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

ISSN –1817 –2695

تنقية وتوصيف الالفا - اميليز المنتج من مالت الشعير المحلي

غياث حميد مجيد * و علي احمد الساهي* و ضياء فالح الفكيكي**

*قسم علوم الأغذية - كلية الزراعة - جامعة البصرة - العراق

alfekaiki@yahoo.com

الاستلام 30-3-2011، القبول 25-9-2011

الخلاصة

تضمنت الدراسة استخلاص الأنزيم الالفا- اميليز المنتج من مالت الشعير المحليباستعمال محلول دارئ الاميدازول ذي رقم هيدروجيني 7.4 و تركيز 0.025 مولار. نقي أنزيم الالفا-أميليز بعدة خطوات شملت الترسيب بكبريتات الامونيوم إذ شبع المستخلص الأنزيمي بتراكيز 30-70% لترسيب الأنزيم بعدها أجريت عملية الديلزة باستعمال المحلول الدارئ نفسه . مرر الناتج خلال عمود الترشيح الهلامي نوع السيفادكسG-100وكان عدد مرات التنقية 20.71 للمستخلص الأنزيمي و بحصيلة أنزيمية 20.72. كان الوزن الجزيئي لأنزيم ألفا– اميليز 40000 دالتن عند تعينه بطريقة الترحيل الكهربائي في هلام الاكريل امايد بوجود SDS . كانت قيم الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم و ثباتهمساوية إلى 5 و (5-7) على التوالي . وجد أن الثبات الحراري للأنزيم يزداد بوجود ايونات الكالسيوم عند تركيز 0.001 مولار إذ أحتفظ الأنزيم بكامل فعاليته عند معاملة الأنزيم بدرجة حرارة 80 ^{o}م لمدة 20 دقيقة بينما احتفظ الأنزيم 30% من فعاليته عند درجة حرارة 90 ^{o}م لمدة 30 دقيقة. أظهرت الثوابت الحركية أن قيم ثابت ميكالس Kmللأنزيم تجاه النشا0.55% و السرعة القصوى بلغت 255.75 وحدة / مل

الكلمات المفتاحية : أنزيم الالفا اميليز – تنقية الانزيم – مالت الشعير

1- المقدمة

تصنف أنزيمات الاميليز من مجموعة أنزيمات التحليل المائي Hydrolysis و تدعى بهذا الاسم كونها تعمل على تحلل الاميلوز Amylolytic Enzymes(10) ويعد أنزيم الالفا- اميليز من أقدم الأنزيمات التي استعملها الإنسان في مجالات مختلفة كان أهمها مجال الصناعات الغذائية اذ استخدمه في تحلل النشا لإنتاج شراب الكلوكوز كما استعملفي أنتاج الايثانول و استخدامه في تحسين الخبز(1). كما يعد من الأنزيمات المهمة تجارياً لقابليته على تحلل المواد النشوية إلى السكريات بسيطة مثل الدكسترينات والمالتوز والكلوكوز التي تعتبر سكريات مهم في الصناعات الغذائية (3)وكون أنزيمات الاميليز تزداد بشكل كبير في الحبوب المنبتة المالت فقد قام العديد من الباحثين في أنتاج أنزيم الالفا- أميليز من الحبوب المنبت المختلفة كالشعير و الحنطة و الذرة البيضاء و دراسة خصائصه و استخدامه في الصناعات الغذائية المختلفة مثل استخدام المالت في أنتاج وجبات الأطفال الرضع كعامل مساعد في تحليل المواد النشوية الى مواد بسيطة سهلة الهضم (13) . اتجهت الدراسات الى استخدام المالت كأحد المصادر النباتية الغنية بأنزيمات الاميليز كون عملية

أنتاج المالت و استخلاص الأنزيم من الطرق السهلة و لا تحتاج إلى أجهزة متطور و أمكانية استخدام الحبوب التي تستخدم كعلف للحيوانات في أنتاج المالت و بتالي أنتاج أنزيم لالفا- اميليز منه. بالإضافة الى عدم أنتاج مواد سامة أثناء عملية إنبات الحبوب بالمقارنة مع أنتاج الأنزيم من مصادر ميكروبية(18). فقد هدفت الدراسةالحالية الى استخلاص و تنقية الالفا- اميليز المنتج من مالت الشعير المحلي صنف أباءودراسة الخصائص و الصفات الحركية للأنزيم

1. مواد وطرائق العمل

جمعت نماذج الشعيرHordeumvulagareصنف إباء 99 ذات ستة صفوفو للموسم الزراعي (2001-2002) المطورة من قبل مركز إباء للأبحاث الزراعية - قسم المحاصيل الحقلية في منطقة الفضيلية في بغداد .تم تصنيع المالت في مختبرات قسم علوم الأغذية و التقانات الاحيائية في كلية الزراعة- جامعة البصرة ، اذ اتبعت طريقة (10)

2-1 تقدير فعالية أنزيمات الاميليز Determination Activity of Amylases

قدرت فعالية أنزيم الاميليز باستخدام طريقة (20) مع أجراء بعض التحويرات عليها. تعرف الوحدة الأنزيمية: بأنها كمية الأنزيم الذي يحلل0.1 ملغم من مادة الخاضعة وهيالنشا خلال عشرة دقائق عند درجة حرارة 40°م عندما يكون تركيز المادة الخاضعة 4 (ملغم/ مل). قدر تركيز البروتين في المراحل المختلفة من الدراسة استناداً الى طريقة (9) .

