Archive of SID

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 74, Number 4, 2019
Original Article

Screening for Wheat Phytase, Inhibitory or Activating Effect, Among Methanol Extract of Some Kurdistan Province Native Plants

Mohammad Ali Zarei, Ramin Mohammadi

Department of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Kurdistan Province, Iran

10.22059/jvr.2018.250154.2750
J Vet Res, 74(4), 554-562

Abstract

BACKGROUND: Phytase enzyme (EC 3.1.3.8), is used to increase the availability of phosphorus in the feeding of monogastric animals. Increasing public attention to environmental issues, improving livestock nutrition and human health have led to considerable attempts to increase its activity or prevent its inhibition as a food additive.

OBJECTIVES: Determination of inhibitory or activating effect of methanolic extract from aerial parts of some herbs, as rich sources of secondary metabolites.

METHODS: Phytase was partially purified from wheat barn. After preparation of methanolic extracts from aerial parts of plants, their effects on phytase activity were measured at four concentrations of 0.001, 0.01, 0.1 and 1 mg/ml. Micro plate assays were performed at 405 nm.

RESULTS: Among analysed plant samples, extracts from *Pedicularis sibthorpi*i Boiss, *Phlomis persica* Boiss, *Solenanthus Circinatus* Ledeb, *Stachys lavandulifolia* Vahl, had appreciable inhibitory effect, while extracts from *Astragalus caraganae* Hohe, *Hypericum scabrum* L, *Linum album* Ky.ex Boiss, *Valeriana sisymbriifolia* Vahl, *Euphorbia denticulate* Lam, *Rindera lanata* (Lam.) Bge, had a considerable activation effect.

CONCLUSIONS: According to the results of this report, plants with positive effect on phytase activity, could be used as food additive along with phytase to improve phosphoros uptake. On the other hand, plants with negative effect on phytase could be viewed as unwanted sources in monogastric animals feeding.

Keywords: Methanolic extract, Monogastric animals, Phosphorus, Phytase, Wheat

Copyright © 2019. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: mazarei@uok.ac.ir **Tel/Fax:** 087-33664600, 33627072

How to cite this article:

Zarei, M.A., Mohammadi, R. (2019). Screening for Wheat Phytase, Inhibitory or Activating Effect, Among Methanol Extract of Some Kurdistan Province Native Plants. J Vet Res, 74(4), 554-562. https://10.22059/jvr.2018.250154.2750

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Phytase activation or Inhibitory effect of methanolic extract from different plants.

Figure 1. Variation in Phytase reaction velosity versus p - Nitro phenyl phosphate concentration as substrate.

Figure 2. Double reciprocal graph (Line-weaver Burk) for Phytase reaction.

www.SID.ir

Archive of SID

مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۴، شماره ۴، ۱۳۹۸
مقاله پژوهشی

غربالگری عصاره متانولی برخی از گیاهان بومی استان کردستان از نظر توان مهارکنندگی یا فعال‌کنندگی آنزیم فیتاز گندم

محمدعلی زارعی، رامین محمدی

گروه علوم زیستی، دانشکده علوم دانشگاه کردستان، سنندج، کردستان، ایران

تاریخ دریافت: ۴ شهریور ماه ۱۳۹۸ **تاریخ پذیرش:** ۳۰ مهر ماه ۱۳۹۸ **تاریخ انتشار آنلاین:** ۰۱ آذر ماه ۱۳۹۸

10.22059/ivr.2018.250154.2750

چکیده

زمینهٔ مطالعه: آنزیم فیتاز (EC 3.1.3.8) به عنوان یک افزودنی غذایی در جیره حیوانات تک معدی، با هدف افزایش میزان جذب فسفات موجود در جیره، در شاخه‌های مختلف علوم تغذیه دام، طیور و آبزیان دارای جایگاه ویژه‌ای می‌باشد. با این وجود اقدامات کافی در زمینه تشدید اثر آن یا رفع موانع عمل بهینه آن صورت نگرفته است.

هدف: این پژوهش با هدف یافتن عوامل فعال‌کننده یا مهارکننده فیتاز در منابع گیاهی غنی از متابولیت‌های ثانویه صورت گرفت.

روش‌کار: آنزیم فیتاز از دانه گندم رقم سرداری استخراج گردید. پس از تهیه عصاره متانولی نمونه‌های گیاهی، اثر آن‌ها در چهار غلظت۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، و ۱ گرم درلیتر، به روش اسپکتروفتومتری میکروپلیت و در طول‌موج ۴۰۵ نانومتر، بر روی فعالیت فیتاز بررسی شد.

