دراسة الظروف المثلى لاستخلاص مثبطات الفا- أميليز لعاب الانسان في خمسة أصناف من الذرة الصفراء

انوار احمد خلف **إيثار زكي ناجي**

anwar.ahmad235@yahoo.com etze-957@yhoo.com

قسم علوم الاغذية– كلية الزراعة–جامعة تكريت - العراق

المستخلص

استخلصت مثبطات الالفا-أميليز من بعض أصناف الذرة الصفراء شملت Veto و Monarg و Rohnaldinia وDaredh وMay-70 باستعمال 0.2 مولار دارئ خلات الصوديوم برقم هيدروجيني 6 وتم تحديد نسب التثبيط لجميع اصناف الذرة الصفراء تجاه أميليز لعاب الانسان بوساطة الطريقة المستخدمة. أظهرت النتائج تباين هذه النسب بإختلاف الصنف إذ تميز الصنف Rohnaldinio في نسب التثبيط تجاه أميليز اللعاب إذ بلغت 40.26% بالمقارنة مع الصنفين Monarg وVeto والبالغة 23.60% و16.47% على التتابع، في حين أظهر الصنفان May-70 وDaredh فعالية قليلة تجاه الاميليزنفسه، اما تحديد النسبة المثالية لاستخلاص مثبطات الالفا-الاميليز من أصناف الذرة الصفراء، وعند نسب مختلفة اشتملت على 2.5:1 و5:1 و 10:1 (وزن:حجم)، فقد اظهرت ان الفعالية النوعية كانت في اقصاها عند استخلاص المثبط من الصنف Rohnaldinia بنسبة خلط 5:1 فبلغت الفعالية النوعية 6.32وحدة ملغم-^{1} بروتين، مقارنة ببقية الاصناف. وبينت نتائج تحديد وقت الاستخلاص الامثل لمثبطات الالفا-أميليز من أصناف الذرة الصفراء وبوقت استخلاص 1.0و 1.5و2.0 ساعة، ان الفعالية النوعية كانت في اقصاها عند استخلاص المثبط من الصنف Rohnaldinia بوقت 1.5 ساعة بلغت 5.66 وحدة ملغم-^{1} بروتين، مقارنة ببقية الاصناف. واظهرت النتائج أيضا وجود تأثير للرقم الهيدروجيني في قابلية تداخل المثبط مع اميليزاللعاب وكان الرقم الامثل لارتباط المثبط من الصنف Rohnaldinia مع اميليز اللعاب بحدود 6، في حين كان لمثبط الصنف Monarg عند رقم هيدروجيني 7، وبين ارتباط المثبط من الصنف Veto بالاميليز نفسه عند رقم هيدروجيني 5 والمثبط من الصنف Daredh عند رقم هيدروجيني 8، وأخيرا جاء ارتباط المثبط من الصنف May-70 بالاميليزعند رقم هيدروجيني 6. وتم تحديد درجة الحرارة المثلى لفعالية المثبط بدرجات حرارية تراوحت بين 30 – 80 °م وتبين حصول زيادة واضحة في فعالية التثبيط بارتفاع درجات الحرارة من 60 °م إلى 80 °م حتى وصلت بدرجة 80°م الى نسبة تثبيط 40.66% عند ارتباط المثبط من الصنف Rohnaldinia باميليز اللعاب.

الكلمات المفتاحية: مثبطات الفا-اميليز، اميليز لعاب الانسان، اصناف الذرة الصفراء.

المقدمة

الذرة الصفراء *Zea mays L.* أحد أنواع الحبوب المهمة، وتزرع في مساحات واسعة في دول العالم النامية، وذلك لاعتماد الملايين من الناس عليها واستعمالها في الصناعات المختلفة (Vivek وآخرون، 2008)، وعلى المستوى العالمي تعد الذرة الصفراء ثالث محصول من بعد الحنطة والرز ويبلغ متوسط الانتاج العالمي من هذا المحصول 960 مليون طن عام 2012، وكانت المساحة المزروعة 113 مليون هكتار وبمتوسط انتاج 2700 كغم هكتار$^{-1}$ (Roney-John وآخرون، 2009) ويعد هذا المحصول من الناحية الاقتصادية من أهم المحاصيل المزروعة في بعض مناطق العالم، ففي الولايات المتحدة الأمريكية يشغل هذا المحصول اكبر مساحة زراعية ويعد أعلى المحاصيل من ناحية القيمة النقدية وتصل نسبة الاراضي المزروعة به سنوياً الى أكثر من 25 % من المساحة المزروعة (يوسف، 2006). ولاشك في ان استعمالات حبوب الذرة الصفراء للغذاء هي الأكثر في العالم، ولقد حلت الذرة الصفراء

استلام البحث: 2016/9/27
قبول النشر: 2017/5/16

محل الدخن والذرة البيضاء في الكثير من المناطق لغرض الغذاء وذلك لسهولة زراعة المحصول وخزنة ولكثرة الاغذية التي يمكن تصنيعها من طحين حبوبها، إذ يقدر محتواها وعلى أساس الوزن الجاف من الكربوهيدرات 63.6% والبروتين 9.8% والدهن 4.9% والألياف 2.0% والرماد 4%، فضلا عن احتوائها على بعض الفيتامينات مثل الرايبوفلافين والبيريدوكسين Perodexin وفيتامين C وعلى الكاروتينويدات (Carotenoids) (Bressanil وآخرون، 1989 ؛ Kaur وآخرون، 2009).

ان محتوى الحبوب من العناصر الغذائية جعلها عرضة للاصابة بالعديد من الحشرات والطفليات ونتيجة الايض الثانوي للنباتات لذا تخزن مواد لها دور مهم في مقاومة هذه الحشرات والطفيليات لاسيما المعتمدة منها على المواد النشوية مصدراً للطاقه لارتفاع نسبة النشا في الحبوب، والتي قد تصل الى 83% تقريبا عن طريق تثبيط اميليز هذه الحشرات التي تعتمد عليه في تحليل النشا وتحويله الى سكريات بسيطة يمكنها امتصاصها وتمثيلها والافاده منها في تحرير الطاقه لانجاز الفعاليات الحيوية (Franco وآخرون، 2005).

