مطالعه ویژگی‌ها و اثرات مهارکننده‌های آمیلازی موجود در بذر لوبیای قرمز *Phaseolus vulgaris*, L.

مسعود حیدری‌زاده[۱]*، فریبا حسن‌وند[۲]

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۳
تاریخ تصویب: ۹۳/۸/۳

چکیده

مهارکننده‌های آنزیمی ترکیباتی پروتئینی هستند که گیاهان در برابر آفت‌ها و عوامل بیماری‌زا تولید می‌کنند. این پروتئین‌ها غالباً در بذرها یافت شده و با بازدارندگی تغذیه‌ایی برای گیاه نقش دفاعی دارند. در این پژوهش پروتئین‌های بذر لوبیای قرمز واریته‌ی صیاد Phaseolus vulgaris, L. به منظور ارزیابی بازدارندگی آنها بر فعالیت آلفا آمیلاز قارچ Aspergillus oryzae, S. جداسازی، خالص سازی و ویژگی آنها مطالعه گردید. پروتئین‌های استخراج شده با درصدهای اشباع ٪(۳۰-۰)، ٪(۶۰-۳۰) و ٪(۱۰۰-۶۰) از نمک آمونیوم سولفات رسوب داده شدند. به منظور برداشته شدن آمونیوم سولفات دیالیز انجام شد. مهارکنندگی هر یک از نمونه‌های پروتئینی حاصله بر فعالیت آلفاآمیلاز

[۱] (استادیار) گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان(نویسنده مسئول)؛ m.haidarizadeh@uok.ac.ir
[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد سلولی مولکولی گروه علوم زیستی، دانشکده علوم ،دانشگاه کردستان

Aspergillus oryzae بر اساس روش استاندارد شده و با استفاده از معرف لوگل انجام شد. نتایج نشان داد تنها پروتئین‌های رسوب یافته در غلظت ٪(۶۰-۳۰) اشباع از آمونیوم سولفات دارای فعالیت مهارکنندگی در برابر آلفاآمیلاز مورد مطالعه هستند. مهارکنندگی این فرکشن ۸۹/۳۲ درصد محاسبه گردید. به منظور تعیین ویژگی‌های این مهارکننده‌ها آنالیز HPLC و SDS-PAGE انجام گردید. با سنجش اثر این مهارکننده‌ها بر روی آلفاآمیلاز بزاقی و پانکراسی شاید بتوان از این مهارکننده‌ها همچون مهارکننده‌های آلفاگلوکوزیدازی آکاربوز و میگلیتول برای درمان دیابت نوع دو غیر وابسته به انسولین استفاده کرد. در کشاورزی نیز می‌توان با ایجاد گیاهان تراریخته که مهارکننده‌های آمیلازی را بیان می‌کنند، گیاهان مقاوم به آفت تولید کرد.

واژه‌های کلیدی: آلفا آمیلاز قارچ آسپیرژیلوس اریزا، پروتئین‌های بذر، خالص‌سازی نسبی، لوبیای قرمز، مهارکننده‌های آلفاآمیلازی

مقدمه

گیاهان در برابر آفت‌ها و عوامل بیماری‌زا ترکیبات شیمیایی مختلفی با نقش دفاعی تولید می‌کنند. از این ترکیبات می‌توان به مهارکننده‌های آنزیمی اشاره نمود (Pelegrini. et al., 2005). مهارکننده‌های آمیلازی و پروتئینازی با مهار فعالیت آنزیم‌های گوارشی در آفت‌ها و علف‌خواران به‌صورت یک مکانیسم دفاعی برای گیاه عمل می‌کنند. مهارکننده‌های آلفاآمیلازی در فرایند شکسته شدن پیوند α(۱و۴) گلیکوزیدی در پلی ساکاریدهایی همچون نشاسته و تبدیل آنها به الیگوساکاریدها ایجاد اختلال می‌نمایند (Terashima and Katoh, 1996). بیشتر مهارکننده‌های آنزیمی، پروتئین‌هایی هستند که با آنزیمی ویژه تشکیل کمپلکس داده جایگاه فعال آنزیم و یا ساختار آنرا تغییر داده و در نهایت عملکرد کاتالیستی آنرا کاهش می‌دهند(Shamkhy. et al.,2011). مهارکننده‌ها غالبا در بذرها یافت‌شده و به عنوان بازدارنده تغذیه‌ایی نقش دفاعی برای گیاه دارند.