2-2 تنقية الأنزيم

خلط 20 غم من مسحوق مالت الشعير مع 100 مل من محلول الدارئ هيدروكلوريك الأميدازول 0.025 مولار ذي الرقم الهيدروجيني (7.4) بنسبة خلط (5/1) (وزن / حجم) كما اوصى بها (3) . أجريت عملية التركيز باستخدام بلورات كبريتات الامونيوم بنسب اشباع (20 – 70) % .وقدر حجم المحلول وفعالية الإنزيم وتركيز البروتينات فيه.أجريت عملية الترشيح لانزيم الالفا- اميليز المنتج من مالت الشعير باستعمال عمود Sephadex G-100 بأبعاد (802.5×) سم و الموازنبمحلول هيدروكلوريك الاميدازول الدارئ حتى اليوم التالي و بسرعة جريان مقدارها 0.5 (مل/دقيقة)بواقع 2مل / جزء . تم تعيين نقاوة الالفا- اميليز المنقى من مالت الشعير بطريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل اميد تحت ظروف غير ماسخة اذ اتبعت تقنية (Disc PAGE) Disc Poly acrylamide gel electrophoresisوفق ماوصف(7)

2-3 دراسة صفات الأنزيم المنقى

درست بعض صفات أنزيم الالفا- أميليز المنقى من مالت الشعير اباء 99 وتم تحضير الهلام و الترحيل الكهربائي وفق ما وصفه(7)

2-4 الثبات الحراري للأنزيم بوجود كلوريد الكالسيوم

أضيف 2 مل من محلول الاميدازول الدارئ (5) الحاوي على 0.01مولار من كلوريد الكالسيوم الى 2 مل من المحلول الأنزيمي المنقى وحضن في حمام مائي مدة (10، 20، 30) دقيقة في درجات حرارة تراوحت بين (60-90) ْم وقدرت فعالية الأنزيم حسب طريقة (19). و تم رسم علاقة بين النسبة المئوية للفعالية المتبقية درجات الحرارية المختلفة لمعرفة مدى ثبات الأنزيم بوجود ايون الكالسيوم

2-5 تعيين الرقم الهيدروجيني pH الأمثل لفعالية الإنزيم

تم تعيين الرقم الهيدروجيني لثبات الفعالية حسب ما ذكر (14) اذ حضن الأنزيم المنقى بدرجة حرارة 40 م لمدة 30 دقيقة مع المحاليل الدارئة ذات مدى من الرقم الهيدروجيني تراوح من (4-9)

2-6 تعيين الرقم الهيدروجيني pHلأمثل لثبات فعالية الإنزيم

تم تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية حسب ما ذكر (14) اذ حضن الأنزيم المنقى بدرجة حرارة 40 م لمدة 30 دقيقة مع المحاليل الدارئة ذات مدى من الرقم الهيدروجيني تراوح من (4-9)حضرت محاليل المادة الخاضعة حسب ما وردة في (14)

2-7 تعيين الثوابت الحركية للأنزيم

استخرج قيمة ثابت ميكالس (Km) السرعة القصوى Vmaxبأربع طرائق حسب ما ذكر في (14)

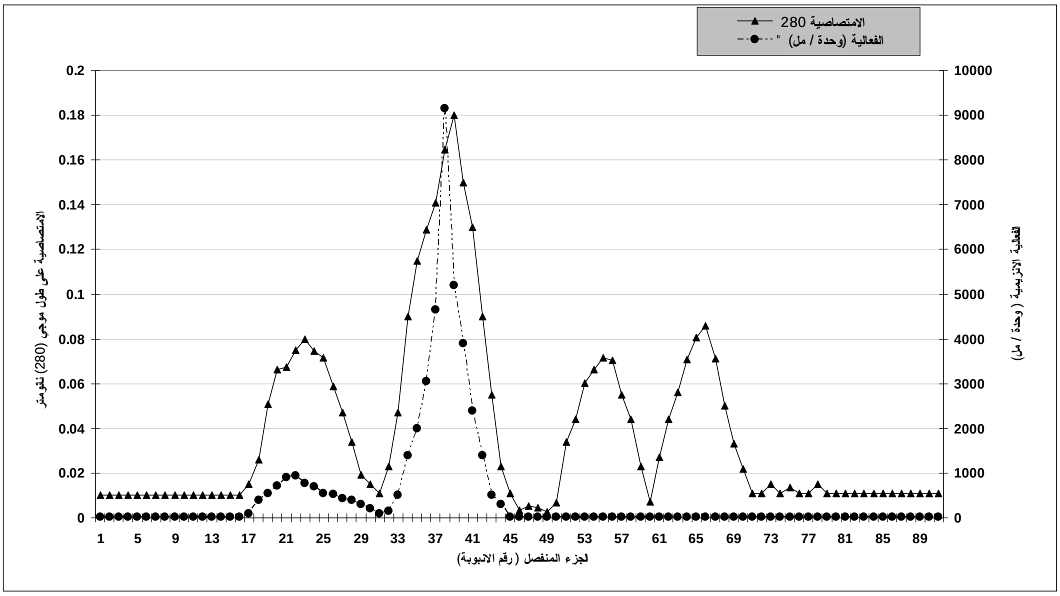
2- النتائج و المناقشة

يبين جدول (1) خطوات تنقية الأنزيم على النحو التالي : اذ استخلص الأنزيم بمحلول دارئ الاميدازول تركيز 0.025 مولار و رقم هيدروجيني 7.4 و بنسبة خلط (5:1) (وزن/حجم) و تم معاملة المستخلص الإنزيمي الناتج بدرجة حرارة مقدارها 70م لمدة 15 دقيقة للتخلص من أنزيمات الاميليز الأخرى ولاسيما البيتا–أميليز،و تم الحصول على فعالية أنزيمية مقدارها 9700 (وحدة/مل) و فعالية نوعية مقدرها 4042 (وحدة/ملغم بروتين) بعدها اجريت عملية تركيز الأنزيم الالفا- اميليز المستخلص من مالت الشعير صنف اباء -99 بنسبة اشباع من كبريتات الامونيوم (30 - 70) % و تم ديلزته مقابل المحلول الدارئ نفسه بغية التخلص من كبريتات الامونيوم فبلغ حجم المحلول الأنزيمي الذي جمع بعد عملية التنافذ الغشائي 20 مل و قيست فعالية الأنزيم و تركيز البروتين فيه و حققت هذه الخطوة فعالية أنزيمية و نوعية مقدارها 15300(وحدة/ مل) و 13909 (وحدة/ملغم بروتين) على التوالي. و تنقية جزئية للأنزيم بلغت 3.44 مرة و حصيلة أنزيمية مقدارها 31.54 و كما موضح في جدول التنقية (1). واستخدم(4) كبريتات الامونيوم بنسبة الإشباع (30 – 60%) في تركيز الالفا- أميليز من بذور البازلاء الخضراء و حصل عل فعالية نوعية للأنزيم في هذه الخطوة مقداره 8.6 (حدة/ ملغم بروتين) و بعدد مرات تنقية مقدارها 10.8 مرة . استكملت التنقية بخطوة أخرى هي خطوة الهلامي باستعمال عمود سيفادكس G-100

و أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (1) الى وجود أربع قمم عند قياس تركيز البروتين على طول موجي مقداره 280 نانومتر، و من خلال قياس الفعالية الأنزيمية لهذه القمم، لوحظ تركيزها في القمة الأولى و القمة الثانية . اذ أظهرت القمة الأولى أعلى فعالية أنزيمية لها والتي بلغت 950 (وحدة/مل) و القمة الثانية كانت أعلى فعالية لها 9160 (وحدة/مل).وقد يعزى تكون القمتين الى وجود متشابهات أنزيمية للالفا – أميليزالمستخلص من مصادر نباتية مقارنة مع المصادر الأخرى التي لاتحتوي على متشابهات . وتقسم المتشابهات الالفا- اميليز الى ثلاثة هي(III , II, I) ، و عند أجراء عملية تركيز للأنزيم بوساطة كبريتات الامونيوم يتحول المتشابه الأنزيمي III الى II, بالتالي عند الترشيح الهلامي يتكون الالفا- أميليز من متشابهين هما I , II ويختلفان من حيث فعالية الأنزيم(17)جمعت أجزاء القمة الثانية وقدر حجمها فكان 30 مل وقدرت فعالية الأنزيم فيها وفعاليته النوعية فكانت 6700 (وحدة/مل) و83750 (وحدة / ملغم بروتين) على التوالي . ووجد ان حصيلة الأنزيم في نهاية هذه المرحلة من التنقية بلغت 20.27% اما عدد مرات التنقية التي أمكن الحصول عليها فكان 20.71 مرة

جدول (1) خطوات تنقية الالفا- اميليز من مالت الشعير صنف أباء-99

الخطوة	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة/ مل)	البروتين (ملغم / مل)	الفعالية النوعية (وحدة / ملغم)	الفعالية الكلية	عدد مرات التنقية	الحصيلة (%)
المستخلص الخام	100	9700	2.4	4042	970000	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم 30- 70 %	20	15300	1.1	13909	306000	3.44	31.54
الترشيح الهلامي على سيفادكس G100	30	6700	0.08	83750	201000	20.71	20.72

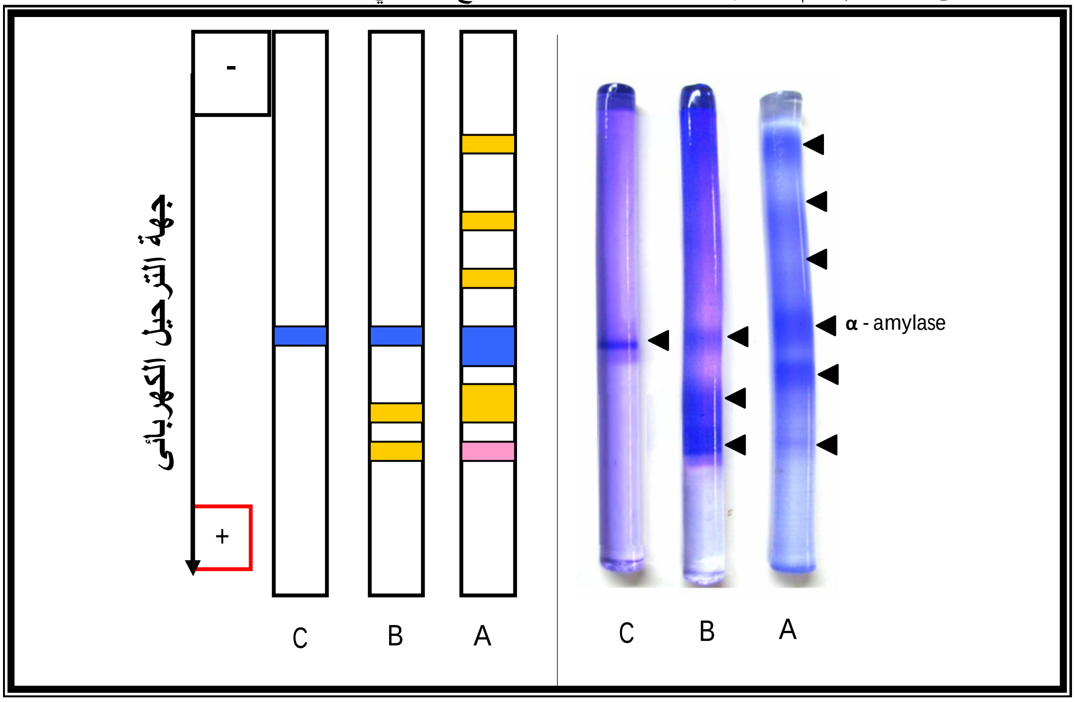


شكل رقم (1) : الترشيح الهلامي لالالفا- أميليز المنتج من مالت الشعير صنف أباء 99 باستعمال عمود-Sephadex G 100 بأبعاد (80×2.5) سم الموازن بمحلول الاميدازول الدارئ بتركيز 0.025 مولار ورقم هيدروجيني 7.4 جرى الاسترداد بالمحلول الدارئ نفسه بسرعة جريان 0.5 (مل / دقيقة) بواقع 2 مل / جزء

3-1 فحص نقاوة الالفا- اميليز

لقد بينت النتائج في شكل (2) ان الترحيل الكهربائي للمستخلص الأنزيمي في هلام الاكريلاامايد أحتوى على (6) حزم و كما موضح في الشكل (A-2) و نظراً لاحتواء المستخلص الخام على مجموعة من البروتينات مختلفة من ضمنها الالفا- أميليز. و يلاحظ من الشكل (B-2)أن عملية تركيز الأنزيم باستخدام نسب إشباع (30– 70)% من كبريتات الامونيوم والتي تمثل خطوة من خطوة تنقية الأنزيم قد احتوت على ثلاثة حزم في هلام الاكريل الامايد عند الترحيل الكهربائي لمستخلص الأنزيمي المركز ، وهذا يدل على احتواء المستخلص الأنزيمي على أكثر من بروتين .اما الشكل (C-2) فيلاحظ منه احتواء هلام الاكريل الامايد على حزمة

واحدة و هذا دليل على نقاوة الإنزيم عند إجراء عمليـــة الترشيح الهلامي له .

