در زراعت و باغبانی

اثر حرارت مرطوب برروی فعالیت مهارکننده‌های تریپسین در نخود معمولی، لوبیای سفید و باقلا

صمد زارع و رضا حیدری، اعضای هیات علمی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه
عبدالغفار عبادی، دانشجوی کارشناسی ارشد دانشکده علوم دانشگاه ارومیه
علوم دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: اسفند ماه ۱۳۸۰ تاریخ پذیرش: مهر ماه ۱۳۸۲

چکیده

در مطالعه حاضر تأثیر حرارت مرطوب در ۱۰۰ درجه سانتیگراد در مدت زمان ۰، ۱، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت برروی آرد نمونه‌های نخود، لوبیا و باقلا مورد بررسی قرار گرفت. میزان پروتئین کل در نخود، لوبیا و باقلا در تیمار حرارتی صفر به ترتیب، ۲۲/۱، ۱۸،۴/۱ و ۳۰/۵ درصد برآورد گردید .تغییرات میزان پروتئین کل در هرسه نمونه مورد مطالعه که تحت تیمارهای حرارتی با زمانهای متفاوت قرارگرفته‌بودند، معنی‌دار نبود. فعالیت مهارکننده‌های تریپسین در نمونه‌های حرارت ندیده در بذور نخود، لوبیا و باقلا، به ترتیب ۲۷/۸، ۴۱/۵ و ۴۹/۹ میکروگرم در هرگرم آرد نمونه تعیین گردید که در طی تیمارهای حرارتی فوق، کاهش معنی‌داری را نشان داد. الکتروفورز درژل‌پلی اکریلامید در حضور سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE) بر روی پروتئین کل نمونه‌های حرارت دیده و حرارت ندیده بعد ازاعمال تیمار آنزیمی انجام گرفت. مقایسه الکتروفوروگرام‌های بدست آمده نشان داد که، تغییرات شدیدی در کاهش ضخامت و رنگ باندها پروتئینی متناسب با افزایش زمان حرارت‌دهی ایجاد شده است. این فرآیند از غیر فعال شدن مهارکننده‌های تریپسین ناشی از اعمال حرارت و تأثیر شدید آنزیم تریپسین در هیدرولیز پروتئینهای نمونه بوده است.

واژه‌های کلیدی: تیمار حرارتی، مهارکننده‌های تریپسین، الکتروفورز، نخود، لوبیا، باقلا

Pajouhesh& Sazandegi No:59 PP: 87-93

Effct of Wet heat treatmen t on trypsin inhibitors activity in 3 specles of legumes *Cicer arietinum, Phaseolus vulgaris, Vicia faba*

Zare. S. HEIDARI. R. E. A. G.

Effect of wet heat treatment at 100^{oc} and various periods (0,1,3,6,12,24 hr) on flours of chickpea, lima bean and broad bean, was investigated. Total protein contents in unheated flours of the samples was estimated as 18.1 22.3 and 30.5 percent respectively. Total protein content of 3 samples in heating and unheating conditions was not affected significantly. Trypsin inhibitors activity (TIA) in heated and unheated of chickpea, lima bean and broad bean were, 27.84,41.5 and 49.9 (µg/g), respectively. Under heating condition, the considerable losses in the TIA contents were observed. Total proteins of heated and unheated samples after enzymatic effect were subjected to SDS-PAGE electrophoresis (%12.5). Electrophotogram obtained were compared and the results indicated that remarkable changes in decrease thickness and brightness of protein bands increase with heating time. This process resulting from inactivation of trypsis inhibitors by heat effect treatment and extreme effects of enzyme in proteins hydrolysis.

