متوفرة على الموقع:http://www.basra-science-journal.org

ISSN –1817 –2695

استخلاص و تنقية و توصيف انزيم الالفا–اميليز المستخلص من حبوب الذرة البيضاء المنبتة

ضياء فالح الفكيكي

قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة / جامعة البصرة / البصرة –العراق

alfekaiki@yahoo.com

الاستلام 25–9–2012، القبول 13–12–2012

الخلاصة

تضمنت الدراسة أجراء عملية أنبات لحبوب الذرة البيضاء و متابعة فعالية انزيم الالفا – اميليز خلال مرحلة الانبات اذ وجد الانزيم يزداد بشكل كبير في اليوم الخامس من الانبات اذ يبلغ 1600وحدة / مل . بعدها اختيار أفضل طريقة لاستخلاص الأنزيم من بين اربعة طرائق ، وتم تنقيته الانزيم بخطوتين شملت الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع (30–70)% ومن ثم الترشيح الهلامي sephadex G 100 وبلغت عدد مرات التنقية بعد هذه الخطوات 19.31 مرة وبحصيلة انزيمية مقدارها 14.60% وقد بينت نتائج توصيف الانزيم بان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم 6 وتراوح الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم بين (5–7) ووجد ان درجة الحرارة المثلى للفعالية تبلغ 65 م واحتفظ الانزيم بكامل فعاليته عند حضنه مدة 20 دقيقة في مدى من الدرجات الحرارية تراوحت بين (30–70) م

الكلمات المفتاحية : أنزيم , الالفا– أميليز ، الذرة البيضاء المنبتة

1. المقدمة

انزيم ألفا–أميليز هو من انزيمات carbohydrases أي الانزيمات المحللة للمواد الكاربوهيدراتية ورقمه التصنيفي (EC:3.2.1.1) ويصنف ضمن مجموعة انزيمات التحلل المائي Hydrolase التي تعمل على تحليل موادها الأساس بمحيط مائي ويسمى احياناً Glucanase أو Glucanhydrolase لانه يعمل على تحلل الكلوكونات Glucans (السكريات المتعددة)، اعطي لهذا الإنزيم اسم اميليز التكسير الداخلي Endo–Acting enzyme لانه يقوم بمهاجمة الأواصر الكلايكوسيدية α–1,4 ويحلل حبيبه النشأ من الداخل الى الخارج ولا يعمل العكس أي انه يهاجم الأواصر الكلايكوسيدية α–1,4 من داخل جزئية السكر المتعدد. [13,12]

لانزيم ألفا– أميليز دور مهم في العمليات التصنيعية الخاصة بالمواد الكربوهيدراتية وهو يعمل كعامل تحسين لنوعية المنتوج، يطلق على ألفا–أميليز في

مجالات التصنيع الغذائي مصطلح الانزيم المسيل (Liquefying enzyme) أي يقوم بتسييل النشأ إذا ترك الانزيم فترة مناسبة ليعمل على النشأ وبهذه الحالة سوف تكون نواتج التحلل النهائية عبارة عن مالتوز، دكستيرنات وكلوكوز وذلك بسبب تأثيره العشوائي غير المنتظم (Randomly hydrolyses) في تحليل الأواصر α-1,4 [14 ,18] .يعد انزيم الالفا- اميليز amylase من الانزيمات الواسعة الانتشار في المملكة النباتية فضلا عن وجوده في المملكة الحيوانية و الاحياء المجهرية [6, 20,19] والاميليزات اولى الانزيمات التي عرفت بأهميتها في مجال التصنيع الغذائي [21]. هناك العديد من الباحثيين الذين قاموا بعزل انزيم الالفا-اميليز و تنقية من الحبوب المختلف كالشعير و الحنطة و الذرة البيضاء و في السنوات الاخيرة دخل محصول الذرة البيضاء بشكل قوي منافساً نتاج المالت كبديل عن مالت الشعير في بعض البلدان نظرا لرخص سعره و توافره بشكل كبير في تلك البلدان و من هذه البلدان جنوب افريقيا[8]

ويوجد انزيم الالفا- اميليز بكميات كبيرة في العائلة النباتية و خصوصا في المحاصيل الحبوبية في اثناء فترة الانبات بالمقارنة مع الحبوب غير المنبتة اذ يوجد ان انزيم الالفا- اميليز في الحبوب الغير منبته بكميات جدا قليلة و لكن عند اجراء عملية الانبات يزداد الانزيم بشكل كبير في اثناء فترة انبات الحبوب [10] واستخدم مالت الذرة البيضاء في العديد من الصناعات و من اهم هذه الصناعات هي انتاج اغذية الاطفال الرضع و دخل ايضا في الصناعات الدوائية و في صناعات محسنات الخبز كونه غنياً بأنزيمات المهمة في عملية التخمير و نظرا لانتشار محصول الذرة البيضاء في محافظة البصرة فقد هدف هذا البحث لاستخدام حبوب الذرة البيضاء المحلية لا نتاج مالت الذرة البيضاء و امكانية انتاج انزيم الالفا- اميليز النباتي نظرا لأهمية الأنزيم الحيوية واستعمالاته الواسعة في المجالات الصناعية والطبية والمختبرية

2. مواد البحث وطرائقه

2-1. الكاشف والمواد الكيميائية

تم جلب حبوب الذرة البيضاء صنف إنقاذ من قسم المحاصيل كلية الزراعة جامعة البصرة لموسم الزراعي 2009- 2010 .الكواشف والمواد الكيميائية المستعملة في التحاليل كانت من النوع التحليلي(Analar) كما استخدم الماء المقطر في جميع مراحل العمل وخطواته.