در بذر لوبیای معمولی سه ایزوفرم مهارکننده آلفا آمیلازی شناسایی شده‌اند که

آلفا آمیلازهای مختلف خوک، حشرات آفت نخود و حشرات آفت لوبیا را بصورت اختصاصی مهار می‌کنند (Kasahara et al., 1996). کلود و همکاران (۲۰۰٤) اثر مهارکننده‌های آلفا آمیلازی نوع یک خالص سازی شده از بذر لوبیا را بر فعالیت آلفا آمیلازی در گونه‌های مختلفی از حشرات، بی‌مهرگان و حدود ۳۰ گونه از قارچ‌ها مطالعه نمودند (Kluh et al., 2005). صابری و قدم یاری (۲۰۱۲) اثر مهارکننده‌های آلفا آمیلازی جداسازی‌شده از لوبیا و نخود را بر آلفا آمیلاز جداسازی شده از روده و همولنف حشره سرخرطومی حنایی خرما مطالعه کردند (Saberi et al., 2012).

دیلر و همکاران (۲۰۰۵) نیز از بذر لوبیای وحشی مهارکننده آلفا آمیلازی جدیدی با فعالیت کیتینازی جداسازی کردند (Dayler et al., 2005).

در انسان پنج ژن آلفاآمیلازی بر روی کروموزوم شماره یک، در موقعیت ۱q، واقع شده اند؛ که سه ژن در بزاق و دو ژن دیگر در پانکراس بیان می‌شوند (Shamkhy et al., 2011). به کارگیری مهارکننده‌های آمیلازی در رژیم غذایی کاهش وزن و رژیم غذایی بیماران دیابتی پیشنهاد گردیده است. مهارکننده‌های آمیلازی ممکن است در رژیم غذایی خردسالان و یا در بیماران دارای مشکلات گوارشی ایجاد اختلال نمایند. مصرف حبوبات به ویژه لوبیا به صورت خام یا نیمه پخته ممکن است به دلیل وجود این مهارکننده‌ها اختلالات گوارشی موقت به همراه داشته باشد. در دهه ۱۹۸۰ عصاره خام لوبیای معمولی به عنوان بازدارنده هضم نشاسته برای کنترل دیابت ملیتوس غیر وابسته به آنسولین و چاقی به کار رفته است. یک گروه تحقیقاتی در کلینیک مایو از لوبیای سفید پروتئینی را خالص سازی کرده و نشان دادند که این پروتئین فعالیت آمیلازی را در بزاق و در دو بخش ابتدایی روده کوچک در شرایط آزمایشگاهی متوقف می‌نماید. تزریق این پروتئین به داخل دوازده (دئودنوم) افراد داوطلب فعالیت آمیلازی مجرای گوارشی را به طور کامل متوقف کرد(Barrett et al., 2011).

در این پژوهش پروتئین‌های بذری واریته لوبیای قرمز به منظور ارزیابی بازدارندگی آنها بر فعالیت آلفا آمیلاز قارچ *Aspergillus oryzae* مطالعه گردید. هدف از این پژوهش جداسازی و تخلیص نسبی مهارکننده آلفا آمیلازی از بذر لوبیای قرمز واریته صیاد و تعیین ویژگی های این پروتئین بود . با توجه به اینکه لوبیای قرمز یکی از منابع غذایی و محصولات زراعی عمده است نتایج این پروژه می‌تواند در زمینه تغذیه، درمان و بیوتکنولوژی گیاهان زراعی اهداف کاربردی داشته باشد.

