عزل وتنقية بيتا كازين حليب الماعز المحلي ودراسة فعالية متحللاته في تثبيط الإنزيم المُحَوِّل للأنجيوتنسين 1

عمر عادل عبود* كفاح سعيد عباس**

*وزارة العلوم والتكنلوجيا/ دائرة البحوث الزراعية - مركز التقنيات الغذائية والإحيائية
**وزارة التعليم العالي/ جامعة بغداد - كلية علوم الهندسة الزراعية، قسم علوم الأغذية
بغداد - العراق

الخلاصـــة

نُقِّيَ بروتين بيتا كازين من الكازين الحامضي لحليب الماعز المَحلي بشكل أولي باستعمال تراكيز من محلول يوريا وتغيير الرقم الهيدروجيني pH ثم تنقية نهائية وبمرحاتين باستعمال المُبادِل الأيوني السالب DEAE-Cellulose 52 ثم الترشيح الهُلامي باستعمال عمود Sephadex G-75 وتم التأكُّد من نقاوته بتقنية الترحيل الكهربائي بوجود المواد الماسخة SDS-PAGE وظَهَرَ بيتا كازين على شكل حُزمة واحدة وبوزن جزيئي 24.2 ك.د مُقَدَّرة بطريقة قياسRF للبروتينَ. أُجْرِيَت عملية تحلل بيتا كازين النقي بإنزيمات الببسين والتربسين وبكليهما معاً بنسبة1:1 وظهرت عدة ببتيدات في المتحللات تختلف في قابليتها على تثبيط الإنزيم المُحَوِّل للإنجيوتنسين1 وكانت أعلى نسبة تثبيط لفعالية Angiotensin Converting Enzyme1 (ACE_1) من الببتيدات الناتجة بالببسين والتربسين معاً وبالذات بعد مرور8 ساعات من التحلل المُشار له بالرمز(M8Hβ) إذ كانت قيمة درجة التحلل(DH) Degree of Hydrolysis هي 54.443% وبِنِسْبَة تثبيط هي 67.310% مقارنة بقيمة DH 48.701 و42.23% وبنسب تثبيط 64.84 و65.665% لكل من المتحللات الناتجة بفعل الببسين والتربسين على التوالي.

الكلمات المُفتاحية: عزل، تنقية، بيتا كازين، متحللات، تثبيط والإنزيم المُحَوِّل للانجيوتنسين1

Separation and Purification of Local Goat Milk β-Casein and Studying Effectiveness of Its Hydrolysates in Inhibition of Angiotensin-converting Enzyme 1 (ACE_1)

***Omar Adil Abbod **Kifah Saaeed Abbas**

*Ministry of Sciences and Technology/Agricultural Researches Directorate-Food and Biological Technique Center
**Ministry of High Education and scientific research /University of Baghdad - College of Agriculture, Department of Food Sciences
Baghdad - Iraq

E_mail: omarabbodi@yahoo.com

Abstract

β- Casein (β-CN) protein from the acid casein of local goat milk was purified primarily using concentrations of urea solution and pH change, then purified with negative ion exchanger DEAE-cellulose 52 and gel filtration using column SephadexG-75. Its purity was confirmed by electrophoresis with SDS-PAGE and the β- CN appeared in a single band with MW of 24.2 kDa estimated by the protein RF measurement method. The hydrolysis of pure β-CN with pepsin, trypsin, and both together at a 1:1 ratio several peptides appeared in the hydrolysates that differed in their ability to inhibit the angiotensin-converting enzyme 1 (ACE_1) and had the highest inhibition of the peptides produced by pepsin and trypsin together, especially after 8 hours of hydrolysis which indicated with symbol (βM8H). Degree of Hydrolysis (DH) was 54.443 % with inhibition rate is 67.310% comparison of DH 48.701 and 42.23% with inhibition rates of 64.84 and 65.665% for both hydrolysates by pepsin and trypsin respectively .

Keywords: Separation, Purification, β-CN, Hydrolysates, Inhibition and Angiotensin-converting Enzyme 1

المقدمــة

من الأساليب المهمة جداً للسيطرة على إرتفاع ضغط الدم هو محاولة خَفْض فعالية Angiotensin Converting Enzyme (ACE_1) المسؤول عن إرتفاع ضغط الدم في الإنسان والحيوانات التجريبية ويتم ذلك باستعمال علاجات كيميائية لها أعراض جانبية خَطِرة (Sica، 2005). في الآونة الأخيرة إتَّجه العالم الى إستعمال البدائل الطبيعية في الوقاية وعلاج الأمراض وذلك لتلافي الأعراض الجانبية التي تُحدِثها العلاجات الكيميائية في بعض أعضاء الجسم فضلاً عن كونِها ذات كُلفة مادية عالية (Korhonen و Pihlanto 2013). عدة دراسات وبائية أكدت أنَّ منتجات الألبان المتخمرة والأجبان المنضجة ذات فعالية مخفضة للكوليسترول والدهون الثلاثية وضغط الدم المرتفع وتساهم في تثبيط ACE_1 وذلك نتيجة لعمليات إنتاج الببتيدات الفعالة حيويا ومن الواضح إنَّ نوع الأحياء المجهرية المستعملة في التخمر وطريقة تحضير المنتج هي عوامل أساسية في عدد ونوع الببتيدات وفعاليتها التثبيطية (Tsutsumi و Tsutsumi 2014). تحتوي بروتينات الحليب على العديد من السلاسل الببتيدية المتخصصة وهي في حالة غير فعالة طالما بقيت مرتبطة باحماض أمينية أخَرى ضمن تركيب البروتين وإنَّ معاملة البروتينات بالإنزيم أو مجموعة من الإنزيمات مجتمعة تقود الى التحلُّلْ البروتيني وتحرر سلاسل ببتيدية حرة يمكن ان تستعمل كعلاج ضد أمراض مزمنة تصيب الأنسان مثل Hypertension (Munn، 2013). من المتحللات ذات فعالية تثبيط ACE_1 هي متحلُّلْ بروتين سائل شجرة التين (Maruyama واخرون 1989) ومتحللات خيار البحر (Li واخرون 2018) والببتيدات المفصولة من حليب الأبقار Ile- Pro- Pro و Pro- Pro-Val اللتان تمتلكان فعالية حيوية في مجال تثبيط ACE_1 وخَفْض ضغط الدم وخواص علاجية أُخرى (Rutella واخرون 2016). تعد الدراسات الخاصة بتأثير الببتيدات وعوامل التخمر الناتجة من تخمر حليب الماعز ولها فعالية تثبيطية تِجاه ACE_1 نادرة وتنحصر الدراسات في إحداث عمليات تخمر باستعمال سلالات مختلفة من بكتريا حامض اللاكتيك في تخمر حليب الماعز واختبار فعاليتها في خفض ضغط الدم (Chen واخرون 2018). ان أهم مايميز حليب الماعز بأن بروتينات الكازين وخاصة البيتا كازين تكون سهلة التحلُّلْ بالإنزيمات المحللة للبروتين إذ من الممكن أن تصل نسبة التحلُّلْ الى 96% فَضلاً عن خواص البروتين الأُخرى كشكل الجسيمة الكازينية وحجمها وقوة شحنتها ونعومة الخثرة الناتجة شجعت على أجراء تجارب لأنتاج ببتيدات فعالة حيوياً مضادة للميكروبات والعديد من الببتيدات منخفضة الوزن الجزيئي لها خصائص علاجية أخرى (Omara، 2018). في دراسة مُنتج كفير الماعز (هو مشروب متخمر ومعتق منشأه جبال القوقاز) بان هذا المنتوج يحتوي على عدد من الببتيدات المتحررة من من متحللات كازين الماعز تمتلك قدرة تثبط ACE1 خارج الجسم الحي (Quiros واخرون 2005). عُرِّضَ كازين حليب الماعز إلى عملية تحلل يفعل إنزيم الببسين والتربسين وان هذه المتحللات اظهرت نسبة تثبيط ACE_1 مرتفعة في حين أن البروتييزات الأُخرى لم تُظهِر متحلُّلْاتها نشاطاً تثبيطياً واضحاً على الرغم من أن قيمة DH لها أعلى من قيمتها في الببسين والتربسين وأسْتُنْتِجَ أنَّ الخصائص التثبيطية لا تحتاج إلى عمليات فصل مُعَقدة وإنَّ عملية تثبيط ACE_1 المسؤول عن رفع ضغط الدم تتناسب طرديا مع DH وبشكل غير خطي (Lee واخرون 2005). أدَّت متحللات كازينية الى تثبيط ACE_1 خارج الجسم الحي وخفض ضغط الدم وزيادة وإفراز Na مع البول كمؤشر على مستوى Ang2 المُحَفِّز للمواد الرافعة لضغط الدم في الأوعية الدموية Spontaneously Hypertensive Rats (SHRs) (Sun واخرون 2014). جُرِّعَت الجرذان

بمتحلُّلْ كازيني بتركيز 1–2 ملغم/كغم من وزن الجسم عن طريق الفم والحقن الوريدي داخل الصفاق ومن خلال النتائج فقد عاد ضغط الدم إلى مستواه الأَصلي بعد ثلاث ساعات من التجريع بالمُتَحللات (Maruyama واخرون 1985). تُعَد درجة التحلُّلْ DH% إحدى أهم القياسات المُسْتَعْمَلة لمعرفة وفهم تأثير الإنزيمات في عملية تحليل البروتين وكذلك فهم العلاقة بين درجة التحلُّلْ وتشخيص الخصائص الوظيفية والحيوية والحسية لهذه البروتينات (Cheison واخرون 2009). تعتمد درجة التحلُّلْ بطريقة TNBS على التفاعل الحاصل بين Trinitrobenzene Sulphoric Acid (TNBS) ومجاميع الأمين الأولية للأحماض الأمينية الطرفية والذي سوف يؤدي إلى تكون معقد لوني يكون أعلى امتصاص ضوئي له عند الطول الموجي 340 نانومتر، ويُعْتَمَد على منحنى قياسي للحامض الأميني ليوسين لقياس كمية المجاميع الأمينية الحرة ومن ثم هنالك العديد من المعادلات التي يمكن إستعمالها لقياس درجة التحلُّلْ (Greyling، 2017).