2-2. التحاليل الكيميائية

أجريت التحاليل الكيميائية بثلاث مكررات على عينات طحين الذرة البيضاء و طحين الذرة البيضاء المنبة وفقا لما ذكر في [3] لتقدير البروتين باستخدام طريقة المايكروكلدال (N ×6.25) والرطوبة بالتجفيف بالفرن الكهربائي على درجة 105 م° حتى ثبات الوزن والرماد بالحرق بفرن الترميد Muffle furnace على درجة 550 م° اما الدهن فقد قدر باستخدام جهاز Soxhlet وحسبت نسبة الكربوهيرات بالفرق

2- 3. عملية الإنبات

أجرى علمية الإنبات حسب طريقة الأطباق الموصوفة [17] اخذ كمية من حبوب الذرة البيضاء و نقعها في محلول هايبو كلوريد الصوديوم تركيز 3% ولمدة 20 دقيقة بعدها تم غسل الحبوب بالماء المقطر بعدها نقع الحبوب بالماء المقطر لمدة 24 ساعة على درجة حرارة 24 م وبعدها تم اجراء مرحلة الانبات من خلال استخدام اطباق بتري أذ وضع في اسفله كل طبق ورقة ترشيح وضع 20 حبة في كل طبق و حضنت الاطباق على درجة حرارة 24 م لمدة 4 ايام مع مراعاة ترطيب الحبوب بالقليل من الماء واثناء مرحلة الانبات تم متابعة فعالية انزيم الالفا- اميليز في اثناء مرحلة الانبات

2- 4 . تحديد الطريقة المثلى لاستخلاص الانزيم

استخدم اربعة محاليل لغرض تحديد الطريقة الفضلى لاستخلاص أنزيم الالفا- اميليز من حبوب الذرة البيضاء فقد استخدمت طرائق مختلفة منها:

2-4 -1.الماء المقطر

2-4 -2. محلول دارئ فوسفات البوتاسيوم

محلول 0.25 عياري دارئ فوسفات البوتاسيوم 0.06عياري حامض الاسكوربيك ذي رقم الهيدروجيني (7). حضر بأذابة 34.02 غم فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH2 PO4) مع 10.56غم من حامض الاسكوربيك في كمية من الماء المقطر و بعد التعديل الرقم الهيدروجيني الى 7 اكمل الحجم الى لتر واحد بالماء المقطر

2-4 -3. محلول دارئ خلات الصوديوم

محلول 0.1 عياري دارئ الخلات 0.1 عياري كلوريد الصوديوم ذي رقم هيدروجيني(5) حضر بخلط 11.4 مل من حامض الخليك الثلجي مع 11.68 غم من كلوريد الصوديوم و اذيب الخليط في الماء المقطر و بعد تعديل الرقم الهيدروجيني إلى 5 أكمل إلى لتر واحد بواسطة الماء المقطر

2-4 -4. محلول دارئ هيدروكلوريك الاميدزول

محلول 0.025 عياري دارئ هيدروكلوريك الأميدازول ذي الرقم الهيدروجيني (7.4) .حضر بإذابة 1.69 غم من مادة الأميدزول في قليل من الماء المقطر وإضافة له 0.7 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز ووضع الخليط في دورق حجمي ذي سعة لتر وأكمل الحجم بواسطة الماء المقطر إلى

2 - 5. طريقة الاستخلاص

خلط كمية من مسحوق حبوب الذرة البيضاء مع محاليل الاستخلاص **(1،2،3،4)** الكل على حدة بنسبة 5:1 (وزن/ حجم) بواسطة خلاط مغناطيسي لمدة 30 دقيقة ثم طرد الخليط مركزيا بسرعة gx 10000 على 5 م لمدة 20دقيقة . بعدها جمع الرائق لكل محلول استخلاص و قدر فيه فعالية انزيم لفا- الاميليز و تركيز البروتين لحساب الفعالية النوعية لأنزيمات الاميليز في محاليل الاستخلاص.

2- 6. تقدير فعالية أنزيم الاميليز

قدرت فعالية أنزيم الاميليز باستخدام طريقة [25]. تعرف الوحدة الأنزيمية: بأنها كمية الأنزيم الذي يحلل 0.1 ملغم من مادة الخاضعة النشأ خلال عشرة دقائق عند درجة حرارة 40°م عندما يكون تركيز المادة الخاضعة 4 (ملغم/ مل). قدر تركيز البروتين في المستخلص الانزيمي لمراحل المختلفة من الدراسة استناداً الى طريقة (Lowry *et al.* 1951).

2-7. تنقية الأنزيم

20 غم من مسحوق الذرة البيضاء المنبتة مع 100 مل من محلول الدارئ هيدروكلوريك الأميدازول 0.025 مولار ذي الرقم الهيدروجيني (7.4) بنسبة خلط (5/1) (وزن / حجم). أجريت عملية التركيز باستخدام بلورات كبريتات الامونيوم بنسب اشباع (30- 70) % ثم بعدها عملية الديلزة ضد دارئ نفس المحلول الدارئ ولمدة 48 ساعة . قدر حجم المحلول وفعالية الإنزيم وتركيز البروتينات فيه. أجريت عملية الترشيح لانزيم الالفا- اميليز المنتج من الذرة البيضاء المنبت باستعمال عمود Sephadex G-100 بأبعاد (2.5×90) سم و الموازن بمحلول هيدروكلوريك الاميدازول الدارئ حتى اليوم التالي و سرعة الجريان 26 مل/ ساعة بحجم 2.5 مل للجزء الواحد وتمت متابعة الامتصاصية للأجزاء المفصولة على الطول الموجي 280 نانومتر فضلا عن تقدير فعالية الإنزيم. .

2 -8 . توصيف الإنزيم

2-8- 1.تعيين الرقم الهيدروجيني(pH) الأمثل لفعالية الإنزيم

حضرت محاليل المادة الاساس بأرقام هيدروجينية (**4, 4.5, 5, 5.5 , 6, 6.5 , 7, 8,7.5**) بتركيز 0.2 مولار وقدرت فعالية الإنزيم في المحاليل ورسمت العلاقة بين قيم الأرقام الهيدروجينية المختلفة مقابل فعالية الإنزيم لتعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية.