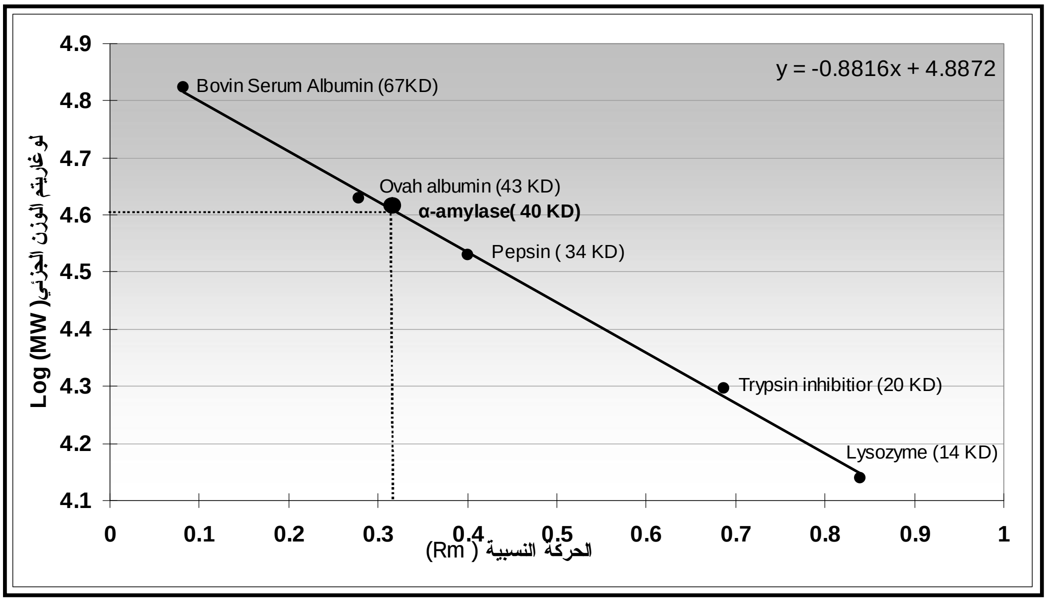


الشكل (2): الترحيل الكهربائي بغياب المواد الماسخة للأنزيم في خطوات التنقية المختلفة لأنزيم الالفا- أميليز المستخلص من مالت الشعير صنف أباء-99 في هلام الاكريل أمايد .

- A= المستخلص الإنزيمي الخام
- B = المستخلص الإنزيمي المركز بوساطة كبريتات الامونيوم بنسبة إشباع 30 – 70 %
- C = الإنزيم المنقى بواسطة بالترشيح الهلامي بوساطة سيفادكس G-100

3-2 تعيين الوزن الجزيئي للالفا- أميليز

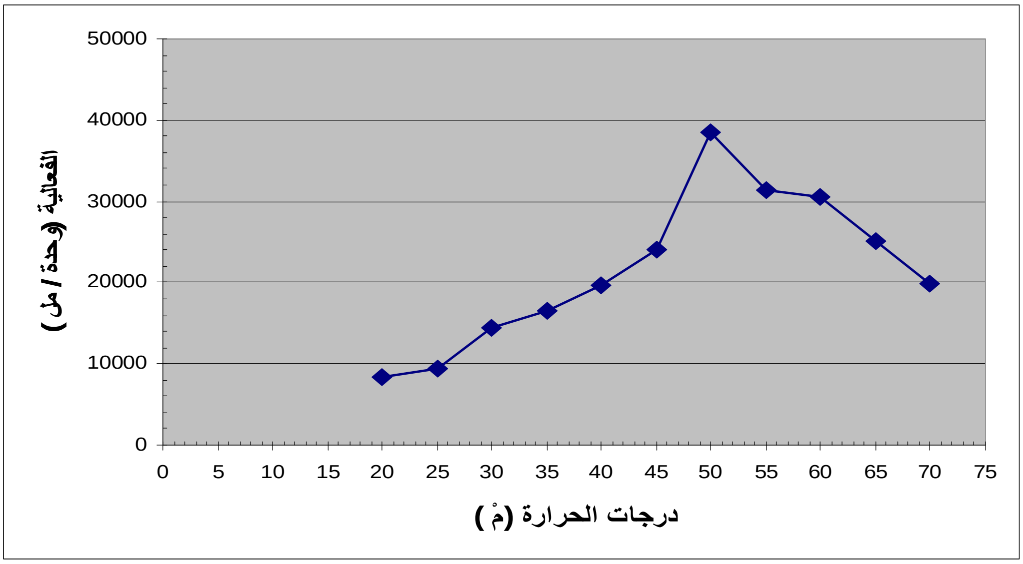
تم تقدير الوزن الجزيئي بوساطة SDS- Gel Electrophorsis وذلك بأستعمال بروتينات قياسية ذات أوزان جزئية معلومة. و يوضح الشكل (3) العلاقتين لوغارتيم الوزن الجزيئي والحركة النسبية للبروتينات المعلومة الوزن الجزيئي (Relative mobility) في هلام الاكريل أمايد المتعدد بوجود SDS لحساب الوزن الجزيئي للأنزيم بطريقة الترحيل الكهربائي.ووجد أنها تساوي 40000 دالتن.. و أورد باحثون آخرون قيماً للأوزان الجزيئية للالفا-أميليز من مصادر نباتية مختلفة . اذ بلغ الوزن الجزيئي للالفا- أميليز من مالت الدخن باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي بوجود مواد ماسخة 48000 دالتن (12).وبلغ الوزن الجزيئي للالفا-أميليز المنقى من لب فاكهة المانكو 55200 دالتن عند استخدام طريق الترحيل الكهربائي كما قدر (4)الوزن الجزيئي للالفا-أميليز المنقى من البازلاء الخضراء بإتباع تقنية الترحيل الكهربائي بوجود مواد ماسخة SDS-PAGE وجده يساوي 45000 دالتن .