نظرا للاتجاه العالمي نحو استعمال الأغذية في علاج بعض الأمراض لكون المستحضرات الدوائية ذات تأثيرات جانبية عدة، فقد هدفت هذه الدراسة الى عزل الجزء البروتيني بيتا كازين من كازين حليب الماعز للمَحَلِّي وتحديد الظروف المُثلى لتحرير مُتَحللات منخفضة الوزن الجزيئي منه بالطرائق الإنزيمية والتي لها فاعلية في تثبيط (ACE_I) المسؤول المباشر عن ارتفاع ضغط الدم في الأنسان وأغلب الثدييات الأخرى.

المواد وطرائق العمل

ـ جُهِّزَ حليب الماعز من موقع أبي غريب/ بغداد ومن السلالة المحلية العراقية والذي يُعَدُّ سلالة غير نقية منقولة من سُلالات بلاد الشام وقُدِّرَت نسبة البروتين فيه باستعمال جهاز فحص مكونات الحليب Milk Otester بلغاري المنشأ وفُرِزَ حليب الماعز الكامل باستعمال جهاز نبذ مركزي مبرد نوع Selecta طراز Modifier BL-S بسرعة 3000×g لمد 15 دقيقة وفي درجة حرارة 4 م° (السعدي، 2001).

ـ حُضِّرَ الكازين الحامضي حسب ما ذكره (السعدي، 2001) ورُسِّبَت كميات الكازين باستعمال حامض الهيدروليك (1 مولاري) حتى الوصول الى الرقم الهيدروجيني 4.2 وهي نقطة التعادل الكهربائي لكازين حليب الماعز ثم فُصِلَ الكازين المُترسِّب باستعمال النَّبذ المركزي بسرعة ×3000g ولمدة 15 دقيقة وفي درجة حرارة 4 م° ثم رُشِّحَ المحلول من خلال ورقة الترشيح Whatman. No 45 تحت التفريغ مع إضافة الماء المُقَطَّر للتخلص من بقايا مكونات الشرش ثم أُذيبَ الكازين الناتِج في الماء المُقَطَّر مع إضافة هيدروكسيد الصوديوم (1 مولاري) لرفع الرقم الهيدروجيني إلى 7 ثمَ رُسِّبَ الكازين مرةً أُخرى باستعمال حامض الهيدروكلوريك وفُصِلَ الراسب بالنبذ المركزي وأُعيدَ غسل وإذابة وترسيب الكازين مرةً أُخرى وجُفِّفَ الراسب بالتَّجفيد وحُفِظَ بدرجة حرارة التجميد تمهيداً لإجراء تنقية بيتا كازين يمرحلتين اولية بالترسيب ونهائية بطرق الكروماتوكرافي.

التنقية الأوّلية لبيتا كازين

ـ أُتّبِعَت طريقة (Aschaffenburg، 1963) لإجراء تنقية أولية لبيتا كازين الخام من الكازين الكلي قبل إجراء طرق التنقية بتقنيات الكروماتوكرافي مع تحوير في كمية الكازين الحامضي المستعمل في بداية عملية التنقية إذ اسْتُخدِمَت كمية كازين 40 غم بدلاً من 30 غم فقد أُذيبَ 40 غم من الكازين الحامضي المحضر سابقاً 700 مل محلول يوريا 3.3 مولاري وضُبِطَ الرقم الهيدروجيني على 7.5 بإضافة هيدروكسيد الصوديوم 1 مولاري وأُكمِلَ الحجم إلى 900 مل بالماء المقطر ثمَ خُفِّضَ الرقم الهيدروجيني للمحلول إلى 4.6 باستعمال حامض الهيدروكلوريك 1 مولاري وتُرِكَ لحين

تَكَون راسب الذي تم التخلص منه بالترشيح باستعمال ورق ترشيح Whatman رقم 45 ليترسب كابا كازين برفقة مواد بروتينية أُخَرى. خِذَ الراشح المُتَبَقي وضُبِطَ الرقم الهيدروجيني على 4.9 أضيفَ للراشح 2 لتر ماء المُقَطَّر وحُضِنَ في حرارة 30 م° لمدة 24 ساعة، أُخِذَ الراسب بعد الترشيح وأُذيبَ الراسب في 400 مل محلول اليوريا 3.3 مولاري وَضُبِطَ الرقم الهيدروجيني على 7.5 باستعمال محلول هيدروكسيد الصوديوم 1 مولاري وخُفِّضَ الرقم الهيدروجيني إلى 4.6 وتُرِكِ بدرجة حرارة 30 م° لحين تكون راسب.

– أجريت عملية الترشيح للتخلص من الراسب وأُخذَ الراشح برقم هيدروجيني 4.9 وأُضيفَ له 800 مل ماء مقطر وحُضِن في درجة حرارة 30 م° لمدة 24 ساعة وجُمِعَ الراسِب باستعمال الترشيح والذي يُمَثِّل بيتا كازين وغُسِلَ بالماء المُقَطَّر عِدّة مرات بالماء المُقَطَّر وجُفِّفَ النموذج بطريقة التجفيد.

تنقية بيتا كازين النهائية

تنقية بيتا كازين بطريقة كروماتوكرافي التبادل الأيوني

ـ أسْتُعْمل المُبادل الأيوني السالب DEAE-cellulose لفصل أجزاء الكازينات المُسْتَحصِل عليها من خطوة الفصل الأولي عن بعضها أعتماداً على فروقات صافي شحنتها وحسب طريقة (Wei و Whitney 1985) و(Whitney، 1988). أُذيبَ 1 غم من بيتا كازين المفصول بصورة أولية من الكازين والمُحَضِّر في الخطوة السابقة في 100 مل من محلول 0.1 مولاري من دارئ الفوسفات برقم الهيدروجيني 7.4 والحاوي على يوريا (3.3 مولاري) وميركابتوإيثانول (0.010 مولاري) ومُزِجَ النموذج مع– Cellulose DEAE المُعامَل بنفس الدارئ المُستعمل لإذابة النموذج ولمدة 15 دقيقة في حرارة 4 م° بعدها صُبَّتْ مادة التبادل الأيوني لتعطي عمود بأبعاد x250 سم وغُسِلَ العمود بالمحلول الدارئ لازالة البروتينات غير المرتبطة.

ـ أُزيلَت الكازينات المرتبطة ومنها بيتا كازين من العامود باستعمال المحلول الدارئ المستعمل لإذابة النموذج والحاوي على كلوريد الصوديوم بتراكيز متصاعدة (0.1 و0.175 و0.2 مولاري) وضُبِطَت سرعة الجريان على 50 مل/ ساعة وبواقع 5 مل لكل أنبوبة باستعمال جهاز جامع الأجزاء وَقُرِأَ الأمْتصاص الضوئي لمحاليل البروتين على طول موجي 280 نانوميتر بجهاز المطياف الضوئي باستعمال برنامج UV Probe 2.1 المُجَهَّز من شركة SHIMADZU وجُمِعَتْ الأنابيب الحاوية على كميات من بيتا كازين وعُومِلَتْ بالتنافذ الغشائي باستعمال أغشية باستعمال أغشية تنافذ نوع F12900، IGS-7.

ـ رُكِّزَت المحاليل باستعمال سكر مُبَلوَر وَحُفِظَ النموذج بطريقة التجفيد تمهيداً لأجراء مرحلة التنقية بطريقة الترشيح الهلامي ثم تأكيد النقاوة وتحديد الوزن الجزيئي للبروتين بطريقة الهجرة الكهربائية في الهلام Gel-electrophoresis وبوجود المادة الماسخة SDS.

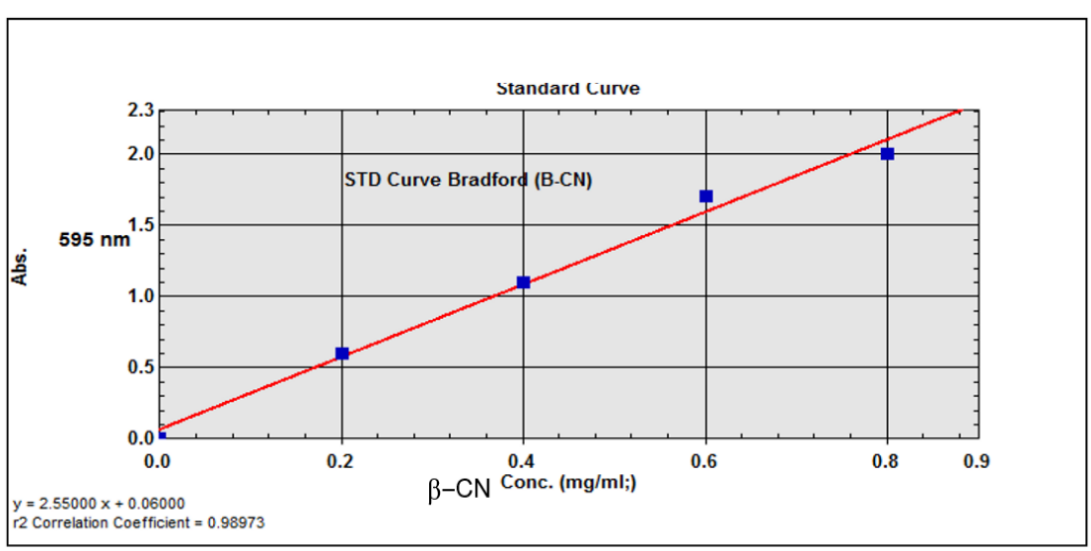
تنقية بيتا كازين باستعمال كروماتوكرافي الترشيح الهلامي

