاصية على الطول الموجي 540 نانومتر، واستخدمت عينة كفء لتصفير الجهاز بتحضيرها بالطريقة نفسها ما عدا اضافة محلول الانزيم بعد اضافة محلول DNSA لمنع حدوث التفاعل. تعرف وحدة الفعالية الانزيمية Enzymatic activity (وحده/ مليلتر) بانها كمية الانزيم التي تحرر 1.0 مايكرومول من السكريات المختزلة (المالتوز) في الدقيقة الواحدة وتحت ظروف القياس.

تقدير الفعالية التثبيطية

قدرت الفعالية التثبيطية للمستخلص الخام بحسب الطريقة التي اعتمدها (11) وبحسب الخطوات الاتية:

1.وضع 1.0 مليلتر من الفا– اميليز لعاب الانسان الخام في انبوبة اختبار

2. اضيف 1.0 مليلترمن مستخلص مثبط الألفا–اميليز الخام المحضر وبواقع ثلاثة مكررات لكل نموذج.

3.حضن الخليط في حمام مائي بدرجة حرارة 37°م ولمدة 30 دقيقة لاتمام تفاعل التثبيط .

4. اخذ 0.1 مليلتر من كل انبوب وقدرت فعالية الاميليز المتبقية وبحسب الخطوات الواردة سابقا تعرف وحدة المثبط (وحده/مليلتر) بانها كمية المثبط اللازمة لتثبيط وحدة واحدة من الانزيم. اما النسبة المئوية لفعالية التثبيط Inhibition activity % فيعبر عنها بحسب القانون الآتي (31):

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

وحسبت الفعالية النوعية للمثبط Specific activity التي تعبر عن وحدة فعالية المثبط لكل ملغم بروتين بحسب القانون الآتي (29):

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

6- تقدير البروتين استخدمت طريقة Bradford في تقدير تركيز البروتين في المستخلصات الخام والمنقاة (5).

خطوات تنقية مثبطات الألفا- اميليز

التركيز بكبريتات الامونيوم ركز المثبط بكبريتات الامونيوم وبنسبة اشباع 70% ، فصل الراسب في جهاز النبذ المركزي بسرعة 3000 xg ولمدة 25 دقيقة ودرجة 4°م. اهمل الرائق واذيب الراسب في كمية من دارئ الفوسفات بتركيز 0.2 مولار ورقم هيدروجيني 7. قدرت بعدها الفعالية التثبيطية وتركيز البروتين، ثم اجريت عملية الديلزه لمدة 10 ساعات بدرجة حرارة الثلاجة، بعدها قدرت كل من الفعالية التثبيطية وتركيز البروتين وعلى وفق الفقرات المذكورة آنفاً(14).

تنقية مثبطات الألفا- اميليز بأستخدام كروماتوكرافيا التبادل الايوني باستخدام المبادل ثنائي اثيل امينو اثيل سليلوز romatography DEAE-Cellulose ion exchange

استحدم المبادل الآيوني DEAE و اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Whitaker (28) في تحضير العمود و تمت موازنته بمحلول الترس الدارئ pH 8 وعبأ ليعطي عمودا بأبعاد 3×11 سم وبسرعة جريان 30 مليليتر/ ساعة.

كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي بهلام السيفاكريل S-200 استخدم هلام السيفاكريلS-200 وعبيء في عمود زجاجي بابعاد (1.5 x 60) سم بسكب محلول الهلام وبشكل مائل على الجدار الداخلي للعمود، ولتجنب تكون فقاعات هوائيه اجريت العملية ببطء وبصورة مستمرة ، ومرر دارئ فوسفات البوتاسيوم ذي رقم هيدروجيني 7 بسرعة جريان 60 مليلتر / ساعه للموازنة

اضافة النموذج/ بعد تعبئة العمود وموازنته اضيف المحلول الحاوي على المثبط والذي تم الحصول عليه بعد خطوة الاسترداد بعد تركيزه باستخدام السكروز على سطح العمود بشكل تدريجي وبالقرب من سطح الهلام. اجريت عملية الاسترداد بوساطة محلول الفوسفات الدارئ (0.2 مولار ورقم هيدروجيني 7) وبسرعة جريان 60 مليلتر/ ساعة وبواقع 3 مليلتر للجزء الواحد وقرئت الامتصاصية على الطول الموجي 280 نانومتر للاجزاء المستردة . تمت متابعة الاجزاء الحاوية على الفعالية ضمن القمة الواحدة وجمعت وقيس حجمها وقدرت الفعالية التثبيطية وتركيز البروتين وكما ورد سابقا.

