Created with PdfEditor Trial Version
www.pixelplanet.com

Summary

إستخلاص وتنقية وتوصيف إنزيم الأليناز من الثوم العراقي *Allium sativum* وإستخدام نواتجه في تحضيرمكمل غذائي

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية الزراعة - جامعة البصرة

وهي جزء من متطلبات نيل درجة

ماجستير في علوم الأغذية

من قبل

إيمان هادي عودة الطائي

بكالوريوس علوم زراعية – علوم الأغذية

2004

بإشراف

أ.م.د.ضياء فالح عبد الله الفكيكي

أ.م.د.رحيم جميل محيسن

ذو الحجة 1438 هـ

أيلول 2017 م

Created with PdfEditor Trial Version
www.pixelplanet.com

الخلاصة

أُجريت الإختبارات الكيميائية على خمسة نباتات من جنس *Allium* شملت الثوم العراقي والثوم الصيني والبصل الأبيض والبصل الأخضر والبصل البنفسجي وأظهرت الإختبارات إن أعلى نسبة رطوبة كانت في البصل الأبيض 89.95% وأقلها في الثوم الصيني إذ بلغت 61.47% وتفوق الثوم العراقي بمحتواه البروتيني الذي بلغ 7.99% وأقل نسبة بروتين في البصل الأبيض بلغت 1.60% . وُجد إن أعلى نسبة دهن في الثوم العراقي وبلغت 0.45% وأقل نسبة دهن في البصل البنفسجي وبلغت 0.15% وكانت أعلى نسبة كاربوهيدرات في الثوم الصيني وصلت إلى 31.86% بينما أقل نسبة كاربوهيدرات وجدت في البصل الأبيض وبلغت 7.79% كما وُجد إن أعلى نسبة رماد كانت في الثوم الصيني وبلغت 1.60% وأقل نسبة رماد كانت في البصل الأبيض وبلغت 0.37% .

تم إختيار الثوم العراقي كأفضل مصدر لإستخلاص الإنزيم من بين النباتات قيد الدراسة إذ حصل على أعلى فعالية نوعية بلغت 134.76 (وحدة/ملغم بروتين) وبينت نتائج تشخيص المركبات الفعالة لمستخلصات النباتات قيد الدراسة تفوق الثوم العراقي بمحتواه من المركبات الكبريتية خاصةً مركب Diallyl disulphide بنسبة 42.53% بينما ظهرت النسبة الأقل للمركب في البصل البنفسجي وبلغت 3.59% .

وُجد إن أفضل فترة زمنية لفعالية الإنزيم في الثوم العراقي هي ثلاثين دقيقة التي بلغت عندها الفعالية النوعية 166.76 (وحدة/ملغم بروتين) وأوضحت نتائج تشخيص المركبات الفعالة لمستخلص الثوم العراقي بتقنية GC-MS خلال فترة زمنية تراوحت بين (5-30) دقيقة إرتفاع نسبة المركب الكبريتي Diallyl disulphide بزيادة الوقت بنسبة تراوحت بين 24.31% - 51.92% وإنخفاض نسبة المركب 3-vinyl-1,2dithiacyclohex-5-ene بزيادة الوقت من 34.31% - 5.52% كما تم تشخيص مركب الأليسين المستخلص من الثوم العراقي بفترات زمنية مختلفة (5 و10 و15 و20 و25 و30 و35) دقيقة بتقنية HPLC وأظهرت المستخلصات قمم مطابقة للأليسين القياسي المشخص بتقنية HPLC عند وقت إحتجاز 16.789 دقيقة .

إستُخلص الإنزيم من الثوم العراقي بإستخدام ثمانية محاليل دارئة ذات تراكيز وأرقام هيدروجينية مختلفة وكانت أعلى فعالية نوعية في الثوم العراقي حيث بلغت 184(وحدة/ملغم بروتين) بإستخدام محلول فوسفات الصوديوم الداريء ذي الرقم الهيدروجيني 6.5 والذي تم أختياره كأفضل محلول إستخلاص وتمت تنقية الإنزيم بترسيب المستخلص الإنزيمي الخام بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع تراوحت بين (30-70)% وبلغت الفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية 192(وحدة/مل) و 165.517 (وحدة/ملغم بروتين) على التوالي بحصيلة