تحتوي الحبوب ومنها الذرة الصفراء على مثبطات الالفا-اميليز والتي تعد من مركبات الأيض الثانوي (Fontanini وآخرون، 2007) وهي عبارة عن بروتينات غنية بالـ Cystine يصنعها النبات بصورة طبيعية لاغراض دفاعية، وقد اظهرت معظم هذه البروتينات فعالية في حماية النبات من الاصابة بالعديد من الحشرات والممرضات (Pelegrini وآخرون، 2008). تنتشر المثبطات البروتينية بصورة واسعة في المملكة النباتية (Jakowski، 2010) وتمثل تقريبا 1-10% من البروتينات الكلية (Buonocore وآخرون، 1977)، ونالت هذه المثبطات بعض الاهتمام لتعدد مجالات الافادة منها، لكنها عدت في بداية التعرف على وجودها في الحبوب عام 1946 (Sandstedt و Beckord, 1946) كمكونات لاغذائية (Burgos-Hernàndes وآخرون، 1999)؛ بسبب امتلاكها القدرة على تثبيط اميليزات اللبائن ومنها اميليز الانسان (Friedman، 1987)، ولكن في عام 1980 بعد ان لاحظ بعض باحثي مجموعة مايو الطبية للبحوث الدوائية ان لهذه المثبطات القدرة على خفض نسبة السكر في الدم عند المرضى المصابين بالسكري والاشخاص الاصحاء بعد تناولهم وجبة غنية بالمواد النشوية، لذا هدفت هذه الدراسة الى الكشف عن قابلية هذه المثبطات في تثبيط الفا-أميليز لعاب الانسان ودراسة الظروف المثلى لاستخلاص هذه المثبطات.

المواد وطرائق البحث

مصادر الذرة الصفراء

تم الحصول على خمسة أصناف من الذرة الصفراء المعتمدة والمزروعة من قبل بعض الفلاحين في منطقة الحويجة من الهيئة العامة للبحوث الزراعية\ صلاح الدين وهي Veto و Monarg و Rohnaldinio و Daredh و May-70 من ناتج الموسم الزراعي 2011، نظفت الحبوب يدويا من المواد الغريبة وحبوب المحاصيل الأخرى والأتربة.

استخلاص مثبطات الالفا-اميليز

استخلصت مثبطات الألفا-أميليز من حبوب جميع اصناف الذرة الصفراء وذلك بعد طحنها باستخدام المطحنة الكهربائية للحصول على طحين ناعم ومتجانس بحسب الطريقة التي اعتمدها (Haidari واخرون، 2005)، ثم استخلصت باستعمال دارئ خلات الصوديوم 0.2 مولار ورقم هيدروجيني 6 وبنسبة خلط 10:1 (وزن:حجم) وباستعمال التحريك المغناطيسي لمدة 60 دقيقة في درجة حرارة الغرفة، بعدها نبذ الخليط مركزيا بسرعة 30000xg لمدة 20 دقيقة ودرجة حرارة 4°م، ثم اخذ الرائق الحاوي على المثبط وهو المستخلص الخام لتقدير فعالية التثبيط.

تقدير الفعالية التثبيطية

قدرت الفعالية الانزيمية على وفق الطريقة التي وصفها Whitakerو Bernaed (1972) واعتمادا على السكريات المختزلة المتحررة نتيجة التحلل المائي للنشا بفعل الانزيم عن طريق حضن 0.1 مليلتر من محلول الالفا-أميليزالمتحصل عليه من اميليز لعاب الانسان، مع 0.9 مليلتر من محلول المادة الأساس (2% نشا) لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 37 °م، بعدها أوقف التفاعل بإضافة 1.0 مليلتر من كاشف DNSA وسخنت المحتويات في حمام مائي مغلي لمدة 5 دقائق ثم بردت بصورة مباشرة واضيف اليها 10 مل من الماء المقطر تلاها المزج وقراءة الامتصاصية عند الطول الموجي 540 نانوميترا، بالمقارنة مع العينة الكفء المحضرة بالطريقة نفسها ما عدا إضافة محلول الانزيم بعد إضافة كاشف DNSA لمنع حدوث التفاعل، اما الفعالية التثبيطية للمستخلص الخام فقد قدرت حسب الطريقة الموضحة من قبل (Kokiladevi واخرون، 1972) وذلك عن طريق تقدير الفعالية الانزيمية المتبقية بعد حضن الانزيم مع مستخلصات المثبطات وبنسبة 1:1 بدرجة حرارة 37 °م ولمدة 30 دقيقة لاتمام تفاعل التثبيط، ثم تقدير فعالية الانزيم المتبقية.

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

قدرالبروتين في محلول المثبط الخام بحسب الطريقة المقترحة من قبل Bradford (1977)، ثم حسبت الفعالية النوعية للمثبط Specific activity والتي تعبر عن وحدات الفعالية لكل ملغم بروتين بحسب المعادلة الاتية (Bernaed و Whitaker، 1972):

$$\text{الفعالية النوعية (وحدة ملغم}^{-1}\text{ بروتين)} = \frac{\text{الفعالية (وحدة مل}^{-1}\text{)}}{\text{تركيز البروتين (ملغم مليلتر)}}$$

تعيين الظروف المثلى لاستخلاص المثبط

ـ تحديد نسبة الاستخلاص المثلى

استخلصت مثبطات الألفا- أميليز من اصناف الذرة الصفراء وباعتماد نسب استخلاص عدة اشتملت على 2.5:1 و5:1 و10:1 (وزن:حجم)، ثم قدرت الفعالية التثبيطية لتحديد نسب الاستخلاص الأمثل لمثبطات الاميليز، بحسب الطريقة التي اعتمدها (Kokiladevi وآخرون، 1972).

ـ تحديد مدة الاستخلاص المثلى

استخلصت مثبطات الألفا-أميليزمن اصناف الذرة الصفراء وبالنسبة المثلى المنتخبة في مدد زمنية مختلفة اشتملت على 1 و 1.5 و 2 ساعة، بعدها قدرت الفعالية التثبيطية لتحديد الزمن الامثل لاستخلاص المثبطات بحسب الطريقة التي اعتمدها Kokiladevi وآخرون (1972).

تعيين الظروف المثلى لفعالية المثبط

ـ تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل

اعتمدت الطريقة التي اقترحها Figueira وآخرون، 2003b) في تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية المثبط وذلك باضافة 1.0 مليلتر من محاليل الدوارئ بارقام هيدروجينية تراوحت بين 4 و9 إلى 0.5 مليلتر من محلول المثبط و 0.5 مليلتر من محلول الانزيم، بعدها حضنت جميع العينات في درجة حرارة 30 °م ولمدة 30 دقيقة، ثم قدرت الفعالية التثبيطية لتحديد الرقم الامثل لفعالية المثبطات.