توصيف مثبط الألفا-اميليز تعيين نقاوة مثبطات الاميليز بوساطة الترحيل الكهربائي في هلام الاكريل- اميد المتعدد بوجود الـ SDS ***SDS- poly acrylamide gel electrophoresis*** اتبعت الطريقة التي قام بوصفها Laemmli (18) في تعين نقاوة المثبط بوساطة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل اميد بوجود العوامل الماسخة (SDS-PAGE) باستخدام جهاز الترحيل الكهربائي وقيست المسافة التي قطعتها صبغة البروموفينول الازرق من السطح العلوي للهلام الى مركز حزمة الصبغة لاستخراج الوزن الجزيئي، وقيست المسافة من السطح العلوي للهلام الى مركز حزم البروتينات القياسية المنفصلة واستخرجت قيمة الحركة النسبية Relative mobility (Rm) لكل بروتين

2.تعيين الوزن الجزيئي بطريقة الترشيح الهلامي عين الوزن الجزيئي لمثبط الألفا-اميليز المنقى بطريقة الترشيح الهلامي باستعمال عمود السيفاكريل S-200 واتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Weselake (26) في تقدير الوزن الجزيئي و باعتماد البروتينات القياسية التالية

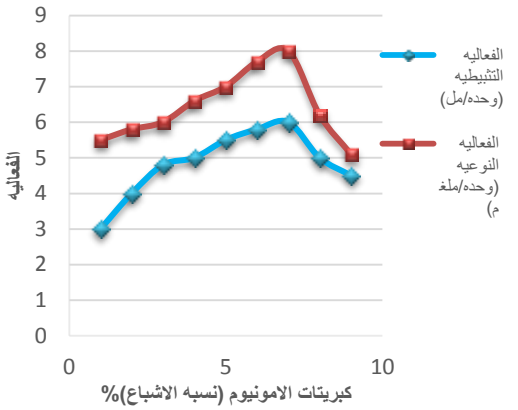
محلول البروتينات القياسية حضرت محاليل البروتينات القياسية بتركيز 10 ملغرام / مليلتر في محلول دارئ فوسفات البوتاسيوم 0.2 مولار ورقم هيدروجيني 7، واشتملت هذه البروتينات على

Lysozyme (14.4 KDal)
Trypsin (23.8 KDal)
Pepsin (35 KDal)
Ovalbumin (43 KDal)
Bovine serum albumin (67 KDal)

النتائج والمناقشة

تنقية مثبطات الألفا–اميليز: استخدمت عدة خطوات متسلسلة ومتعاقبة لغرض تنقية مثبطات الألفا–اميليز من المستخلص الخام للشعير للتخلص من اكبر كميه ممكنه من المكونات الاخرى الموجودة مع هذه المثبطات ولغرض دراسة خواص المثبط وصفاته لابد من الحصول عليه بدرجة عالية من النقاوة تصل الى حد التجانس لان وجود مركبات ومواد اخرى ملوثة تؤدي الى الوصول الى نتائج غير صحيحة واشتملت خطوات التنقية على ما يأتي:

تركيز مثبطات الألفا–اميليز: يظهر الشكل 2 نتائج تركيز وترسيب المثبط اذ تبين زيادة الفعالية التثبيطية والفعالية النوعية بزيادة نسب الاشباع بكبريتات الامونيوم اذ نجد ان افضل نسبه اشباع بكبريتات الامونيوم كانت عند 70% لمستخلص الشعير.اذ بلغت الفعالية التثبيطية والفعالية النوعية 6 وحده/مل، 8 وحده/ملغم بروتين على التوالي.