Created with PdfEditor Trial Version
www.pixelplanet.com

Summary

إنزيمية تساوي 37.04% وعدد مرات تنقية 1.30 مرة وأُجريت بعدها عملية ديلزة للمستخلص الإنزيمي ضد الماء المقطر ثم تنقية الإنزيم حتى التجانس بعملية الترشيح الهلامي بجهاز ÄKTA pure 25 بإمرار المحلول الناتج المركز بعمود Superdex 200 وبلغت الفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية 155.4(وحدة/مل) و254.754 (وحدة/ملغم بروتين) على التوالي بحصيلة إنزيمية تساوي 13.48% وعدد مرات تنقية 2.01 مرة ثم حددت نقاوة الإنزيم بتقنية الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الأكرل أمايد بغياب المواد الماسخة للبروتين وكذلك تم تقدير الوزن الجزيئي للإنزيم المنقى بطريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الأكرل أمايد بوجود المواد الماسخة للبروتين SDS-PAGE ووُجد أنه يساوي 49 كيلو دالتن .

وُجد إن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم تساوي 6 أما قيم الرقم الهيدروجيني الأمثل لثباتية الإنزيم تراوحت بين 6-8 كما بينت النتائج إن أفضل درجة حرارة لفعالية الإنزيم كانت عند 35 مْ أما أفضل درجة حرارة لثباتية الإنزيم تراوحت بين 30 - 45 مْ .

تباين تأثير الأيونات المعدنية على فعالية الإنزيم وتم إستخدام تركيزين من الأملاح المعدنية واحتفظ الإنزيم بمعظم فعاليته بإستخدام أيونات الصوديوم والبوتاسيوم عند تركيز1 و5 ملي مولاري وكان لأيونات المغنيسيوم تأثيراً منشطاً على فعالية الإنزيم حيث بلغت الفعالية المتبقية 105.02% و101.31% عند تركيز1 و5 ملي مولاري على التوالي بينما ظهر التأثير التثبيطي لفعالية الإنزيم بإستخدام أيونات الكالسيوم والنيكل والزئبق والنحاس وكان أكثرها تثبيطا أيونات النحاس وأيونات النيكل عند تركيز5 ملي مولاري وبلغت الفعالية المتبقية 14.64% و 16.25% على التوالي .

أظهرت دراسة الثوابت الحركية لإنزيم الألينيز النقي المقدرة بطرق لينويفر– برك وهانس – وولف و وولف – أوغستنسون – هوفستي وإيدي – سكاتكارد إن قيمة ثابت ميكالس K_m تساوي 0.35 (ملغم/مل) والسرعة القصوى V_{max} بلغت 121.3 مايكرومول/مللتر/دقيقة .

شُخص مستخلص الثوم العراقي المحضر مختبرياً بإعتباره مكمل غذائي بالإضافة إلى نوعين آخرين من المكملات الغذائية التجارية بتقنية HPLC وتقنية GC-MS لمعرفة مكوناتها من الأليسين والمركبات الكبريتية الفعالة كما تم تغليف المستخلص بشكل كبسول من نوع Soft gel ، وتم تطبيق فعالية المستخلص على جرذان التجارب والتي تمت معاملتها بمكمل غذائي أمريكي والمستخلص الإنزيمي المحضر من الثوم العراقي لمعرفة تأثير الثوم المضاد للتخثر من خلال إختبارات تحليل الدم المتمثلة بوقت التخثر ووقت الثرومبوبلاستين الجزئي ونسبة المعيارية الدولية وأعطت نتائج مستخلص الثوم فعالية جيدة مضادة للتخثر أعلى من مجموعة المكمل الغذائي التجاري بفارق معنوي عند مستوى معنوية $p \leq 0.05$ وبلغ وقت التخثر 21.74 ثانية ووقت الثرومبوبلاستين الجزئي 18.66 ثانية أما نسبة المعيارية الدولية فبلغت 1.4 .

Created with PdfEditor Trial Version
www.pixelplanet.com

Summary

Extraction, Purification and Characterization of Alliinase From Iraqi Garlic(*Allium sativum*) and Using its Prouducts to Preparation a Food Supplement

A Thesis

Submitted to a Council of the Agriculture College at the University of Basra in Partial Fulfillment of the Requirments for the Degree of Master in Food Sciences

By

Iman Hadi Auda AL-Taai

B.Sc of Agriculture-Food Sciences
2004

Advisors

Dr.Dhia Falih Abdulaha Al-Fekaiki

Dr.Raheem Jamail Mahesein

Thul Hijjah **1438** September **2017**

Created with PdfEditor Trial Version
www.pixelplanet.com

Summary

The chemical tests were performanced on five plants from *Allium* genus including Iraqi garlic, Chinese garlic, white onion, green onion and purple onion. The tests showed that higher moisture percentage 89.95% was found in the white onion and less percentage 61.47% in the Chinese garlic.The Iraqi garlic was superior in protein content which has higher protein percentage 7.99%, while the white onion has less protein percentage 1.60% .The fat percentage was higher in the Iraqi garlic 0.45% and less fat percentage 0.15% was found in the purple onion. High carbohydrate percentage was found in the Chinese garlic which reached 31.86%, while the white onion showed less percentage equal to 7.79% . The ash content was 1.60% in the Chinese garlic and less content was 0.37% in the white onion .