الشكل (3) تعيين الوزن الجزيئي للالفا- أميليز (المنقى) من مالت الشعير صنف أباء-99 بطريقة الترحيل الكهربائي في هلام الاكريل امايد المتعدد بوجود المواد الماسخة للبروتين SDSو المركبتو اثانول

3-3 تعيين درجة الحرارة المثلى للأنزيم

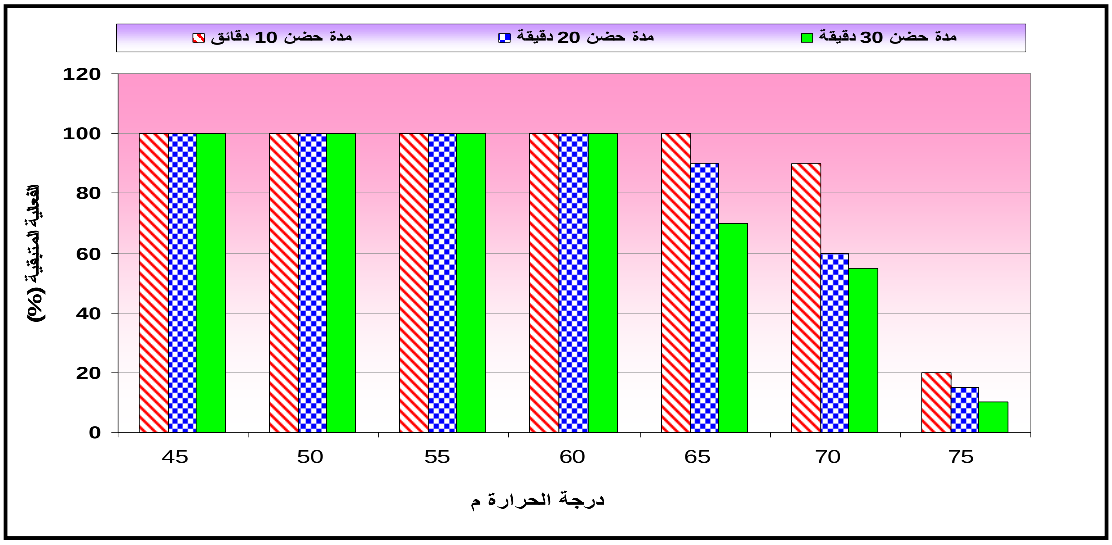
درس تأثير درجة الحرارة في فعالية الالفا- أميليز المنقى من مالت الشعير صنف أباء-99 وذلك ضمن مدى حراري تراوح ما بين (20–70)°م وأظهرت النتائج المبينة في الشكل(4) ارتفاع في فعالية الإنزيم مع ارتفاع درجة الحرارة وبلغت أقصاها عند درجة الحرارة 50م إذ بلغت 39000(وحدة/مل) ثم انخفضت بزيادة درجة الحرارة وصولا الى درجة الحرارة 70م اذ بلغت 20000 (وحدة/مل). ويعزى سبب زيادة سرعة التفاعلات الإنزيمية مع ارتفاع درجة الحرارة لحد معين إلى زيادة التصادمات بين جزيئات الإنزيم والمادة الخاضعة ، نتيجة لزيادة الطاقة الحركية للجزيئات بتأثير زيادة درجة الحرارة (14) فيما تسبب درجات الحرارة العالية انخفاض في فعالية الإنزيم بسبب تأثيرها في مسخ الإنزيم نتيجة تأثير الحرارة في تركيب الإنزيم ، وتغير هيأة الموقع الفعال مما يؤدي إلى فقدان فعاليته (9)



شكل (4) درجة الحرارة المثلى لفعالية الالفا – اميليز المنقى من مالت الشعير صنف أباء- 99)

3-4 ثباتية الأنزيم اتجاه الحرارة

يوضح الشكل (5) ثباتية الالفا- أميليز المنقى من مالت الشعير صنف أباء 99 عند معاملته بدرجات حرارية مختلفة و لمدد زمنية مختلفة ، اذ حضن الأنزيم في درجات حرارة تراوحت بين (45 – 75) ^{o}م و لمدد (10 ، 20 ، 30) دقيقة و يلاحظ من النتائج المستحصل عليها ان الأنزيم أحتفظ بكامل فعاليته بين درجتي الحرارة (45-60)^{o}م و لمدد الحضن الثلاث ، و انخفضت ثباتية الأنزيم عند معاملته بدرجة حرارة 65^{o}م في مدة 20 ، 30 دقيقة ، اذ بلغت نسبة الفعالية المتبقية 95% و 70% على التوالي، بينما فقد الأنزيم فعاليته بشكل كبير عند معاملته بدرجة حرارة 75^{o}م لمدة 30 دقيقة اذ بلغت 10%

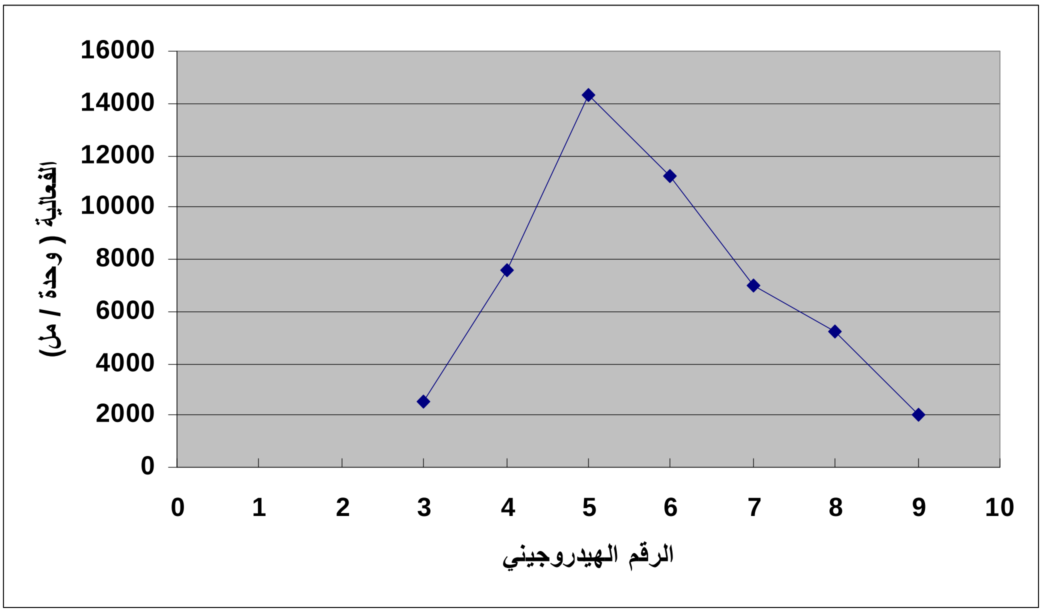


الشكل (5): ثباتية فعالية الالفا- أميليز المنتج من مالت شعير صنف أباء 99 اتجاه الحرارة .