أسْتُعْمِلَ هلام السفادكس G-75 في تحضير عمود السفادكس G-75 وحسب الطريقة التي إتّبَعَها (السعدي، 2001) والشركة المُجهِّزة Fine Pharmacia Chemicals إذ أُذيبَ 0.5 غم من بيتا كازين المُحَضَّرَ حسب الطريقة المذكورة أعلاه والذَي نُقِّي سابقاً بتنقية التبادل الأيوني كما وردَ سابقا في 10 مل من محلول دارئ الموازَنة وَصُبَّ هذا المحلول على عمود السيفادكس الذي كَوَّنَ حجماً مقداره 158 سم^2 ثم أسْتُرِدَّت الأجزاء من عمود السفادكس الذي ضُبِطَ معدَّل جريانه بمعدَّل 20

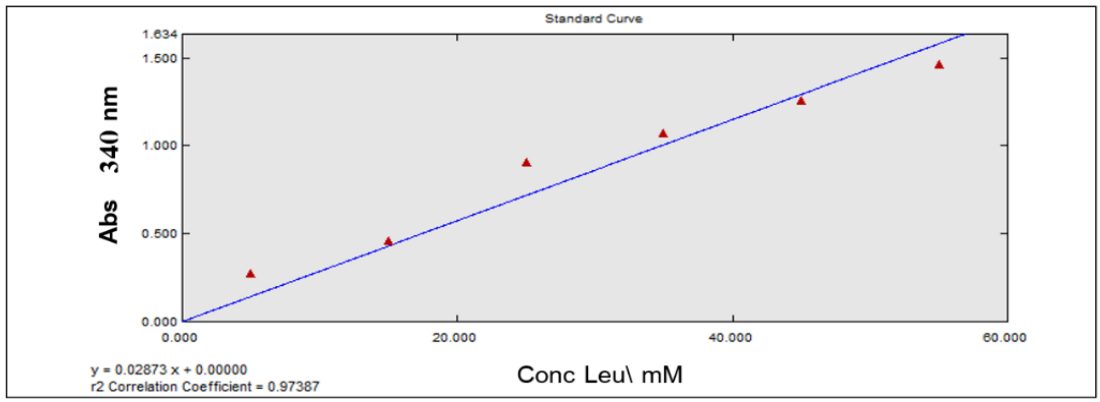
مل/ساعة وضُبِطّ جهاز جامع الأَجزاء على جمع حجم 3 مل في كل أنبوبة وفُحِصَت الأنابيب بجهاز المطياف الضوئي لحين ظهور التراكيز الأولية للبروتين وعلى طول موجي 280 نانوميتر بالإستناد الى قراءة المنحنى القياسي (شكل 1) المحَضَّر مُسبقاً لبروتين β-CN القياسي المُذاب في نفس المحلول الدارئ وبصورة مباشرة بجهاز المطياف الضوئي باستعمال برنامج UV Probe 2.1 المُجَهَّز من شركة SHIMADZU وجُمِعَتْ المحاليل الموجودة في الأنابيب التي تحتوي على البروتين النقي وعومِلَ بالتنافذ الغشائي ضد الماء المُقَطَّر لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة التبريد ورُكِّزَ باستعمال السكر المتبلور وقُدِّرِ تركيز البروتين الكلي بطريقة برادفورد ثم جُفِفَ بالتجفيد لحين أجراء فحص نقاوته لاحقاً باستعمال الترحيل الكهربائي في الهلام وقبل إجراء التحلُّلْ البروتيني البيسين والتربسين.

تأكيد نقاوة بيتا كازين وتقدير وزنه الجزيئي

لتأكيد نقاوة بيتا كازين المفصول سابقاً وتحديد وزنه الجزيئي، إسْتُعْمِلت طريقة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريلامايد بوجود المادة الماسخة Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) وباستخدام جهاز الترحيل الكهربائي العمودي حسب الطريقة التي ذكرها (Laemmli، 1970) والمُحَورة من قِبَل (Schägger، 2006) إذ خُلِطَت مُكَوِّنات هُلام الفصل بتركيز 12.5% وهلام التجميع بتركيز 10% Stacking gel حُضِّرَ النموذج بوزن 5 ملغم في 1 مل ماء مُقطر وأُخِذَ منه حجم 50 مايكروليتر وخُلِطَ مع 50 مايكروليتر من دارئ العينة ثم سُخِّنَ في حمام مائي مغلي لمدة ثلاث دقائق.



شكل (1) المُنحَنى القياسي لتقدير β-CN بطريقة برادفورد ويمثل العلاقة بين تركيز البروتين والإمتصاصية على طول موجي 595 نانوميتر



شكل (2) المنحنى القياسي للحامض الأميني ليوسين المُستُعمل لتقدير درجة التحل البروتيني وتركيز الببتيدات المُتحررة نتيجة التحلل البروتيني بالإنزيمات المُحَلِّلة للبروتين

تحلُّلْ بيتا كازين بالإنزيمات المحللة للبروتين

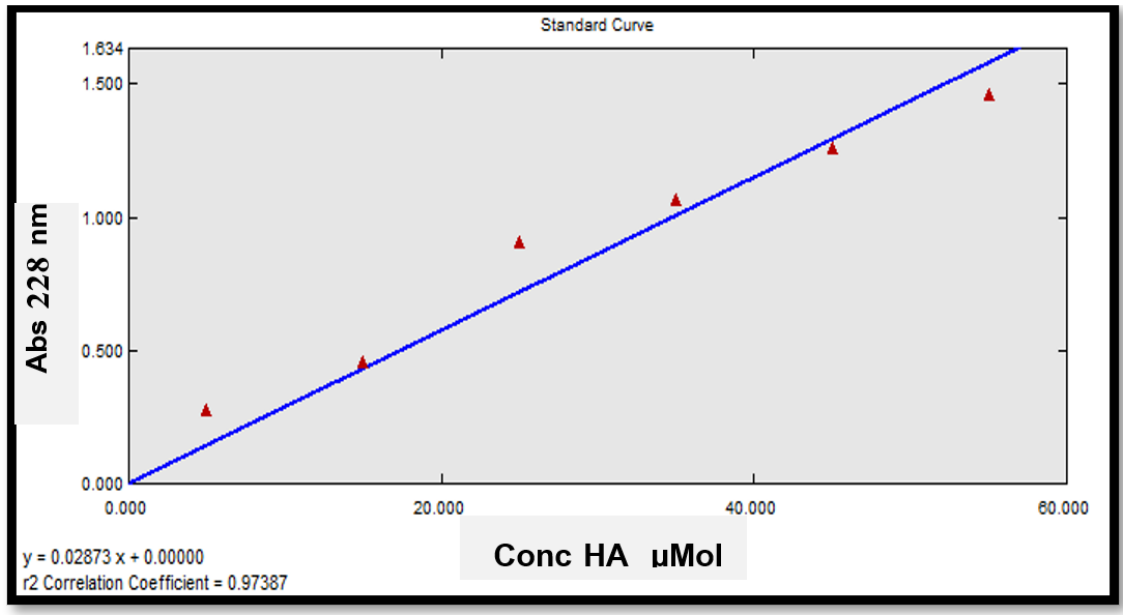
إتُّبِعَتْ الطريقة التي أجراها (Adamson و Reynolds 1996) مع تطبيق التحويرات التي أجراها (Lee واخرون 2005) في كمية المادة الأساس وعدد الوحدات الإنزيمية المُحَلِّلة للبروتين بما يتلائم مع كميات البروتين المستحصل عليها من خطوات التنقية إذ حُضِّرَ محلول من β-CN بنسبة 100:1 (و/ ح) بإذابة 0.1 غم بروتين في 10 مل ماء مقطر وعُدِّلَ الرقم الهيدروجيني الى 2 باستعمال حامض الهيدروكلوريك 0.5 مولاري عند استعمال الببسين والرقم الهيدروجيني الى 8 باستعمال هيدروكسيد الصوديوم 0.5 مولاري عند استعمال التربسين ورقم هيدروجيني 2 أولاً و8 ثانياً عند استعمال الإنزيمين معا بطريقة تآزرية ووِضِعَ المحلول في حمام مائي بدرجة 37م° وأُضيفَ إنزيم الببسين الى خليط التفاعل بنسبة 18 وحدة/ 100 ملغم وأُضيفَ إنزيم التربسين الى خليط التفاعل بنسبة 20 وحدة/ 20 ملغم مع الإستمرار مع الإستمرار بتثبيت الرقم الهيدروجيني بعدها أخذت العينات المهضومة بأوقات زمنية (1 و2 و3 و4 و5 و6 و7 و8) ساعة أما عند إستعمال الإنزيمين بطريقة تآزرية فقد استعملت بنفس القوة الإنزيمية للإنزيمين السابقين عند رقم هيدروجيني 2 واستمر التفاعل لمدة 4 ساعات ثم أضيف إنزيم التربسين الى خليط التفاعل ولكن بعد تعديل الرقم الهيدروجيني الى 8 ولمدة 4 ساعات أُخرى أيضاً وأوقف عمل الإنزيمات بتعريض النموذج إلى درجة حرارة الغليان لمدة 5 دقائق وأُجْرِيت عملية النبذ المركزي على 12000×g لمدة 15 دقيقة وجمع الراشح وجُفِّفَ بالتجفيد وحفظ في درجة حرارة −18 م° لحين الإستعمال.