مواد و روش‌ها

بذر لوبیای قرمز *Phaseolus vulgaris* L. واریته‌ی صیاد محصول سال ۹۰ از مرکز تحقیقات کشاورزی سنندج تهیه گردید. فرایند استخراج پروتئین‌های مورد نظر پس از آسیاب کردن بذرها در بافر ۰/۱۵ مولار NaCl و ۰/۱ مولار HCl به نسبت ۱ به ۵ (وزن آرد به حجم بافر) در دمای چهار درجه‌ی سانتیگراد به مدت چهار ساعت بر روی هم‌زن[1] انجام گردید (Dayler et al., 2005).

بعد از استخراج فرایند جداسازی پروتئین‌های هدف با سانتریفوژ محلول در شتاب ۱۰۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه در دمای چهار درجه‌ی سانتیگراد توسط دستگاه میکروسانتریفوژ یخچال‌دار مدل VS_15000CFNII ساخت کشور کره انجام و مایع رویی[2] برای انجام مراحل خالص‌سازی جمع‌آوری شد (Franco et al., 2000).

به منظور رسوب‌دهی پروتئین‌های هدف جداسازی شده در مرحله قبل، سه محلول با درصدهای اشباع ۳۰-۰، ۶۰-۳۰ و ۱۰۰-۶۰ درصد از سولفات آمونیم تهیه و با استفاده ازمیکروسانتریفوژ یخچال‌دار در دمای چهار درجه‌ی سانتیگراد تنظیم و با سرعت RCF[3] ۴۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. در صورت وجود پروتئین در هر کدام از سه بازه فوق پروتئین رسوب خواهد کرد. سپس به منظور حذف نمک بر روی نمونه‌ها فرایند دیالیز انجام شد. ابتدا غشای دیالیزی بر اساس دستور العمل شرکت تولید کننده، فعال‌سازی و نمونه‌ها در داخل آن قرار داده شدند. پس از بستن غشای دیالیزی ، غشاء در محلول بافری با حجمی ۲۰۰-۱۰۰ برابر حجم نمونه قرار داده می‌شود. در این مطالعه از آب مقطر به عنوان بافر دیالیزی استفاده شد. در طی مدت زمان دیالیز سه بار بافر دیالیزی تعویض گردید. پس از پایان دیالیز، نمونه داخل کیسه دیالیزی با سمپلر به آرامی برداشته و در دمای چهار درجه‌ی سانتیگراد نگه‌داری گردید (Alzahrani et al., 2010).

پس از انجام دیالیز، نمونه ها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC شرکت کن آور و ستون Reprosi 100 C18 آنالیز گردیدند.

در مرحله بعد میزان مهار فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز قارچ آسپیرژیلوس اُریزا (Fluka) طبق روش استاندارد شده با استفاده از معرف لوگل انجام گردید. به هر کدام از هفت عدد لوله‌ی آزمایش ۰/۲ میلی‌لیتر نشاسته‌ی بافری اضافه شد. سپس به ترتیب حجم مناسبی از هر یک از مهارکننده‌ها به شش لوله‌ی اول و به لوله‌ی هفتم یک میلی‌لیتر آب مقطر به عنوان کنترل منفی اضافه شد. آن‌گاه

[1] Shaker
[2] supernatant
[3] Relative Centrifugal Force(RCF)

به مدت پنج دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد پیش انکوبه شدند . سپس ۰/۲ میلی لیتر از محلول آنزیمی تهیه شده به هر هفت لوله اضافه شد . سپس همه‌ی نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد انکوبه شدند. بعد از اتمام زمان انکوباسیون یک میلی‌لیتر لوگل به منظور متوقف کردن واکنش هیدرولیزی آلفاآمیلاز اضافه شد. دانسیته‌ی نوری هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۵٤۰ نانومتر به وسیله‌ی دستگاه اسپکتوفتومتر مدل اسپیکورد[1] سنجیده و با استفاده از معادله (۲-۱) درصد بازدارندگی محاسبه شد(Subramanian et al., 2008).