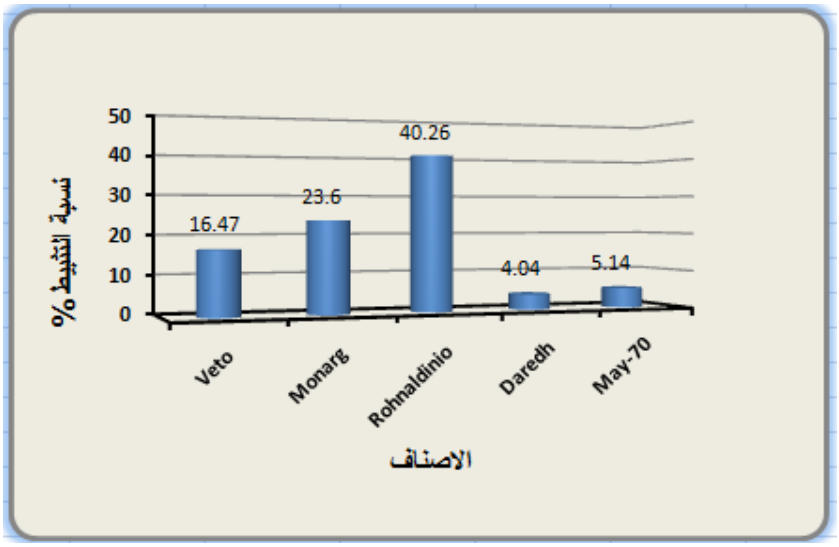
ـــ تحديد درجة الحرارة المثلى

لتحديد درجة الحرارة المثلى لفعالية المثبط، قدرت الفعالية التثبيطية بحسب الطريقة التي اعتمدها Kokiladevi وآخرون (1972) بعد حضن مثبط الاميليز وبنسب متساوية (1:1) (حجم:حجم) مع أميليزاللعاب في مدى من درجات الحرارة تراوحت بين 30- 80 °م ولمدة 30 دقيقة ثم رسمت العلاقة بين درجات الحرارة والفعالية التثبيطية.

النتائج والمناقشة

التحري عن مثبطات الألفا-أميليز في بعض أصناف الذرة الصفراء

يوضح الشكل 1 نسب التثبيط لأصناف مختلفة من الذرة الصفراء اختيرت لهذه الدراسة تجاه ألفا-أميليز لعاب الانسان، ويظهر فيه تباين هذه النسب بإختلاف الصنف، فقد تميز الصنف Rohnaldinio في تجاه أميليز اللعاب بنسبة تثبيط قدرها 40.26% بالمقارنة مع الصنفينMonarg وVeto والبالغة 23.60% و16.47%على التتابع، في حين أظهر الصنفان May-70 و Daredh أدنى نسبة تثبيط بلغت 5.14% و 4.04% على التتابع تجاه الاميليز نفسه.



الشكل 1. نسب التثبيط لمثبطات الفا-أميليز المستخلصة من أصناف الذرة الصفراء تجاه الفا-أميليز لعاب الانسان

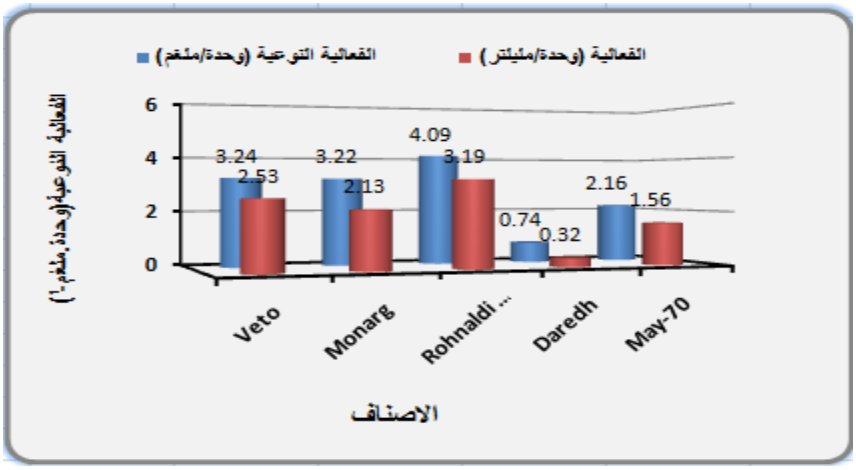
إنّ الاختلاف في فعالية التثبيط بين الاصناف يعد امراً طبيعياً وقد شخصها العديد من الباحثين، فقد أشار عدد من الباحثين الى وجود إختلافات في فعالية التثبيط بين أنواع الشعير Barley (Jarrett وآخرون، 1997) والشيلم Rye (Taufel وآخرون، 1997). ووجد Mulimani وSupriya (1993a) اختلافاً في فعالية التثبيط عندما تَحريا عن فعالية مستخلصات اربعة انواع من الحبوب في تثبيط اميليز لعاب الانسان.

تحديد الظروف المثلى لاستخلاص مثبطات الاميليز

ـــ نسبة الاستخلاص المثلى لمثبطات الالفا-اميليز

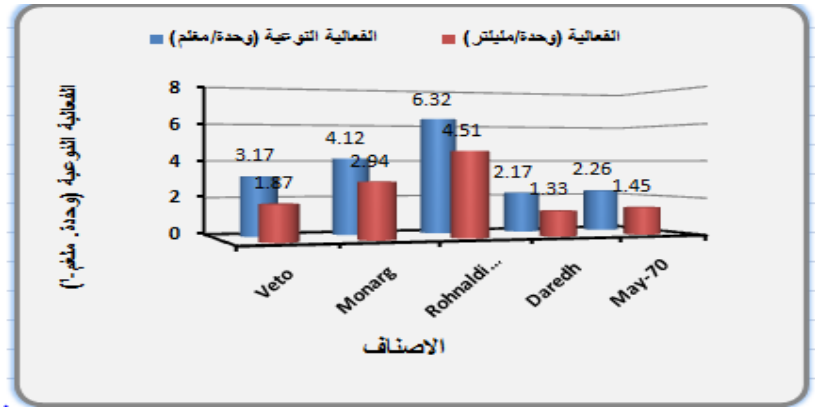
اظهرت النتائج المبينة في الشكل 2 ان فعالية التثبيط كانت في اقصاها عند استخلاص المثبط من صنف الذرة الصفراء Rohnaldinia بنسبة خلط 2.5:1، حيث بلغت فعالية التثبيط 3.19 وحدة مليلتر وبفعالية نوعية مقدارها 4.09 وحدة ملغم-1 بروتين مقارنة مع بقية الاصناف، في حين بلغت الفعالية النوعية 3.24 وحدة ملغم-1 عند استخلاص المثبط من الصنف Veto، وبلغت 0.74 وحدة ملغم-1عند استخلاص المثبط من الصنف Daredh وبالنسبة نفسها، وبلغت للمثبط المستخلص من الصنفين