تقدير درجة التحلُّلْ البروتيني DH

قُدِّرِت درجة التحلُّلْ لكميات بيتا كازين وفقا لما ذكره (Liu و Chiang 2008) مع بعض التحوير في زيادة تراكيز الحامض ليوسين القياسي وحسب المنحنى القياسي (شكل 2) إذ نُقِلَ حجم 0.250 مل من النماذج قيد الدراسة لكل الفترات الزمنية قبل تجفيدها الى أنبوبة زجاجية وأُخْضِعَت إلى خطوات عمل تحضير المُنحَنى القياسي ووفق التوقيتات السابقة المُشار إليها، كما أُجريَت عملية تحلُّلْ كامل لبيتا–كازين باستعمال حامض الهيدروكلوريك 6 مولاري/ 24 ساعة، وحُسِبَت مجاميع NH_3 الطرفية (تركيز الببتيدات المتحررة) بالإستناد الى المنحنى القياسي للحامض الأميني الليوسين وقُدِّرَت درجة التحلُّلْ بإدخال المعادلة أدناه الى برنامج UV- PROBE 2.1 والمُشار اليها من قبل (Jamdar واخرون 2010):

$$DH = [(L_t-L_0)/ (L_{MAX}-L_0)] \times 100$$

اذ ان:



شكل (3) مُنحنى قياسي يوضح العلاقة بين تراكيز مختلفة من حامض الهيبيوريك القياسي والإمتصاصية مُقَدَّرة على طول موجي 228 نانوميتر

L_t = المجاميع الأمينية الحُرَّة في الوقت (0–8) ساعة

L_0 = كمية الأحماض الأمينية الموجودة في عينة البروتين الأصلية بدون أي معاملة.

L_{MAX} = كمية الأحماض الأمينية الكُلِّيَّة في العينة غير المُتَحَلِّلة بالإنزيمات والتي أَمكن الحصول عليها بعد التحلُّلْ الحامضي باستعمال حامض الهيدروكلوريك 6 مولاري على درجة حرارة 120 م° مدة 24 ساعة.

تقدير فعالية متحلُّلات بيتا–كازين في تثبيط ACE_1

قُدِّرت فعالية متحلُّلات بيتا–كازين عند كل درجة تحلُّلْ في تثبيط ACE بالطريقة الطيفية والتي أساسها تحويل الببتيد هيبيوريل–هستدين–ليوسين– N (Hippuryl-his-leu Hydrate) (HHL) الى حامض الهيبيوريك (Hippuric Acid) (AH) (Benzoylaminoacetic Acid) بفعل ACE_1 وحسب ما أشار اليه Cushman و Cheung (1971) والمُحَوَّرة من قِبَل Chen واخرون (2018) Lee واخرون (2005) واستعمل المنحنى القياسي لحامض الهيبيوريك شكل (3) لتقدير فعالية ACE_1.

حُضِنَ حجم 100 مايكروليتر من عينات متحلُّلات بروتين بيتا–كازين ولثلاث فترات (بداية ووسط ونهاية) عملية التحلل للمعاملات الثلاثة الببسين والتربسن وخليطهما 1:1 مع 200 مايكروليتر من محلول المادة الأساس Substrate (HHL) في درجة حرارة 37 م° لمدة 5 دقائق باستعمال حمام مائي، أُضيفَ الى هذا الخليط 20 مايكروليتر من محلول 0.2 ACE_1 وحدة/مل المُحَضَّر مُسبقاً واستمرَّت عملية الحضن في نفس درجة الحرارة لمدة 30 دقيقة أُخْرى وأُوقِفَ التفاعُل الإنزيمي باستعمال 0.25 مل من حامض الهيدروكلوريك 1 مولاري، إنَّ كمية حامض الهيبيوريك الناتج من التفاعُل إسْتُخْلِصَ من الخليط بإضافة خلات الأثيل وعلى مرحلتين بواقع 3 مل في كل مرحلة بحيث كانت الإضافة الأُولى بعد فترة 5 دقيقة والثانية بعد 30 دقيقة وعلى درجة حرارة 100 م° باستعمال المبخِّر الدوّار وأُضيفَ الى المتبقي حجم 3 مل ماء مقطر. قدِّرَت الإمتصاصية لحامض الهيبيوريك عند طول موجي 228 نانوميتر بجهاز المطياف الضوئي بمقارنة كميات حامض HA المتحررة من HHL مع المنحنى

القياسي لحامض الهيبيوريك HA والتي قُرِأَت في نفس الجهاز.

كمية HA المتحررة بغياب المتحلُّلات البروتينية أيضاً أعْتُبِرَت كفعالية ACE_1 100% وأستُعمِلَت المعادلة $(A\text{-}B)/A_x100\%$ لحساب فعالية الإنزيمية كنسبة مئوية إذ أنَّ:

% للتثبيط= $((A\text{-}B)/A)100x$ اذ:

A= تركيز حامض الهيبيوريك= 234.036 مايكروليتر، بغياب أي عامل من عوامل تثبيط فعالية ACE (الفعالية 100%).

B= تركيز حامض الهيبيوريك بوجود مُثَبِّطات ACE_1 وهي الببتيدات قيد الدراسة.

بعد تثبيت ظروف تحلُّل بيتا–كازين من حيث نوع الإنزيم ووقت التحلُّلْ للمتحلُّلْ الذي أظهرَت سلاسله الببتيدية أعلى فعالية في تثبيط ACE_1، أُعيدت العملية بنفس الظروف لكميات البروتين المُستَحصل عليها من خطوات التنقية السابقة للحصول على أكبر كمية من المتحلُّلْات وأطْلِقَ عليه βH نسبة الى متحلُّلات ناتجة من بيتا–كازين.

النتائج والمناقشة

الكازين الحامضي

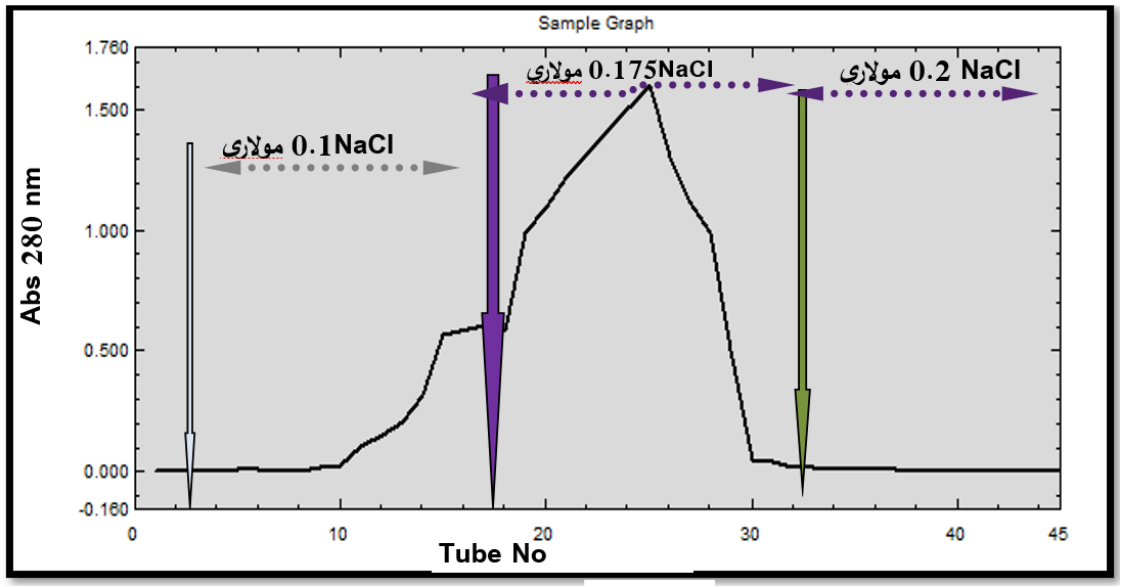
أظهرت النتائج إن كمية الكازين التي تم الحصول عليها بعد الترسيب الحامضي لكازين حليب الماعز العراقي بطريقة النبذ المركزي المُبَرَّد هي 2.6% وهي ضمن الحدود الطبيعية لنسبة الكازين في حليب الماعز وأن نسبة البروتين في الحليب هي 3.5% وهي ضمن الحدود الدنيا لنسبة البروتين في حليب الماعز وهي متقاربة جداً مع ما وجده Yangilar (2013) الذي حدد نسبة البروتين كحد أدنى في حليب الماعز لعدد من السلالات وهي 3.4% ونسبة الكازين الكلي 2.4% علماً أن أعلى نسبة للبروتين في حليب الماعز الإسباني هي 4.6% حددها Park واخرون (2007) وأشار إلى أَنَّها تعود للإختلافات الجينية مابين الأنواع فَضلاً عن عوامل أُخَرى كالتغذية وعدد الولادات وغيرها من العوامل التي تؤدي إلى تغييرات في نِسَبْ البروتين الكلي.

التنقية الأولية لبيتا–كازين

أظْهَرت النتائج الكمية للفصل الأولي β-CN من كازين حليب الماعز الكُلي الحامضي إلى أنَّ مُحَصَّلة التنقية الأولية هي 22 غم β-CN من أصل 40 غم كازين وهي تُمَثِّل نسبة 55% وهذه النسبة متوافقة من نسبة β-CN التي حصل عليها كل من (Aschaffenburg، 1963) و(Bramanti واخرون 2003) وهي 56% و58.5% على التوالي وأقل من النسبة التي حصل عليها (السعدي،2001) البالغة 68% ولكن جميع تلك النتائج تؤكد أنَّ β-CN هو الجزء الرئيس من كازينات حليب الماعز مع احتمال ان يكون هنالك نوع من التداخل مع الكازينات الأخرى وخاصة k-CN. ان النسبة β/as بلغت 0.42 وهي متوافقة مع النسبة 0.41 التي حددها كلاً من (Božanić واخرون a2002) ونسبة 0.412 التي حددها (Bramanti واخرون 2003).