2-8- 2. تعيين الرقم الهيدروجيني (pH) لأمثل لثبات فعالية الإنزيم

مزجت حجوم متساوية من محلول الإنزيم مع المحلول الدارئ بأرقام هيدروجينية (**4, 4.5, 5, 5.5 , 6, 6.5 , 7, 8,7.5**) بتركيز 0.2 مولار حضنت الأنابيب في حمام مائي بدرجة حرارة 40 م مدة 20 دقيقة وقدرت الفعالية الإنزيمية المتبقية ورسمت العلاقة بين قيم الرقم الهيدروجيني المختلفة مقابل النسبة المئوية للفعالية المتبقية للإنزيم لتعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الانزيم

2-8- 3. تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم

قدرت فعالية الإنزيم على مدى درجات الحرارة تراوح بين (**30-60**) **م** ورسمت العلاقة بين درجة الحرارة مقابل فعالية الإنزيم

2-8- 3. تعيين الثبات الحراري للإنزيم

حضن 1 مل من المحلول الإنزيمي بدرجات حرارية مختلفة تراوحت بين (**30-80**) م بفارق 5 درجات مئوية بين محلول واخر على الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم لمدة 20 دقيقة بعدها بردت الأنابيب مباشرة ثم قدرت فعالية المتبقية الإنزيم%.

3. النتائج و المناقشة

3 -1 . المحتوي الكيمياوي

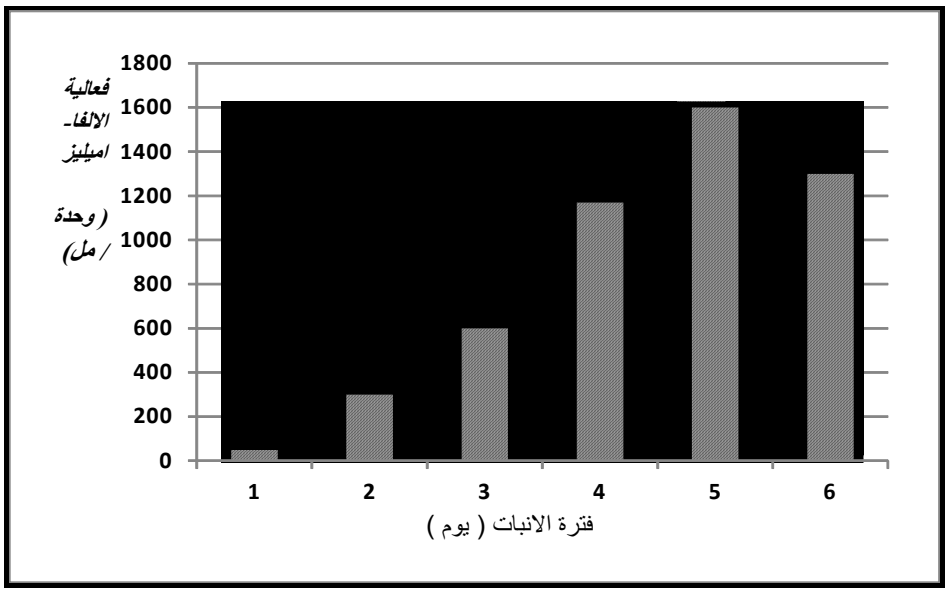
يبين الجدول 1 نتائج التحليل لحبوب الذرة البيضاء المحلية قبل و بعد الانبات من حيث تحليل مكوناته من الرطوبة والبروتين والدهن والرماد والكربوهيدرات . حيث يلاحظ من النتائج هو ارتفاع نسبة الرطوبة الى 16% في حبوب المنبتة بالمقارنة مع الحبوب الغير منبته 13% و يعود هذا السبب الى اجراء عملية النقع و الترطيب التي تجري للحبوب المنبتة . اما بالنسبة الى محتوى البروتين نلاحظ ارتفاع طفيف في نسبة البروتين وهذا يعود الى تطور اغلب البروتينات نتيجة عملية الانبات بالإضافة الى الانزيمات بصورة خاصة في حبوب الذرة البيضاء المنبتة ومن النتائج المتحصل عليها نجد ان نسب الرماد انخفضت بالمقارنة مع الحبوب المنبتة و قد يعزو السبب لعملية النقع التي تودي الى فقد كمية قليلة الاملاح الموجود بالحبوب الغير منبته و هذا بدوره يوثر على الحبوب المنبتة . كما يبين الجدول انخفاض في نسبة كل من نسبة الدن و الكربوهيدرات و هذا يعود للاستهلاك كمية منن الدهون و الكربوهيدرات اثناء عملية الانبات .

جدول 1 - التركيب الكيماوية للحبوب الذرة البيضاء قبل بعد الانبات

المحتوي الكيمياوي %	قبل الإنبات	بعد الإنبات
الرطوبة	13	16
البروتين	10	11.13
الرماد	2.52	2.3
الدهن	2.48	2.01
الكربوهيدرات	72	68.56

3 -2 . فعالية انزيم الالفا- اميليز اثناء فترة الانبات

يلاحظ من الشكل 1 تطور فعالية أنزيم الالفا- أميليز لحبوب الذرة البيضاء اثناء فترة الانبات اذ يلاحظ تطور فعالية الالفا- اميليز من اول يوم من الانبات اذ بلغ 30 وحدة / مل الى خامس يوم من الانبات حيث بلغت الفعالية الانزيمية 1600 وحدة / مل بعدها انخفضت فعالية الانزيم في اليوم السادس من الانبات وهذا يتفق مع ما ذكره [7] ان فعالية انزيم الالفا أميليز في الحنطة غير المنبتة تزداد من 0.2 وحدة/ملغم إلى 170 وحدة/ ملغم في الحنطة المنبتة لفترة 144ساعة وبعدها تنخفض في اليوم السادس . كم وجد [4] ان كل من ان الالفا اميليز و انزيم البيتا اميليز تزداد فعاليتهم في مالت الذرة البيضاء المنبته لمدة خمسة ايام حيث بلغت الفعاليتهم في اليوم الرابع من الانبات 250 وحدة / غم و 470 وحدة/غم على التوالي و بعدها انخفضت فعاليتهم في اليوم الخامس من الانبات 230 وحدة /غم و400 وحدة/غم على التوالي. ووجد [10] ان انزيمات الاميليز تزداد بشكل ملحوظ عند انبات حبوب الذرة البيضاء لمدة 144ساعة اذ تصل فعالية الانزيم اعلى ما يكون بعدها تنخفض الفعالية الانزيم كما لاحظ كل من [11] ان انزيم الالفا- اميليز المنقي من الفاصوليا المنبتة لفترة 72ساعة ان انزيم الالفا- اميليز يزداد بشكل كبير في اليوم خلال 72 بعدها يبدا الانزيم بالانخفاض في الفعالية الانزيمية .