3-5 تعيين الرقم الهيدروجيني pH الأمثل لفعالية الإنزيم

درس تأثير الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الالفا – أميليز المنقى من مستخلص مالت الشعير صنف أباء 99 بمدى من الأرقام الهيدروجينية تراوحت (3- 9) . وبينت النتائج الموضحة في الشكل (6) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية كان 5 اذ ظهرت أعلى فعالية للأنزيم في هذا الرقم . ويلاحظ من الشكل ان فعالية الأنزيم تزداد بزيادة الرقم الهيدروجيني لوسط التفاعل من (3– 5) وأنها تبلغ حدها الأقصى عند هذا الرقم الهيدروجيني(5) وبلغ 14350(وحدة/ مل) . وأن سبب الانخفاض في فعالية الالفا-أميليز في المدى القاعدي الأعلى و المدى الحامضي الأعلى يعود لتأثير الرقم الهيدروجيني لوسط التفاعل في المجاميع القابلة للتأين الموجود في الموقع الفعال، أو حدوث تغيير في المادة الخاضعة للتفاعل، أو نتيجة لحدوث تغيير في الحالة الأيونية لمواد التفاعل التي تشمل معقد الأنزيم مع مادة الخاضعة (ES) ومعقد الأنزيم مع نواتج التفاعل (EP) . اتفقت هذه النتائج مع (5) ، اذ ان الرقم الهيدروجيني الأمثل للأنزيم الذي تكون عنده جميع مكونات وسط التفاعل في أفضل حالة أيونية ولاسيما الأحماض الامينية الموجودة في الموقع الفعال للأنزيم مما يدفع التفاعل الأنزيمي بزيادة بمستوى عالية، أما التأثير الثاني للرقم الهيدروجيني الأمثل في الأنزيم فيظهر في تغيير شكله الفراغي جراء تغيير عدد من الأواصر المثبتة للتركيب الثانوي والثالثي(11) ويستدل

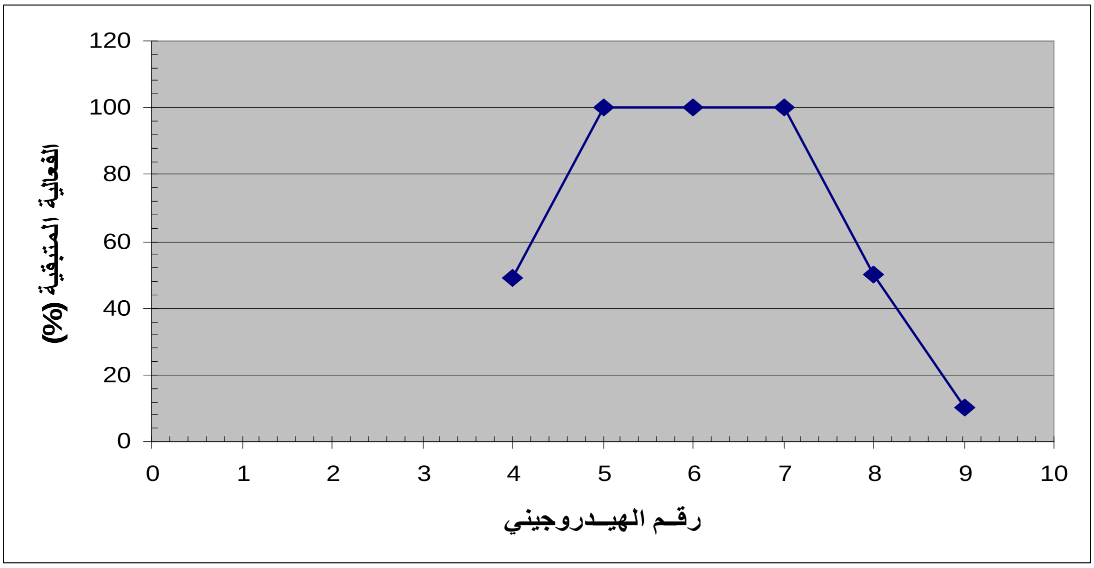
من ذلك أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعاليــة الأنــزيم يختلف باختلاف تركيب الأنزيم وشكله الفراغي ومكوناته من الأحماض الامينية ،لاسيما تلك التــي تـشارك فـي التفاعل الأنزيمي في الموقع الفعال ، وتجدر الإشارة الى ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الاميليزات ومنهـا الالفا–اميليز، يعد من أهم المحددات لاسـتعمالات هـذه الأنزيمات في المجالات التطبيقية كالـصناعات الغذائيــة وفي عمليات التنظيف .



شكل (6): الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الالفا- أميليز المنتج من مالت الشعير صنف أباء-99

3-6 تعيين الرقم الهيدروجيني pH لثبات الفعالية للأنزيم

اظهرت النتائج الموضحة في الشكل (7) ان الانــزيم يحتفظ بكامل فعاليته 100% عند قيم الرقم الهيدروجيني (5-7) و هذا يعني ان الانزيم يكون ثابت في هذا المدى . و تنخفض ثباتية الانزيم في قيم الــرقم الهيــدروجني الحامضي(4) اذ تبلغ فعالية الأنــزيم المتبقيــة 49.9 % وأيضا تنخفض فعالية الأنزيم