تنقية بيتا–كازين النهائية بطريقة المبادل الأيوني السالب

أُمُرِّرَ β-CN على عمود DEAD-cellulose ولكون هذا البروتين يمتلك صافي شحنة سالبة أضعف من αS-CN وأقوى من K-CN فقد استعملت تراكيز ملحية مختلفة من NaCl لغرض تنقيته من البروتينات المُرافقة له ويوضح شكل (4) ظهور أول منحنى لاسترداد البروتين ضمن منطقة إضافة محلول كلوريد الصوديوم 0.1 مولاري في منطقة K-CN في الأنابيب (9–18) فهو يمثل انفصال هذا البروتين عن β-CN إذ أن 0.1 مولاري من محلول كلوريد الصوديوم يُعَد هو التركيز المناسب لاسترداد K-CN.



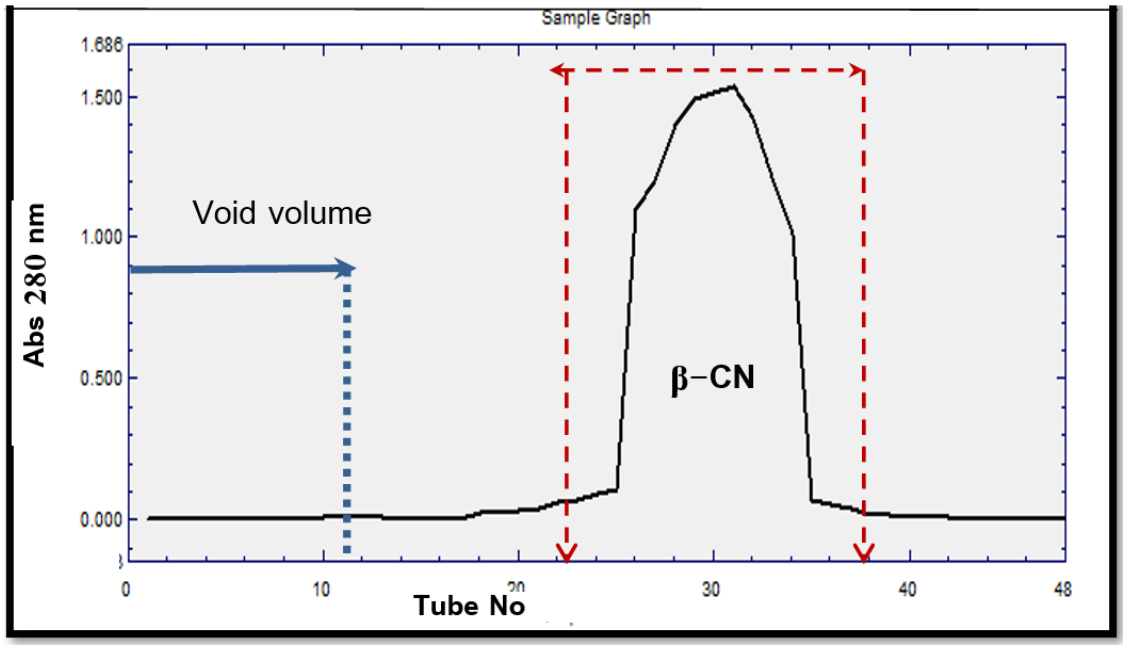
شكل (4) تنقية β−CN حليب الماعز على عمود التبادل الأيوني السالب DAEA−celluose بأبعاد 50×2 سم.

إن هذا التداخل الموجود بالرغم من إجراء عملية التنقية الأولية التي أُجريت سابقاً كان قد أشار اليه (السعدي، 2001) إذ أوضح إنه يُعزى إلى التقارب الكبير بين بروتين K-CN وβ-CN ضمن جزيئة الكازين إضافة إلى وجود الأواصر ثنائية الكبريت غير المتحلِّلة وهذه النتيجة تتوافق أيضاً مع النتائج التي حصل عليها (Davies و Law 1977). كما يوضح شكل (4) أن استرداد بيتا كازين في القمة الرئيسية في الأنابيب (33−18) وبعد استعمال تركيز 0.175 مولاري NaCl. إن كمية بروتين β-CN الكُلِّيَّة المُستَرَدة جُفِّفَت بطريقة التجفيد باستخدام Freeze Drier لغرض الاستمرار بتنقيتها إذ بلغ وزنها 859.511 ملغم من وزن 1 غم فيما بلغ تركيز البروتين 11.547 ملغم/ مل وهذا يُظهِر أهمية عملية الفصل الأولي باليوريا وNaCl في الحصول على كميات كبيرة من بروتين بيتا كازين β-CN وعدم وجود تداخلات كبيرة بين αS-CN وβ-CN. من المهم أيضاً الإشارة إلى أنَّه لم تظهر أي قمة في منطقة الغسل وبدأ ظهور القمم في منطقة الاسترداد بعد إضافة التركيز الأول من محلول ملح كلوريد الصوديوم مما يدل على عدم وجود أي بروتينات ذات صافي شحنة موجبة أذ لو كانت موجودة لظهرت في منطقة الغسل نتيجة لتنافرها مع شحنة العمود وبالتالي عدم ارتباطها.

التنقية النهائية لبروتين β-CN بطريقة الترشيح الهلامي وباستعمال السيفادكس G-75

أُجريت عملية تنقية نهائية بطريقة الترشيح الهلامي لكميات β-CN المُستَرَدَّة من عمود التبادل الأيوني وذلك لإزالة جميع الملوثات من البروتينات التي قد تكون مرافقة له وخاصةً بروتين K-CN إذْ أشار (Aschaffenburg، 1963) الى تلوث β-CN بكميات من K-CN بعد اجراء عملية فصل اولي بمحلول اليوريا ومحلول كلوريد الصوديوم إذ أشار (Andrews، 1965) إلى أن فصلا جيداً يوفره عمود السيفادكس G-75 وG-100 للمواد البيولوجية التي وزنها الجزيئي بين 12−80 ك د.

يظهر الشكل (5) ظهور قمة رئيسة واحدة فقط في الأنابيب رقم (35−22) وهي تُمثل β-CN النقي الذي جُمِعت كمياته ورُكِّزَت وجُفِّفت بطريقة التجفيد.

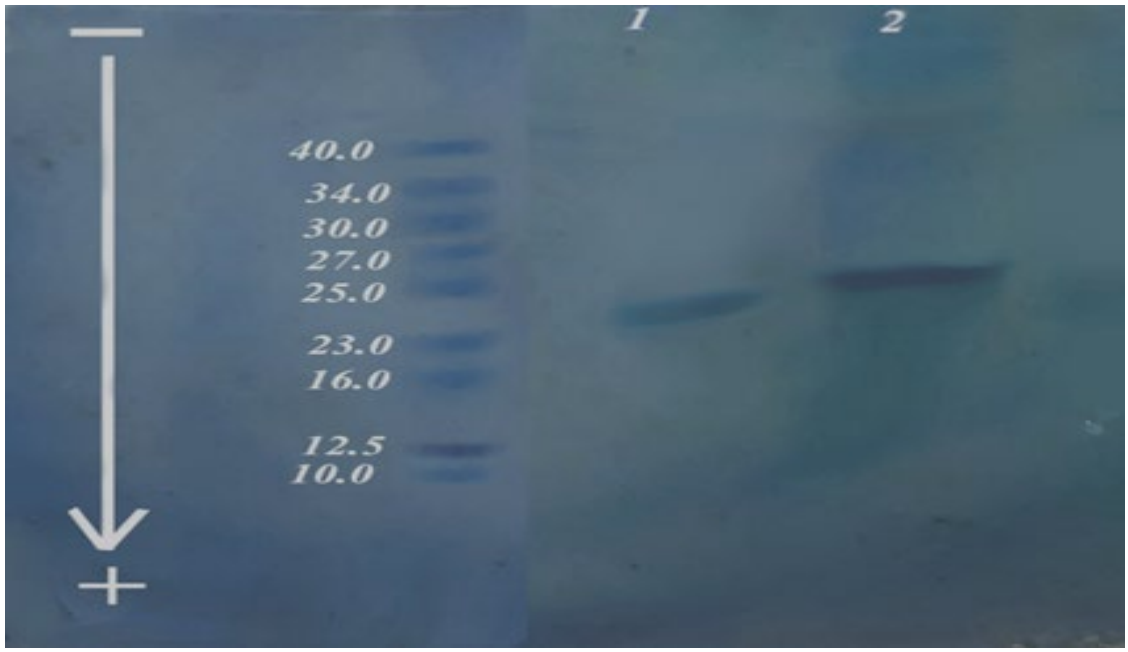


شكل (5) تنقية β–CN حليب الماعز النهائية باستخدام عمود سيفادكس G–75 عمود بأبعاد 90 × 1.5 سم

إذ بلغ معدل الكمية 402.135 ملغم من 0.5 غم بروتين أستخدم في عملية التنقية وتركيز البروتين بلغ 9.574 ملغم/ مل. ان ظهور قمة رئيسة واحدة يدُل على كفاءة عملية التنقية في التخلص من كل الآثار المُتَبَقية من البروتينات الأخرى وأن الكميات التي جُمِعَت من عملية التنقية السابقة بالمُبادِل الأيوني السالب أحتوت على β-CN بشكل نقي ولكن عملية الترشيح الهلامي أسهَمت في الحصول على البروتين بدرجة نقاوة عالية وهذا يتفق مع النتائج التي حصل عليها (Salem واخرون 2009) عند مقارنته لأجزاء كازينات حليب الماعز ومقارنته مع حليب الأبقار والأنسان وتتفق هذه النتائج مع (السعدي، 2001) إذْ حصل على β-CN حليب الماعز بصوره نقية عند إستعماله تقنية الترشيح الهلامي. يُستَنْتَج مما تقدم إنَّه من الممكن الحصول على β-CN نقي بأستعمال طريقتي التبادل الأيوني ثم الترشيح الهلامي إذْ أَنَّ إجراء التنقية بتقنية واحدة فقط غير كافية للحصول على بروتين عالي النقاوة وبكميات كبيرة النقاوة وهذا ما أشارت اليه (دوش، 2007) عندما حصلت على بروتييزات بنقاوة عالية باستعمال تقنيتي التبادل الأيوني ثم الترشيح الهلامي.