شكل 1 – فعالية أنزيم الالفا- أميليز لحبوب الذرة البيضاء اثناء فترة الانبات

3-3 تحديد الطريقة المثلى لاستخلاص الانزيم

استخدمت محاليل استخلاص مختلفة لاستخلاص الالفا- اميليز من مسحوق الذرة البيضاء المنبتة .اذ أظهرت النتائج المبينة في الجدول 2 اختلاف الفعالية النوعية للأنزيم باختلاف المحاليل الدارئة اذ أعطى محلول الدارئ هيدروكلوريك الأميدازول ذو عيارية 0.025 مولار و الرقم الهيدروجيني (7.4) أعلى فعالية نوعية (وحدة / ملغم بروتين) عند مقارنة الفعالية النوعية محسوبة على أساس وحدة النشاط الانزيمي لكل

ملغرام بروتين مع طرائق الاستخلاص الاخرى ، اذ تفوق محلول دارئ هيدروكلوريك الأميدازول إذ بلغت الفعالية النوعية 10073.33 وحدة / ملغم بروتين في حين أنخفضت الفعالية النوعية عند استخدام الماء المقطر الى 6587.045 وحدة / ملغم بروتين ، وقد انحصرت الفعالية النوعية لبقية المحاليل بين هاتين القيمتين . لذلك فقد أختيار محلول هيدروكلوريك الأميدازول ذي عيارية 0.025 مولار و الرقم الهيدروجيني (7.4) في التجارب اللاحقة . جاءت نتائج هذه الدراسة مطابقة لبعض الدراسات المتعلقة بمحاليل الاستخلاص أنزيم الالفا– الاميليز من مصادر حبوبية مختلفه فقد تم استخدام محلول هيدروكلوريك الأميدازول ذي عيارية 0.025 مولار و الرقم الهيدروجيني (7.4) ، استخلاص انزيم الالفا– اميليز من كل من حبوب الشعير و الحنطة و الحنطة الشيلمية [16] . كما وجد [2] ان محلول هيدروكلوريك الأميدازول ذي عيارية 0.025 مولار و الرقم الهيدروجيني (7.4) افضل محلول دارئ لاستخلاص انزيم الالفا– اميليز من مالت الشعير المحلى اذ اعطى اعلى فعالية بالمقارنة مع محاليل استخلاص اخرى بالدراسة . و يذكر ان الفعالية النوعية في المستخلصات الخام المتحصل عليها اثناء عملية الاستخلاص تعتمد على نوع الأنزيم ومصدر الأنزيم , تعتمد على طبيعة و تركيب الأنزيم والحالة الوراثية والبيئية لمصدر الأنزيم وإلى طبيعة الارتباطات الحاصلة بين الأنزيم والمكونات الأخرى للحيوان أو النبات مثل المواد البكتينية والألياف والمواد الكربوهيدراتية التي تحتاج إلى محاليل استخلاص ذات أس هيدروجيني منخفض وذات قوة أيونية عالية لتسهيل الاستخلاص الانزيمات و الحصول على مستخلص انزيمي ذي فعالية انزيمية عالية بالمقارنة مع محاليل [1 , 12] وقد يعزى تفوق محلول دارئ هيدروكلوريك الأميدازول الى السعة البفرية التي يتمتع بها عند الرقم الهيدروجيني 7.4 ، والقوة الايونية العالية التي تسهم في انتزاع الانزيم من المعقدات الناشئة عن ارتباطه بالمكونات غير الذائبة كالمواد البكتينية دون التأثير في تركيبه وفعاليته .

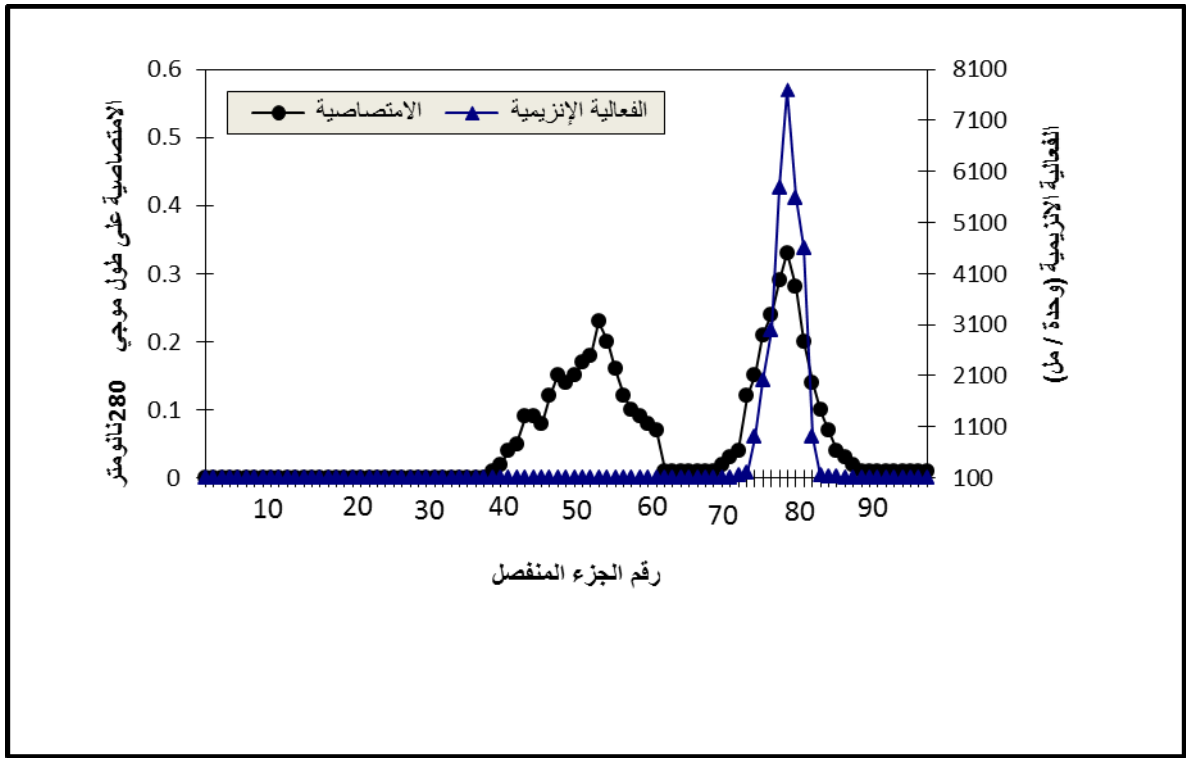
جدول 2 - استخلاص أنزيم الالفا –اميليز من مسحوق الذرة البيضاء المنبتة باستخدام دوارئ وبالارقام هيدروجينية مختلفة ولمدة اربع ساعات