The Iraqi garlic was chosen as the best source for an enzyme extraction among the plants under the study and having a higher specific enzyme activity which reached 134.76 (units/mg protein). The results showed the diagnosis of bioactive compounds of the plants under study by using technology of gas chromatography - mass spectrophotometr (GC-MS) superior of the Iraqi garlic content from sulfur compounds specially diallyl disulphide which reached to 42.53% while the least percentage showed in the purple onion which reached to 3.59%.

A best period for alliinase activity in the Iraqi garlic was found through 30 min. and the specific activity was 166.76 (units/mg protein). The results of diagnosis the bioactive compounds of the Iraqi garlic extract with GC-MS during periods of time ranging between (5-30) minutes showed a high proportion of sulfurous composite diallyl disulphide up time ranged between 24.31% - 51.92% and decline in the proportion of the Composite 3- vinyl-1,2dithiacyclohex-5-ene up time from 34.31% - 5.52% . Allicin was diagnosed in the Iraqi garlic etract at different periods of time (5, 10, 15, 20, 25,30 and 35) minutes by HPLC technique with matching standard allicin peak at retention time 16.789 minutes.

Alliinase was extracted from the Iraqi garlic by using eight buffer solutions with different concentrations and hydrogen numbers. The higher specific activity was 184 (units/mg protein) by using sodium phosphate buffer solution with pH 6.5 which chosen as the best solution for the extraction. The enzyme was purified by precipitation extracted crude enzyme by ammonium sulfate with saturation ratio ranged from (30-70)% . The enzyme activity and specific activity were equals to 192

Created with PdfEditor Trial Version www.pixelplanet.com

(units/ml) and 165.517 (units/mg protein) respectively with enzymatic yield of 37.04% and purification fold was 1.30 time.After precipitation process the enzymatic extract was dialysis versus distilled water then, enzyme purification until homogenity with gel filtration method by ÄKTA pure 25 appartus passing the concentration solution through column Superdex 200 and the enzyme activity and specific activity were equals to 155.4 (units/ml) and 254.754 (units/mg protein) respectively with enzymatic yield of 13.48% and purification fold was 2.01time. The purity of enzyme was determined by electrophoresis of polyacrylamide gel in absence of denaturating materials (SDS) . The molecular weight of the purified enzyme was (49 KDa) estimated by electrophoresis method of polyacrylamide gel in a presence of denaturating materials (SDS) .

The optimum pH value for an enzyme activity equal to 6 while optimum pH value for an enzyme stablity ranged between 8-6 and the results showed the optimum temperature for an enzyme activity found at 35℃ and optimum an enzyme stablity temperature ranged between 30-45℃.

Variation the effect of metal ions on the the enzyme activity using two concentrations of minerals. An enzyme was kept most of its activity by using sodium and potassium ions at concentration 1 and 5 milli molari, magenisum ions had revitalized effectiveness on the enzyme activity with residual activity 105.02% and 101.31% respectively when using the concentration 1 and 5 milli molari respectively, while the inhibition effectiveness of the enzyme activity was noticed when using calcium, nickel, mercury and copper ions , the most inhibition ions were copper and nickel ions at concentration of 5 milli molari with residual activity 14.64% and16.25% respectively.

The kinetic constants of enzyme was estimated by Lineweaver-Burk reciprocal plot, Hanes-Woolf plot, Woolf-Augustinsson-Hofstee plot and Eadie - Scatchard plot showed that Mikaelis constant value (K_m) equal to 0.35 M and V_{max} 121.3 µMol/ml/min.

Diagnosed the prepared extract which consedered as food supplement besides to two others commercial food supplements by HPLC and GC-MS technique to recognized its content from allicin and other sulphurous compounds . The oily extract of the Iraqi garlic was encapsulated in capsule type of soft gel can eat safely.