تأكيد نقاوة β-CN بطريقة الهجرة الكهربائية وتحديد وزنه الجزيئي

أُجرِيَت عملية الترحيل الكهربائي على هلام متعدد الأكريلامايد بوجود المادة الماسخة SDS والتي تُعَد من أسهل طرائق تأكيد نقاوة البروتينات المعزولة بطرائق الكروماتوكرافي المُختلفة إذ يُوَضِّح الشكل (6) ظهور حُزَمة β-CN المُنَقى بصورة نهائية بشكل منفرد مما يُؤكّد خلوه من التداخل مع أجزاء الكازين إذ قطعَ مسافة مساوية تقريباً للمسافة التي قطعها البروتين القياسي كما لم تَظْهَر أي حُزم مُرافقة للبروتين المُنَقى كما يوضح ان β-CN ظَهَر بحُزمة واحدة أيضاً مع وجود فارق بسيط في المسافة التي قطَعَها بالمقارنة مع CN الأبقار القياسي إذ تحرّك لمسافة أطول قليلاً وهذا يعني أنَّ وزنه الجزيئي أقل نسبياً من القياسي الذي يعود لحليب الأبقار مع أنه كمياً يشكل الجزء الأكبر من كازينات حليب الماعز.

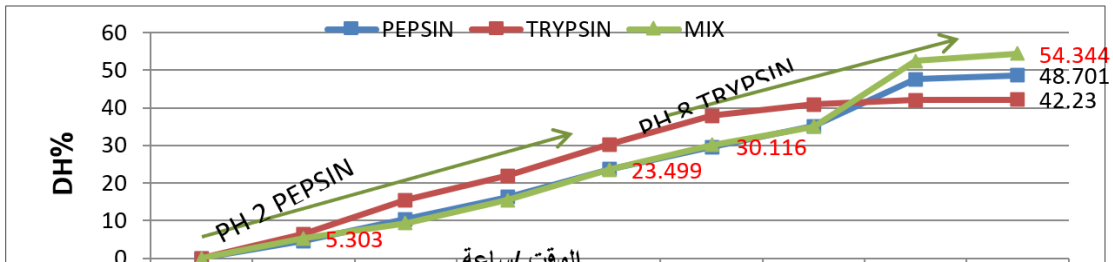


شكل (6) ترحيل β-CN المُنقى مع البروتين القياسي وladder القياسي بمدى 10-40KD في β-CN 12.5% SDS-PAG حليب الماعز المُنَقَّى (2) β-CN القياسي

قُدِّرَ الوزن الجزيئي للبروتين النقي إعتماداً على المسافة التي قطعها البروتين بالمقارنة مع المسافة التي قطعتها البروتينات القياسية من جهة وبالمقارنة مع الوزن الجزيئي للبروتين المقابل لها في Ladder من جهة إخرى وذلك باستعمال برنامج تحليل المسافة في الصور Photocapt الذي يُحَدِّد الوزن الجزيئي لحُزم البروتين وDNA بدقة أكبر من القياس بالمسطرة إذْ بلغ وزن β-CN الجزيئي KD 24.2 وهذا الوزن الجزيئي يتوافق مع ما وجده (Raak واخرون 2018) عند ترحيل الكازينات بطريقة SDS-PAGE فوجدها أقل KD 26.8 إذ كانت الوزن الجزيئي مُقارب جداً لهذه النتائج مما يؤكد نقاوة الروتين. إنَّ وجود الأختلافات في الأوزان الجزيئية لأجزاء الكازينات في حليب حيوانات مُختلفة الأنواع يعود الى عوامل جينية بالدرجة الأساس ولوجود بعض الأرتباطات بأواصر ثنائية الكبريت بين تلك الأجزاء لم تتأثر بالعوامل المُخْتَزِلة بدرجة كافية مما يُظهِرها بأوزان جزيئية أكبر فَضلاً عن درجة الفسفرة لأنواع الكازينات وكذلك تأثير تركيز هلام الفصل الذي يمكن أن يكون 16.5% وهو الذي إستعمله (Salem واخرون 2009) وتركيز 12.5 % في الدراسة التي أجراها (العاني، 2013).

درجة تحلُّلْ بيتا كازين بفعل إنزيمات الببسين والتربسين وخليطهما

قُدّرَت درجة تحلُّلْ β- CN بتأثير إنزيم الببسين وتربسين وخليطهما بنسبة 1:1 ولمدة 8 ساعات إذ أُخِذَت القراءات كل ساعة وقورنت القراءات مع منحنى قياسي للحامض الأميني ليوسين المُتَّحد مع المُركَّب (Trinitrobenzensulphoric Acid) (TNBS) أِذ يَتَّحِد هذا المُرَكَّب مع مجموعة الأمين الطرفية الحُرَّة للأحماض الأمينية المُرتَبِطة بذرة الكربون ألفا ليَنْتُج لون أصفر باهت جداً يُقرَأ على طول مَوجي 340 نانوميتر وإنَّ شدة اللون تتناسب طردياً مع تركيز الببتديات المُتَحّررة في المحلول. يتضح من النتائج المعروضة في شكل (7) إن درجة التحلل DH تزداد بتقدم وقت الحضن لنَوعَي الإنزيمات وخليطَهما بنسبة 1:1



	0	1	2	3	4	5	6	7	8
PEPSIN	0.099	4.622	10.509	16.201	23.694	29.629	35.078	47.728	48.701
TRYPSIN	0.099	6.422	15.569	21.942	30.213	37.9	41.014	42.133	42.23
MIX	0.099	5.303	9.292	15.423	23.499	30.116	34.932	52.593	54.344

شكل (7) النسبة المئوية لتحلُّلْ β-Casein بفعل الببسين والتربسين وخليطهما بنسبة 1:1 أثناء الحضن على حرارة 37 م° ولمدة 8 ساعات

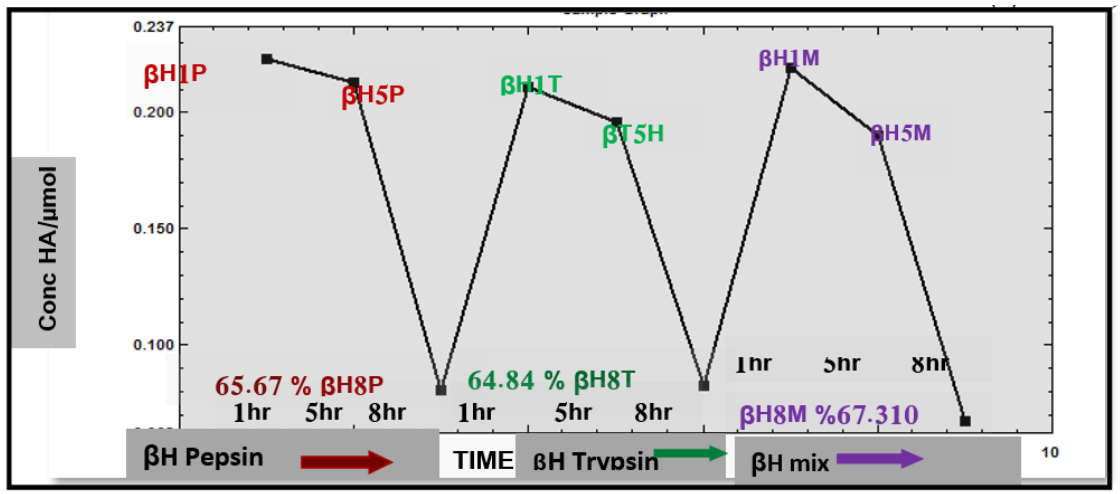
ويَظهر هذا واضحاً من خلال الإرتفاع في الأمتصاصية على طول موجي 340 نانوميتر بتقدُّم وقت الحضن مما يعني تحرراً مُتزايداً للببتيدات peptides ومتعدد الببتيد poly peptides بسبب الفعل التحلُّلي المُتَخصص بالإنزيمات المذكورة ويُوضِّح الشكل أيضاً تشابه الأطار العام لسلوك المعاملات الثلاثة في كونها بلَغت أعلى نسب تحلُّلْ لها بعد مرور 8 ساعات من الحضن لكن بنسب تحلُّلْ مختلفة هي 48.701 و42.23 و54.344% للبسين والتربسين وخليطهما على التوالي، الّا أنَّ قيمة درجة التحلل بفعل إنزيم الببسين بلغت 48.701% وهذه النتيجة متوافقة مع النتيجة التي توصل إليها Lee واخرون (2005) البالغة 48% في كازين حليب الماعز وهذا يدل على ارتفاع كفاءة تحلل بيتا كازين بفعل إنزيم الببسين وهذ يعود الى توفر المادة الأساس من أحماض أمينية حلقية ومُلائمة التركيب الفراغي لهذه البروتينات لتحفيز المواقع الفعالة في الببسين. أما بالنسبة إلى قِيَم DH لبروتين β -CN بفعل إنزيم التربسين كانت 42.23% بعد مرور 8 ساعات وهي منخفضة نسبيا وهذا يعود بالدرجة الأساسية لأختلاف الهيئة التركيبية الخاصة لكل بروتين ومحتواه من الأحماض الأمينية المناسبة ومدى توافر الأحماض Arg و Lys التي يهاجمها التربسين مما يدل على أن التربسين له فعالية منخفضة باتجاه تحليل β -CN مقارنة بالببسين (Rodriguez واخرون 2007). تقاربت هذه النتيجة مع ما توصل إليه (Wang واخرون 2013) من أن قيمة DH بيتا كازين بفعل إنزيم التربسين هي 45.2% خلال 90 دقيقة وهذه الفروقات البسيطة تعود استعمال تراكيز إنزيمية أعلى كما أن نتيجة هذه الدراسة غير متوافقة مع قيمة DH التي حصل عليها (Lee واخرون 2005) البالغة 59.5% وهذا يعود إلى طول فترة الحضن التي أستعملها الباحث والبالغة 72 ساعة. أما فيما يتعلق بالفعل التآزري لتحليل β-CN بالببسين والتربسين فتُشير النتائج في شكل (7) إلى ارتفاع قيمة DH وهي 54.344% وهذا يدُل على كفاءة الفعل التآزري للإنزيمين في الحصول غلى درجة تحلل عالية وهذه النتائج متفقه مع نتائج (Sun واخرون 2014) إذ استعمل التربسين في التحلل بعد إنزيمات مختلفة محللة للبروتين لترتفع قيمة DH للكازين من 44.5 الى 72%. إن نسب التحلل المرتفعة لبروتينات كازين حليب الماعز المفصولة والمُنقاة بأوقات قصيرة يدل على ان الحصول على ببتيدات بأوزان جزيئية منخفضة يمكن الحصول عليه عند استعمال كازينات نقية منفصلة عن بعضها أفضل وأسرع مما هو عليه في الكازين الكامل أو أي بروتين آخر وأن التباينات