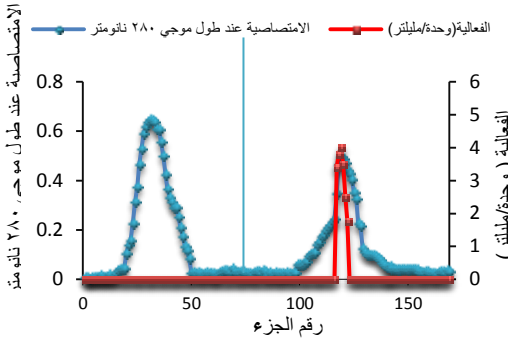


شكل2. نسب الاشباع بكبريتات الامونيوم لترسيب مثبطات الألفا–اميليز من الشعير

تلتها نسبة الاشباع 60% ثم 50% اذ بلغت الفعالية التثبيطية 5.8 و5.5 وحده/مل والفعالية النوعية (7.7، 7) وحده/ملغم بروتين على التوالي اما نسب الاشباع 40%، 30%، 20% فقد اعطت قيماً اقل اذ بلغت الفعالية التثبيطية (5، 4.8، 4) وحده /مل والفعالية النوعية (6.6، 6، 5.8) وحده/ملغم بروتين على التوالي، وانخفضت ايضاً الفعالية التثبيطية والنوعية عند نسب الاشباع 80% ، 90% اذ بلغت (5، 4.5) وحده/مل (6.2، 5.1) وحده /ملغم بروتين على التوالي .تستخدم كبريتات الامونيوم بشكل واسع في تركيز البروتينات اذ تتميز بصفات ايجابية مثل رخص ثمنها وتوفرها وذائبيتها العالية في الماء ولاتسبب مسخاً لكثير من البروتينات عند ترسيبها.ان تركيز البروتينات بكبريتات الامونيوم يعتمد على طبيعة توزيع المجاميع الوظيفية (الايونية والقطبية والكارهة للماء) وكثافة و توزيع الشحنات على سطح البروتين حيث يعمل الملح على معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين والاخلال بطبقة الماء المحيطة بجزيئة البروتين مما يؤدي الى انخفاض ذائبيته وترسبه (4). اشارت كثير من الدراسات الى استخدام كبريتات الامونيوم في تركيز مثبطات الألفا–اميليز وتختلف نسب الاشباع المستخدمة اعتماداً على نوع البذور وطبيعة المثبط ونوع محلول الاستخلاص فقد استخدمها Blanco-Labra (3) بنسبة اشباع 60% لتركيز مثبطات الألفا–اميليز من الذرة واستخدمت كبريتات الامونيوم في تركيز المثبطات من الشعير بنسبة اشباع 70% (17) واستخدمها ايضاً Weselake (26) في تركيز المثبطات من مستخلص الشعير و بالنسبة المذكورة آنفاً نفسها وهذا يتوافق مع ما توصلنا اليه من نتائج اذ سجلت نسبة الاشباع 70% اعلى فعالية نوعية في تركيز المثبط من مستخلص الشعير . تلت خطوة الترسيب اعادة الاذابة في محلول دارىء الفوسفات 0.2 مولار ورقم هيدروجيني 7 ثم اجريت عملية النضح الغشائي للتخلص من املاح الكبريتات الذي قد يؤثر في فعالية المثبط اعقبها التركيز بأستخدام السكروز وكما يلاحظ من الجدول 3 ان الفعالية النوعية لهذه الخطوة بلغت (8.32) وحدة / ملغم بروتين وان عدد مرات التنقية (1.38) مرة مع حصيلة مقدارها (34.8)% لمستخلص الشعير

2. كروما توكرافيا التبادل الآيوني اظهرت خطوة التنقية بعمود المبادل الايوني السالب DEAE-Cellulose انفصال قمة واحدة في مرحله الغسل حيث تم قياس الامتصاصية لاجزاء الغسل على طول موجي 280 نانومتر كما يظهر الشكل 3، بعدها تم استرداد البروتينات المرتبطة والتي تحمل شحنة مخالفة لشحنة المبادل (البروتينات السالبة) بأستخدام التدرج الملحي بواسطة محلول الترس الداريء المحتوي على تراكيز متدرجة من ملح كلوريد الصوديوم (0–1) مولار، حيث لوحظ ظهور قمة واحدة في مرحلة الاسترداد وعند قياس الفعالية التثبيطية للقمتين تبين ان القمة الناتجة في مرحلة الغسل لا تمتلك فعالية في تثبيط اميليز اللعاب وامتلاك القمة الناتجة من مرحلة الاسترداد فعالية وقد تركزت القمة في

الاجزاء المنفصلة (114–124) شكل 3 وهذا يعني ان المثبط يحمل شحنة سالبة تحت الظروف المستخدمه في التجربة ما ساعده على الارتباط بمادة العمود،. بعدها جمعت الاجزاء الفعالة وقدرت فعاليتها التثبيطية والنوعية.



شكل 3. كروماتوكرافيا التبادل الايوني لتنقية مثبطات الألفا –اميليز من الشعير باستعمال عمود المبادل الايوني (DEAE-Cellulose) بابعاد (3×11) سم

