مجلة البصرة للعلوم الزراعية 2012، 25(1): 149-160

تقييد أنزيم الالفا– اميليز المنتج من مالت الشعير المحلي بألجينات الكالسيوم

ضياء فالح الفكيكي وغياث حميد مجيد وعلي احمد الساهي
قسم علوم الأغذية- كلية- جامعة البصرة -العراق

المستخلص. تضمنت الدراسة تقييد الالفا– أميليز المنتج من مالت الشعير المحلي باستعمال أربعة أنواع من المواد المقيدة اذ كانت أفضل مادة تقيدة هي باستخدام ألجينات الكالسيوم فقد أظهرت أعلى تقييد للبروتين بلغ 9.25 ملغم/غم وأعلى كفاءة تقييد للأنزيم بلغت 68 % مقارنة بمواد التقييد الأخرى. كان أفضل تركيز لتقييد أنزيم الألفا–أميليز بألجينات الكالسيوم هو 4% إذ أعطى فعالية أنزيمية 160 وحدة / غم وصلابة جيدة . اختير حجم 2ملم أفضل حجم من حبيبات ألجينات الكالسيوم لتقييد أنزيم الالفا– أميليز و أدت زيادة كمية الأنزيم المقيد من 0.5 الى 3 غم إلى زيادة الفعالية الأنزيمية بشكل تدريجي و حصل على أعلى فعالية باستعمال 3 غم من ألجينات الكالسيوم المقيدة بالإنزيم .أحتفظ الانزيم المقيد بالاجينات بـ 98.5% من الفعالية بعد استعماله 6 مرات . عند دراسة تأثير كمية حبيبات ألجينات الكالسيوم المقيدة لألفا–أميليز في لزوجة المحلول النشأ لوحظ انخفاض اللزوجة النسبية بصورة تدريجية بعد 5 دقائق من عمل الأنزيم المقيد الى 70% عند الدقيقة 60 من بدء التحلل.

الكلمات المفتاحية: تقييد الإنزيم – الالفا– اميليز – الشعير المنبت

المقدمة

أنزيم الالفا– اميليز أسمه النظامي EC 3.2.1.1 1.4 glucan – 4–glucanohydrolase وهو من إنزيمات التسييل (Liquefying enzymes) حيث يسبب التكسير الداخلي للنشا Endo– cleavage لأنه يهاجم الآصرة الكلايكوسيدية (4–1)□□ ويكون تأثيره عشوائياً على المادة الخاضعة إذ ينتج عند تحلله دكسترينات ومالتوز وكلوكوز (13,4). وبما ان الاميليزات تزداد بشكل كبير في الحبوب المنبتة فقد ذكر (15) ان كمية الإنزيم في الحبوب قبل الإنبات تكون قليل جداً بالمقارنة مع عملية الإنبات اذ يزداد إنزيم الألفا – اميليز بمقدار ألف مرة . فقد قام العديد من الباحثين في أنتاج الالفا– أميليز من الحبوب المنبتة المختلفة كالشعير والحنطة والذرة البيضاء (1)، واستعملت تقنية تقييد الإنزيمات من اجل تحسين خصائص الأنزيمات وإمكانية استخدامه عدد مرات فتعرف عملية تقييد الأنزيمات بأنها العمليه التي يتم بوساطتها تقييد أو حجز الأنزيمات بطرق فيزيائية على سطح او داخل مواد ساندة غير فعالة مع احتفاظ الأنزيم بفعاليته و أمكانية استخدامه لعدة مرات و بشكل مستمر (12)

فقد استعملت الجينات الكالسيوم في تقييد بعض الأنزيمات مثل أنزيم الالفا–أميليز البكتيري (7) ومن اجل أطالة الفترة الخزنية للإنزيم المقيد بالمقارنة بالأنزيم الحر (2) هدف هذه الدراسة تقييد الالفا– أميليز المنتج من مالت الشعير بطرق تقييد مختلفة و انتخاب أفضل طريقة لتقييد الأنزيم .وإمكانية استعمال الأنزيم المقيد في تحلل المواد النشوية في عمود المفاعل .

المواد وطرائق العمل

جلب الشعير صنف إباء 99 ذات ستة للموسم الزراعي 2006-2007 المطورة من قبل مركز إباء للأبحاث الزراعية - قسم المحاصيل الحقلية في منطقة الفضيلية في بغداد، تم تنظيف الحبوب وتنقيتها من الشوائب ووضعها في أكياس من البولي أثلين وتم حفظها في الثلاجة لحين إجراء الفحوصات عليها.

المواد الكيميائية

جميع المواد و الكواشف والمذيبات المستعملة خلال فترة أجراء البحث من نوع التحليلي هي (Analytical Grade) كما استخدم الماء المقطر في جميع مراحل خطوات العمل.

إنتاج المالت

تم تصنيع المالت في مختبرات قسم علوم الاغذية في كلية الزراعة - جامعة البصرة إذ اتبعت طريقة (1).

طريقة الاستخلاص

خلط كمية من مسحوق مالت الشعير الجاف مع المحلول الدارئ هيدروكلوريك الأميدازول ذي عياري0.025 ودالة هيدروجيني 7.4 بنسبة 5:1 (وزن/ حجم) بواسطة خلاط مغناطيسي Magnatic Stirrer لمدة 30 دقيقة ثم طرد الخليط مركزيا بسرعة 10000 gx على 5°م لمدة 20دقيقة . بعدها جمع الرائق لمحلول الاستخلاص و قدر فيه فعالية أنزيم الاميليز.

تقدير فعالية أنزيمات الاميليز

Determination Activity of Amylases

قدرت فعالية أنزيم الاميليز بإتباع طريقة (16) وتعرف 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).