في درجة تحلُّلْ كازين حليب الماعز وغيرها من الكازينات والبروتينات يعود الى الهيئة الفراغية الخاصة بكل بروتين ومكوناته من الأحماض الأمينية وتسلسلها فضلاً عن نوع الإنزيمات المُستعملة في التحليل وتركيزها وزيادة متحلُّلات بيتا كازين بفعل الببسين والتريسبن في حليب الماعز والأنسان مقارنة بكازينات نوعين من الأبقار والفرس يعود الى توافر بيتا كازين كمياً فيهِما (Jasińska، 1995).

فعالية مُتَحَلِّلات بيتا كازين (βH) في تثبيط ACE_I

قُدِّرَت فعالية تثبيط المُتَحللات الناتجه من بيتا كازين والتي أُصْطُلِحَ عليه βH ولثلاث فترات1، 5 و8 ساعة من عملية التحلل بالببسين والتريسين وخليطهما بنسبة 1:1 إعتماداً على تحرر HA ويوضح شكل (8) تأثير متحللات ثلاث فترات زمنية ناتجة من فعل إنزيم الببسين في β-CN الناتجة بعد مرور 1 و5 و8 ساعات من الحضن مع ACE_I والمشار إليها β H1P و β H5P و βH8P وكذلك ثلاث متحللات لنفس القراءات السابقة ولكن بفعل إنزيم التريسين والمُشار إليها βH1T و βH5T و βH8T ولخليطَهما المُشار لها βH1M و βH5M و βH8M على فعالية ACE_I إذ يُظْهِر شكل (8) تناسباً عكسياً بين تركيز HA والنسبة المئوية لتثبيط ACE_I ويُلاحَظ من جدول (1) إن أعلى درجات التثبيط هي للمتحللات الناتجة بعد مرور 8 ساعة إذ بلغت 65.665 و064.84 و67.310% وبتركيز HA هو 0.08 و0.082 و0.076 مايكرومولار للمتحللات βH8P و βH8T و βH8M على التوالي ويلاحَظ أيضاً أرتفاع الفعالية التثبيطية بعد مرور 5 ساعة من 4.783 الى 8.896% بالببسين ومن 7.719 الى 0016.3% بالتريسين ومن 6.428 الى 018.77% بخليطَهما مُقارنة بارتفاعه الى 65.665 و064.84 و067.31% بعد مرور 8 ساعة على التوالي وبتناسب طرديا مع DH. فيما يتعلق بالتحلل بالببسين والتريسين فالنتائج تُعَد مؤشراً على أن الزيادة في درجة التحلل مهمة جداً لرفع الفعالية التثبيطية وهذا ناتج لظهور سلاسل ببتيدية جديدة بأوزان جزيئية منخفِضة ذات فعالية تثبيطية عالية نتيجة استمرار عملية التحلل. أما فيما يتعلق بتأثير المُتحللات الناتجة عن الفعل التآزري لإنزيم الببسين والتريسين معاً فإن النتائج تُشير الى أهمية استعمال خليط من الإنزيمَين في عملية التحلل للحصول على أعلى نسبة لتثبيط ACE_I حيث سجلت المُعامَلة βH8M أعلى فعالية تثبيطية بين المعاملات حيث بلغت 67.310% وبتركيز ببتيدات 46.104 مليمولار وتركيز حامض HA 0.076 مايكرومولار. جاءت هذه النتائج مُقاربة إلى ما ذكره (Lee واخرون 2005) من إنَّ أعلى نسبة تثبيط ACE_I بلغت 67.6% عند تحليله كازين الماعز بالتريسين وهي أقل مما وجده (Chobert واخرون 2005) في تحليله لبروتين بيتا لاكتوكلوبيولين بالتريسين وهو 85 % وأعلى مما وجده (Otte واخرون 2007) في مُتَحللات بيتا كازين بالتريسين بعد مرور 3 ساعات ونسبة تثبيط 58%.

بشكل عام فإن متحللات β -CN أظهَرَت كفاءة عالية في تثبيط فعالية ACE_I مقدارها (67.31%) وقيمة DH هي (54.344%) باستعمال خليط الإنزيمَين وبنفس وقت التحلل مما يدُل على أنَّ نوعية الببتيدات المُتَحررة هي عامل مؤثِّر في كفاءة تثبيط ACE_I وهذا يتفق مع استنتاج (Ferreira واخرون 2007) الذي أثبت أن متحللات الشرش بفعل إنزيم التريسين عند استعماله مع انزيمات اخرى تمتلك فعالية أقوى من متحللات الشرش بأنزيمات منفردة لانتاج ببتيدات ذات فعالية في تثبيط ACE_I ولكن (Munn، 2013) إعْتَبَرَ أنَّ عامِلَين هما قيمة DH ونوع الببتيدات في المُتحلِّل الكازيني يُساهِمان معاً في ظهور فعالية عالية في تثبيط ACE_I مع التأكيد على أهمية الفعل التآزري في تحرر لببتيدات فعالة حيوياً ومُنخفِضة الوزن الجزيئي.



شكل (8) دراسة تأثير مُتَحللات بيتا كازين(Hβ) الناتجة بفعل إنزيم الببسين والتربسين وخليطَهُما بنسبة 1:1 في تثبيط فعالية (ACE_I)

جدول (1) علاقة نسبة DH وقيم تراكيز متحللات β-CN مع تركيز HA وفعالية تثبيط ACE_I

متحللات α^{s2}-CN	βH1p	βH5p	βH8p	βH1T	βH5T	βh8T	βH1M	βH5M	*βh8M
الفعالية التثبيطية %	4.783	8.896	65.665	7.719	16.300	64.84	6.428	18.770	67.310*
تركيز حامض الهيبيوريك HA µmol	0.223	0.213	0.080	0.211	0.196	0.082	0.219	0.190	0.076
درجة تحلل البروتين %	4.600	29.629	48.701	6.400	30.230	42.23	5.303	30.116	54.344
تركيز الببتيدات mmol مجموعة NH3 الطرفية	4.012	20.157	41.326	5.535	25.625	35.848	0.588	25.593	46.104

الإستنتاجات والتوصيات

بيتا كازين حليب الماعز المحلي يمكن تنقيته بطرائق الكروماتوكرافي ووزنه الجزيئي بحدود 24.2 ك د وان متحللاته الببسينية والتربسينية تمتلك كفاءة في خفض فعالية الإنزيم المُحَوِّل للإنجيوتنسين1 خارج الجسم الحي مع تأثير ملحوظ لزيادة درجة التحلل البروتيني على رفع الكفاءة التثبيطية. من الممكن الحصول على سلاسل ببتيدية منخفضة الوزن الجزيئي من تحلل أجزاء كازين الماعز α s و CN-K كما ان عمليات التنقية للمتحللات تعمل على زيادة الفعالية التثبيطية وخاصة عند الحصول على ببتيدات منفردة وليس ضمن أجزاء متحللات وتمتلك وزناً جزيئياً منخفضاً وعندئذ من الممكن اجراء تجارب داخل الجسم الحي لبيان تأثير تلك الببتيدات في ACE_I وخفض ضغط الدم الانبساطي والانقباضي فضلاً عن استخدام إنزيمات أخرى محللة للبروتين غير الببسين والتربسين

يمكن أن تحرر ببتيدات متنوعة لها تأثير تثبيطي كما يمكن اجراء نفس الدراسة ولكن باستعمال الكازين الكامل او تخمر حليب الماعز الكامل باستعمال بكتريا التخمر اللاكتيكي للحصول على منتجات ذات خاصية علاجية.

المصادر

دوش، كفاح سعيد عباس (2007) أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة/ جامعة بغداد. تنقية وتوصيف بعض بروتييزات خلايا الدم البيضاء المُتَعددة الأشكال النووية المعزولة من حليب الأبقار المُصابة بالتهاب الضِّرع ودراسة دورها في إنضاج جبن الشدر.