نتایج: در میان عصاره‌های متانولی بررسی‌شده، عصاره متانولی چهار گیاه *Pedicularis sibthorpi*i Boiss، *Phlomis persica* Boiss، *Solenanthus Circinatus* Ledeb، *Stachys lavandulifolia* Vahl، اثر مهارکنندگی قابل‌توجهی بر فعالیت آنزیم فیتاز از خود نشان دادند. در مقابل عصاره متانولی شش گیاه *Astragalus caraganae* Hohe، *Hypericum scabrum* L، *Linum album* Ky.ex Boiss، *Valeriana sisymbriifolia* Vahl، *Euphorbia denticulate* Lam، *Rindera lanata* (Lam.)Bge، اثر فعال‌کنندگی قابل‌توجهی بر فعالیت آنزیم فیتاز از خود نشان دادند.

نتیجه‌گیری نهایی: مطابق نتایج این مطالعه می‌توان هم گیاهان دارای خاصیت فعال‌کنندگی فیتاز و هم گیاهان دارای خاصیت مهارکنندگی فیتاز را به‌عنوان منابعی بالقوه جهت استفاده در جیره حیوانات تک معدی با هدف افزایش راندمان جذب فسفات جیره، پیشنهاد نمود. گروه نخست می‌توان را جهت تقویت فعالیت فیتاز به جیره اضافه کرد و اعضای گروه دوم را، اگر به شکلی در رژیم غذایی این حیوانات موجود باشد می‌توان حذف نمود.

کلمات کلیدی: حیوانات تک معدی، فیتاز، گندم، فسفر، عصاره متانولی

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: محمدعلی زارعی، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم دانشگاه کردستان، سنندج، کردستان، ایران
پست الکترونیکی: mazarei@uok.ac.ir

مقدمه

اهمیت مواد معدنی در تغذیه حیوانات از حدود ۲۰۰۰ سال پیش مشخص شده است. در متون علمی وجود ۲۱ عنصر معدنی در جیره ضروری تشخیص داده شده است. مواد معدنی حدود ۴ درصد وزن بدن اکثر مهره‌داران را تشکیل می‌دهند که کلسیم و فسفر بیش از نیمی از این مقدار را در بر می‌گیرند. در این میان کلسیم و فسفر به لحاظ مقدار نسبی حضور در جیره، هزینه تأمین و نیز عوارض سوء ناشی از عدم تأمین آن‌ها به مقدار کافی بیشترین توجه را به خود جلب نموده‌اند (۲۸). فسفر برای حیوانات یک عنصر ضروری می‌باشد که علاوه بر داشتن نقش حیاتی در توسعه و نگهداری بافت اسکلتی، در بسیاری از اعمال متابولیکی نیز اهمیت دارد. فیتک اسید یک فرم آلی فسفر است که برای جانوران تک معده‌ای از قبیل ماکیان، خوک‌ها، ماهیان، انسان و پرندگان قابل‌دسترس نیست؛ چون این جانوران سطح مناسبی از آنزیم‌های هیدرولیز کننده فیتات در دستگاه معدی-روده‌ای خود ندارند (۱،۱۰).

فیتات (میو- اینوزیتول هگزا فسفات) فرم اصلی ذخیره‌ی فسفر در دانه‌های غلات، حبوبات، دانه‌ی گرده و دانه‌های روغنی است (۷،۲۰). این مولکول بسیار باردار است و ۶ گروه فسفات از حلقه میواینوزیتول مرکزی آن امتداد یافته‌اند. فیتیک‌اسید یک فاکتور ضد تغذیه‌ای برای انسان‌ها و دام‌ها به شمار می‌رود؛ زیرا

www.SID.ir

Archive of SID

شلاتور نیرومندی برای کاتیون‌هایی از قبیل Ca^{2+}، Mg^{2+}، $Fe^{2+/3+}$، Zn^{2+}، K^{+}، Mn^{2+} و Cu^{2+} است و از جذب آن‌ها در دستگاه گوارش جانوران جلوگیری می‌کند. همچنین به علت اتصال به مواد مغذی، آمینواسیدها و چربی‌ها، سبب عدم جذب آن‌ها شده و با اتصال به پروتئین‌ها، سبب جلوگیری از عملکرد صحیح آن‌ها در غذای حیوانات شده و درنتیجه میزان مؤثر این مواد را در رژیم غذایی کاهش می‌دهد (۵،۸،۱۵،۱۶). به دلیل نبود آنزیم‌های مؤثر جهت هضم فیتات، مقدار زیادی از فسفر به همراه سایر مواد معدنی و غیره از بدن حیوانات تک معده‌ای دفع می‌گردد. فیتات تجزیه نشده، نه‌تنها سبب کاهش کیفیت مواد غذایی شده بلکه سبب آلودگی‌های زیست‌محیطی نیز می‌شوند (۲۶).