تمت الموازنة بأستخدام محلول الترس الداريء بتركيز 0.005 برقم هيدروجيني 8 استردت الاجزاء المرتبطة بالمبادل بمحلول الموازنة نفسه والمحتوي على تراكيز متدرجة من كلوريد الصوديوم تراوحت 0–1 مولار وبسرعة جريان 60 مل/ساعة بواقع 3 مل للجزء الواحد. وقد بلغت الفعالية النوعية 26.7 وحدة /ملغم بروتين لقمة مستخلص الشعير. كما بلغت عدد مرات التنقية لهذه الخطوة 4.47 مرة وبحصيلة مقدارها 77.4% جدول 1 ثم استعملت هذه الاجزاء الفعالة في استكمال المراحل اللاحقة من التنقية. اشارت كثير من الدراسات ان نقطة التعادل الكهربائي لمثبطات الاميليز المستخلصة من البذور هي اقل من 8 كتفسير للنتيجة التي حصلنا عليها عند الفصل على عمود التبادل الآيوني اذ تم الغسل بداريء الترس برقم هيدروجيني 8 وكان المثبط ضمن البروتينات المرتبطة وهذا يعني انه يحمل شحنة سالبة. ومن الامور المهمة التي يجب الاشارة اليها هي ان البروتينات التي لم ترتبط بالمبادل الايوني السالب وتم فصلها في جزء الغسل تعود الى بروتينات تحمل محصلة شحنة سالبة منعتها من الارتباط بالمبادل الايوني السالب المشابه لها بالشحنة في حين ان البروتينات التي لاتحمل على سطحها شحنات مخالفة لشحنة المبادل تزداد قدرتها على الادمصاص على سطح المبادل المخالف لها بالشحنة وقد يكون الارتباط شديد بحيث يصعب فصلها لذا فأن زيادة تركيز الملح في داريء الاسترداد يساعد في عملية فصل مثل هذه البروتينات. وتعد طريقة التبادل الايوني من الطرق الملائمة في الفصل اذ يمكن بواسطتها تمييز نوعين من البروتينات، الفرق بينهما حامض اميني واحد (20). كما يمتاز المبادل الايوني DEAE-cellulose بسمات مرغوبة منها استيعابه الواسع وفصله العالي وسهوله تحضيره وامكانية استخدامه عدة مرات. وقد استخدمت المبادلات الايونية الطبيعية التي هي عبارة عن مشتقات السليلوز بسبب ملاءمتها لفصل البروتينات فضلاً عن الاحتمالات القليلة لمسخ البروتين حيث يحتفظ البروتين بعد استرداده من المبادل بفعاليته (4). لقد استخدمت المبادلات الايونية المختلفة في عدد من الدراسات المتعلقة بتنقية مثبطات الألفا–اميليز من انواع مختلفة من الحبوب والبقول. فقد استخدمت من قبل Weselake وجماعته (27) و Jun-ichi (17) عند تنقية المثبط من الشعير كذلك استخدمت من قبلYi-Hung (32) في تنقية المثبط المستخلص من الرز واستخدم كل من Wisessing وجماعته (30) وHeidari وجماعته (14) كروموتوكرافيا التبادل الايوني في تنقية المثبطات المستخلصة من الحنطة. قد تكون خطوة التبادل الايوني كافية لتنقية مثبط الألفا–اميليز غير ان استعمال خطوات تنقية اخرى يحقق درجة اعلى من النقاوة لذا استكملت عملية تنقية المثبط قيد الدراسة بعد تركيزه بأستعمال السكروز بخطوة الترشيح الهلامي.

3. كروما توكرافيا الترشيح الهلامي:

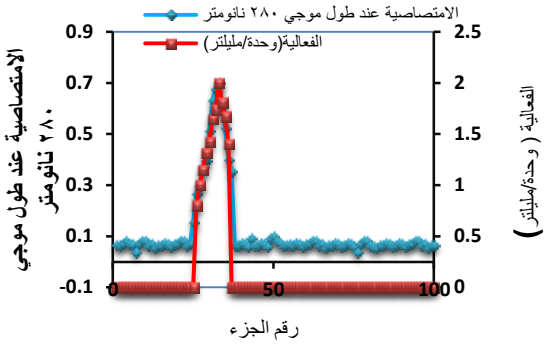
اجري الترشيح الهلامي بأستعمال هلام السيفاكريل S-200 لما يتمتع به من خصائص جيده فهو يحتوي على الاكريل امايد فضلاً عن الدكسترات مما يعطيه صلابةومقاومة للانضغاط ويمتاز كذلك بالفصل الجيد والسريع وسهولة الاستخدام والتحضير (2)، مررت قمةالمثبط التي تم الحصول عليها من مرحلة التبادل الايوني خلال عمود هلام السفاكريل وعند تمرير القمة لوحظ انفصال قمه بروتينية واحده شكل 4 ، وقد حققت هذه القمة عدد مرات تنقية 5.59 وحصيلة مقدارها 46.5 جدول 1 وكما يظهر من الشكل 4 تطابق قمة البروتين والفعالية ويعد هذا التطابق احد ادلة النقاوة للبروتين (28) بعدها تم تركيز المحلول البروتيني المنقى الناتج من هذه الخطوة بتجفيفه بالتجفيد

Lyophilization بأستخدام جهاز Freeze-Dry لاستخدامه في التجارب اللاحقه من الدراسة.