تقييد الالفا- اميليز المنقى من مالت الشعير

Immobilization of alpha amylase

اتبعت أربع تقنيات لتقييد الالفا اميليز المستخلص من مالت الشعير حسب الطريقة الموصوفة من قبل (17) وهي تقييد الأنزيم بحجزه بألجينات الكالسيوم Entrapment by sodium alginate، تقييد الأنزيم بالادمصاص على السلكا جيل Adsorption on silica gel، تقييد الأنزيم بألادمصاص على الراتنجات Adsorption on resinsباستعمال راتنج نوع Amberlite IRC-50 (H) والادمصاص باستعمال مادة اوكسيد الألمنيوم Al_2O_3.

تقييم تقنيات التقييد Evaluation of the immobilization techniques

اتبعت طريقة (17) في تقييم تقنيات التقييد الأربعة اعتمادا على قياس حمل البروتين protein loading (ملغم بروتين/غم مادة رابطة) و قياس كفاءة التقييد immobilization efficiency activity (وحدة/غم مادة رابطة).

تقدير حمل البروتين للمواد المقيدة for protein loading immobilization

قدر تركيز البروتين في محلول الالفا- اميليز المنقى (الحر) حسب طريقة (8) تم حساب حمل البروتين من خلال المعادلة التالية:

$$p = \frac{(C_o \times V_o) - (C_f \times V_f)}{Wg}$$

P = حمل البروتين (ملغم / غم مادة مقيدة).

Co = تركيز البروتين في محلول الالفا- اميليز الحر (ملغم / مل) .

Vo = حجم محلول الالفا- اميليز الحر (مل) .

Cf = تركيز البروتين في محلول الالفا– اميليز المقيد (ملغم / مل).

Vf = حجم محلول أنزيم محلول الالفا– اميليز المقيد (مل).

Wg = وزن المادة المقيدة الجافة (غم).

تقدير كفاءة التقييد للإنزيم Determination of immobilization efficiency

قيست فعالية الالفا – أميليز حسب (16) في محلول الالفا– اميليز الحر، ثم قدرت فعالية الأنزيم في محلول الالفا– اميليز المستخلص من حبيبات المواد الرابطة بعد ربط الأنزيم و تم حساب كفاءة تقييد الأنزيم من خلال المعادلة التالية

$$\eta = \frac{(E_0 \times V_0) - (E_f \times V_f)}{(C_f \times V_f)} \times 100$$

η = كفاءة تقييد الأنزيم (%)

Eo = فعالية الالفا– اميليز الحر (وحدة / مل) .

Vo = حجم محلول أنزيم م الالفا – اميليز الحر (مل).

Ef = فعالية الالفا– اميليز المقيد (وحدة / مل).

Vf = حجم محلول أنزيم المقيد (مل).

Cf = تركيز البروتين في محلول الالفا– اميليز المقيد (ملغم / مل).

اختبار أفضل تركيز من ألجينات الصوديوم في تقييد الأنزيم

اتبعت طريقة (4) في اختيار أفضل تركيز من محلول ألجينات الصوديوم لتقييد الالفا– اميليز.

تقدير فعالية الالفا اميليز المقيد

قدر حسب ما ذكر في (16) اذ وضع 2 غم من حبيبات ألجينات الكالسيوم الحاوي على انزيم المقيد لكل من (2% ، 3%، 4% ،5% ،6%) الجينات الصوديوم) الى 20 مل من محلول النشأ ذي تركيز 0.4% و حضن مدة عشرة دقائق بدرجة حرارة 50 °م في حاضنة هزازة بقوة 150 (هزة/ بالدقيقة).

اختيار أفضل حجم للحبيبات ألجينات الكالسيوم لتقييد للأنزيم

حضرت أربعة حجوم (2 ، 3، 4 ، 5) ملم3 من حبيبات ألجينات الكالسيوم باستعمال تركيز 4% من ألجينات الصوديوم لتقييد الالفا– أميليز

تأثير كمية الأنزيم المقيد في فعالية الأنزيم

حضن (0.5 ، 1 ، 1.5 ،2، 2.5 ، 3) غم مادة مقيدة مع 20 مل من المحلول النشوي ذي تركيز 2% في حمام مائي هزاز على درجة حرارة 40°م لمدة 10 دقائق ثم قيست فعالية الأنزيم (16) ورسمت العلاقة بين كمية الأنزيم المقيد مع فعالية الأنزيم المقيد.

تأثير الالفا– أميليز المرتبط على اللزوجة النسبية للمحلول النشوي

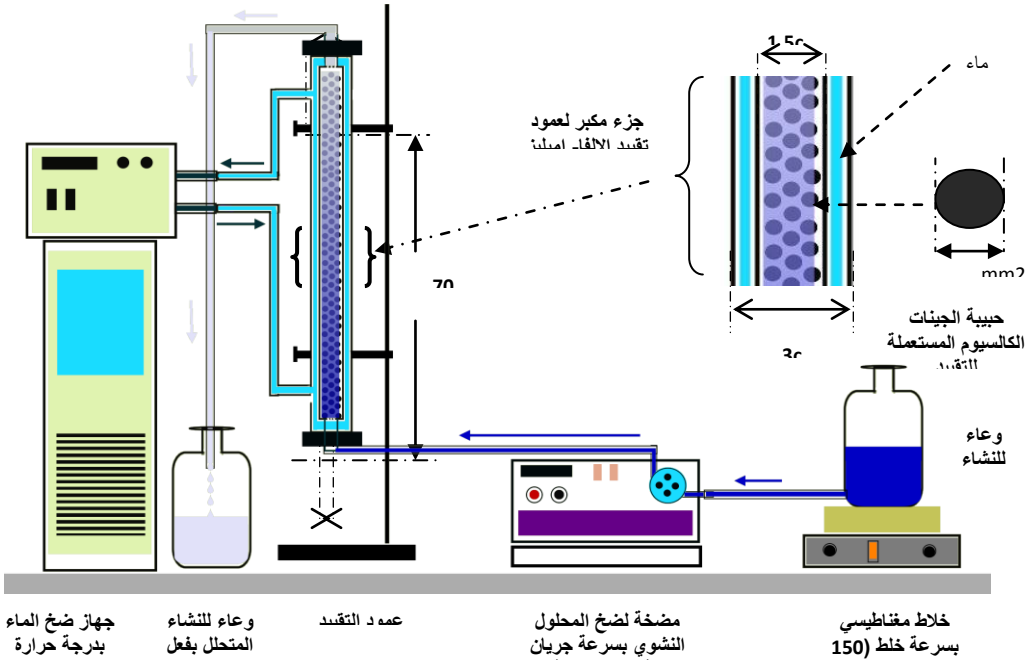
حضن 10 غم من الانزيم المقيد ذي فعالية 75 (وحدة / غم مادة مقيدة) مع 100 مل من المحلول النشوي ذي تركيز 2% في حمام مائي هزاز على درجة حرارة 40°م ثم حسبت لزوجة نسبة للمحلول النشوي بعد (10،30،60،90،120) دقيقة من مدة الحضن، و حسبت اللزوجة النسبية.