Key words: Heat treatment, Trypsin inhibitors, Electrophoresis, Chickpea, Lima bean, Broad bean

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

گیاهان خانواده لگومینه (بقولات)، در برخی نقاط جهان، به لحاظ بالا بودن پروتئین ذخیره‌ای دانه‌هایشان، کشت می‌شوند. محتوای پروتئینی دانه سویا به طور متوسط ۳۸ تا ۴۲ درصد می‌باشد(۱). به طور متوسط در نخود معمولی ۱۸ تا ۲۰ درصد، لوبیا ۲۰ تا ۲۵ درصد و باقلا ۳۰ تا ۳۵ درصد پروتئین گزارش شده است(۱). ارزش غذایی پروتئین بقولات، بیشتر به خاطر تعادل اسیدهای آمینه ضروری خصوصاً اسیدهای آمینه ضروری مانند تریپتوفان و ایزولوسین در آنها است(۱).

با وجود محتوای فراوان پروتئینی، عوامل ضد تغذیه‌ای نیز در دانه گیاهان بقوله‌ای یافت می‌شوند(۲). این عوامل در میزان هضم و جذب پروتئین‌ها مشکل‌ساز بوده و بنابراین باعث کاهش ارزش تغذیه‌ای پروتئین می‌گردند(۶). از مهمترین مواد ضد تغذیه‌ای می‌توان با بازدارنده‌های پروتئازی شامل مهارکننده‌های تریپسین اشاره کرد. این مواد به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند:

۱- موادی که وزن مولکولی ۲۰ تا ۲۵ کیلو دالتون داشته و منحصراً بازدارنده تریپسین‌اند.

۲- موادی که وزن مولکولی ۵ تا ۱۰ کیلو دالتون داشته و بازدارنده تریپسین و کیموتریپسین می‌باشند. هر دو آنزیم از لوزالمعده ترشح می‌شوند(۲). از دیگر مواد ضد تغذیه‌ای عوارضی همچون کاهش رشد، آثار سوءتغذیه و مرگ تدریجی را در انسان و نیز هیپرپلازی و هیپرتروفی پانکراس را در حیوانات آزمایشگاهی ایجاد می‌کنند(۱۷).

علی‌رغم عوارض سوء مواد ضد تغذیه‌ای خواص مفیدی نیز برای این مواد گزارش شده است که می‌توان به مقاومت دانه‌ها در مقابل هجوم حشرات یا عوامل بیماریزا توسط ساپونین‌ها و نیز به عنوان ضدقارچ هنگام جوانه‌زدن بذور، کاهش کلسترول خون توسط مهارکننده‌های تریپسین اشاره کرد(۴،۱۰،۱۱،۱۲).

عوارض ضدتغذیه‌ای بیشتر در صورت مصرف بذور فوق به صورت خام و نپخته ایجاد می‌شود. در صورت فرآوری تا حدود زیادی اثرات ضد تغذیه‌ای مواد فوق کاهش یافته یا از بین می‌رود. در این میان حرارت دادن، ازجمله مهمترین روشها برای از بین بردن عوامل مشکل‌ساز در تغذیه و هضم ساده پروتئینها است(۱۵). از سایر روشها می‌توان به پختن و سرخ کردن (۵،۳)، تیمار با اسید، جوانه‌زدن (۱۴)، تفت دادن(۳) و جوشاندن در آب اشاره کرد(۱۹).

کاهش ترکیبات ضدتغذیه‌ای با روشهای فرآوری باید همسو با حفظ کیفیت غذایی پروتئین باشد. از میان روشهای فرآوری، تیمار حرارتی به صورت خشک و مرطوب، کمک بیشتری به حفظ کیفیت پروتئین می‌کند(۱۵).