Applied an activity of the Iraqi garlic extract on experiments rats which treated with American anti-clotting commercial food supplement, and with enzymatic

Created with PdfEditor Trial Version www.pixelplanet.com

Summary

extract prepared from the Iraqi garlic to notice the effective of anti-coagulans of garlic through the blood clotting tests that including prothrombin time (PT), partial thromboplastin time (PTT) and international normalized ratio (INR), the Iraqi garlic extract results (T_3) showed good anti-clotting activity higher than commercial drug group (T_2) when compared to the control group (T_1) with significant at level $p \leq 0.05$, the value of PT was 21.74 seconds, PTT was 18.66 seconds and INR was 1.4 .

Summary

قائمة المحتويات

ت	المحتويات	الصفحة
1	المقدمة	1
2	مراجعة المصادر	4
1-2	العائلة النرجسية	4
1-1-2	البصل	5
2-1-2	الثوم	6
2-2	التركيب الكيميائي للثوم	7
3-2	مركبات الثوم الفعالة	9
1-3-2	ألين (+)-S-allyl-L-cysteine sulphoxide (Alliin)	9
2-3-2	أليسين S-(+)-2-propenyl-L-cysteine sulfoxide (Allicin)	11
3-3-2	أجوين 4,5,9-trithiadodeca-1,6,11-triene 9-oxide (Ajoene)	12
4-3-2	فنيل دايثين Vinyldithiins	13
4-2	إنزيم الأليناز Alliinase	15
5-2	المرافق الإنزيمي Pyridoxal–5–Phosphate (PLP)	17
6-2	مصادر الإنزيم	18
7-2	إستخلاص إنزيم الأليناز	20
8-2	تنقية الإنزيم	21
9-2	الترشيح الهلامي بجهاز ÄKTA Pure 25	23
10-2	تقدير فعالية إنزيم الأليناز	24
11-2	توصيف إنزيم الأليناز	26
1-11-2	الرقم الهيدروجيني (pH) الأمثل لفعالية الإنزيم	26
2-11-2	الرقم الهيدروجيني (pH) الأمثل لثباتية الإنزيم	27
3-11-2	درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم	27
4-11-2	درجة الحرارة المثلى لثباتية الإنزيم	28
5-11-2	الوزن الجزيئي	28
6-11-2	الثوابت الحركية	29

Summary

7-11-2	تأثير الأيونات والمعادن على فعالية الإنزيم	30
12-2	تقنيات تشخيص مركبات الثوم الفعالة	31
13-2	فوائد الثوم العلاجية	32
14-2	مكملات الثوم الغذائية	35
15-2	تأثير الثوم المضاد للتجلط	37
3	المواد وطرائق العمل	39
1-3	المواد والأجهزة المستعملة	39
1-1-3	جمع العينات	39
2-1-3	المواد الكيميائية المستعملة	40
3-1-3	الأجهزة المستعملة	42
2-3	طرائق العمل	43
1-2-3	الاختبارات الكيميائية	45
1-1-2-3	تقدير الرطوبة	45
2-1-2-3	تقدير الدهن	45
3-1-2-3	تقدير البروتين	45
4-1-2-3	تقدير الرماد	45
5-1-2-3	تقدير الكاربوهيدرات	45
2-2-3	إنتخاب أفضل مصدر نباتي لفعالية إنزيم الأليبنيز	45
3-3	إستخلاص الإنزيم	46
4-3	تقدير فعالية الإنزيم	46
1-4-3	المحاليل المستخدمة	46
2-4-3	طريقة العمل	46
3-4-3	إعداد المنحنى القياسي لحامض البايروفيك	47
5-3	تقدير تركيز البروتين	48
1-5-3	المحاليل المستخدمة	48
2-5-3	إعداد منحنى البروتين القياسي	48
6-3	محاليل إستخلاص الإنزيم	49
1-6-3	الماء المقطر	49