Monarg و May-703.22 وحدة ملغم و 2.16 وحدة ملغم-1 على التتابع، وقد أشارت عدد من الدراسات الى ان نسبة الاستخلاص تتباين بتباين نوع المثبط ونوع الدارئ المستعمل وكفاءته في الاستخلاص ولكن بصورة عامة فان نسبة الاستخلاص لهذه الدراسة تتفق مع ماذكره Blanco-Labra واخرون (1980) اذ اشاروا الى ان نسبة التثبيط الامثل كانت عند نسبة استخلاص 2.5:1 عند استخلاصهم لمثبطات الاميليز من الذرة الصفراء.



شكل 2 . تأثير نسبة الاستخلاص 2.5:1 في فعالية التثبيط والفعالية النوعية لمثبطات الفا-اميليز اللعاب المستخلصة من اصناف الذرة الصفراء قيد الدراسة

وأظهرت النتائج في الشكل 3 ان فعالية التثبيط كانت في اقصاها عند استخلاص المثبط من صنف الذرة الصفراء Rohnaldinia بنسبة خلط 5:1، بالمقارنة مع بقية الاصناف وبلغت فعالية التثبيط 4.51 وحدة مليلتر وبفعالية نوعية مقدارها 6.32 وحدة ملغم-1 بروتين، في حين كانت الفعالية النوعية 4.12 وحدة ملغم عند استخلاص المثبط من الصنف Monarg، ووصلت الى 2.17 وحدة ملغم-1 عند استخلاص المثبط من الصنف Daredh بنسبة 5:1، وبلغت للمثبط المستخلص من الصنفين May-70 و Veto 2.26 وحدة ملغم-1 و3.17 وحدة ملغم-1على التوالي.

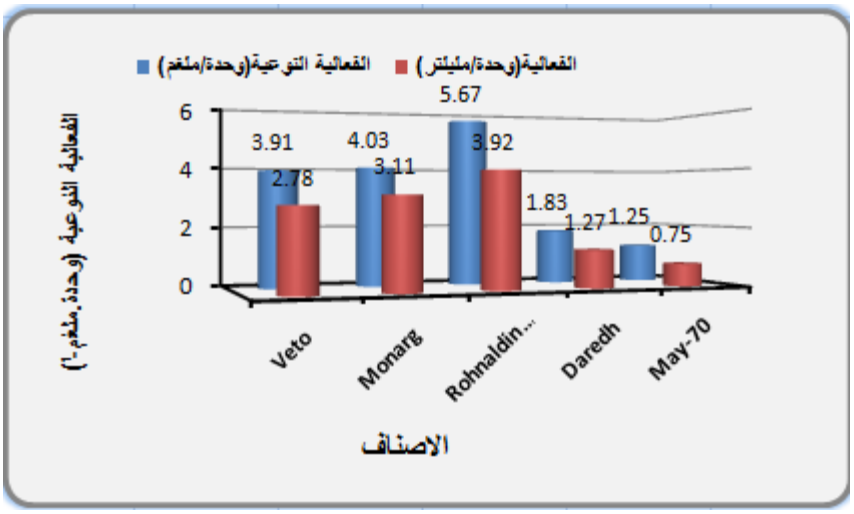


الشكل 3. تأثير نسبة الاستخلاص 5:1 في فعالية التثبيط والفعالية النوعية لمثبطات الفا-أميليز اللعاب المستخلصة من اصناف الذرة الصفراء قيد الدراسة

وهذا يتفق مع ماذكره Figueira وآخرون (2003a) الذين اشاروا الى ان نسبة التثبيط الامثل كانت عند نسبة استخلاص 5:1 تجاه اميليز لعاب الانسان عند استخلاصهم لمثبطات الاميليز من الذرة الصفراء.

ويبين الشكل 4 ان فعالية التثبيط كانت في اقصاها عند استخلاص المثبط من الصنف Rohnaldinia بنسبة خلط 10:1 حيث بلغت فعالية التثبيط 3.92 وحدة مليلتر وبفعالية نوعية مقدارها 5.67 وحدة ملغم-1

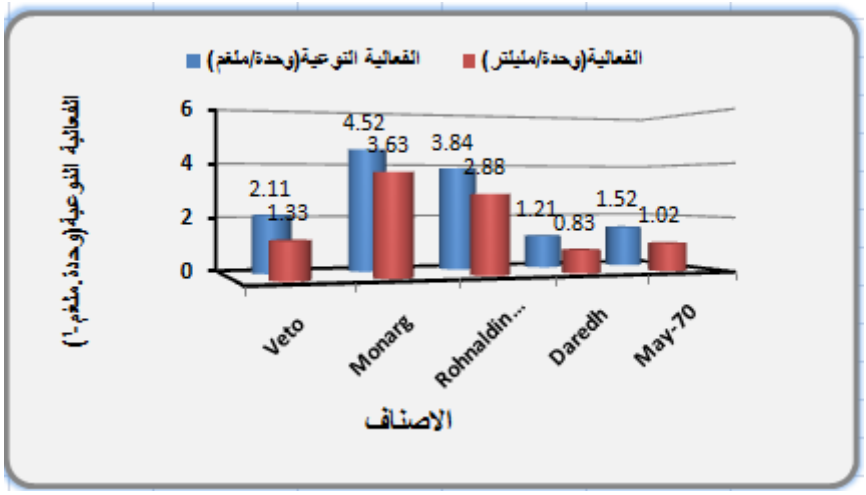
بروتين، في حين كانت الفعالية النوعية 4.03 وحدة ملغم-1 عند استخلاص المثبط من الصنف Monarg ووصلت الى 1.25 وحدة ملغم-1 عند استخلاص المثبط من الصنف May-70 بالنسبة نفسها وبلغت للمثبط المستخلص من الصنفين Daredh وVeto 1.83 وحدة ملغم-1 و 3.91 وحدة ملغم-1 على التتابع وهذا يتفق مع ماذكره Rebecca وآخرون (2001) و Figueira وآخرون (2003b) و Silva-Sanchez واخرون (2004) وHeidari واخرون (2005).