جدول 1 . خطوات تنقية مثبطات الألفا–اميليز المستخلصة من الشعير

خطوات التنقية	الحجم (مليلتر)	الفعالية (وحدة /مليلتر)	البروتين (ملغم / مليلتر)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم بروتين)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة %
المستخلص الخام	50	3.1	0.52	5.96	155	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم 70%	15	6	0.73	8.22	90	1.38	58.1
التبادل الايوني بعمود DEAE-Cellulose	18	4	0.15	26.7	72	4.47	46.5
الترشيح الهلامي بأستعمال هلام Sphacryl s-200	33	2	0.06	33.3	66	5.59	42.6

استخدمت خطوة الترشيح الهلامي وبأستخدام انواع هلام مختلفة في كثير من الدراسات المتعلقة بتنقية مثبطات الألفا–اميليز من مصادر مختلفة، فقد استخدمت هذه الخطوة كخطوة اخيرة في تنقية المثبط من الشعير(27) و(1) واعتمد Jun-ichi وجماعته(17)على خطوه الترشيح الهلامي كخطوة اخيرة بعد خطوتي تبادل ايوني في تنقية مثبطات الاميليز من الشعير ايضاً كما استخدم عمود الترشيح الهلامي بعد خطوة التبادل الايوني في تنقية مثبطات الاميليز من الرز(32). كما استخدم Gilbert وجماعته (13) و Watanabe وجماعته (25) تقنية الترشيح الهلامي كخطوة اولى في تنقية المثبطات من الحنطة.



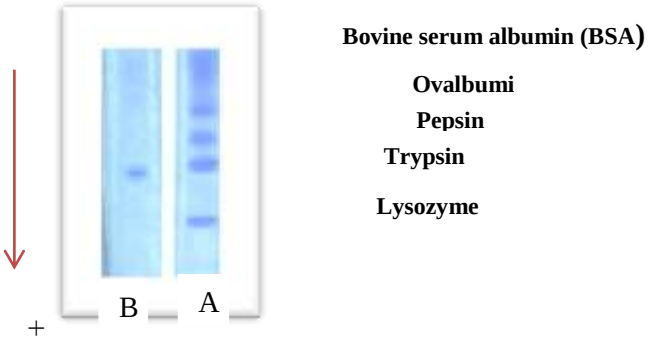
شكل4 .كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي في عم ود السيفاكريلS-200 بأبعاد 1.5×60 سم لتنقية مثبط الألفا– اميليز المستخلص من الشعير

تمت الموازنة والاسترداد بمحلول فوسفات الصوديوم الداريء بتركيز 0.2 مولار وبرقم هيدروجيني 7، بسرعة جريان 60 مليلتر /ساعة وبواقع 3مل للجزء الواحد .

2 – توصيف مثبطات الألفا –اميليز المنقاه:

تعيين نقاوة المثبط بأستخدام تقنية الترحيل

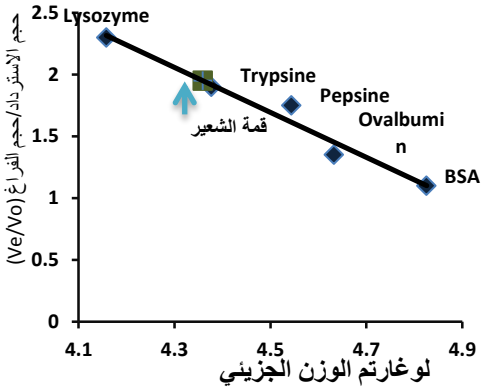
أظهر ترحيل المثبط المنقى على هلام البولي اكريلامايد وجود حزمة واحدة شكل5، وهذه احدى ادلة النقاوة ، وهذا يعطي صورة واضحة عن مدى كفاءة عمليات التنقية. تعتمد حركة البروتينات في هلام متعدد الأكريل آمايد بوجود العوامل الماسخة على الوزن الجزيئي لهذه البروتينات ومقدار حركتها التي تتناسب بشكل عكسي مع وزنها الجزيئي وعليه يمكن فصل البروتينات بصورة واضحة بدلا من اعتماد الترحيل الكهربائي بغياب العوامل الماسخة لاعتمادها على شحنة البروتينات والوزن الجزيئي والتي قد تعطي نتائج خاطئة في بعض الأحيان نتيجة لتشابه أو تقارب محصلة الشحنة لبعض البروتينات (19).