در این مطالعه از تیمار حرارتی مرطوب برای کاهش میزان مهارکننده‌های تریپسین برروی آرد نمونه‌های نخود، لوبیا و باقلا در زمان‌های متغیر در ۱۰۰ درجه سانتیگراد استفاده شد و سپس میزان پروتئین کل، فعالیت بازدارنده‌های تریپسین در نمونه‌های حرارت دیده و حرارت ندیده، بعد از تیمار آنزیمی مورد مطالعه قرار گرفت. تا بدینوسیله اثرات تیمار حرارتی اعمال شده در زمان‌های مختلف در کاهش میزان مواد ضدتغذیه‌ای مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روشها

دانه‌های مورد استفاده در آزمایش از محل‌های زیر تهیه شد

دانه نخود (*Cicer arietinum*) رقم کابلی از مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی شهر ارومیه، دانه لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) رقم دانشکده و دانه باقلا (*Vicia faba*) رقم برکت از مؤسسات تحقیقات دانه و نهال در کرج تهیه شد.

تهیه آرد نمونه ها

تعداد ۲۰ تا ۳۰ دانه برای هر آزمایش انتخاب و بعد از آرد کردن، با صافی ۳۵۰ میکرومتری الک شدند.

اعمال تیمار حرارت مرطوب

نمونه آرد هر یک از نمونه‌ها در تشتک‌های پتری درباز، در بن ماری ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت، بطوریکه فقط بخار آب با نمونه‌ها تماس داشت.

اندازه گیری پروتئین کل

میزان پروتئین کل با استفاده از دستگاه کجلدال اتوماتیک (مدل ۱۰۳۰ از شرکت تکاتور) در ۳ تکرار اندازه گیری شد(۱۸).

اندازه گیری فعالیت بازدارنده تریپسین

فعالیت مهارکننده تریپسین که براساس میکروگرم مهارکننده در میلی گرم نمونه یا میکروگرم مهارکننده در میلی گرم پروتئین بیان می‌شود و با استفاده از روش ساده و دقیق هامستراند ارزیابی شد(۱۶). در این روش ابتدا ۱ گرم از آرد نمونه را با ۵۰ میلی لیتر سود ۰/۰۱ نرمال ترکیب کرده، بعد از هم زدن، pH را با ۰/۰۱ HCl نرمال به ۸/۴ رسانده، سپس مخلوط را صاف و ۲ میلی لیتر از آن را با ۲ میلی لیتر محلول استاندارد تریپسین مخلوط کرده، واکنش را بمدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد انجام می دهیم (pH=۷) سپس ۲ میلی لیتر محلول استاندارد سوبسترا به ترکیب فوق اضافه کردیم. این واکنش نیز به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد صورت گرفت. در پایان ۱ میلی لیتر اسیداستیک ۳۰٪ به نمونه اضافه شده، حداکثر جذب آن در ۴۱۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتری (Buush&lumb) خوانده شد. براساس روش Kakade، هر میکروگرم مهارکننده تریپسین فعالیتی معادل ۰/۰۱۹ واحد جذب دارد که معادل با میزان مهارکننده است. آزمایش فوق برای هر نمونه در ۳ تکرار انجام شد(۱۷).

Archive of SID
www.SID.ir

الکتروفورز SDS-PAGE پروتئینهای کل در نمونه‌های حرارت دیده و حرارت ندیده بعد از تیمار آنزیمی

برای استخراج پروتئین نیم میلی لیتر از محلول‌های پروتئینی تیمار شده با آنزیم تریپسین برداشته شده و، روی آن مستقیماً ۲ میلی‌لیتر محلول لاملی اضافه گردید. محلول به مدت ۱ ساعت بهم‌زده، سپس به مدت ۵ دقیقه در بن ماری ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد.بعد از سانتریفیوژ در ۹۵۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه، از محلول هموژن رویی، به اندازه ۳۰ تا ۳۵ میکرولیتر با سرنگ هامیلتون برداشته و در چاهک‌ها تزریق گردید(۱۸).

این آزمایش طبق روش لاملی (۱۹) و با استفاده از دستگاه الکتروفورز ساخت اختریان پاور سایزی مدل ۱۰۰ انجام شد. در این آزمایش غلظت ژل زیرین بالایی ۸٪ انتخاب گردید.