شكل 4 . تأثير نسبة الاستخلاص10:1 في فعالية التثبيط والفعالية النوعية لمثبطات الفا-أميليز اللعاب المستخلصة من اصناف الذرة الصفراء قيد الدراسة

وقت الاستخلاص الامثل لمثبطات الالفا-اميليز

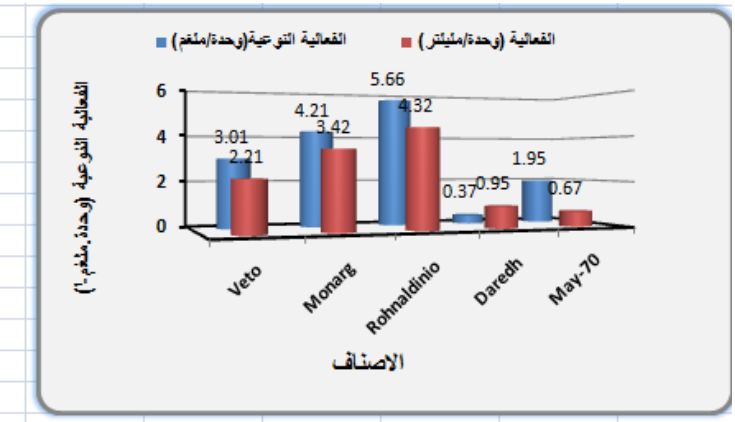
يمثل الشكل 5 العلاقة بين وقت استخلاص المثبط من اصناف الذرة الصفراء قيد الدراسة لمدة ساعة واحدة وفعالية التثبيط والفعالية النوعية لهذه المثبطات . بينت النتائج تميز الصنف Monarg بامتلاكه اعلى فعالية تثبيط بلغت 3.63 وحدة مليلتر وفعالية نوعية مقدارها 4.52 وحدة ملغم-1 بروتين، في حين بلغت الفعالية النوعية 3.84 و 2.11 و 1.52 و1.21 وحدة ملغم-1عند استخلاص المثبط من الاصناف Rohnaldinia وVeto وMay-70 و Daredh على التتابع.



شكل 5 . تاثير وقت الاستخلاص لمدة 1.0 ساعة في فعالية التثبيط والفعالية النوعية لمثبطات الفا-اميليز اللعاب المستخلصة من أصناف الذرة الصفراء قيد الدراسة

إنّ وقت الاستخلاص هذا يتفق مع ماأشار اليه Titarenko وآخرون (2000) في استعمال مدة ساعة في استخلاص مثبطات الاميليز من الذرة الصفراء ، واستُعمل الوقت نفسه في استخلاص مثبطات الاميليز من الشيلم والتريتيكيل (Burgos-Hernandez وآخرون، 1999) واختلف الوقت الذي استعمل في هذه الدراسة مع بعض ما ورد في البحوث العلمية إذ أشير فيها الى استعمال وقتاً اقل لاغراض الاستخلاص من الحبوب فمثلا استخدم Nagaraj و Pattabiraman (1985) الخلط لمدة 20 دقيقة في استخلاص المثبط من دخن الـ Proso.

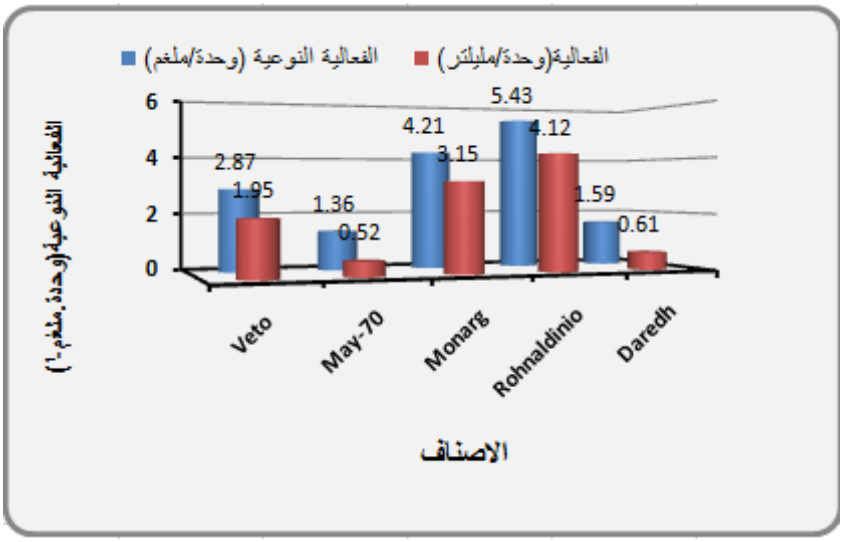
يبين الشكل 6 ان أعلى فعالية تثبيطية كانت عند استخلاص المثبط من صنف الذرة الصفراء Rohnaldinio بوقت استخلاص 1.5 ساعة حيث بلغت فعالية التثبيط 4.32 وحدة مليلتر وبفعالية نوعية مقدارها 5.66 وحدة ملغم-1 بروتين، تلاها المثبط المستخلص من الصنف Monarg بفعالية نوعية بلغت 4.21 وحدة ملغم-1 بروتين، في حين بلغت الفعالية النوعية 3.01 و 1.95 و 0.37 وحدة ملغم-1 للمثبطات المستخلصة من الاصناف Veto و May-70 و Daredh على التتابع، واختلف الوقت الذي استعمل في هذه الدراسة مع بعض ما ورد في البحوث العلمية إذ إشير فيها الى استخدام وقتاً أطول لاغراض الاستخلاص من الحبوب، فقد استعمل Mulimani و Supriya (1993) 6 ساعات في استخلاص المثبطات من الذرة البيضاء واستخلص Miranda وآخرون (1995) المثبط من الذرة الصفراء لمدة خلط 2 ساعة.