تأثير عدد مرات استعمال الأنزيم المقيد في الفعالية المتبقية

حضن 2 غم من حبيبات الرابط للأنزيم ذات حجم 2ملم3 و فعالية (80) وحدة /غم مع 20 مل من محلول المادة الخاضعة تركيز 0.4% في حمام مائي هزاز بدرجة حرارة 40°م لمدة عشر دقائق بعدها تم إيقاف التفاعل من خلال ترشيح الخليط بواسطة ورق ترشيح وتم فصل الحبيبات الرابطة للإنزيم و غسلها بـ 10 مل ماء مقطر وثم قيست فعالية الإنزيم المرتبط بالخليط بعدها تم استعمال الحبيبات عدة مرات، في كل مرة يتم حساب فعالية الأنزيم المرتبط. ورسمت العلاقة بين عدد مرات الاستعمال و الفعالية المتبقية للأنزيم.

مفاعل الأنزيم المقيد المستمرة Continuous Immobilized Enzyme Reactor

اتبعت طريقة (10) بتقدير سرعة الجريان الأفضل في تحلل النشأ عبر الطريقة المستمرة وكما موضح بالشكل (1) لتحلل النشأ بوساطة عمود الأنزيم المقيد.



شكل (1): مخطط يوضح أجزاء عمود التقييد الذي يحتوي على حبيبات الجينات الكاليسوم التي تحجز الالفا- اميليز

النتائج والمناقشة

جدول (1): تقييم تقييد للالفا- اميليز المنقى من مالت الشعير صنف أباء-99 بواسطة حمل البروتين و كفاءة التقييد باستخدام أربع تقنيات تقييد.

تقنيات تقييد الأنزيم	المادة المقيدة	حمل البروتين (ملغم /غم مادة داعمة)	كفاءة التقييد %
ادمصاص على السليكا	silica gel	6.4	30
ادمصاص على الراتنجات	Amberlite IRC-50 (H)	9.25	35
بالادمصاص و الترسيب	Al_2O_3	5.52	34
بوساطة الحجز ألجينات الصوديوم	Sodium alginate	9.25	68

ظهر الجدول (1) تفوق طريقة ألجينات الصوديوم في تقييد الالفا– أميليز مقارنة مع الطرق الأخرى من خلال الحصول على أعلى تقييد للبروتين اذ بلغ 9.25 (ملغم/غم للحبيبات) وأعلى كفاءة تقييد للأنزيم إذ بلغت 68 % . بينما حصلت طريقة تقييد الأنزيم بوساطة السلكا جيل على تقييد للبروتين و كفاءة التقييد للأنزيم بلغت 6.4 (ملغم/غم للحبيبات) و30% على التوالي.و يلاحظ من النتائج انه لا توجد علاقة قوية بين قابلية المادة المستعملة لتقيد الأنزيم (المادة الداعمة) لحمل البروتين و بين كفاء تقييد الأنزيم و قد يعزى ذلك عند تقييد الأنزيم على مادة داعمة قد يحدث فقد لفعالية الأنزيم نتيجة لحدوث ضرر للمواقع الفعالة نتيجة الادمصاص الأنزيم على سطح المادة الداعمة ، او حدوث عملية ارتباط للمواقع الفعالة مع المادة الداعمة . وجاءت هذه النتائج متفقة مع ما توصل اليه كل (17) عند دراسته أمكانية تقييد اللايبيز Lipase على مجموعة من المواد الرابطة و من ضمن هذه المواد ألجينات الصوديوم ، فوجد ان كفاءة التقييد الأنزيم تساوي 67% و قابلية حمل البروتين الداعمة للبروتين تساوي 13.4 (ملغم/غرام). كما وجد (14) أمكانية تقييد الالفا– أميليز على ألياف البكاز(Bagasse) المؤكسد بوساطة حامض Perodic acid ووجد ان كفاءة التقييد للانزيم تساوي 44%. ودرس كل من (6) تقدير تصافي تقييد الالفا–أميليز عند تقييده على مادة داعمة باستخدام عدة طرق عدة لتقييد الأنزيم ووجد أن كفاءة تقييد الأنزيم تتراوح بين (6–32)% وجميع هذه الطرائق استعمل فيها تقنية تقييد الأنزيم بوساطة الادمصاص على سطح هذه المواد. تعد هذه النتائج مشجعة في تقييد الأنزيم بوساطة Amberlite IRC–50 (H) و طريقة Sodium alginate وذلك لكون الفعالية التي احتفظ بها الأنزيم المقيد تقع ضمن المدى الطبيعي الذي يتراوح بين 50–80% من الفعالية الأصلية (9). لهذا تم تقييد الأنزيم بوساطة الجينات الكالسيوم في التجارب اللاحقة من الدراسة.