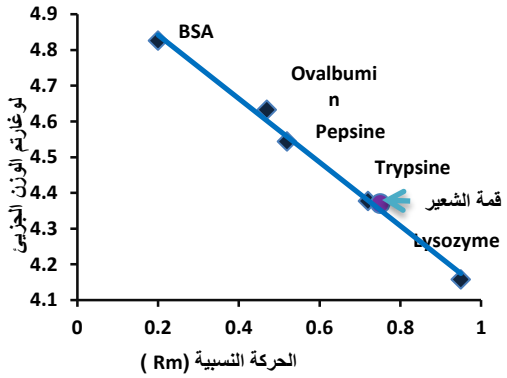
شكل 5. الترحيل الكهربائي لمثبط الألفا –اميليز المنقى من الشعير بتقنية الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود المادة الماسخة(SDS-PAGE) A البروتينات القياسية B قمة المثبط

2. تعيين الوزن الجزيئي للمثبطات اتبعت طريقتان لتقدير الوزن الجزيئي لمثبط الألفا –اميليز كانت الاولى بأستخدام

الترشيح الهلامي على عمود السفاكريل S-200 المحضر بأبعاد (1.5 × 60) سم اذ تم اولاً تعيين حجم الفراغ Void Volum) Vo للعمود بواسطة الدكستران الازرق Blue dextran كما تم تعين حجوم الاسترداد Elution (voleum) Ve لقمة المثبط المنقى والبروتينات القياسية وبشكل منفرد لكل بروتين وحسبت نسبة حجم الاسترداد لكل بروتين قياسي لقمة المثبط الى حجم استرداد الدكستران الازرق. ومن خلال رسم العلاقة بين نسبة حجم الاسترداد الى حجم الفراغ (Ve/Vo) للبروتينات القياسية مقابل لوغاريتم الوزن الجزيئي تم تقدير الوزن الجزيئي لقمة مثبط الألفا –اميليز حيث اظهرت النتائج المبينة في الشكل 8 ان الوزن الجزيئي لقمه المثبط المستخلص من الشعير تقارب 22.9 كيلودالتون وكانت الطريقة الثانية لتقدير الوزن الجزيئي للمثبط قيد الدراسة باستعمال تقنية الترحيل الكهربائي على هلام البولي اكريل امايد الحاوي على SDS ،وبالمقارنة مع البروتينات القياسية (Bovine serum albumin , Ovalbumin ,Pepsin, Trypsin، Lysozyme) الشكل 7 كانت نتائج تقدير الحركة النسبية للبروتينات القياسية (0.2 ، 0.47، 0.52، 0.72، 0.95) على التوالي ومن العلاقة الخطية بين الحركة النسبية لهذه البروتينات ولوغارتم وزنها الجزيئي الشكل7 أمكن تقدير الوزن الجزيئي للمثبط من خلال تقدير الحركة النسبية لهم إذ بلغ 23.44 كيلودالتون.



شكل 6. تعيين الوزن الجزيئي لمثبط الألفا – اميليز المنقى من الشعير بطريقة الترشيح الهلامي باستخدام عمود السيفاكريل (Sephacryl-S-200).



شكل 7 .تعيين الوزن الجزيئي لمثبطات الألفا –اميليز المنقاة من الشعير بتقنية الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود المادة الماسخة للبروتين (-SDS PAGE)

مما تقدم يتضح ان استعمال تقنيات مختلفة لتقدير الوزن الجزيئي لبروتين معين ينتج عنها اختلاف في القمم المستحصلة وقد يكون مرد ذلك الى الاختلافات في محتوى البروتين من الكاربوهيدرات الذي ينعكس بدوره على اضفاء وزن جزيئي الى البروتين يكون أكبر من الواقع إذ يحاط البروتين بعدد كبير من جزيئات الماء مقارنة مع البروتينات الأخرى التي تخلو من أي جزء كاربوهيدراتي من جانب آخر فان الاختلاف الناتج في قيمة الوزن الجزيئي للبروتين ذاته عند تقديره بتقنية الترحيل الكهربائي وبوجود SDS ربما يعود الى انخفاض نسبة ارتباط جزيئات SDS بالبروتين عند الترحيل لاحتوائه على جزء كاربوهيدراتي مؤدياً بذلك الى انخفاض نسبة الشحنة / الكتلة ومن ثم تقليل حركته ليظهر البروتين بوزن جزيئي أكبر مما هو عليه في الحقيقة علماً ان حركة البروتينات في الهلام تتناسب عكسياً مع لوغارتم الوزن الجزيئي (22) وقد ينسب ذلك الى سبب آخر. ان الاختلاف في الوزن الجزيئي لمثبطات الألفا –اميليز يعود الى التنوع الواسع في انواعها حيث تختلف في التركيب البنائي من حيث نوع وعدد الوحدات الرئيسة المكونة لها بأختلاف مصادرها حيث اظهرت الدراسات وجود اختلافات في الوزن الجزيئي تبعاً لمصدر المثبط وكذلك بأختلاف الطريقة المتبعه في التقدير وتراوحت الاوزان الجزئية لمثبط الاميليز المستخلص من مصادر نباتية مختلفة بشكل عام بين 5–60 كيلودالتون (21 و10)حيث بين Weselake وجماعته(27) ان الوزن الجزيئي لمثبط الاميليز المنقى من الشعير اعلى من 10 كيلودالتون وكان بحدود 20 كيلودالتون عند تقديره بطريقة