محلول الاستخلاص	الفعالية الكمية (وحدة / مل)	تركيز البروتين (ملغم / مل)	الفعالية النوعية (وحدة / ملغم بروتين)
ماء مقطر	1627	0.247	6587.045
محلول دارئ الاميدازول	1511	0.15	10073.33
محلول دارئ خلات الصوديم	1502	0.179	8391.061
محلول دارئ فوسفات البوتاسيوم	1623	0.234	6935.897

3-4 . تركيز الإنزيم

اخضع المستخلص الإنزيمي الخام لخطوتين من التنقية تمثلت الأولى بتركيز الإنزيم للتخلص من نسبة كبيرة من الماء باستخدام ملح كبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع % (30 –70) وجمع الراسب الناتج من النبذ المركزي

واذيب في محلول الدارئ هيدروكلوريك الأميدازول وتم ديلزته تجاه الماء المقطر وقيس حجمه وفعالية الانزيم وتركيز البروتين فيه وحققت هذه الخطوة تنقية جزئية للإنزيم بلغت 19.31 مرة وبحصيلة إنزيمية مقدارها 14.60 وكما موضح في جدول 2 وجود قمتين بروتينتين رئيسيتين كانت احدى هذه القمم وهي الثانية حاوية على فعالية انزيمية فقط ، اما القمم الاخرى فكانت خالية من الفعالية الانزيمية. وكانت قمة الفعالية مطابقة الى حد كبير للقمة البروتينية الاولى كما موضح في الشكل 2 و ان مطابقة منحني الفعالية والبروتين الى هذا الحد تعد احدى الدلائل الاولية للنقاوة الانزيم [23] .و هنالك تنوعا في خطوات التنقية التي استخدمها باحثون آخرون . فقد قام [2] بتنقية انزيم الاالفا–اميليز المنقى من مالت الشعير المحلي بالترسيبه بكبريتات الامونيوم بنسبة إشباع تراوحت بين30 – 70 % في المرحلة الأولى للتنقية ومن ثم استعمال كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي باستخدام Sephadex G–100 وحصلوا بالمقابل على حصيلة أنزيمية بالغة 20.72% وعدد مرات تنقية مقدارها 20.71مرة .



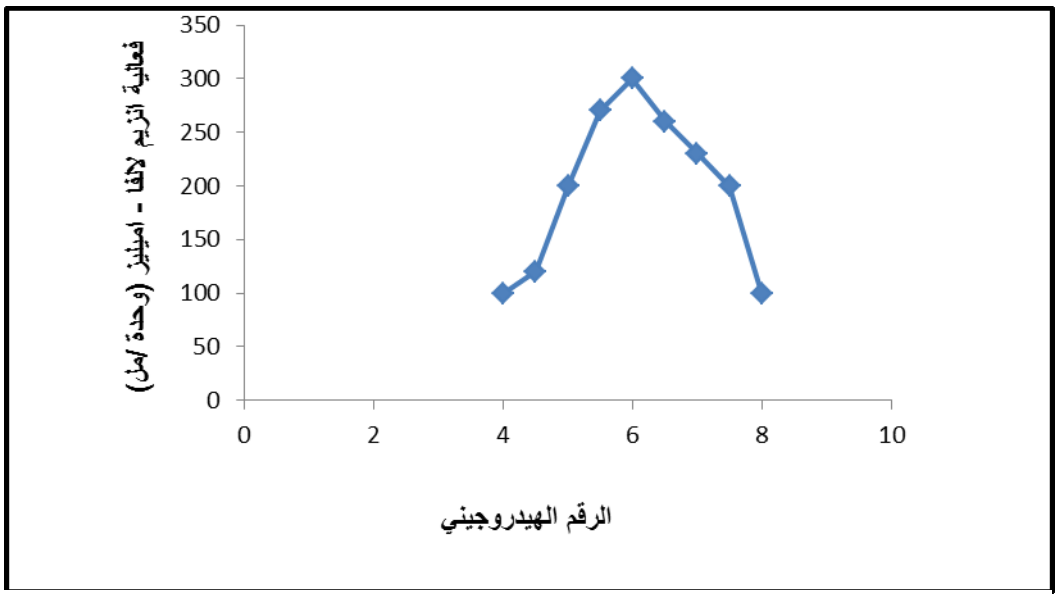
شكل 2 - كروموتوغرافي الترشيح الهلامي لانزيم الالفا- اميليز المستخلص من حبوب الذرة البيضاء المنبتة باستخدام عمود من هلام Sephadex G-100 سرعة الجريان 26 مل / ساعة بحجم 2.5 مل للجزء الواحد

جدول 2 - تنقية أنزيـم الالفا- اميليز المستخلص من حبوب الذرة البيضاء المنبتة

الخطوة	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة/ مل)	تر كيز البروتين (ملغم / مل)	الفعالية النوعية (وحدة / ملغم)	الفعالية الكلية	عدد مرات التنقية	الحصيلة (%)
الإنزيم الخام	70	11150	3.4	3279.41	780500	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة إشباع 30–70 %	30	15300	2.1	7285.71	459000	2.22	58.80
الترشيح الهلامي Sephadex G100	20	5700	0.09	63333	114000	19.31	14.60