اختيار أفضل تركيز من الجينات الصوديوم في تقييد الأنزيم

بينت النتائج الموضحة في الشكل (2) أن أفضل تركيز لتقييد الالفا–أميليز بألجينات الصوديوم هو تركيز 4% إذ أعطى فعالية أنزيمية بلغت 160 (وحدة/غم للحبيبات) مقارنة مع تركيز 5% و6%. ألا أن تركيز 2% و3% قد أعطى فعالية أنزيمية عالية مقارنة مع تركيز 4%. وسبب ذلك هو هشاشة حبيبات الجينات الكالسيوم الرابط للأنزيم بسبب تركيزها الواطئ مما أدى ذلك إلى تحطم الحبيبات و خروج الأنزيم من الحبيبات مما أدى ذلك الى حصول فعالية عالية مقارنة مع تركيز 4% الذي أعطى صلابة تسمح إلى تخلخل المادة الخاضعة إلى الأنزيم دون حدوث تحطم للحبيبات. وانخفضت فعالية الأنزيم المرتبط في تركيز 5% و6% ويعزى ذلك الى صلابة حبيبات الجينات الكالسيوم مما أدى ذلك إلى إعاقة وصول المادة الخاضعة إلى الإنزيم المحجوز في الحبيبات . وقد اتفقت هذه النتائج مع ما توصل اليه (5) . عند دراسته تقييد أنزيم الالفا– اميليز المنتج من بكتريا *Bacillus circulans* بتراكيز مختلفة تراوحت (2–6)% من الجينات الصوديوم إذ وجد أن أفضل تركيز هو 4% و ذلك لإعطائه أعلى كفاءة تقييد للأنزيم إذ بلغت 70%.

اختيار أفضل حجم لحبيبات ألجينات الكالسيوم لتقييد للأنزيم

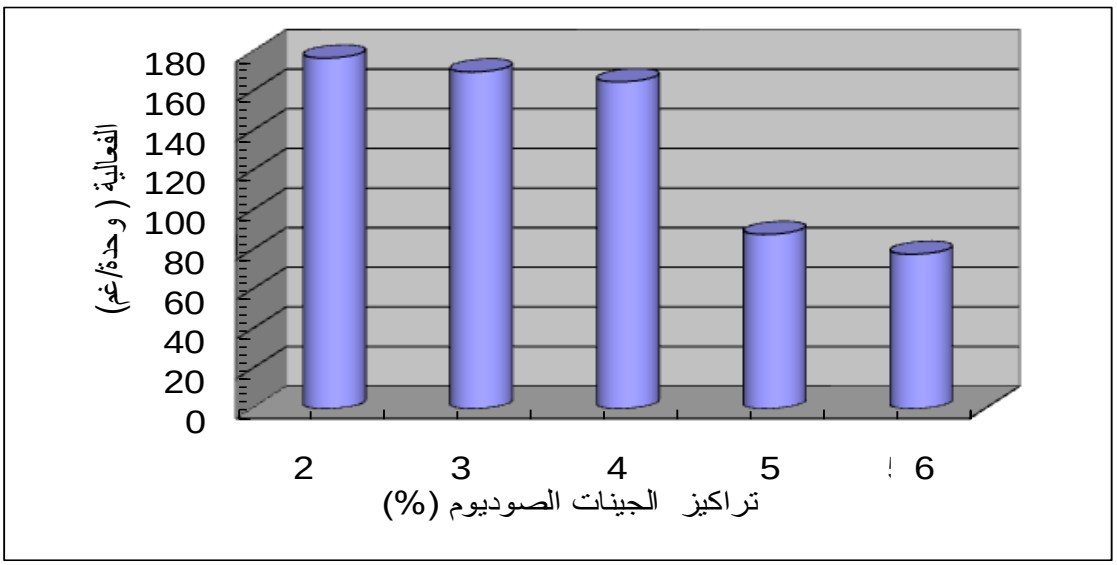
بينت النتائج الموضحة في الشكل (3) تفوق حبيبات الجينات الكالسيوم المقيدة للأنزيم ذات حجم 2 ملم^3 ولفترات الحضن المختلفة بالمقارنة مع الحجوم المختلفة من خلال حصول حبيبات ذات حجم 2ملم^3 على أعلى فعالية إذ بلغت 9246 (وحدة/غرام للحبيبات) عند مدة حضن 100 دقيقة.

وسجلت حبيبات الجينات الكالسيوم المقييدة للأنزيم ذات حجم 5 ملم^3 اقل فعالية إذ بلغت 4202 (وحدة/غم) ويلاحظ من الشكل أن فعالية الأنزيم المرتبط تزداد بزيادة مدد الحضن وصولاً إلى مدة حضن 100 دقيقة لجميع الحجوم.