نتایج و بحث

میانگین درصد پروتئین کل در سه گونه نخود، لوبیا و باقلای مورد مطالعه قبل و بعد از اعمال حرارت مربوط در شکل ۱ نشان داده شده است. میانگین درصد پروتئین کل در ۶ تیمار اعمال شده (۰،۱،۳،۶،۱۲ و ۲۴ ساعت) در دانه گیاهان مورد مطالعه در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نبوده و با تیمار اعمال شده تفاوت نیست (شکل ۱ و جدول ۱).

این نتایج با سایر گزارشات در نخود (۱۵) و نخود فرنگی (۹) در اثر اعمال تیمار حرارتی خشک همبستگی دارد.

ـ در هر گروه به ترتیب از چپ به راست نخود، لوبیا و باقلا نشان داده شده است)

داده‌های بدست آمده از این تحقیق کاهش شدید فعالیت مهارکننده‌های تریپسین (TIA) را به موازات افزایش زمان حرارت‌دهی نشان داد (شکل ۲). فعالیت مهارکننده‌های تریپسین در آرد نمونه‌های حرارت ندیده در نخود، لوبیا و باقلا به ترتیب ۲۷/۸۴، ۴۱/۵۱ و ۴۹/۹۴ مهارکننده در گرم آرد نمونه سنجش گردید. تیمار حرارتی ۶ ساعت در هر ۳ نمونه شدیدترین کاهش را در میزان مهارکننده نشان داد به طوریکه در نخود تا ۷۷٪، در لوبیا ۸۴٪ و در باقلا ۷۴٪ کاهش مشاهده گردید(شکل ۲ و جدول ۲). این مطالعات با نتایج الکتروفورزی نمونه‌ها نیز همخوانی دارد. یعنی نوارهای پروتئینی به موازات افزایش درجه حرارت کم رنگ‌تر می‌شوند.

مطالعات انجام گرفته بوسیله سایر محققین برروی گیاهانی چون لوبیای بالدار (۱۲)، نخود فرنگی (۱۳) و باقلا(۸) در اثر تیمار حرارت خشک به ترتیب ۷۰، ۷۸ و ۷۹ درصد کاهش را در میزان مهارکننده‌های تریپسین نشان داده است.

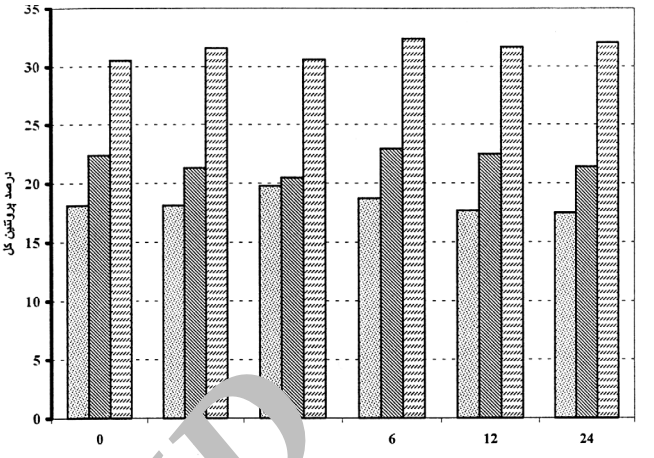
بررسی مهارکنندگی باقیمانده (Rmain inhibitory)

در نمونه‌ها نشان می‌دهد که حتی بعد از تیمار ۲۴ ساعت نیز مهارکننده‌ها به طور کامل از بین نمی‌روند. مقادیر جزئی باقیمانده اشکالات تغذیه‌ای خاصی ایجاد نمی‌کند (۱۵) (شکل ۳).