شكل 6 . تاثير وقت الاستخلاص لمدة 1.5 ساعة في فعالية التثبيط والفعالية النوعية لمثبطات الفا- اميليزاللعاب المستخلصة من اصناف الذرة الصفراء قيد الدراسة

يبين الشكل 7 ان فعالية التثبيط كانت في اقصاها عند استخلاص المثبط من صنف الذرة الصفراء Rohnaldinio بوقت استخلاص 2.0 ساعة، فقد بلغت فعالية التثبيط 4.12 وحدة مليلتر وبفعالية نوعية مقدارها 5.43 وحدة ملغم-1 بروتين، تلاها المثبط المستخلص من الصنف Monarg بفعالية نوعية 4.21 وحدة ملغم-1، ثم مثبط الصنف Veto بفعالية نوعية 2.87 وحدة ملغم-1، ثم مثبط الصنف Daredh وMay-70 بفعالية نوعية 1.95 و 1.36 على التتابع. وقد اتفقت هذه النتيجة مع بعض الدراسات في هذا المجال، فقد استخلص Miranda وآخرون (1995) المثبط من الذرة الصفراء بمدة خلط بلغت 2 ساعة، واعتمد العديد من الدارسين وقتا اطول من الوقت المحدد في هذه الدراسة، فقد أشار Franco واخرون (2002) الى استخلاص المثبط بالخلط لمدة 5 ساعات باستعمال 0.15 مولار كلوريد الصوديوم في ظروف مبردة، ويتضح من ذلك ان وقت الاستخلاص يتحدد بعدة عوامل منها مصدر المثبط وصنفه، ونوع المثبط ونسبة الاستخلاص وكذلك نوع الدارئ المستعمل وظروفه وكفاءته في استخلاص المثبط المطلوب.

مما سبق يتضح ان افضل وقت لاستخلاص المثبط من الصنف Rohnaldinio كان 1.5 و 2.0 ساعة، ثم الصنف Monarg بوقت 1.0 ساعة.



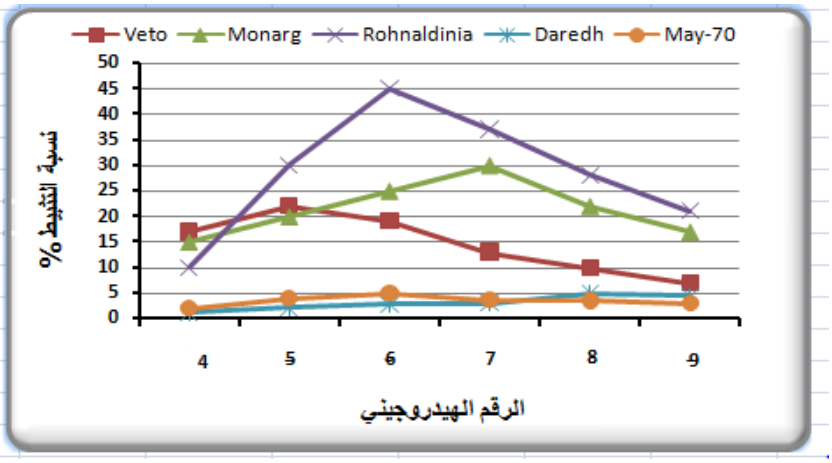
شكل 7 . تاثير وقت الاستخلاص لمدة 2.0 ساعة في فعالية التثبيط والفعالية النوعية لمثبطات الفا- اميليز اللعاب المستخلصة من اصناف الذرة الصفراء قيد الدراسة

تعيين الظروف المثلى لفعالية المثبط

ـ الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية مثبطات الالفا-أميليز

درس تأثير ارقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين 4–9 في فعالية التثبيط لمثبطات الالفا-أميليز لجميع أصناف الذرة الصفراء قيد الدراسة لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لارتباط هذه المثبطات مع اميليز لعاب الانسان عند حضنهما معا عند درجة حرارة 30°م ولمدة 30 دقيقه، وتظهر النتائج المبينة في الشكل 8 وجود تأثير للرقم الهيدروجيني في قابلية تداخل المثبط مع اميليز لعاب الانسان، ويلاحظ من الشكل المذكور ارتباط المثبط من الصنف Veto باميليز اللعاب عند رقم هيدروجيني 5 وبنسبة تثبيط 22%، في حين كانت افضل قابلية لارتباط المثبط من الصنف Monarg بأميليز اللعاب عند رقم هيدروجيني 7 وبنسبة تثبيط 30% ، وتبين ان الرقم الامثل لارتباط المثبط من الصنف Rohnaldinio مع اميليز اللعاب هو بحدود 6 وبنسبة تثبيط 45% ويُظهرالشكل ايضا نسبة تثبيط بلغت 5% عند ارتباط المثبط من الصنف Daredh بالاميليز نفسه عند رقم هيدروجيني 8، وأخيرا جاء ارتباط المثبط من الصنف May-70 بالاميليز عند رقم هيدروجيني 6 وبنسبة تثبيط 5% تتثبط فعالية اميليز لعاب الانسان في الارقام الهيدروجينية الحامضية لان الاميليز هو نفسه يتثبط في هذه الاوساط ويعود ذلك الى الدنترة التي تسببها هذه الارقام للاميليز.

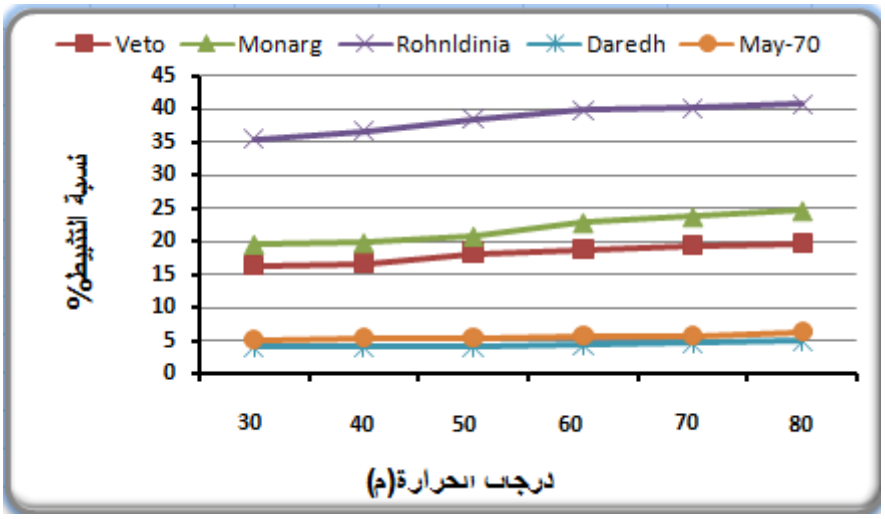
وردت دراسات اشارت الى اختلاف الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية المثبط نوعا ما تبعا لمصدره ونوعه ذكر ان الرقم الامثل لفعالية المثبط المعزول من الشعيرفي تثبيط الاميليزات الداخلية للشعير والشيلم هو بحدود الارقام القاعدية وفي الارقام اعلى من 8 (Weslake واخرون، 1983 ؛ Torronen وآخرون، 1992)، واشار Blanco وآخرون (1995) أيضاً الى ان اعلى نسبة تثبيط كانت عند رقم هيدروجيني 6.8 بدرجة حرارة 80 °م وبوقت 10 دقائق من المثبط المستخلص من الذرة الصفراء تجاه اميليز *Sitophilus zeamias* وهو اعلى نسبة تثبيط مقارنة بالمثبط المعزول من الذرة الصفراء والذي كان عند رقم هيدروجيني بحدود 7 لتثبيط الانزيم نفسه.