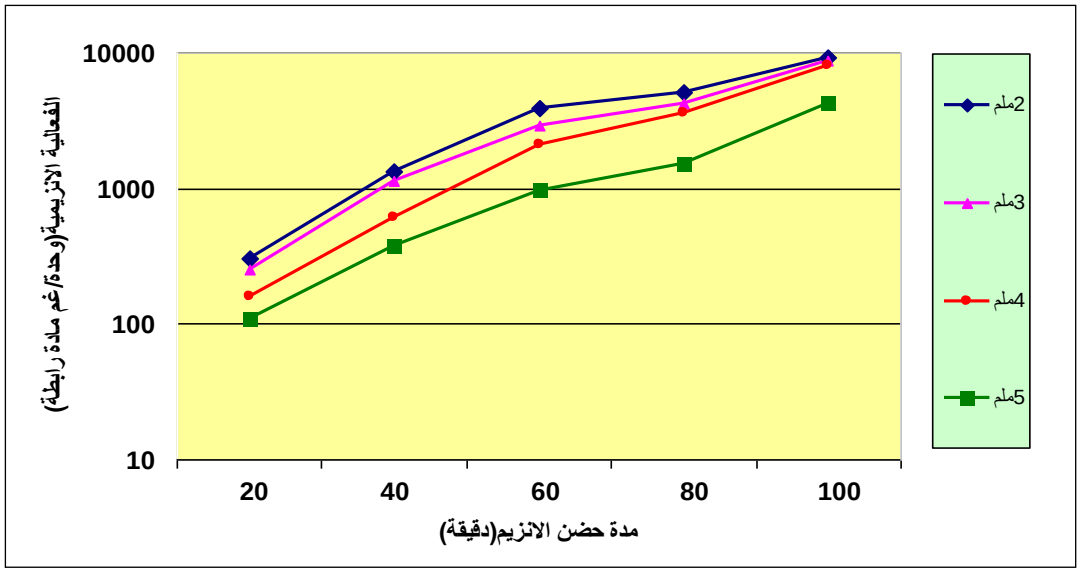
وجاءت هذا النتائج متفقة مع النتائج التي حصل عليها (5) عند دراستهم تأثير أحجام مختلفة من حبيبات الجينات الكالسيوم في كفاءة تقييد الالفا–اميليز المنتج من بكتريا *Bacillus circulans* ووجد أن أفضل حجم لتقييد الأنزيم هو 2 ملم إذ أعطى أعلى فعالية أنزيمية حيث بلغت 33 (ميكرومول/غم للحبيبات) وحصل حجم 5 ملم^3 على اقل فعالية اذ بلغت 4 (ميكرومول/ غم للحبيبات) ويعزى ارتفاع الفعالية الأنزيمية للحبيبات ذات حجم 2 ملم^3 الى زيادة المساحة السطحية للحبيبات التي تتفاعل مع المادة الخاضعة و بالتالي يؤدي ذلك الى حدوث تحلل للمحلول النشوي مسبباً إلى زيادة الفعالية على العكس من حبيبات ذات حجم 5 ملم التي أعطت اقل فعالية أنزيمية بسبب قلة المساحة السطحية للحبيبات المعرضة للمادة الخاضعة.

تأثير كمية الأنزيم المقيد في الفعالية

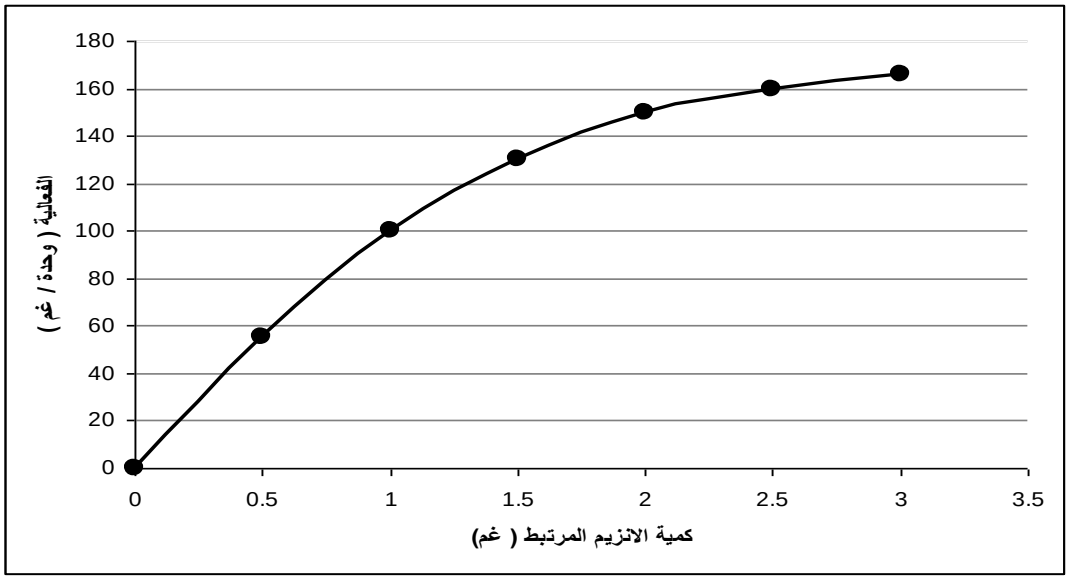
تمت دراسة تأثير كمية الالفا– اميليز المقيد بالحبيبات (0.5 ، 1 ،1.5، 2 ، 2.5 ،3) غم للحبيبات على فعالية الأنزيم عند درجة حرارة 40م ومدة حضن لمدة 10 دقائق. وبينت النتائج الموضحة في الشكل (4) أن فعالية لأنزيم تزداد بزيادة كمية حبيبات الأنزيم المقيد المضافة إلى وسط التفاعل بشكل ملحوظ حتى تصل إلى فعالية مقدارها 166 (وحدة/غم للحبيبات) عند 3غم من الأنزيم المقيد وجاءت هذه النتائج مقاربة لما توصل اليه (3) من خلال دراسته تأثير كمية البيتا – أميليز المقيد بـ Polyacrylamide Polymer في فعالية الأنزيم المرتبط عند حضن الأنزيم المرتبط لمدة 5 ساعات بدرجة حرارة م في حمام مائي هزاز، ووجد أن فعالية الأنزيم المرتبط تزداد بزيادة كمية الأنزيم المقيد ولاحظ أن الفعالية تزداد من كمية 1 ملغم إذ تبلغ نسبة الفعالية 20 (وحدة/غم للحبيبات) وصولا الى 6 ملغم 11 كانت تكون نسبة الفعالية (130 وحدة/غم للحبيبات). وتعزى هذه الزيادة إلى زيادة كمية الأنزيم المقيد وثبات كمية المادة الخاضعة التي يعمل عليها الأنزيم،ويقوم بتحللها بشكل أكبر عند مدة حضن واحدة.