$$\text{درصد بازدارندگی } \% = \left(\left(OD_{\text{کنترل}} - OD_{\text{نمونه آزمایش}}\right) / OD_{\text{کنترل}}\right) \times 100 \quad (۲-۱)$$

میانگین سه تکرار به عنوان درصد بازدارندگی محاسبه شد.

در مرحله بعد با استفاده از الکتروفورز ژل سدیم دودسیل سولفات پلی اکریل آمید SDS-PAGE پروتئین‌های موجود در نمونه‌ها تعیین ویژگی گردیدند.

نتایج و بحث

در شکل ۱ کروماتوگرام پروتئین‌های استخراج شده از بذر لوبیا در سه کسر اشباع(A) کسر ۳۰-۰ درصد،(B) ٦۰-۳۰ درصد، (C) ۱۰۰-٦۰ درصد مشاهده می‌شود. در جدول ۱ مشخصات پیک‌های اصلی خارج شده از ستون HPLC نشان داده شده است. در شکل۲ پروفایل الکتروفورز پروتئین‌های خالص سازی شده با روش SDS-PAGE نشان داده شده است. در جدول ۲ نتایج سنجش اثر مهارکننده‌های آمیلازی خالص سازی شده از بذرهای لوبیا بر روی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز قارچ آسپیرژیلوس اُریزا آورده شده است. در شکل شماره ۲ مهار فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز قارچ آسپیرژیلوس اُریزا نشان داده شده است.

هدف اصلی از مطالعه‌ی حاضر خالص‌سازی نسبی مهارکننده‌های آلفاآمیلازی موجود در بذر لوبیای قرمز بود. در تحقیقات پیشین مهارکننده‌های آلفاآمیلازی دیگر واریته‌های لوبیای قرمز و گندم جداسازی و اثرات مهارکنندگی آن‌ها بر روی آلفا آمیلازهایی با منشأ بیولوژیکی مختلف بررسی شده است. با توجه به نبود برخی از تجهیزات لازم برای تکمیل فرآیند خالص‌سازی مهارکننده‌ها، پس از انجام مراحل عصاره‌گیری، رسوب دهی با آمونیوم سولفات و دیالیز، اثر نسبی بازدارندگی مهارکننده‌های به دست آمده بر روی آلفا آمیلاز *Aspergillus oryzae* مورد مطالعه قرار گرفت.

در تحقیقات پیشین پس از عصاره‌گیری، رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات تنها در یک غلظت مشخص انجام شده است؛ از جمله