السعدي، جاسم محمد صالح (2001) رسالة ماجستير. كلية الزراعة/ جامعة بغداد. دراسة بروتينات حليب الماعز والبقر وعلاقتهما بفرط الحساسية.

العاني، محمد قيس (2013) عزل وتنقية بروتين الكازائين من حليب الإبل العراقية Camels dromedaries وتقييم فعاليته ضد انواع من الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي. المجلة العراقية للسرطان والوراثة الطبية، مجلد6 عدد (1)، (100-93).

Adamson, N. J., and Reynolds, E. C. (1996). Characterization of Casein Phosphopeptides Prepared Using Alcalase: Determination of Enzyme Specificity. Enzyme and Microbial Technology, 19(3), 202-207.

Andrews, P. (1965). The Gel-filtration Behaviour of Proteins Related to Their Molecular Weights Over a Wide Range. Biochemical Journal, 96(3), 595-606.

Aschaffenburg, R. (1963). Preparation of β-casein by a Modified Urea Fractionation Method. Journal of Dairy Research, 30(2), 259-260.

Božanić, R.; Tratnik, L., and Drgalić, I. (2002a). Goat's Milk: Characteristics and Possibility. Mljekarstvo: Časopis Za Unaprjeđenje Proizvodnje I Prerade Mlijeka, 52(3), 207-237.

Bramanti, E.; Sortino, C.; Onor, M.; Beni, F., and Raspi, G. (2003). Separation and Determination of Denatured αs1-, αs2-, β-and K-caseins by Hydrophobic Interaction Chromatography in Cows', Ewes' and Goats' Milk, Milk Mixtures and Cheeses. Journal of Chromatography A, 994(1-2), 59-74.

Cheison, S. C.; Zhang, S. B.; Wang, Z., and Xu, S. Y. (2009). Comparison of a Modified Spectrophotometric and the Ph-stat Methods for Determination of The Degree of Hydrolysis of Whey Proteins Hydrolysed in a Ttangential-flow Filter Membrane Reactor. Food Research International, 42(1), 91-97.

Chen, Li; Qiuhong Zhang; Zhe Ji; Guowei Shu, and He Chen. (2018). Production and Fermentation Characteristics of Angiotensin-I-converting Enzyme Inhibitory Peptides of Goat Milk Fermented by a Novel Wild Lactobacillus Plantarum 69." LWT 91: 532-540.

Chobert, J. M.; El-Zahar, K.; Sitohy, M.; Dalgalarrondo, M.; Métro, F.; Choiset, Y., and Haertlé, T. (2005). Angiotensin I-converting-enzyme (ACE)-inhibitory Activity of Tryptic Peptides of Ovine beta -lactoglobulin and of Milk Yoghurts Obtained by Using Different Starters. Le Lait, 85(3), 141-152.

Cushman, D. W., and Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric Assay and Properties of the Angiotensin-converting Enzyme of Rabbit Lung. Biochemical Pharmacology, 20(7), 1637-1648.

Davies, D. T. and Law, A. J. R. (1977). An Improved Method for the Quantitative Fractionation of Casein Mixtures Using Ion-exchange

Chromatography. Journal of Dairy Research, 44(2), 213-221.

Ferreira, I. M. P. L. V. O.; Pinho, O.; Mota, M. V.; Tavares, P.; Pereira, A.; Goncalves, M. P. and Teixeira, J. A. (2007). Preparation of Ingredients Containing an ACE-inhibitory Peptide by Tryptic Hydrolysis of Whey Protein Concentrates. International Dairy Journal, 17(5), 481-487.

Greyling, N. (2017). Optimisation of Enzymatic Hydrolysis of Monkfish Heads for Preparing Protein Hydrolysates as Animal Feed Ingredient (Doctoral Dissertation, Stellenbosch: Stellenbosch University)

Jamdar, S. N.; Rajalakshmi, V.; Pednekar, M. D.; Juan, F.; Yardi, V., and Sharma, A. (2010). Influence of Degree of Hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE Inhibitory Activity of Peanut Protein Hydrolysate. Food Chemistry, 121(1), 178-184.

Jasińska, B. (1995). The Comparison of Pepsin and Trypsin Action on Goat, Cow, Mare and Human Caseins. Roczniki Akademii Medycznej w. Bialymstoku (1995), 40(3), 486-493.

Korhonen, H. and Pihlanto, A., (2003). Food-derived Bioactive Peptides-opportunities for Designing Future Foods. Current Pharmaceutical Design, 9(16), 1297-1308.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, 227(5259), 680 -685.

Lee, K. J.; Kim, S. B.; Ryu, J. S., Shin; H. S., and Lim, J. W., (2005). Separation and Purification of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Goat's Milk Casein Hydrolysates. Asian-australasian Journal of Animal Sciences, 18(5), pp.741-746.

Li, J.; Liu, Z.; Zhao, Y.; Zhu, X.; Yu, R.; Dong, S., and Wu, H. (2018). Novel natural angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides derived from sea cucumber-modified hydrolysates by adding exogenous proline and a Study of their Structure–activity Relationship. Marine drugs, 16(8), 271.

Liu, B. L., and Chiang, P. S. (2008). Production of Hydrolysate with Antioxidative Activity and Functional Properties by Enzymatic Hydrolysis of Defatted Sesame (*Sesamum indicum* L.). International Journal of Applied Science and Engineering, 6(2), 73-83.

Maruyama, S.; Miyoshi, S., and Tanaka, H. (1989). Angiotensin I-converting Enzyme Inhibitors Derived from Ficus Carica. Agricultural and biological chemistry, 53(10), 2763-2767.

Maruyama, S.; Nakagomi, K.; Tomizuka, N., and Suzuki, H. (1985). Angiotensin 1-converting Enzyme Inhibitor Derived from an Enzymatic Hydrolysate of Casein. Ii. Isolation and Bradykinin-potentiating Activity on the Uterus and the Ileum of Rats. Agricultural and Biological Chemistry, 49(5), 1405-1409.

Munn, S. M. (2013). Dairy and Soy Derived Bioactive Peptide and the Renin-angiotensin-aldosterone System. A Thesis Submitted to the Faculty of the Graduate School of the University of Minnesota for the Degree of Master of Science.

Omara, T. (2018). Antibacterial Activity of Papain Hydrolysates of 2 Isoelectrically-Isolated Casein and Thermoprecipitated 3 Alpha-lactalbumin From Bovine and Caprine Milk on 4 Diarrheagenic Bacteria 5.

Otte, J.; Shalaby, S. M.; Zakora, M., and Nielsen, M. S. (2007). Fractionation and

Identification of ACE-inhibitory Peptides from α-lactalbumin and β-casein Produced by Thermolysin-catalysed Hydrolysis, International Dairy Journal, 17(12), 1460-1472.

Park, Y.W.; Juárez, M.; Ramos, M. and Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical Characteristics of Goat and Sheep Milk. Milk. Small Ruminant Research, 68(1-2), 88-113.

Quirós, A.; Hernández-ledesma, B.; Ramos, M.; Amigo, L. and Recio, I. (2005). Angiotensin-converting Enzyme Inhibitory Activity of Peptides Derived from Caprine Kefir. Journal of Dairy Science, 88(10), 3480-3487.

Raak, N.; Abbate, R.; Lederer, A.; Rohm, H., and Jaros, D. (2018). Size Separation Techniques for the Characterisation of Cross-linked Casein: A Review of Methods and Their Applications. Separations, 5(1), 14.

Rodriguez, J.; Gupta, N.; Smith, R. D., and Pevzner, P. A. (2007). Does trypsin cut before proline? Journal of Proteome Research, 7(01), 300-305.

Rutella, G. S.; Solieri, L.; Martini, S.; and Tagliazucchi, D. (2016). Release of the Antihypertensive Tripeptides Valine-proline-proline and Isoleucine-proline-Proline from Bovine Milk Caseins During In Vitro Gastrointestinal Digestion. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64(45), 8509-8515.

Salem, S.A.; Elagamy, E. I.; Salama, F. and Abosoliman, N. H. (2009). Isolation, Molecular and Biochemical Characterization of Goat Milk Casein and its Fractions. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 11(1), 29-35.

Schägger, H. (2006). Tricine–sds-page. Nature protocols, 1(1), 16.

Sica, D. A. (2005). Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors' Side Effects-physiologic and Non-physiologic Considerations. The Journal of Clinical Hypertension, 7, 17-23.

Sun, H.; Li, T. J., and Zhao, X. H. (2014). Ace Inhibition and Enzymatic Resistance In Vitro of a Casein Hydrolysate Subjected to Plastein Reaction in the Presence of Extrinsic Proline and Ethanol-or Methanol-water Fractionation. International journal of food properties, 17(2), 386-398.

Tsutsumi, R. and Tsutsumi, Y. M., (2014). Peptides and Proteins in Whey and Their Benefits for Human Health. Austin J Nutri Food Sci, 1(1), 1002.

Wang, J.; Su, Y.; Jia, F. and Jin, H., (2013). Characterization of Casein Hydrolysates Derived from Enzmetic Hydrolysis. Chemistry Central Journal, 7(1), 62.

Wei, T. M. and Whitney, R. M., (1985). Batch Fractionation of Bovine Caseins with Diethylaminoethyl Cellulose1, 2. Journal of Dairy Science, 68(7), 1630-1636.

Whitney, R. M. (1988). Proteins of Milk in Fundamentals of Dairy Chemistry pp.81-169. Springer, Boston, MA.

Yangilar, F., (2013). As a Potentially Functional Food: Goats Milk and Products. J. Food Nutr. Res, 1(4), 68-81.