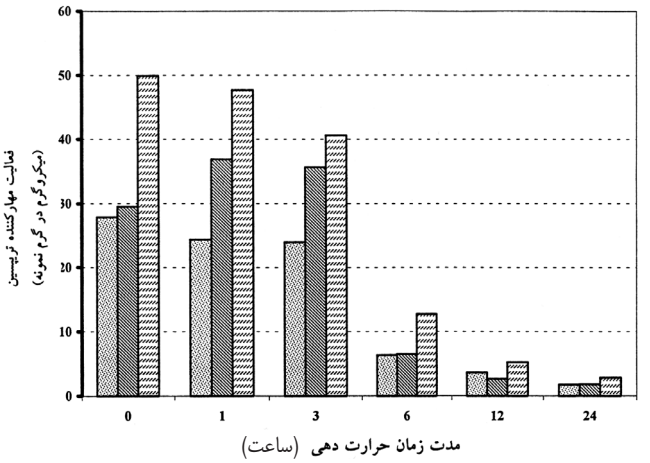
جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس تأثیر حرارت برروی محتوای پروتئین کل در ارقام مورد مطالعه

		m of Squares	df	Mean Square	F	Sig
نخود	Between Groups	۱۳۹/۱۰۷	۵	۲/۰۲۱	۵۱۹/۲	۰/۰۸۸
	within Groups	۹/۶۲۸	۱۲	۰/۸۰۲		
	Total	۱۹/۷۳۲	۱۷			
لوبیا	Between Groups	۱۲/۹۵۱	۵	۲/۵۹۰	۷۴۵/۱	۰/۱۹۹
	within Groups	۱۷/۸۱۱	۱۲	۱/۴۸۴		
	;Tpta	۳۰/۷۶۲	۱۷			
باقلا	Between Groups	۸/۸۸۷	۵	۱/۷۷۷	۵۴۹/۰	۰/۷۳۷
	within Groups	۳۸/۸۷۷	۱۲	۳/۲۴۰		
	Total	۴۷/۷۶۴	۱۷			

Archive of SID
www.SID.ir



شکل شماره ۱- اثر تیمار حرارت بر مقادیر پروتئین کل در دانه خود، لوبیا و باقلا. (در هر گروه به‌ترتیب از چپ به راست نخود، لوبیا و باقلا نشان داده شده است)



شکل۲- مقایسه میانگین فعالیت مهارکننده تریپسین تحت اثر تیمار حرارت مرطوب در دانه نخود، لوبیا و باقلا. (در هر گروه به ترتیب از چپ به راست نخود، لوبیا و باقلا نشان داده شده است)

الکتروفوروگرام حاصل از الکتروفور SDS-PAGLS

پروتئین کل در نمونه‌های حرارت دیده و حرارت ندیده بعد از تیمار آنزیمی در ۳ گونه مورد مطالعه نشان داد که میزان برخی از پلی پپتیدها، بعد از اعمال تیمار آنزیمی کاهش یافته است (تصاویر ۴، ۵ و ۶). براین اساس تعداد باندهای پروتئینی در تیمار صفر بعد از تأثیر آنزیم تریپسین در نخود، لوبیا و باقلا به ترتیب ۱۴، ۱۲ و ۱۸ باند پروتئینی بود. در طی تیمار ۶ ساعته بعد از اعمال اثر آنزیم کم رنگ شدن و حذف بسیاری از باندهای پروتئینی مشهود است (شکل۴). بررسی‌های جداگانه اثر حرارت و آنزیم، برروی گیاهانی همچون Amaranth و Glycin نشان داده که کاهش ضخامت باندها و حذف آنها در اثر تیمار حرارتی نبوده، بلکه کاهش در ضخامت و حذف باندها بر اثر حساسیت آنها به آنزیم و تأثیر هیدرولیز آنزیمی است (۷، ۱۰) که با نتایج بدست آمده از تحقیق همخوانی دارد.

منابع مورد استفاده

۱- ارزانی، ۱۳۷۸. اصلاح گیاهان زراعی (ترجمه). مرکز نشر دانشگاه صنعتی اصفهان. ۶۰۷صفحه.