شكل (2): تأثيرتركيز الجينات الصوديوم لتكوين حبيبات بحجم 3 ملم^3 في تقييد الالفا- اميليز المنقى من مالت الشعير صنف أباء 99.



شكل (3): تأثير حجم حبيبات الجينات الكالسيوم المقيدة للأنزيم في فعالية الأنزيم خلال مدد خضن مختلفة على درجة حرارة 40م .



شكل (4): تاثير كمية حبيبات الجينات الكالسيوم الرابطة للانزيم في فعالية الانزيم عند درجة حرارة 40°م و ومدة حضن 10 دقائق.

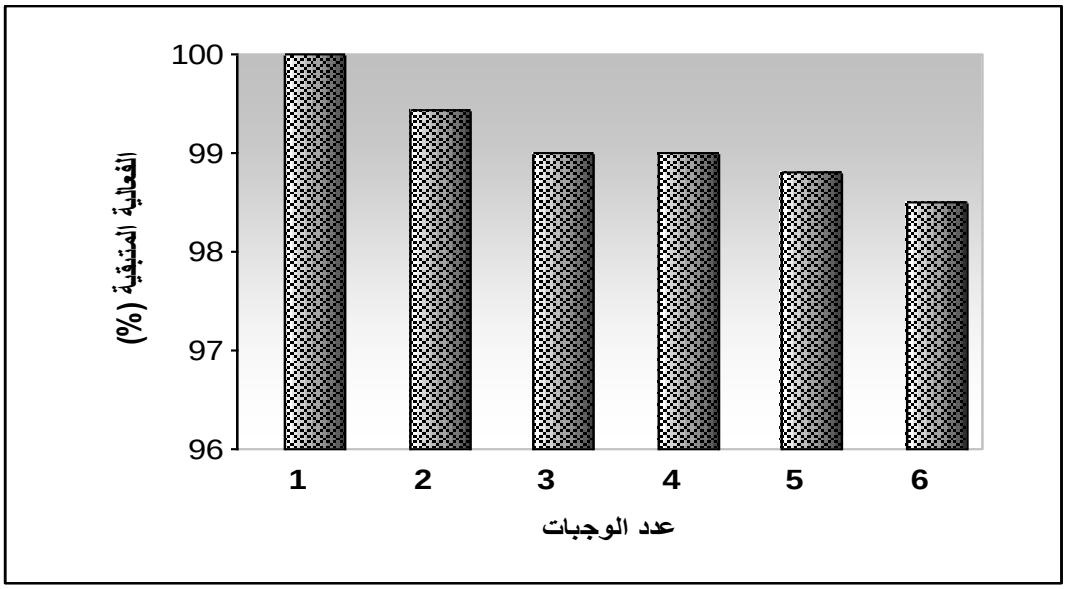
تأثير كمية الأنزيم المقيد في الفعالية

تمت دراسة تأثير كمية الالفا– اميليز المقيد بالحبيبات (0.5 ، 1 ، 1.5، 2، 2.5،3) غم للحبيبات على فعالية الأنزيم عند درجة حرارة 40م و ومدة حضن لمدة 10 دقائق . و بينت النتائج الموضحة في الشكل (4) أن فعالية لأنزيم تزداد بزيادة كمية حبيبات الأنزيم المقيد المضافة إلى وسط التفاعل بشكل ملحوظ حتى تصل إلى فعالية مقدارها 166(وحدة/غم للحبيبات) عند3غم من الأنزيم المقيد و جاءت هذه النتائج مقاربة لما توصل اليه (3) من

خلال دراسته تأثير كمية البيتا – أميليز المقيد بـ Polyacrylamide Polymer في فعالية الأنزيم المرتبط عند حضن الأنزيم المرتبط لمدة 5 ساعات بدرجة حرارة م في حمام مائي هزاز، ووجد أن فعالية الأنزيم المرتبط تزداد بزيادة كمية الأنزيم المقيد ولاحظ أن الفعالية تزداد من كمية 1 ملغم إذ تبلغ نسبة الفعالية 20 (وحدة/غم للحبيبات) وصولا الى 6 ملغم 11 كانت تكون نسبة الفعالية (130 وحدة/غم للحبيبات). وتعزى هذه الزيادة إلى زيادة كمية الأنزيم المقيد وثبات كمية المادة الخاضعة التي يعمل عليها الأنزيم،ويقوم بتحللها بشكل أكبر عند مدة حضن واحدة.

تأثير عدد مرات استعمال الأنزيم المقيد في الفعالية

بينت النتائج في شكل (5) انخفاض الفعالية إذ احتفظت حبيبات الجينات الكالسيوم المقيدة للالفا–أميليز اذ بلغت الفعالية المتبقية للانزيم 98.5% من الفعالية بعد استعمال الانزيم المقيد 6 مرات ويعزى هذا الانخفاض في الفعالية الأنزيمية للفقد في كمية الأنزيم المقيد نتيجة حركة الحبيبات والاستعمال المتكرر للحبيبات المقيدة للأنزيم . فقد وجد (17) عند دراسته تأثير عدد مرات استعمال أنزيم اللايبيز المقيد بمادة Amberlite IRC–50 في فعالية الأنزيم المقيد فقد لاحظ انخفاض الفعالية الأنزيمية بعد الاستعمال المتكرر للانزيم المقيد 7 مرات اذ بلغت الفعالية التحللية المتبقية 40 %.