[1] Spicord

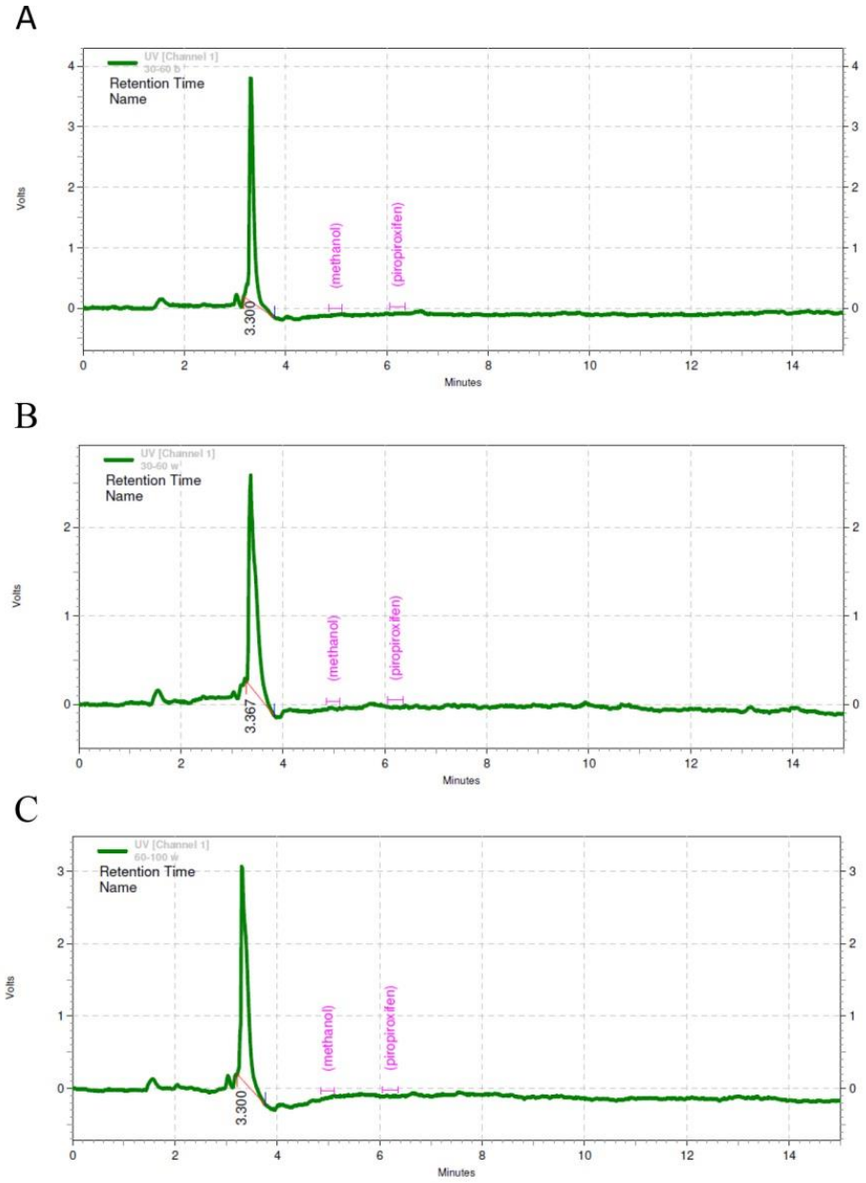
چارلز اس. ای. دیلر و همکاران (۲۰۰۵) (Dayler et al., 2005) ، ویسسینگ[1] و همکاران (۲۰۱۰) (Wisessing et al., 2010) ، فرانکو و همکاران (۲۰۰۰) (Franco et al., 2000) و وسلاک[2] و همکاران (۱۹۸۳) (Subramanian et al., 2008)، رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات را در درصدهای اشباع ٪(۸۵-۰)، ٪(۸۰-۰)، ٪(۴۰-۲۰) و ٪(۷۰-۴۰)، به ترتیب انجام داده‌اند؛ اما در مطالعه‌ی حاضر، رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات در قالب سه بخش(٪(۳۰-۰)، ٪(۶۰-۳۰) و ٪(۱۰۰-۶۰)) انجام شده‌است.

پس از رسوب پروتئین‌ها با آمونیوم سولفات ودیالیز متعاقب آن، HPLC انجام گردید. برای هر یک از سه بخش نمونه‌های لوبیای قرمز در نمودار کروماتوگرام تنها یک پیک تشکیل شد؛ در حالیکه در کارهای دیگر معمولاً چندین پیک تشکیل شده است.