۲- مجنون حسینی، ن ۱۳۷۲. حبوبات در ایران. انتشارات جهاددانشگاهی دانشگاه تهران. ص ۳۸-۲۵.

3)Almazan.A.M, and F, Begum .1996; Nutrient and antinutrient in peanut greens, University. International. Network. Fodd. Data. System, 9(4): 375-383.

4) Bakr.A.A, 1991; Nutritional evaluation and cooking quality of dry cowpea (*Vigna sinensis L.*) grown under various agricultural conditions. 1. Effect of soaking and cooking on the chemical composition and nutritional quality of cooked seeds. J.food. Sci. Techno(5)28-312-316.

5) Chilost.G 2000; Antifungal activity of a bowman-birk – type trypsin inhibitor from wheat kernel.J.Phytopathology 148:477-481.

6) Duhan.A, N. Khetarpaul, and S.Bishnoi, 2001; Sapon n content and trypsin inhibitor activity in processed cooked pigeon pea cultivars. Inter.J.food Sci. Nut.52: 53-59.

7) Filippetti. A,G.H. Azadegan, and Sepa , 1999; Breeding strategies for seed protein content and trypsin inhibitors inferred from combining ability and heterosis in test crosses of Vicia faba. Plant breeding 118:411-416.

8) Gorinstein.S,M. Ruth, 91; Evaluation of four Amaranthus species th h prote electrophoretic patterns and their amino acid comp n.J.Agric.Food Chem, 39: 851-854.

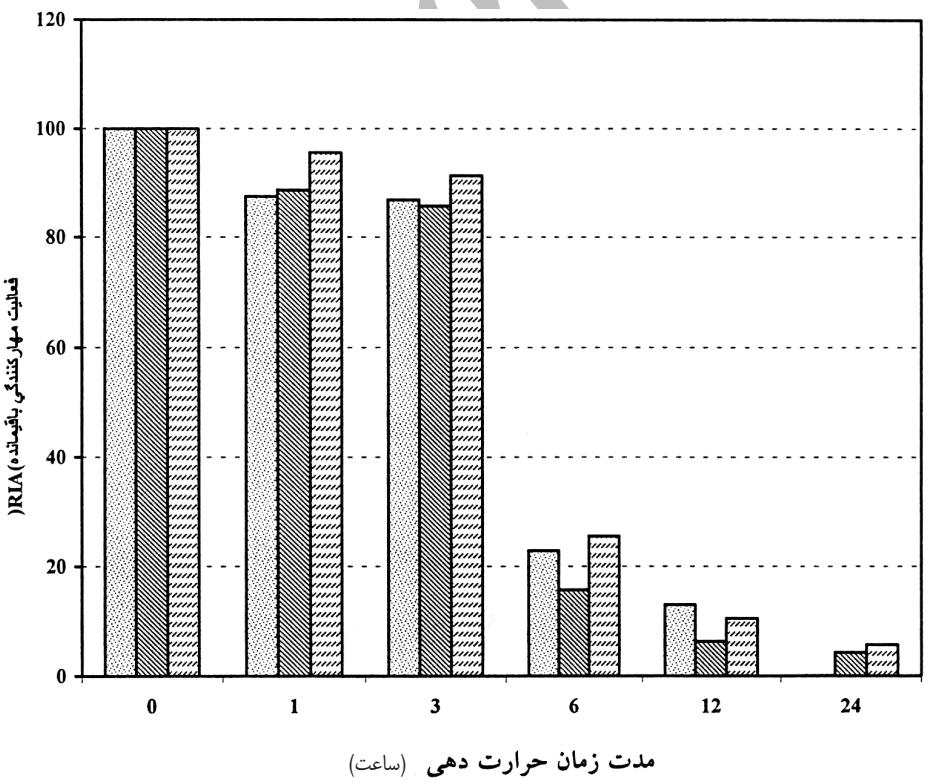
9) Helsper.G.F,J.P. Hoogendij and K.M. Johanna, 1993, Antinutritional factors in faba beans (*Vicia faba*) as affected by breeding toward the absence tannins.J. Agric. Food Chem. 41:1058-1061.