شكل 8 . تاثير الرقم الهيدروجيني في نسبة التثبيط لمثبطات الفا-اميليز لعاب الانسان المستخلصة من اصناف الذرة الصفراء

ـ درجة الحرارة المثلى لفعالية مثبطات الالفا-اميليز

لتحديد درجة الحرارة المثلى لفعالية المثبطات حضنت هذه المثبطات مع أميليز اللعاب الخام في درجات حرارة بين 30- 80 °م لمدة 30 دقيقة، ويلاحظ من الشكل 9 وجود زيادة بسيطة في فعالية التثبيط بارتفاع درجة الحرارة ولغاية 60°م، ويلاحظ ايضا من الشكل ذاته حصول زيادة واضحة في فعالية التثبيط بارتفاع درجة الحرارة من 60 إلى 80°م، إذ يلاحظ ارتباط المثبط من الصنف Veto باميليز اللعاب عند درجة حرارة 80°م وبنسبة تثبيط 19.54%، في حين كانت افضل قابلية لارتباط المثبط من الصنف Monarg بنسبة تثبيط 24.66% عند درجة حرارة 80°م، وتبين ان درجة الحرارة المثلى لارتباط المثبط من الصنف Rohnldinia مع اميليز اللعاب هي عند 80°م وبنسبة تثبيط 40.66%، ويمكن تفسير ذلك بتأثير درجات الحرارة العالية في الاميليز والتسبب في دنترته فيظهر المثبط كأنما اعطى زيادة في نسبة التثبيط، في حين قد يعود تاثير التثبيط الاضافي للحرارة المستعملة وليس للمثبط نفسه، فقد ورد في العديد من البحوث العلمية أن المثبطات المختلفة تتباين في درجات الحرارة المطلوبة تبعاً لمصدرها ونوعها وكذلك مصدر ونوع الاميليز الذي يتم تثبيطه فقد أشار Edson وآخرون (2003) الى زيادة مقدارها 47.6% في فعالية المثبط المنقى من الذرة الصفراء عند حضنه بمدى من درجات الحرارة بين 0-94 °م مع أميليز الفطر *Fusarium verticillioides* ولمدة 60 دقيقة.



شكل 9 . تاثير درجة الحرارة المثلى في فعالية التثبيط والفعالية النوعية لمثبطات الفا-اميليز لعاب الانسان المستخلصة من اصناف الذرة الصفراء

المصادر

يوسف، ضياء بطرس وموفق سعيد نعوم وعباس خضير عباس ولمياء إسماعيل محمد. 2006. إنتاج وتقييم بعض الهجن الزوجية الفردية المدخلة من الذرة الصفراء. *مجلة دراسات- العلوم الزراعية*. 33(2): 59–70.

Blanco-Labra, A., F. A. Iturbe-Chiñas. 1980. Purification and characterization of an α-amylase inhibitor from maize (*Zea maize*). *J. Food Biochem.* 5: 1–17.

Blanco-Labra, A. A., N. Chagolla-Lopez, Mart.nez-Gallardo and S. Valdes-Rodrigues. 1995. Further characterization of the 12 kD protease alpha-amylase inhibitor present in maize seeds. *J. Food Biochem.* 19: 27-41.

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.* 72: 248-254.

Bressanil, R. A. Breuner and Ortiz, 1989. Contenidodfibraacidoy neutron-detergenteyde minerals menores maize sutortilla. *Arch. Latinoam. Nutr*., 39: 282-391.

Edson, Z., D. G. White and G. A. Payne. 2003. Corn seed proteins inhibitory to *Fusarium verticillioides* and aflatoxin biosynthesis. *Phytopathology*, 87: 622-627.

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

Figueira, E. L. Z., A. Blanco-Labra, E. Y. S. Gerage, E. Ono, Y. Mendiola-Olaya, E. Y. Ueno and E. Y. Hirooka. 2003b. Amylase inhibitor present in corn seeds active in vitro against amylase from *Fusariumverticillioides*. *Plant Dis*. 87: 233-240.

Buonocore, V., T. Petrucci and V. Silano. 1977. Wheat protein inhibitors of α-amylase. *Phytochemistry*, 16: 811-820.

Burgos-Hernández, A., C. Rosas-Burgos, B. Ramírez, Wong, A. A. Carbonell-Barrachina and F. J. Cinco-Moroyoqui. 1999. Identification of α-amylase inhibitors in triticale grain. *J. Sci. Food Agric*., 79: 1671-1675.

Fontanini, D., Capocchi , V. Muccilli, F. Saviozzi, V. Cunsolo, R. Saletti, S. Foti and L. Galleschi. 2007. Dimeric inhibitors of human salivary alpha-amylase from emmer (TriticumdicocconSchrank) seeds. *J. Agric. Food Chem.* 55(25): 10452-60.

Franco, O. L., R. M. Francislete, A. M. Paulo, N. S. Paes, M. Yokoyama, M. V. Coutinho, C. Jr. Bloch and M. F. Grossi-de–Sá. 2005. Characterization of

two *Acanthoscelidesobtectus* alpha-amylases and their inactivation by wheat inhibitors. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol*. 140: 313-9.

Franco, O. L., D. J. Rigden, F. R. Melo, and Grossi-de-Sá. 2002. Plant α-amylase inhibitors and their interaction with insect α-amylases structure, functionand potential for crop protection. *Eur. J. Biochem.*, 269: 397-412.

Friedman, M. 1987. Nutritional and toxicological significance of enzyme inhibitors in foods, Advances in Experimental Medicine and Biology, Plenum Press, New York. Pp: 199-483.