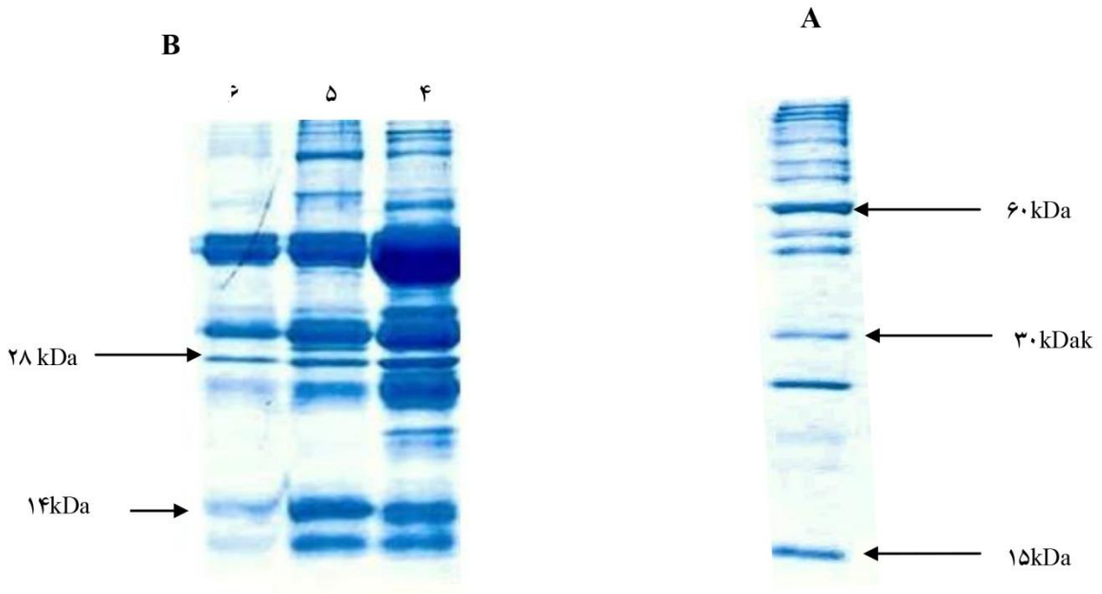
جدول ۱: مشخصات پیک‌های اصلی خارج شده از ستون HPLC

Number of fraction	Retention time(min)	Area	Area %	Height	Height %	Width
A	3.300	22636	100.00	3687	100.00	0.62
B	3.367	22297	100.00	2390	100.00	0.55
C	3.300	24654	100.00	2939	100.00	0.55

[1] AnussornWisessing
[2] Randall J. Weselake



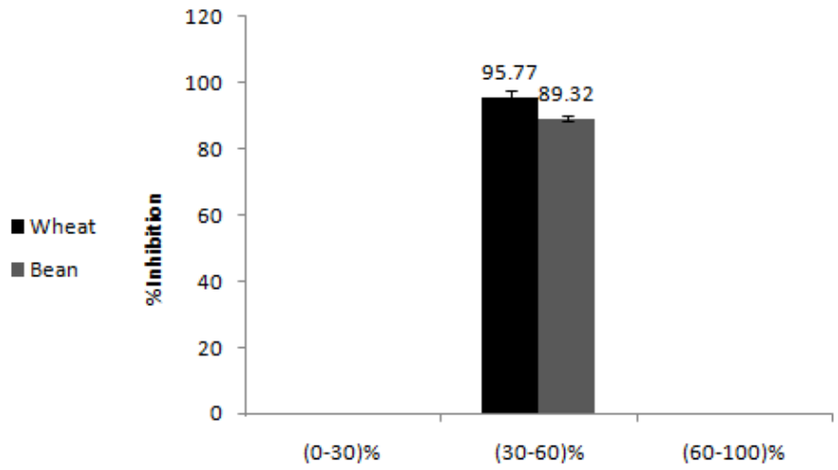
شکل ۱: منحنی‌های کروماتوگرام پروتئین‌های استخراج شده از بذر لوبیا در سه کسر اشباع A: کسر ۳۰-۰ درصد، B: ۶۰-۳۰ درصد، C: ۱۰۰-۶۰ درصد



شکل ۲: SDS-PAGE نمونه‌ها با استفاده از ژل ۱۲/۵٪ ؛ A: پروتئین مارکر و B: از راست به چپ ۴، ۵ و ۶ به ترتیب کسرهای ٪(۱۰۰-۶۰)، ٪(۶۰-۳۰) و ٪(۳۰-۰) لوبیا.