10) Huet. C, and J.B, Jacques, 1987; Constancy of composition of storage proteins deposited in *fisum sativum* seeds. Phytochemistry. 26(1):47-50

11) Kollipara. P and K.H.Theodor, 1992; Characterization of trypsin and chymotrypsin inhibitors in the wild perennial Glycine species. J. Agric.Food chem., 40:2356-2363.

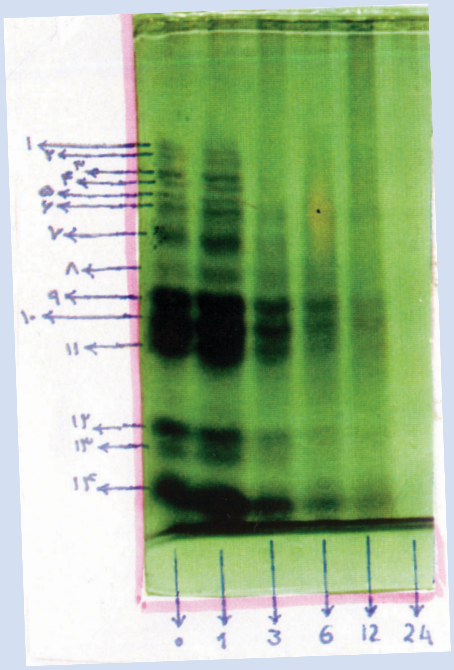
Archive of SID
www.SID.ir

12) Konarev.A, V. Kochetkor, 1999; The detection of inhibitors of the *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de bary extracellular proteinases in sunflower.J. Phytopathology, 147: 105-108.
13) Krishnan.H.B, and A.A. White, 1996; Alcohol-soluble protein and protein body formation in the endosperm of tall fescue. Crop Sci.36:1023-1029.
14) Liu. K.W. and M. Dixon, 1992; Protein insolubilization and thermal destabilization during storage as related to hard-to-cook detect in cowpea, J. Agric. Food Chem, 40: 2483-2486.
15) Lu. S.Y, and H.Kim, 1987; Changes in phytase activity and phytate during the germination of six canola cultivars.J.Food. Sci, 52(1): 173-176.
16) Marques.C.M, and R. Alonso, 1998; Effect of dry heat on the invitro digestibility and trypsin inhibitors activity of chick pea flour. J.Food. Sci. Technol, 33:527-532.
17) Prinya. W.W. and R.R. Eitenmiller, 1996; Cowpea flour vitamins and trypsin inhibitor affected by treatment and fermentation with *Rhizopus microsporus*. J.Food. Sci, 61: 1039-1042.
18) Rackis. J.J, and J.E. McGee, 1979; Effects of soy proteins containing trypsin inhibitors in long term feeding studies in rats. Am. Oil. Chemists. Soc, 56: 162-165.
19) Schuler. A,and Z.E. Raymond, .1989)., Methods in plant molecular biology. Academic press, pp:50-79.
20) Shams.A.M and R.D. Thompson, 1987; Quantitative determination of pea losses as affected by conventional water blanching. J.Food. Sci, (4): 1006-1009.