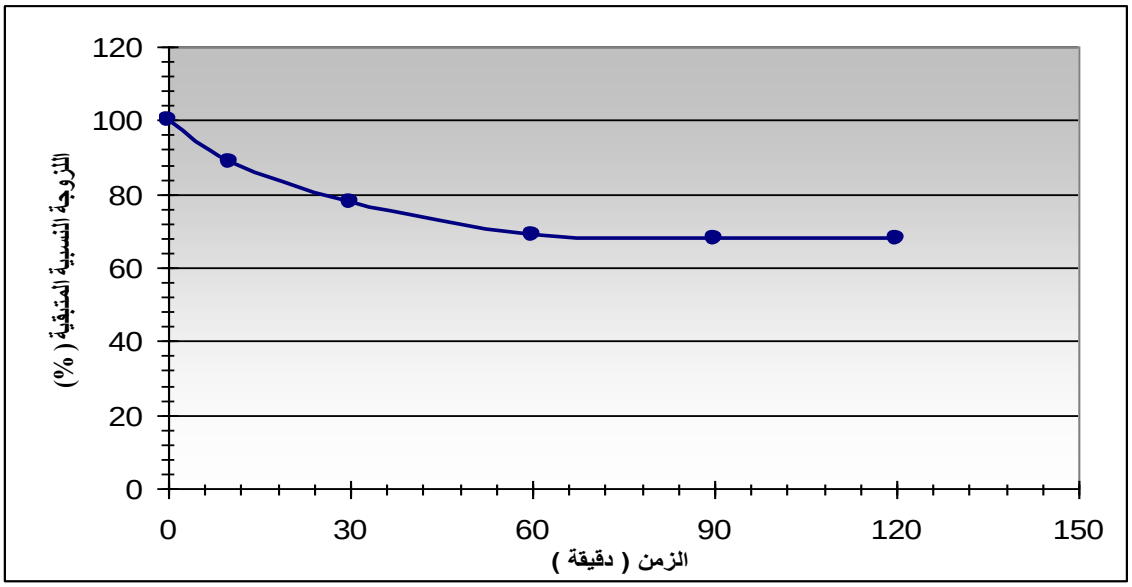


شكل (5): تاثير عدد مرات استعمال حبيبات ألجينات الكالسيوم المقيدة للإنزيم ذات تركيز 4% وحجم 2ملم في فعالية الالفا-اميليز المتبقية عند درجة حرارة 40م ولمدة 10دقائق.

تأثير الالفا – أميليز المرتبط في اللزوجة النسبية للمحلول النشوي

بينت النتائج الموضحة في الشكل (6) انخفاض االلزوجة النسبية بصورة تدريجية بعد 5 دقائق من عمل الأنزيم المقيد الى 70% وصولا إلى الدقيقة 60 عندها ثبتت اللزوجة النسبية على 70% حتى الدقيقة 120. ويعزى هذا الانخفاض مقارنة مع عمل الالفا–اميليز الحر إلى تقييد الأنزيم الذي يعيق وصول المادة الخاضعة للأنزيم المقيد بسرعة مما يودي ذلك إلى أطالة مدة التحلل و بالتالي تنعكس على تحلل المحلول النشوي و انخفاض اللزوجة النسبية . و تدل عملية تحلل المحلول النشوي بوساطة الأنزيم المقيد على مدى كفاءة عمل الأنزيم. وقد أوضح (14) تأثير عدد مرات استخدام الالفا–

أميليز المرتبط على اللزوجة للمحلول النشوي ذي تركيز 5% عند استعمال الطريقة المستمرة في تحلل النشا عند درجة حرارة 95م . و لاحظ أن لزوجة المحلول النشوي عند استخدام الأنزيم المقيد في المرة الأولى انخفضت من 2330 cp إلى 12 cp و أنخفضت اللزوجة من 2330cp الى66 cp بعد استعمال الانزيم المرتبط عشرمرات. و عزى ذلك إلى ثباتية الأنزيم اتجاه الحرارة و طول مدة استخدام الأنزيم المرتبط .



شكل (6): تأثير الالفا- اميليز المقيد في اللزوجة النسبية للمحلول النشوي ذي تركيز 2% ومدة حضن 120 دقيقة على درجة حرارة 40م.

تأثير سرعة الجريان في تحلل المحلول النشوي في عمود التقييد

تمت دراسة تأثير سرعة الجريان في نسبة تحلل المحلول النشوي و نواتج التحلل خلال ساعة من اجل تثبيت أفضل معدل جريان للمحلول النشوي تركيز 2% الداخل لعمود التقييد، ومن ثم الحصول على أفضل نسبة تحلل و إنتاجية بإتباع الطريقة المستمرة في تحليل المحلول النشوي. وقد درست معدلات جريان مختلفة للمحلول النشوي ابتداءً من10 – 100(مل/ دقيقة) باستعمال عمود تقييد بأبعاد (70 ×1.5) سم وكما موضح في الشكل (1) و كانت مدد المرور بعمود التقييد من (1–10) دقيقة . وبينت النتائج الموضحة في جدول (2) زيادة نسبة التحلل بانخفاض سرعة الجريان إذ نلاحظ من الجدول أن نسبة التحلل عند سرعة جريان 100 (مل/دقيقة) كانت 10.59 % ونسبة التحلل عند سرعة جريان 10(مل/دقيقة) كانت 98.53 %. ويعزى هذا الارتفاع في نسبة التحلل إلى طول مدة حضن المحلول النشوي مع حبيبات المقيدة للأنزيم الموجود في داخل العمود عند سرعة الجريان البطيئة ، مما يودي ذلك إلى زيادة تحلل المحلول النشوي بانخفاض سرعة الجريان. وهذا لا يعني ان سرعة الجريان المنخفضة هي الأفضل اذ ان هناك عوامل أخرى مؤثرة وهي طول العمود و وقت مرور المحلول النشوي في العمود، لذا فقد حسبت كمية تحلل المحلول النشوي خلال ساعة. ويبين جدول(2) تفوق سرعة جريان 66 (مل/ دقيقة) على بقية السرع بحصولها على أعلى إنتاجية اذ بلغت 156.5 (ملغم/ مل) بالساعة بينما سجلت

سرعة الجريان 10 (مل/ دقيقة) اقل كمية تحلل اذ بلغت 59.12 (ملغم/ مل) بالساعة.