جدول ۲: نتایج سنجش اثر مهارکننده‌های آمیلازی موجود در بذر لوبیای قرمز و جذب نوری آن‌ها در ۵۴۰ نانومتر

٪ مهارکنندگی	جذب نوری	٪ اشباع آمونیوم سولفات
لوبیا	لوبیا	
۰	۷	۰-۳۰
۰	۷	
۰	۷	
۸۷/۹۳	./۸٤٥	۳۰-٦۰
۹۰/٤۱	./۸۳۱	
۸۹/٦۳	./۸۲٥	
۸۹/۳۲(۱/۰٤)		
۰	۷	٦۰-۱۰۰
۰	۷	
۰	۷	



شکل ۳: نمودار مقایسه درصد مهارکنندگی پروتئین‌های خالص سازی شده

از دلایل احتمالی برای این مشاهده شاید بتوان به تقسیم بندی نمونه‌ها به سه بخش، متفاوت بودن نوع ستون و شرایط انجام HPLC اشاره کرد. مهمتر اینکه در کارهای قبلی در بیشتر موارد، ابتدا کروماتوگرافی تبادل آنیونی انجام وسپس از HPLC فاز معکوس[1] برای خالص‌سازی بیشتر، استفاده شده‌است.

در مطالعه‌ی حاضر امکان جمع‌آوری نمونه‌ها پس از آنالیز HPLC فراهم نبود بنابراین این مرحله صرفاً نشان‌دهنده درستی مراحل خالص‌سازی و رسوب‌دهی پروتئین‌ها و تاییدکننده آنها می‌باشد. با توجه به موارد فوق، SDS-PAGE و آزمون سنجش میزان مهارکنندگی نمونه‌ها بعد از دیالیز انجام شد. با توجه به نوع ستون مورد استفاده و عدم استفاده از کروماتوگرافی تبادل آنیونی و HPLC فاز معکوس همه پروتئین‌های موجود در فراکشن‌های پروفایل الکتروفورز شکل ۲ بر اساس جذب نوری پروتئین بصورت یک پیک در شکل ۱ مشاهده می‌شوند. یعنی همه پروتئین‌ها در هر یک از فراکشن‌ها به دلیل انجام نشدن کروماتوگرافی تبادل آنیونی و جذبی بصورت یکجا از ستون خارج و به صورت یک پیک در کروماتوگرام نمود پیدا کرده‌اند. تفاوت سه کروماتوگرام A, B و C در شکل ۱ تفاوت پروتئین‌های رسوب یافته در سه بازه غلظتی اشباع از آمونیوم سولفات را نشان می‌دهد.

پس از انجام آزمون سنجش میزان مهارکنندگی در نمونه‌های مورد مطالعه مشخص شد که تنها پروتئین‌های رسوب یافته در کسر ٪(۶۰-۳۰) درصد اشباع از

[1] Reversed-phase HPLC

آمونیوم سولفات ویژگی مهارکننده آلفاآمیلازی را دارا هستند. همانطور که اشاره شد در تحقیقات قبلی ، مهارکننده‌ها معمولاً در کسرهای ٪(۸۵-۰) ، ٪(۸۰-۰)، ٪(۴۰-۲۰)و ٪(۷۰-۴۰) گزارش گردیده‌اند. نتایج این تحقیق نشان‌دهنده‌ی وجود مهارکننده‌ها در کسر ٪(۶۰-۳۰) است که با نتایج پژوهش‌های قبلی در این زمینه هم‌خوانی دارد.