3-5 . تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم

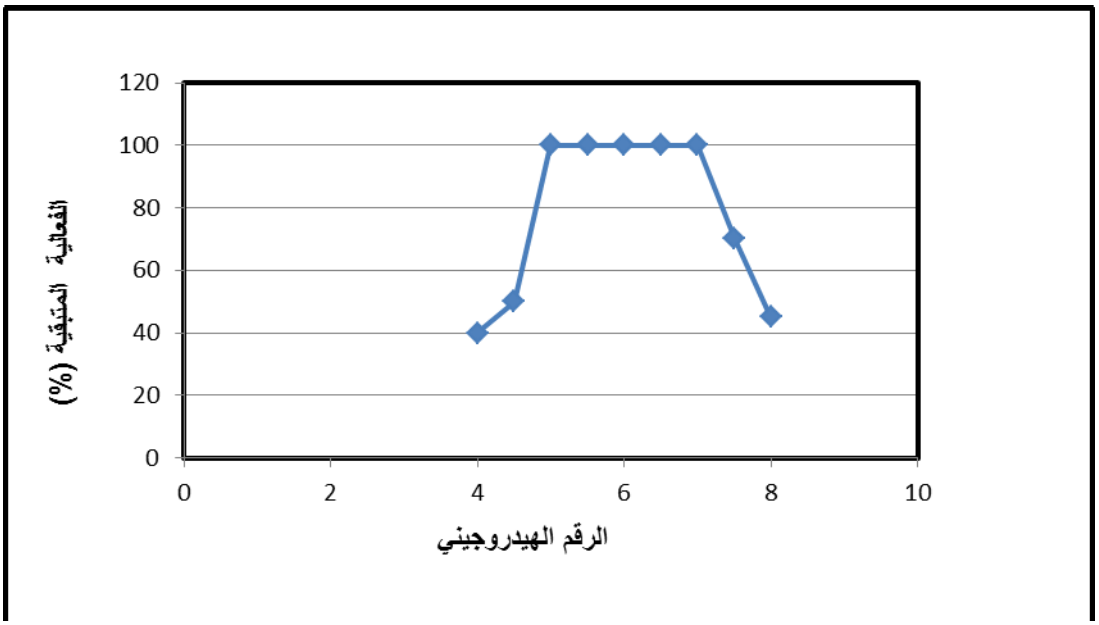
قدر الرقم الهيدروجيني الأمثل للإنزيم المستخلص من حبوب الذرة البيضاء المنبتة بمدى من الأرقام هيدروجينية تراوحت بين (4–8) وبينت النتائج الموضحة في شكل 3 إن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم 6 ولوحظ انخفاض بفعالية الإنزيم عند الأرقام الهيدروجينية المتطرفة القاعدية والحامضية. ويعود هذا الانخفاض في الفعالية إلى تأثير تغير الرقم الهيدروجيني على الصفات الآيونية لجزيئة الإنزيم وعلى مكونات وسط التفاعل الأخرى وتقع هذه النتيجة ضمن المدى لنتائج دراسات أخرى في هذا المجال التي تناولت الرقم الهيدروجيني إنزيم الفا –إميليز بمدى من الأرقام الهيدروجينية ومن مصادره المختلفة. حيث جاءت هذه النتيجة مقاربة لما توصل اليه كل من [9] اذ وجدو بان الرقم الهيدروجيني الأمثل للإنزيم لالفا– اميليز في حبوب الذرة البيضاء المنبته هو 6.5. وجد [2] ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم الالفا– اميليز المنتج و المنقى من مالت الشعير المحلي 5 . وتوصل [17] بان الرقم الهيدروجيني الأمثل للإنزيم الالفا– اميليز النقى من مالت الذرة البيضاء 5 .



شكل3- منحنى الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم الفا -اميليز المنقى من حبوب الذرة البيضاء المنبته تجاه الأس الهيدروجيني

6-3 . تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم

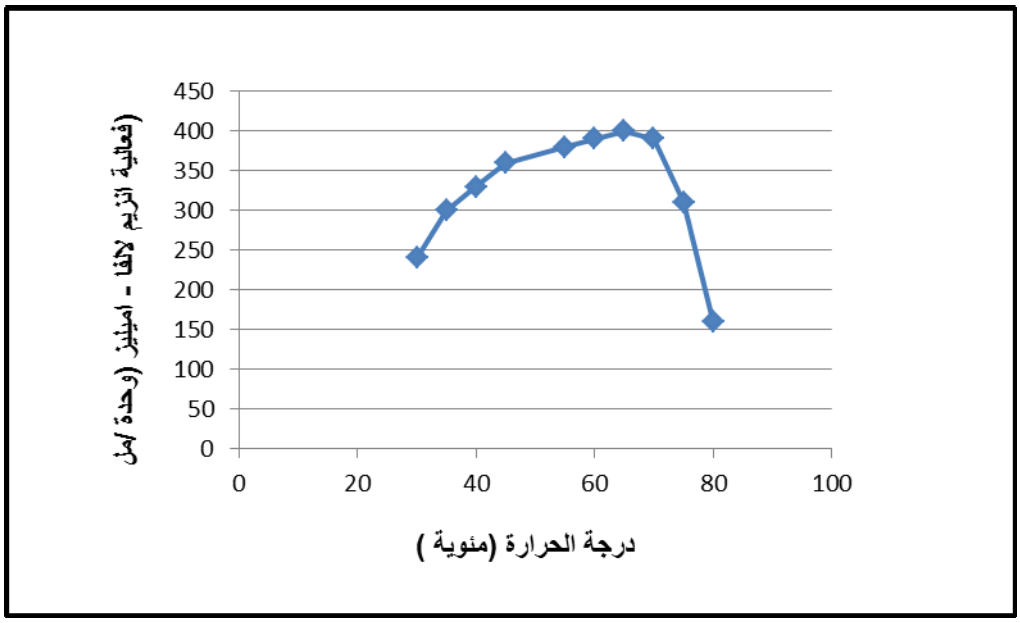
درس ثبات إنزيم الفا – إميليز المنقى من حبوب الذرة البيضاء المنبتة بمدى من الأرقام الهيدروجينية بين (4-8) حيث يعد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم من الصفات المهمة في اختيار وتعيين ظروف التنقية وخزن الإنزيم ويبين الشكل 4 نتائج هذه الدراسة حيث ظهر إن الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم كان بمدى يتراوح بين (5-7) ويقع هذا ضمن المدى لنتائج دراسات أخرى في هذا المجال التي تناولت ثبات إنزيم الفا –إميليز بمدى من الأرقام الهيدروجينية ومن مصادره حبوبية مختلفة . كما جاءت هذه النتائج متفقه لما توصل اليه [2] حيث وجدو ان الرقم الهيدروجيني لثبات الانزيم المستخلص من مالت الشعير المحلي (5-7) ووجد [5] عند دراسة ثباتية أنزيم الالفا– أميليز المنقى من بذور اللوبيا الخضراء أتجاه مدى من الارقام الهيدروجينية تراوحت بين (4– 8) ان الانزيم يكون ثابت عند (6-6.5) كما بين [24] ان التباين في ثبات الإنزيم عند وجوده في قيم مختلفة من الأس الهيدروجيني قد يعود الى التأثير في قدرة الموقع الفعال (Active site) للإنزيم على الارتباط بالركيزة (Substrate) في الظروف الحامضية والقاعدية. ويعد ثبات الإنزيم تجاه الأس الهيدروجيني معياراً مهماً لتحديد الظروف الواجب توفيرها خلال تنقية وتداول وخزن الإنزيم وهو يتأثر ببعض العوامل مثل نوع ومصدر ونقاوة الإنزيم [22] .