الترشيح الهلامي و21 كيلودالتون عند حسابه بطريقة الهجرة الكهربائية (26) واوضح Svendsen وجماعته (23) ان مثبط الألفا –اميليز المستخلص من الشعير يتألف من سلسلة مفردة تحتوي على 181 حامضاً امينياً مع اثنان من جسور ثنائية الكبريت. وقد اشار Yetter وجماعته (31) الى وجود نوعين من مثبطات الألفا–اميليز في الحنطة صنف أباء 99 وبأوزان جزيئية تقارب 17.8 و 20 كيلودالتون عند تقدير الوزن الجزيئي بطريقة الترشيح الهلامي و24 و 24.6 كيلودالتون عند تقديره بطريقة الهجرة الكهربائية، وذكر Wisessing وجماعته (30 ان الوزن الجزيئي لمثبط الألفا –اميليز المستخلصه من نوع من انواع الفاصوليا يقارب 27 كيلودالتون عند تقديره بطريقة الترشيح الهلامي و30 كيلودالتون عند تقديره بطريقة الهجرة الكهربائية. واثبت Huang وجماعته (15) الى وجود نوعين من مثبطات الألفا–اميليز في الذرة الصفراء الاول بوزن جزيئي 28 كيلودالتون له القدرة على تثبيط فعالية انزيم الاميليز المستخلص من عفن _*Aspergillus flavus*_ وبروتين اخر بوزن جزيئي__100 كيلودالتون يثبط التصنيع الحيوي للافلاتوكسين، واستطاع Chen وجماعته (6) تنقية بروتين بوزن جزيئي 14 كيلو دالتون والذي يمثل 19% من مجموع البروتين الكلي من صنف من اصناف الذرة اثبت فعاليته في تثبيط اميليز *A.flavus* ، وفي صنف اخر من اصناف الذرة اشار Fakhoury وجماعته (7) الى وجود مثبط بوزن جزيئي 36 كيلودالتون له فعالية في تثبيط انزيم الألفا –اميليز لمجموعه من الفطريات والحيوانات والنباتات وان تعاقب الحوامض الامينية المكونة لهذا البروتين تشابه الحوامض الامينية المكونة لمثبطات الألفا–اميليز العائلة البقولية .وبين Figueira (9) ان الوزن الجزيئي للمثبط المستخلص من الذرة يقارب 19.7 كيلودالتون اما المثبط المستخلص من الرز فيبلغ 20 كيلودالتون (32) في حين بين Feng وجماعته (8) ان الرز يحتوي على بروتين ذي وزن جزيئي 14 كيلودالتون ذي فعالية في تثبيط انزيم الألفا – اميليز للعاب الانسان والحشرات والبكتريا.يلاحظ من نتائج الدراسة الحالية ان الوزن الجزيئي للمثبط المنقى يقع ضمن المدى المسجل لقيم الاوزان الجزيئية لمعظم الدراسات المذكورة آنفاً.

REFERENCE

1.Abe , J. I. ; U . Sidenius ,. ; and B.Svensson 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 PP.

.2.Ahmed , H. 2005 . Principles and Reactions of Protein Extraction , Purification and Characterization . CRC PRESS , Boca Raton London New York Washington, D.C.

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

4.Bonner , P. L. R. 2007 . Protein purification .The Basic. Nottingham Trent University . Published by : Taylor & Francis Group. Bonner , P. L. R.55-67 PP.

5.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.

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

7.Fakhoury, A. M. and C. P.Woloshuk, 2001 Inhibition of Growth of *Aspergillus flavus* and Fungal α-Amylases by a Lectin-Like Protein from *Lablab purpureus* . The American Phytopathological Society Vol. 14, No. 8, pp. 955–961.

8.Feng , G. ; M.Chen ; K. J. Kramer , and G. R. Reeck 1991 . α-amylase inhibitors from rice: Fractionation and selectivity towards insect , mammalian and bacterial α-amylases. Cereal Chem., 68 : 516-521.

9.Figueira , E. L. ; , E. Y Hirooka. , E. Men diola Olaya , and A.Blanco-Labra 2002 . Characterization of a hydrophobic amylase inhibitor from Corn (*Zea mays*) seeds with activity against amylase from Fusarium verticillioides . Phytopathology , 93 (8) : 917-922