پیشنهاد می‌شود در مطالعات و پژوهش‌های آینده در این زمینه، خالص‌سازی کامل مهارکننده‌های آلفاآمیلازی به‌وسیله‌ی کروماتوگرافی تبادل آنیونی و سپس HPLC فاز معکوس انجام و پروتئین‌های به‌دست آمده از هر مرحله برای سنجش اثر مهارکننده‌گی جمع‌آوری شوند. همچنین اثر این مهارکننده‌ها بر روی آلفاآمیلازهای بزاقی و پانکراسی انسانی به عنوان راهبردی در آینده برای درمان دیابت نوع دوم بررسی گردد.

منابع

Alzahrani, Z. (2010), Salting in, salting out, and dialysis of proteins Department of Biochemistry, King Saudi University press. College of Science. A Thesis Submitted for the Degree of M. Sc.

Barrett, M. L. Udani, J. K. (2011). A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*) A review of clinical studies on weight loss and glycemic control, Journal of Nutrition 45: 10-24.

Dayler, C. S. A., Mendes, P. A. M., Prates, M. V. Bloch, C. (2005). Identification of a novel bean a-amylase inhibitor with chitinolytic activity, Journal of FEBS 579: 5616-20.

Franco, O. L., Rigden, D. J. Melo, F. R. Bloch, C. Silva, C. P. Grossi, M.F. (2000). Activity of wheat a-amylase inhibitors towards bruchid a-amylases and structural explanation of observed specificities, European Journal of Biochemistry. 267: 2166-73.

Kasahara, K. Hayashi, K. Arakawa, T. Philo, J S. Wen, J. Hara, S. (1996). Complete Sequence, Subunit Structure, and Complexes with Pancreatic α-Amylase of an α-Amylase Inhibitor from *Phaseolus vulgaris*White Kidney Beans, Journal of Biochemistry120: 177-83.

Kluh, I. Horn, M. Hyblova, J. Hubert, J. Maresova, LD. Voburka, Z. (2005). Inhibitory specificity and insecticidal selectivity of a-amylase inhibitor from *P haseolus vulgaris*, Journal of Phytochemistry. 66: 31-9.

Moreno, J. Altabela, T. Chrispeels, M. J. (1990). Characterization of alpha-Amylase-Inhibitor, a Lectin-Like Protein in the Seeds of *Phaseolus vulgaris*, Journal of Plant Physiology and Biochemistry. 92(3): 703-9.

Pelegrini, P. B. Franco, O. L. (2005). Novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins, Journal of Biochemistry and cell Biology. 37: 2239-53.

Saberi, N. R. Ghadamyari, M. (2012). Biochemical characterization of α-amylases from gut and hemolymph of Rhynchophorus ferrugineus Olivieri (Col Curculionidae) and their inhibition by extracts from the legumes Vignaradiata L. and Phaseolus vulgaris L., Journal of Information Systems. 9: 72-81.

Sales, P. M. Souza, P. M. Simeoni, L. A. Magalhaes, P. O. Silveria, D. (2012). α-Amylase Inhibitors: A Review of Raw Material and Isolated Compounds from Plant Source, Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences. 15(1): 141-83.

Shamkhy, A. Ali, A. Nadum, O. (2011). Proper Extraction Method for Amylase Inhibitor from Different Cereals, Journal of Cell & Plant Science. 2(4): 1-3.

Terashima, M. Katoh, S. (1996). Modification of α-amylase function by protein engineering, Journal of Annals of the New York Academy of Sciences. 799: 65-9.

Wisessing, A. Engkagul, A. Wongpiyasatid, A. Choowongkomon, K. (2010). Biochemical characterization of the alpha-amylase inhibitor in mung beans and its application in inhibiting the growth of Callosobruchusmaculatus, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58(4): 2131-7.

Subramanian, R. Asmawi, M. Z. Sadikun, A. (2008). In vitro α-glucosidase and α-amylase enzyme inhibitory effects of Andrographis paniculata extract, Journal of Acta Biochimica Polonica. 55(2): 391-8.