شكل4- منحنى الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات فعالية إنزيم الفا -اميليز المنقى من حبوب الذرة البيضاء المنبته تجاه الأس الهيدروجيني

3-7 . تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم

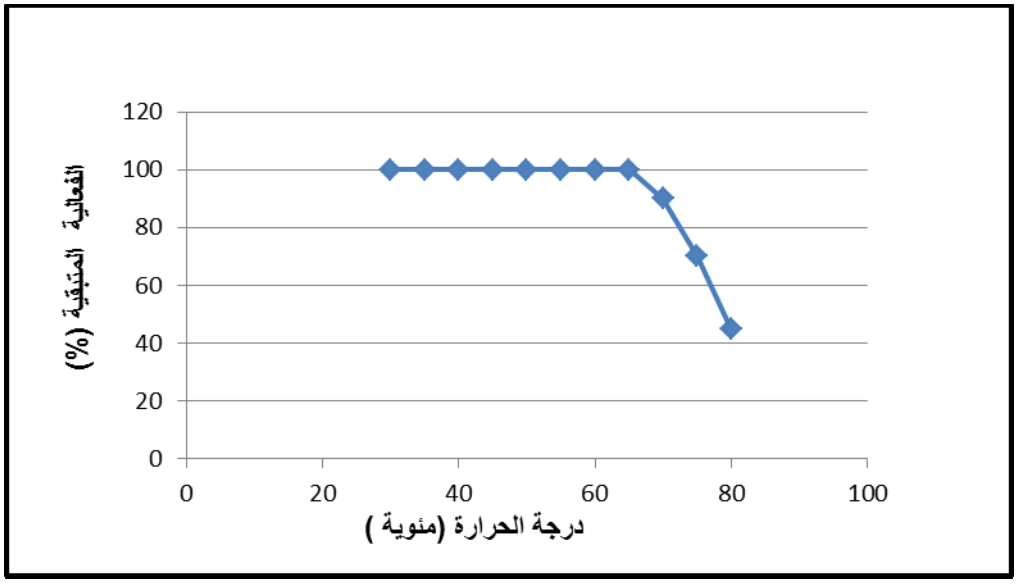
أظهرت النتائج المبينة في شكل 5 ازدياد فعالية الإنزيم مع زيادة درجة الحرارة وبلغت أقصاها عند درجة الحرارة 65 لمدة 20 دقيقة ثم انخفضت بزيادة درجة الحرارة . و جاءت هذه النتيجة مقاربة لما توصل اليه [17] ان درجة الحرارة المثلى للإنزيم الالفا– اميليز المنقى من مالت الذرة البيضاء كانت 70 م و لمدة 10 دقائق . كما وجد كل من [9] ان درجة الحرارة المثلى للإنزيم الالفا– اميليز المنقى من الذرة البيضاء المنبته لمدة 200 ساعة هو 70م . كما وجد [2] ان درجة الحرارة المثلى للإنزيم الالفا– اميليز المنقى من مالت الشعير المنبت 50م . ويعزى سبب زيادة سرعة التفاعلات الإنزيمية مع ارتفاع درجة الحرارة لحد معين إلى زيادة التصادمات بين جزيئات الإنزيم والمادة الأساس نتيجة لزيادة الطاقة الحركية للجزيئات بتأثير زيادة درجة الحرارة فيما تسبب درجات الحرارة العالية انخفاضا في فعالية الإنزيم بسبب تأثيرها على مسخ الإنزيم نتيجة تأثير الحرارة في تركيب الإنزيم وتغير هيئة الموقع الفعال مما يؤدي إلى فقدان فعاليته



شكل5- منحنى درجة الحرارة المثلى لفعالية إنزيم الفا -اميليز المنقى من حبوب الذرة البيضاء المنبته

3-8 . تعيين الثبات الحراري للإنزيم

أظهرت نتائج حضن إنزيم الالفا– اميليز المنقى من حبوب الذرة البيضاء المنبته بدرجات حرارية تراوحت بين (30 – 80) م لمدة 20 دقيقة وبرقم هيدروجيني الامثل للأنزيم و كما موضح بشكل 6 إن الإنزيم يحتفظ بكامل فعاليته لغاية درجة الحرارة 65 مأخذ ت بعدها تنحفض الفعالية تدريجيا عند رفع درجة الحرارة إلى 70 م حيث يحتفظ الإنزيم بحوالي 90% من فعاليته عند هذه الدرجة وعند 80 م يفقد الإنزيم حوالي 55 % من فعاليته . وجاءت هذه النتيجة كما وجدها [2] ان درجة الحرارة المثلى لثبات للإنزيم الالفا– اميليز المنقى من مالت الشعير المنبت كانت (45–60) م لمدة 30 م و انخفضت ثباتيه الانزيم عند معاملته بدرجة حرارة 65م لمدة 20 و 30 دقيقة ع اذ بلغت الفعالية المتبيقة 95% و 70% على التوالي .



شكل 6 - تعيين الثبات الحرارية لا نزيم لالفا- اميليز المستخلص من حبوب الذرة البيضاء المنبته

4. المصادر References

1. **الاعرجي، سند باقر محمد** .(2000) .فصل أنزيم الليبوكسيجينيز ومثبط التربسين من فول الصويا صنف إباء وتنقيتهما وتوصيفهما .أطروحة دكتوراه . كلية الزراعة – جامعة بغداد.