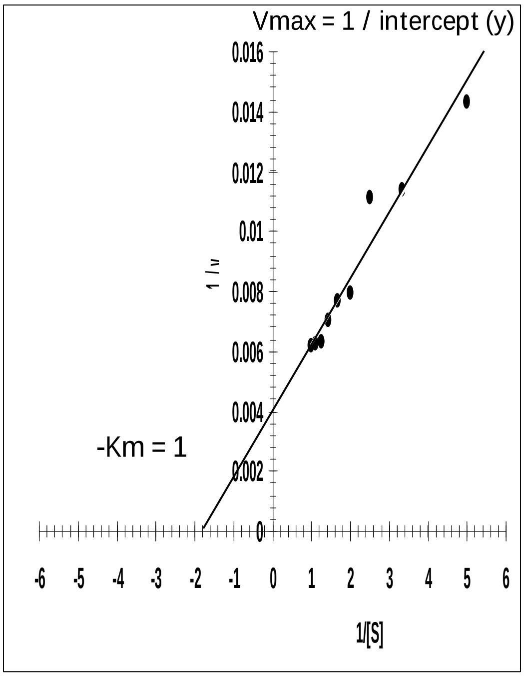


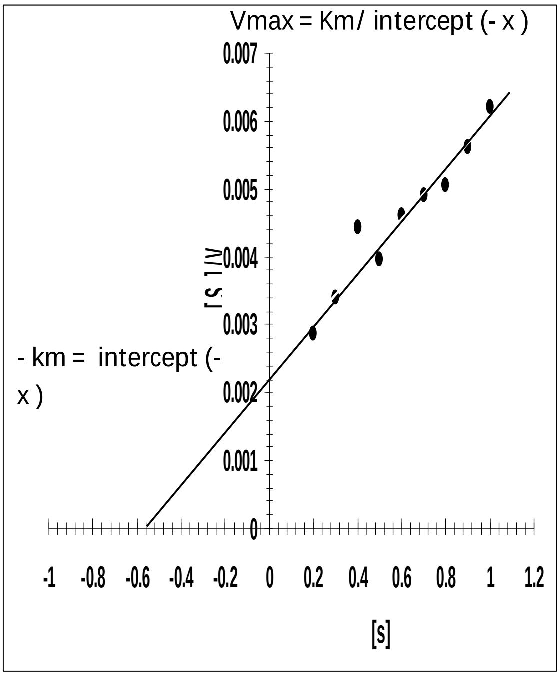
شكل(7): الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الالفا – اميليز المنتج من مالت الشعير صنف أباء 99

عند قيمة الرقم الهيدروجيني القاعدية (9) اذ تبلغ فعالية الانزيمية المتبقية (12.6) % ،و يعزى هذا الانخفاض في فعالية الانزيم عند قيم الرقم الهيدروجيني الطرفية الى مسخ جزئية البروتين وتغيير هيأة المواقع الفعالة او ربما تغيير التركيب الثانوي اوالثالثي للأنزيم و بالتالي فقدان الفعالية الإنزيمية(14) و جاءت هذه النتائج مقاربة من النتائج التي ذكرها (15)اذ ذكر ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الالفا- أميليز المنقى من مالت الشعير يقع ضمن مدى (5- 6) . كما كانت مقاربة لما توصل اليه (4)عند دراسته ثباتية أنزيم الالفا- أميليز المنقى من بذور البازلاء الخضراء تجاه مدى من الأرقام الهيدروجينية تراوحت بين (4- 8) ووجد ان الانزيم يكون ثابتاً عند (6- 6.5) . وان الأنزيم يحتفظ بحوالي 90% من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني (5) كما لوحظ ان الأنزيم يحتفظ بـ85%من فعالية الأنزيم عند الرقم الهيدروجيني (7)

3-7 تعيين الثوابت الحركية للإنزيم

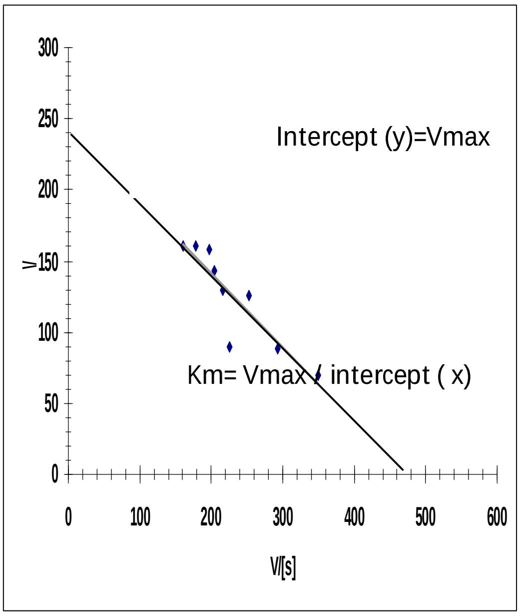
اتبعت أربع طرائق لرسم العلاقة بين سرعة التفاعل وتراكيز مختلفة من النشأ بوصفها المادة الخاضعة Substrate لتعيين قيم ثابت ميكالس Km والسرعة القصوى Vmax كما موضح في الشكل (A,B,C,D8. فقد بلغ معدل القيم للثوابت الحركية Km وVmax 0.55 % و 255.75 وحدة/مل على التوالي ، و جاءت هذه النتائج قريبة الى مع ما توصلت إليه (2) إذ وجدت أن ثابت ميكالس اتجاه النشأ للالفا- أميليز المنتج من بكتريا R5 B. licheniformis يساوي 0.44%والسرعة القصوى كانت 13.22 (ميكرومول/دقيقة). وعند استخدامها الكلايكوجين و الاميلوز مادتين خاضعتين كان ثابت ميكالس يساوي 0.43 و 0.28% على التوالي ، ووجد (13) أن قيمة ثابت ميكالس يساوي 0.27 % عند دراسة الثوابت الحركية للالفا-أميليز المنقى من مستخلص قصب السكر . كما نقى (4)الالفا- اميليز من البازلاء الخضراء ودرس قيمة ثابت ميكالس اتجاه النشأ فوجد إنه يبلغ 0.83 (غرام /لتر) . ودرس (12) الثوابت الحركية للالفا- اميليز المنقى من لب فاكهة المانكو إذ وجد ان ثابت ميكالس يساوي 0.33% عند استخدام النشأ كمادة خاضعة . إن تباين قيم الثوابت الحركية لا يعود إلى نوع الإنزيم ومصدره فحسب وإنما إلى ظروف تقدير الفعالية أيضا (عند استخدام الإنزيم من المصدر ذاته) كالرقم الهيدروجيني ودرجة حرارة التفاعل فضلا عن نوع محلول الدارئ وقوته الأيونية مع الاختلاف في الطرائق المستخدمة للحصول على قيم هذا الثابت (16)وقد يعزى هذا التباين في قيم ثابت ميكالس بين نتائج الباحثين و النتائج المتحصل عليها قيد الدراسة الى الاختلاف في مصادر الأنزيم المنقى منها فضلاً عن اختلاف طرق تقدير فعالية الأنزيم والتنوع في استخدام المواد الخاضعة المختلفة .و إن تباين قيم الثوابت الحركية لا يعود إلى نوع الإنزيم ومصدره فحسب وإنما إلى ظروف تقدير الفعالية أيضا عند استخدام الإنزيم من المصدر ذاته كالرقم الهيدروجيني ودرجة حرارة التفاعل