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.

Jakbowski, H. 2010. Personal communication. Online study. Chapter 6-Transport and Kinetics. C. Models of Enzyme Inhibition and D. More complicated Enzymes. *Biol*. (Paris)., 29(4): 223-228.

Jarrett, S. J., R. J. Marschke, M. H. Symons, C. E. Gibson, G. P. Fox and R. J. Henry. 1997. Alpha-amylase/subtilisin inhibitor levels in Australian barleys. *Journal of Cereal Science*, 25: 261-266.

Kaur, R. A., P. Poonam Sahota and A. Kaur. 2009. Changes in mircoflora of steeped and cured baby corn (*Zea mays* L.). *J. Horti. Forestry*, 1(3): 32–37.

Kokiladevi, E., A. Manickam and B. Thayumanavan. 1972. Characterization of Alpha-amylase inhibitor in *Vignasublobata*. *Bott. Bull. Acad. Sun*., 46: 186-189.

Miranda, M. M. M. Picanco, F. G. Faleiro and A. T. Machado. 1995. Detecc. o deno-preferenciaaandSitophiluszeamais Mots. Emespigas gr. Os de 49 populac. es de milho. *Rev. Bras. Armaz*., 20: 21-25.

Mulimani, V. H. and D. Supriya. 1993. Effect of heat treatments on alpha-amylase inhibitor activity in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Plant Foods Hum. Nut*., 44: 181-6.

Nagaraj, R. H. and T. N. Pattabiraman. 1985. Purification and properties of an α-amylase inhibitor specific for human pancreatic amylase from proso (*Paniciummiliaceum*) seeds. *J. Bio. sci*., 7(3& 4): 257-268.

Pelegrini, P. B., F. T. Lay, A. M. Murad, M. A. Anderson and O. L. Franco. 2008. Novel insights on the mechanism of action of alpha- amylase inhibitors from the plant defensinfamily. *Proteins*, 22.

Rebecca, L. O. Schimoler, S. Rourke, Z. Michael Richardson, and P. Selitrennikoff. 2001. Zeamatin inhibits Trypsin and α-amylase Activities, *Appl. Environ. Microbiol*., 67(5): 2365-2366.

Roney-John, C. 2009. The Beginnings of Maize Agriculture Archaeology. *South West*, 1: 23-45.

Sandstedt, R. M. and O. C. Beckord. 1946. Photomicrographic studies of wheat starch. II. Amylolytic enzymes and the amylase inhibitor of the developing wheat kernel. *Cereal Chem*., 23: 548-558.

Silva-Sanchez, J., A. Gonzalez–Castaneda, De Len-Rodriguez and A. P. Barba De La Rosa. 2004. Functional and rheological properties of amaranth albumins extracted from two Mexican varieties. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59(4): 169-174.

Taufel, A., H. Böhm and W. Flamme. 1997. Protein inhibitors of alpha-amylase in mature and germinating grain of rye (*Secalecereale*). *J. of Cereal Sci*., 25(3): 267-273.

Titarenko, E. and M. J. Chrispeels. 2000. cDNA Cloning, bioche-mical characterization and inhibition by plant inhibitors of the α- amylases of the western corn root worm, Diabroticavirgiferavirgifera. *Insect. Biochem. Mol. Biol*., 30: 979-990.

Torronen, A. Mattileisola and S. Haarasilta. 1992. Inhibition of rye α-amylase activity by barley α-amylase inhibitor. *Cereal Chem*., 69(4): 355-358.

Whitaker, J. R. and R. A. Bernard. 1972. Experiment for Introduction to Enzymology. The Wiber Press Davis.

Vivek, B. S., A. F. Krivanik, N. A. Palacios-Rojas, Afriyie S. Twnmasi and A. O. Diallo. 2008. Breeding quality protein maize protocols for developing QPM cultivars. International Maize and wheat Improvement center (CIMMYT), printed in Mexico. 75(3): 231–229.

Weselake, R. J., A. W. McGregor, R. D. Hill and H. W. Duckworth. 1983b. Purification and characteristics of an endogenous α-amylase inhibitor from barely kernels. *Plant Physiol*., 73: 1008-1012.

DETERMINATION OF THE OPTIMAL CONDITIONS FOR EXTRACTING ALPHA-AMYLASE INHIBITORS OF HUMAN SALIVA FROM FIVE MAIZE VARIETIES

Anwer Ahmed Khalaf anwar.Ahmad235@yahoo.com

Ethar Zeki Naji etze-957@yahoo.com

College of Agriculture-University of Tikrit, Iraq

ABSTRACT

Alpha-amylase inhibitors were extracted from some maize varieties including Veto, Monarg Rohnaldinia, Daredh and May-70, using 0.2 M buffer solution of sodium acetate, pH 6. Inhibition of all maize cultivars towards human saliva amylase was determined by the method used.

The results showed that inhibition percentages varied by different species. Rohnaldinio variety was characterized by amylase inhibition ratio of 40.26% compared to the Monarg and Veto of 23.60% and 16.47%, respectively. May-70 and Daredh showed little efficacy towards amylase. The optimal ratio for alpha-amylase inhibitors extraction from maize varieties, and at different proportions including 2.5: 1, 5: 1 and 10: 1 (weight: volume), showed that the specific efficacy was the greatest when extracting the inhibitor from Rohnaldinio variety by using 1:5 (w: v) mixing proportion. The specific efficacy was 6.32 unit mg^{-1} protein, compared to the other varieties.

Determination the optimal extraction time for alpha-amylase inhibitors from maize varieties at 1.0, 1.5 and 2.0 hours extraction time showed that the specific efficacy was the highest when the inhibitor was extracted from Rohnaldinio variety in 1.5 hour. It was 5.66 unit mg^{-1} protein compared to the rest of the varieties. The results also showed a pH effect on the interaction of the inhibitor with amylase saliva. The optimal pH for bindings the inhibitor from Rohnaldinia variety with amylase saliva was 6, whereas 7, 5, 8 and 6 for inhibitors from Monarg, Veto, Daredh and May-70, respectively. The optimum temperature for inhibitor activity was examined between 30 – 80 ˚C. A significant increase in the effectiveness of inhibition was shown with increasing temperature from 60 to 80 ˚C. Inhibition at 80 ˚C was 40.66% when the inhibitor from Rohnaldinia linked with amylase saliva.

Key words: Alpha-amylase inhibitors, human saliva amylase, varieties of maize.