2. **مجيد غياث حميد, علي احمد ساهي , ضياء فالح الفكيكي** (2011) عزل وتنقية انزيم الالفا– اميليز من مالت الشعير مجلة ابحاث البصرة – العلميات العدد السابع والثلاثون الجزء الخامس B

3. **A.O.A.C.** (Association of Official Analytical Chemists) (1980). Official Methods of Analysis, 13th ed., Washington.

4. **Agu. R. C. and Palmerb. G. H. (1996)** GLUCOSIDASE ACTIVITY OF SORGHUM AND BARLEY MALTS , / Inst. Brew., January–February 1997, Vol. 103, pp. 25–29

5. **Bastos Joao Luiz Pinheiro, José tarquinio Prisco and Enéas Gomes filho (1994)** Purification and characterization of aCot yledonary a –amylase from cowpea Seedlings. R. Bras. Fisiol. Veg., 6(1):33–39

6. **Ceci, L. N. and Lozano, J. E. (2002)** Amylase for Apple Juice Processing: Effects of pH, Heat and Ca2+ Ions. Food Technol. Biotechnol. 40 (1):33-38. Chem. Clin Biochem. V. 22: 735 – 739

7. **Corder, A. M., and Henry. R. J. (1989).** Carbohydrate Degrading Enzymes in Germinating wheat. Cereal Chem., 66: 435-439

8. **CSIR Food Science and Technology. Information Handbook(1999).** Sorghum Malting, Sorghum Fermentation, Preparation of Composite Bread and Instant Weaning Foo". CSIR Food Science and Technology, Pretoria, South Africa

9. **Egwin,E.C and O.B,Oloyed .(2006)** Comparison of α amylase activity insome sprouting .Nig .Cereal.Biokemistri,18:15-20

10. **Elena N. CIORNEA, GABRIELA C. VASILE 1, DUMITRU C. COJOCARU (2008).** ON THE AMYLOLYTIC ACTIVITY OF SORGHUM VULGARE . Analele tiinţifice ale Universităţii „Alexandru Ioan Cuza", Secţiunea Genetică şi Biologie Moleculară, TOM IX, 2008

11. **Ghavidel R. A. and Davoodi M. G. (2011**). Evaluation of Changes in Phytase, α-Amylase and Protease Activities of Some Legume Seeds during ermination . International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics IPCBEE vol.5

12. **Javeri, S. and Uhlenbruck, G. (2004). Isolation of B–galactosidese. J. Clin Chem. Clin Biochem. V. 22: 735 – 739**

13. **Jespersen, H. M.; MacGregor, E. A.; Henrissat, B.; Sierks, M. R. and Svensson, B. (1993).** Starch and glycogen debranching and branching enzymes: prediction of structural features of the catalytic (beta/alpha) 8-barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes. I: J. Protein Chem. 12(6): 791-805.

14. **Kimura, A. and Robyt J. F. (1995).** Reaction of enzymes with starch granules: Kinetics and products of the reaction with gluco amylase. Carbohydr. Res. 277: 87-107.

15. **Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Far, A. L. and Randall, R. J. (1951).** Protein Measurement-with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

16. **MacGREGOR, A. W., MARCHYLO, B. A., and KRUGER, J. E.(1988)** Multiple a-amylase components in germinated cereal grains determine by isoelectric focusing and chromatofocusing. Cereal Chern. 65:326.

17. **Mawahib E.M. El Nour ; S.O. Yagoub (2010) .** Partial purification and characterization of α amylase β–amylase isolated from sorghum bicolor cv.(Feterita)Malt , Journal of Applied Sciences ,vol.10

18. **McKee, T. and Mckee, R. (1996).** Biochemistry an introduction. Chapter 7 / Carbohydrates. Printed in the USA.

19. **Nevalyonny, A. N.; Zaistev, V. F.; Yegorov, S. N. and Korostelyov, S. G. (1991).** Effect of water pH different values on activity of some digestive enzymes in carp (Cuprinus carpio L.) Acta Ichthyologica et Piscatoria. V. 21(1): 59-63.

20. **Pandey, A.; Nigam, P.; Soccal, C. R.; Soccal, V. T.; Singh, D. and Mohan, R. (2000).** Advances in Microbial amylase. Biotechnol. Appl. Biochem. 31: 135-152

21. **Reed, G. (1975).** Carbohydrases. In: Enzymes in Food Processing, 2nd, Academic Press. New York.Robinson and N. A. Eskin (Ed) P. 175 Elsevier Applied Sci. London.

22. **Segel, I.H. (1976).** Biochemical calculations. 2nd edition, John and sons. Inc. New York.

23. **Whitaker, J. R. (1972**). Principle of Enzymology for the Food Science page 607 , Marcel Dekker , INC , New York

24. **Whitaker, J. R. (1994).** Lipoxygenase. In Oxidative Enzyme in Foods, D. S.,

25. **Wilson, J. J. and Ingledew, W. M.(1982).** Isolation and characterization of the amylolytic enzymes of Schwanniomyces alluvius. Appl. Environ. Microbiol. 44:301-307.

Extraction , Purification and Characterization of alpha- amylase from germinated Sorghum seeds

Dhia . Falih . Alfekaiki
Depart. of Food Sciences / College of Agriculture/ University Of Basra
Basrah- Iraq
alfekaiki@yahoo.com

Abstract

The study included germination of sorghum cereal and alpha- amylase was followed up during the germination stages, the results showed increase in the activity of amylase in five day from germination 1600 U/ml .after that was selected of the best methods to extract the enzyme among fore methods. The purification stages were done by two steps included precipitation by ammonium sulphate at (30-70) % saturation and gel filtration on sephadex G100. The final purification folds and the yield of the enzyme were 19.31. times and 14.60%, respectively. The purified enzyme showed following characteristics: The optimum pH of the enzyme activity was 6. The enzyme was most stable at pH (4.5 - 6). The optimum temperature for its activity was 65 c. The enzyme retained its original activity when incubates at (30-70) c for 20 minutes.

Key words : enzyme , alpha amylase , sorghum germination