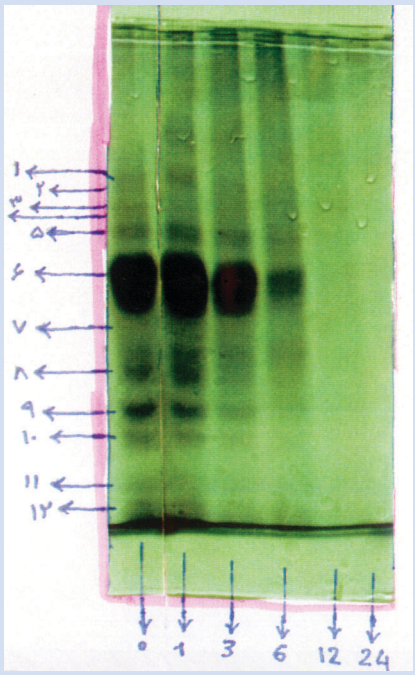


شکل ۳- مقایسه میانگین فعالیت مهارکننده‌های باقی مانده تحت اثر تیمار حرارت مرطوب در دانه نخود، لوبیا و باقلا. (در هر گروه به‌ترتیب از چپ به راست نخود، لوبیا و باقلا نشان داده شده است)

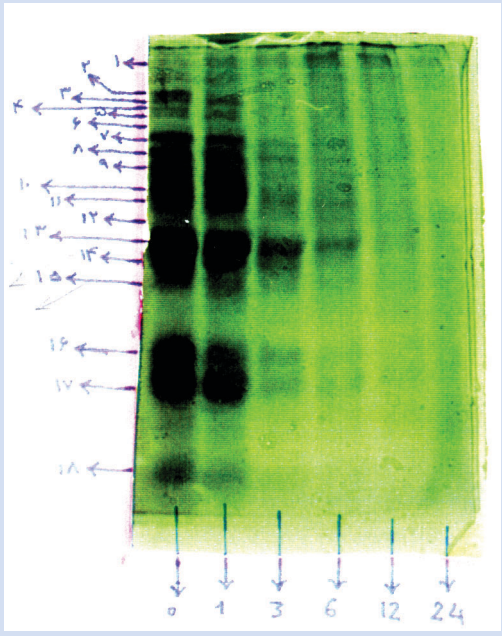
www.SID.ir



a- نخود: باندهای حاصل از الکتروفورز (ADS-PAGE) پروتئین های کل در نمونه های حرارت دیده و حرارت ندیده، بعد از تاثیر هیدرولیز آنزیمی در گونه نخود



b - لوبیا: باندهای حاصل از الکتروفورز (SDS-PAGE) پروتئین های کل در نمونه های حرارت دیده و حرارت ندیده، بعد از تاثیر هیدرولیز آنزیمی در گونه لوبیا



c- باقلا: باندهای حاصل از الکتروفورز (SDS-PAGE)پروتئین های کل در نمونه های حرارت دیده و حرارت ندیده، بعد از تاثیر هیدرولیز آنزیمی در گونه باقلا

شکل شماره ۴- الکتروفورز گرام پروتئین ها ی کل در نمونه های حرارت دیده و حرارت ندیده بعد از تیمار آنزیمی

www.SID.ir

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس حرارت بر روی تغییرات فعالیت مهارکنندهای تریپسین در ارقام مورد مطالعه

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
نخود	Between Groups	۲۱۳۹/۱۰۷	۵	۴۲۷/۸۲۱	۵۲۹/۹۲۳	۰/۰۰۰
	within Groups	۹/۶۸۸	۱۲	۰/۸۰۷		
	Tptal	۲۱۴۸/۷۹۵	۱۷			
لوبیا	Between Groups	۴۲۶۹/۱۹۰	۵	۸۵۱ [illegible]۸	۱۰/۹۰۶	۰/۰۰۰
	within Groups	۹۳۹/۴۴۷	۱۲	۷۸/۲۸۷		
	;Tpta	۵۲۰۸/۶۳۷	[illegible]			
باقلا	Between Groups	۷۲۰۱/۸۷۴	[illegible]	۱۴۴/۳۷۵	۱۵۲۲/۴۰۷	۰/۰۰۰
	within Groups	۱۱/۳۵۳	[illegible]	۰/۹۴۶		
	Total	۷۲۱۳/[illegible]	۱۷			

Archive of SID

www.SID.ir