10.Franco , O. L. ; D. J. Rigden; F. R. Melo; C. Jr.Bloch ; C. P. Silva and M. F. Grossi de-Sá 2000 . Activity of wheat alpha- amylase inhibitors towards bruchid alpha- amylases and structural explanation of observed

specificities . Eur J Biochem. , Apr ; 267 (8) : 2166-73 .
11.Franco , O. L. ; D. J. Rigden; F. R. Melo , and de-Sá. Grossi- 2002 . Plant α- amylase inhibitors and their interaction with insect α-amylases structure , function and potential for crop protection . Eur. J. Biochem. , 269 :397-412 .
12.Gatehouse , A. M. R. ; K. A. Fenton; I. Jepson and J.Pavey 1985. The effects of α-amylase inhibitors on insect storage pests: Inhibition of α-amylase *in vitro* and effects on development *in vivo* . Journal of the Science of Food and Agriculture , 37 (8) : 727-734
13.Gilbert , S. M. ; G. R. Burnett; , E. N. Mills; P. S. Belton ; P. R. Shewry , And A. S. Tatham 2003 Identification of the wheat seed protein CM3 as a highly active emulsifier using a novel functional screen . J. Agric. Food Chem. , 51 (7) : 2019-2025 .
14.Heidari , R. ; S. Zareae , and , M. Heidarizadeh 2005 . Extraction , purification , and inhibitory effect of alpha- amylase inhibitor from Wheat (*Triticum aestivum)* Var. Zarrin . Pakistan Journal of Nutrition , 4 (2) : 101-105 .
15.Huang, Z. Y., D. G White,., and G. A Payne. 1997 Corn seed proteins inhibitory to *Aspergillus flavus* and aflatoxin biosynthesis. Phytopathology87:622-627.
16.Iulek , J. ; O. L Franco , M. Silva ; C. T. Slivinski; C. Bloch ; D. J. Rigden , and M.F. Grossi , de Sá. 2000 . Purification , biochemical characterization and partial primary structure of a new α- amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye) . The International Journal of Biochemistry & Cell Biology , 32 : 1195-1204
17.Jun-ichi ,B.; S.Ulrik, and S.Birte, 1993 Arginine is essential for the α-amylase inhibitory activity of the α-amylase /subtilisin inhibitor (BASI) Ffrom barley seeds .Biochem. J. 293,151-155.
18.Laemmli, U. K. 1970.Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature .227: 680 - 690.
19.Lass, T. 1998 . Electrophoresis in Gels .In: Protein Purification. (eds: J. C. Janson; L. Ryden).463-495.
20.Pharmacia Fine Chemica -lPublication. 1980. Ion-exchang Chroma tography .Principle and Methods. Uppsala , 23-30.
21.Roy , I and M. N. Gupta 2000 . Purification of a double- headed inhibitor of alpha- amylase / proteinase K from wheat germ by expanded bed chromatography . Bioseparation , 9 : 239-245 .
22.Segrest,J.P.and R.I.Jackson1972. The collagenase. In "The enzymes" (ed. By D.P.Boyer) Vol.3 : 649 - 693. Academic press.New York.
23.Svendsen ,I.; J.Hejagaard, and J.Mundy1986.CarlsbergRes.Commun. 51, 43-50 (cited from Yi-Hung 2006).
24.Takahiro , T. and T. Takeshi 2007 . Carbohydrase Inhibitors Derived from Chestnut. United states333-398
25.Watanabe , J. ; S.Tanabe ; K.Sonoyama ; M. Kuroda , and M.Watanabe 2001. IgE-reactive 60 kDa glycoprotein occurring in wheat flour . Biosci. Biotechnol. Biochem. , 65 (9) : 2102-2105 .
26.Weselake , R. J. ; A. W. McGregor; R. D. Hill and H. W. Duckworth , 1983 b Purificationandcharacteristics of an endogenous αamylaseinhibitor from Barely kernels . Plant Physiol. , 73 : 1008-1012.
27.Weselake , R. J. ; A. W. McGregor , and R. D. Hill 1983 a . An endogenous α-amylase inhibitor in Barely kernels . Plant Physiol. , 72 : 809-812 .
28.Whitaker , J. R. 1972 . Principles of Enzymology for the Food Science . Mercel Dekker. Inc. , New York , USA PP.34-45
29.Whitaker , J. R. and R. A. Bernard 1972 . Experiment for Introduction to Enzymology . The Wiber Press Davis PP.78-88.
30.Wisessing , A. ; A. Engkagut ; A.Wongp - iyasatid, and K.Choowongkomon, 2010 Biochemical Characterization of the r-Amylase InhibitorMungbeans and Its Application in Inhibiting the Growth of Callosobruchus maculatus . J. Agric. Food Chem., 58, 2131–2137.
31.Yetter , M. A. ; R. M. Saunders , and H. P. Boles 1979 . α- Amylase inhibitors from wheat kernels as factors in resistance to postharvest insects . Cereal Chem. , 56 (4) : 243-244 .
32.Yi-Hung L.; P.; C.Wen-Yan Chun-Jung 2006.Purification,Crystallizatio and reliminary Xraycrystallographic analysisofricebifunctional-α-amylase /subtilisin inhibitor from *Oryza sativa*
33.Acta Cryst. F62,743-745.