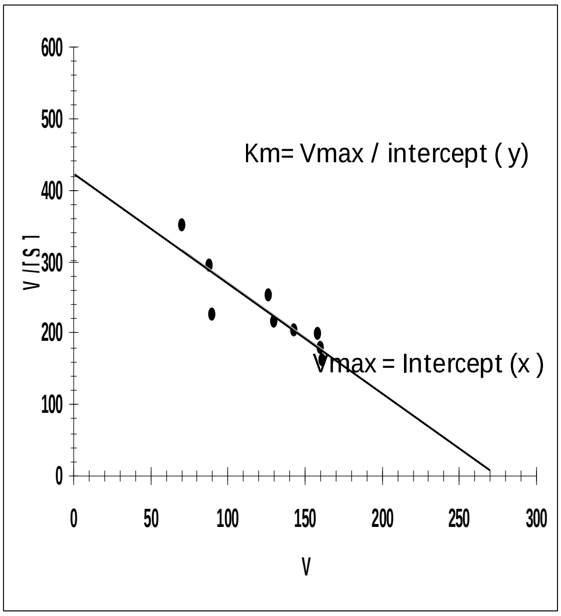




(A) 1/V :Lineweaver– Burk Reciprocal Plot versus 1/[S]

(B) [S] /V versus :Hanse – Woolf Plot [S]





(C) V :Woolf – Augustinsson – HofsteePlot versus V/ [S]

(D) V/[S] versus V :Eadie – Scatshard Plot

الشكل (8) الثوابت الحركية للالفا- أميليز المنقى من مالت الشعير صنف أباء 99 مقدرة بأربع طرائق

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. **الشيخلي ، رنا عبدالله حسين** (2004) . أنتاج أنزيم الالفا- اميليز من بكتريا *Bacillus licheniformis* *R5* المعزولـــة محلياً وتنقيته ودراسة خواصة . رسالة ماجستير . كلية الزراعة – جامعة بغداد .
3. **Abdul- Hussain , A .S. and Varriano-Marston , E. (1982)** . Amylolysis of pear Millet starch and Its fractions by pear Millet alpha-amylase ., Cereal Chem .59(5) 351-355 th
4. **Bastos, Joao luiz. pinheiro .; josé, tarquinio. Prisco., and enéas,Gomes. Filho. (1994)** . Purification and Characterization of a Cotyledonary α-amylase from Cowpea Seedlings . R. Bras. Fisiol. Veg., 6(1):33-39.
5. **Crabb, W.D. and Shetty, J.K. (1999).** Commodity scale production of sugars from starches. Current Option in Microbiology. 2: 252-256.
6. **Fullbrook , P .D .(1983)** . Kinetics (Practical applied Kinetics) . Chapter 2 .pp. 67- 70 In: Godforg, T and Riechelt ,J.(1983) Industrial Enzymology . The Nature press . U.K.
7. **Garfin , D.E. (1990) .** Purification Procedures Electrophoretic Methods . In Methods in Enzymology (ed, Murray ,E. D. and Dentscher , P.J. Vol. 128 : 425 – 411 .
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. **Maciunska, J.; Czyz, B. and Synowiecki, J. (1998**). Isolation and some properties of B-galactosidase from the thermophilic bacterium
10. **Meredith, W. O. S.; Anderson, J. A. and Handson, L.E.(1962).** Evaluation of malting barley. (C. F. Barley and Malt, ed. by A. H. Cook. PP 207-269. Academic Press London and New York).
11. **Nielsen, J.E.; Borchert, T.V. and Uriend, G. (2001)**. The determinants of α- amylase pH – activity profiles. Protein Engineering. 14 (7): 505-512.
12. **Rahman, M. Mahbubar. and AbSar , Nurul. (2001)**. Purification , Characterization and Effect of Physico–chemical Agents on the Stability of Amylase from Mango–pulp. Pakiistan Journal of Biological Sciences 4 (1) :98- 102 .
13. **Rahman,M.;Habibur, Md.; Salim, Uddin.; Nural, Islam.; Farjana. Nikkon and M. Fida .Hasan**. **(2001).** Comparative Analysis on the Purified Amylases from Healthy and Diseased Sugarcane Juice . Pakistan Journal of Biological Sciences 4 (6): 728-732.
14. **Segel, I.H. (1976).** Biochemical calculations. 2nd edition, John and sons. Inc. New York.
15. **Straathof, A.; Panke, S. and Schmid, A. (2002.)**The productionof fine chemicals by biotransformations,Curr. Opin. Biotechnol, 13,548–556.
16. **Thoma ,J.A. (1971) .** In Enzymes ,3rd.ed ., Vol 5 Boyer , P.D., Academic Press (New Your NY: 1971) pp .115- 189.
17. **Vetere, A. and Paoletti, S.(1998).**Separation and characterization ofthree β – galactosidase from *Bacillus circulans* . Biochem. Biophys. Acta. 1380:223-231.

Mercel Dekker. Inc. New York, USA

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

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

19. **Whitaker, J.R. (1972).** Principles of Enzymology for the food science.

Purification and Characterization of alpha-amylase produced from a local Malt Barley

*Ghyath .H.Majeed *Ali .A.Sahi **Dhia .F .Alfekaiki

** Food sciences Dept. – Agric.college - Basra Univ.*

alfekaiki@yahoo.com

summary

The study included , alpha amylase was extracted from malt barley local by Imidazol buffer of pH 7.4 , 0.025 M. Alpha-amylase was purified by number of steps which induced precipitation by ammonium sulphate saturated concentration was 30- 70 % and dialysis was performed against the same buffer . The result extract was passed through a column of sephdex G-100 . Purification was 20.71 fold and enzyme yield was 20.72%. Molecular weight of alpha – amylase was 40000 Dalton as estimated by SDS –Polyacrylamide electrophoresis. Optimum pH for activity and stability of enzyme was 5 and (5-7), respectively . Heat stability of enzyme increased in the presence of Ca++ ione, at a concentration of 0. 001 M , when the enzyme retained all of its activity when heated to 80 °C for 20 min while 30 % of the activity remained at 90°C for 30 min . Kinetic constants study when using starch as a substrate showed that Km was 0.55% and Vmax was 255.75 unit /ml

Key words ;alpha amylase – enzyme purification –malt barley