Summary

2-6-3	محلول فوسفات البوتاسيوم الداريء ذو رقم هيدروجيني 6.0	49
3-6-3	محلول فوسفات الصوديوم الداريء ذو رقم هيدروجيني 6.5	50
4-6-3	محلول فوسفات البوتاسيوم الداريء ذو رقم هيدروجيني 7.0	50
5-6-3	محلول فوسفات الصوديوم/البوتاسيوم الداريء ذو رقم هيدروجيني 7.5	50
6-6-3	محلول Tris-HCl ذو رقم هيدروجيني 7.5	50
7-6-3	محلول Tris-HCl ذو رقم هيدروجيني 7.5	50
8-6-3	محلول EDTA بتركيز 5 ملي مولاري	50
7-3	متابعة المركبات الفعالة الناتجة بفعل الإنزيم في النباتات قيد الدراسة بجهاز كروماتوكرافي الغاز المتصل بمطياف الكتلة GC-MS	50
8-3	إختيار وقت الإستخلاص الأمثل لفعالية إنزيم الأليناز في الثوم العراقي	51
9-3	متابعة المركبات الفعالة في الثوم العراقي الناتجة بفعل إنزيم الأليناز خلال فترات إستخلاص مختلفة بجهاز GC-MS	51
10-3	متابعة تركيز الأليسين بتقنية كروماتوكرافي السائل عالي الأداء HPLC	52
1-10-3	إعداد منحنى الأليسين القياسي	52
2-10-3	إستخلاص الأليسين من الثوم العراقي	52
11-3	تنقية الإنزيم	53
1-11-3	التركيز بكبريتات الأمونيوم	53
2-11-3	الترشيح الهلامي بجهاز ÄKTA Pure 25	53
3-11-3	تحديد نقاوة الإنزيم بإستخدام طريقة الترحيل الكهربائي بغياب المواد الماسخة	54
1-3-11-3	المواد والمحاليل المستخدمة	54
2-3-11-3	طريقة العمل	55
12-3	توصيف الإنزيم	56
1-12-3	تعيين الوزن الجزيئي بإستخدام طريقة الترحيل الكهربائي بوجود المواد الماسخة SDS-PAGE	56
1-1-12-3	المواد والمحاليل المستخدمة	56
2-1-12-3	طريقة العمل	57
2-12-3	تعيين الرقم الهيدروجيني (pH) الأمثل لفعالية الإنزيم	57
3-12-3	تعيين الرقم الهيدروجيني (pH) الأمثل لثباتية الإنزيم	58
4-12-3	تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم	58

Summary

5-12-3	تعيين درجة الحرارة المثلى لثبات الإنزيم	58
6-12-3	تأثير الأيونات المعدنية في فعالية الإنزيم	58
7-12-3	تعيين الثوابت الحركية للإنزيم	58
13-3	إختبار فعالية مستخلصات الثوم المحضرة مختبرياً	59
1-13-3	تحضير مكمل الثوم العراقي الغذائي	59
2-13-3	حيوانات التجارب	59
3-13-3	تصميم التجربة	59
4-13-3	فحص التخثر	60
5-13-3	التحليل الإحصائي للتجربة	60
4	النتائج والمناقشة	61
1-4	الإختبارات الكيميائية	61
2-4	إنتخاب أفضل مصدر نباتي لفعالية الإنزيم	63
3-4	إستخلاص الإنزيم	64
4-4	متابعة المركبات الفعالة الناتجة بفعل الإنزيم في النباتات قيد الدراسة بجهاز GC-MS	65
5-4	إختيار وقت الإستخلاص الأمثل لفعالية إنزيم الأليناز في الثوم العراقي	67
6-4	متابعة المركبات الفعالة في الثوم العراقي الناتجة بفعل إنزيم الأليناز خلال فترات إستخلاص مختلفة بجهاز GC-MS	68
7-4	متابعة تركيز الأليسين بتقنية كروماتوكرافي السائل عالي الأداء HPLC	77
1-7-4	منحنى الأليسين القياسي	77
2-7-4	إستخلاص الأليسين من الثوم العراقي	77
8-4	تنقية الإنزيم	79
1-8-4	تركيز الإنزيم بإستخدام كبريتات الأمونيوم	79
2-8-4	الترشيح الهلامي	80
3-8-4	تحديد نقاوة الإنزيم	83
9-4	توصيف الإنزيم	84
1-9-4	تعيين الوزن الجزيئي	84
2-9-4	تعيين الرقم الهيدروجيني pH الأمثل لفعالية الإنزيم	86
3-9-4	تعيين الرقم الهيدروجيني pH الأمثل لثبات الإنزيم	87

Summary

4-9-4	تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم	88
5-9-4	تعيين درجة الحرارة المثلى لثبات الإنزيم	89
6-9-4	تأثير الأملاح المعدنية على فعالية الإنزيم	90
7-9-4	تعيين الثوابت الحركية للإنزيم	92
10-4	تحليل مكمل الثوم العراقي الغذائي بتقنية HPLC و GC-MS	94
11-4	إختبارات التخثر	103
5	الإستنتاجات والتوصيات	105
1-5	الإستنتاجات	105
2-5	التوصيات	106
6	المصادر	107
1-6	المصادر العربية	107
2-6	المصادر الأجنبية	108
7	الملاحق	128
1-7	الملحق A	128
2-7	الملحق B	133
3-7	الملحق C	136