جدول (2): تأثير سرعة جريان المحلول النشوي في عمود التقييد على نسبة تحلل النشأ ونواتج التحلل خلال ساعة.

سرعة الجريان (مل/ دقيقة)	وقت المرور بالعمود (دقيقة)	تحلل النشأ (ملغم/ مل)	نسبة التحلل (%)	نواتج التحلل (ملغم/ مل)	نواتج التحلل (ملغم/ مل بالساعة)
100	1	1.05	10.59	1.05	63.56
85	1.17	2.59	25.9	3.03	132.8
75	1.33	3.2	32.02	4.25	144.5
66	1.51	3.93	39.37	5.94	156.5
50	2	4.72	47.21	9.44	141.6
40	2.5	4.98	49.84	12.46	119.6
33	3.02	5.22	52.233	15.77	103.8
25	4	6.63	66.31	26.52	99.48
15	6.66	8.65	86.52	57.62	77.95
10	10	9.85	98.53	98.53	59.12

المصادر

1. الفكيكي، ضياء فالح عبد الله (2002). أنتاج المالت من الشعير المحلي واستخدامه كمحسن في صناعة الخبز. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة البصرة.

2. الراوي رشا محمد شاكر (2004) أنتاج الانفرتيز من العفن *Aspergillus terreus* بوساطة تخمرات الحالة الصلبة. رسالة ماجستير، كلية الزراعة – جامعة بغداد.

3. Atia, S.K.; Ismil, .A.S and Dessouki, M.A. (2003). Immobilization of alpha–amylase using polyacrylamide polymer derivatives. J. Chem. Technol. Biotechnol., 78: 891-898.

4. Crueger, W. and Crueger, A. (1989). Biotechnology: A Test book of Industrial Microbiology 2nd edition. Sinauer Associate., Inc. Sutherland, M.AG1375. pp. 189-208.

5. Dey, Gargi..; Bhupinder, Singh.; and Rintu, Banerjee. (2003). Immobilization of a-Amylase Produced by *Bacillus circulans* GRS 313 Brazilian Archives of Biology and Technology. 46(2): 167-176.

6. Howard , A. Chase .and Yuhui , Yang (1998). immobilization of enzyme on poly (vinyl alcochol) – coated perfluorocarbon supports: comparison of techniques for the immobilization of trypsin and alpha – amylase on poly (vinyl alcohol) – coated solid and liquid perfluorocarbones. Biotechnol. Appl. Biochem., 27: 205- 216.

7. Kahraman, M. Vezir.; Nilhan, Kayaman-Apohan and Aye, Ogan. Atilla Güngör (2006). Soybean oil based resin: A new tool for improved immobilization of α-amylase . Journal of Applied Polymer Science, 100: (6): 4757 – 4761.

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

9. Monsan, P. and Combes, D. (1988). "Enzyme Stabilization by Immobilization", in Mathods in Enzymology Vol. 137, Part D, pp.584, Edited by Klaus Mosbach, Academic Press, Inc.

10. Nam, Sun. Wang.(2002). experiment no. 13 continuous immobilized enzyme reactor. Department of Chemical Engineering. University of Maryland. College Park, Biochemical Engineering Laboratory MD 20742-2111.

11. Rivera, H.; Hunguia, A.L.; Soberon, X.; and Rincon, G.S. (2003). α–amylase from *Bacillus licheniformis* mutants near to the catalytic site: effects on hydrolytic and transglycosylation site: effects on hydrolytic and transglycosylation activity. Protein Engineering, 16 (7): 505-514.

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

13. Straathof, A.; Panke, S. and Schmid, A. (2002). The production of fine chemicals by biotransformations, Curr. Opin. Biotechnol., 13: 548–556.

14. Varavinita, S.; Narisa. C., and Sujin, S. (2002). Immobilization of a thermostable alpha-amylase. Science Asia, 28: 247-251.

15. Weselake, J. Randall., Alexander, W. MacGregor., Robert, D. Hill (1983). An Endogenous α- Amylase Inhibitor in Barley Kernels. Plant Physiol. 72: 809 – 812.

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

17. Winkelhausen, Vilmaminovska; Eleonora, and lobodanka, k. (2005) Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis. J. Serb. Chem. Soc. 70 (4): 609–624

Basrah J. Agric. Sci. 2012, 25(1): 149-160

Alpha - amylase immobilize which produced from malt of local barley on calcium alginate

Dhia F. Alfekaiki*¸ Ghyath H. Majeed, Ali A. Sahi
Department of Food Sciences, College of Agriculture, University of Basrah, Iraq
alfekaiki@yahoo.com

Abstract. The study included, Alpha - amylase immobilized which was produced from malt of local barley by four different binding materials. The best one was calcium alginate, which gave highest binding for protein (9.25 mg /gm) and highest efficiency of enzyme immobilization 68%. of Calcium alginate . Best concentration of Calcium alginate to bind enzyme was 4% which gave an enzyme activity of 160 unit/ g and good hardens Volume of 2ml was chosen as the best volume of calcium alginate to bind alpha – amylase. Increasing of binding enzyme from 0.5 -3 g was found to result in an showed a gradually increase in enzyme activity at a gradually and gave highest activity at a quantity of 3 g of enzyme binding calcium alginate. Enzyme –binding calcium alginate was found to retain 98.5% of alpha – amylase activity when using it 6 folds. Effect of amount of enzyme – binding calcium alginate on starch solution viscosity was found to decrease gradually after 5 minutes from the binding of the reaction, the relative viscosity reached 70% then 60 min from the start of the reaction.

Key words: Immobilization of enzymes - alpha amylase –malt barley

*Part of thesis Ph.D.