آنزیم فیتاز (EC 3.1.3.8) یک افزودنی مهم تغذیه‌ای برای افزایش دسترسی به فسفر و دیگر مواد معدنی تغذیه‌ای است که در جیره‌ی حیوانات تک معده‌ای، جهت هیدرولیز اسید فیتیک موجود در جیره مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶،۲۱،۲۴). در صنایع بیوتکنولوژی از انواع فیتازها در زمینه‌های مختلف ازجمله در حمایت محیط‌زیست، آبزی‌پروری و کشاورزی استفاده می‌شود (۴،۱۳). از آنزیم‌های فیتاز همچنین به‌عنوان مکمل غذایی جهت افزایش جذب آهن برای مصارف انسانی و همچنین به‌عنوان مکمل در تغذیه ماهی‌ها کاربرد دارد. این آنزیم‌ها، همچنین در صنعت نانوایی، صنایع غذایی و جداسازی پروتئین‌های گیاهی نیز کاربرد دارند (۱۴).

از دید آنزیم‌شناسی فیتازها گروه ویژه‌ای از فسفاتازها یا فسفریک مونواستر هیدرولازها به‌حساب می‌آیند که قادر به هیدرولیز فیتات می‌باشند (۲۳). این آنزیم‌ها از گسترش بالایی در طبیعت برخوردارند و فعالیت فیتازی در گیاهان، جانوران و ریزسازواره‌ها گزارش‌شده است که همگی قادر به رهاسازی فسفات از فیتات هستند که منبع اصلی فسفر در دانه گیاهان می‌باشد (۱۲). بدون شک افزایش توجه عمومی به مسائل زیست محیطی، بهبود تغذیه دام و سلامت انسان باعث توجه به توسعه بیوتکنولوژی فیتازها و کاربرد آن‌ها در حیطه‌های مربوطه شده است (۱۷).

گیاهان به علت تنوع زیستی و ساختمان اجزایشان، منابع منحصربه‌فرد و تجدید شدنی برای کشف داروهای جدید هستند. در کشورهای صنعتی حدود ۵۰ درصد از داروهای تجویزشده از گیاهان مشتق شده است و طبق اعلام سازمان بهداشت جهانی، گیاهان برای حدود ۳/۴ میلیارد نفر به‌عنوان اولین منبع دارویی در کشورهای درحال‌توسعه محسوب می‌شود (۳). از نظر تأثیر مواد مختلف بر روی فعالیت آنزیم یون‌های مختلف مانند روی، مس، فلوراید و EDTA می‌توانند اثر مهارکنندگی و فعال‌کنندگی داشته باشند (۱۴،۲۹). تاکنون گزارشی از اثر گیاهان و عصاره آن‌ها بر فعالیت فیتاز گزارش نشده است؛ در این پژوهش برای اولین بار تأثیر عصاره متانولی اندام‌های هوایی گیاهان مختلف بر روی فعالیت آنزیم فیتاز استخراج‌شده از سبوس گندم واریته سرداری که فعالیت فیتازی بالای آن قبلاً توسط نویسنده مورد بررسی قرار گرفته است (۳۰)، مورد سنجش قرارگرفته است. هدف یافتن گیاهانی بود که احتمالاً توان فعال‌سازی یا مهار بالایی بر روی فعالیت فیتاز دارند. تا بتوان از آن‌ها به‌عنوان یک‌راه‌حل طبیعی و کم‌هزینه، بدون اثرات جانبی برای جلوگیری از مهار و یا افزایش فعالیت آنزیم فیتازی و به‌عنوان مکمل غذایی به جیره‌ی حیوانات تک معدی استفاده نمود.

مواد و روش‌کار

نمونه‌های گیاهی: اندام‌های هوایی گیاهان، توسط کارشناسی ارشد سیستماتیک گیاهی از مناطق مختلف استان جمع‌آوری شدند. پس از شناسایی تاکسونومیک آن‌ها در هرباریوم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کردستان، بلافاصله به آزمایشگاه گروه علوم زیستی منتقل شدند. گیاهان جمع‌آوری‌شده در سایه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. قبل از تهیه پودر از نمونه‌ها، آن‌ها ازلحاظ نظافت و عدم آلودگی به خاک و یا سایر گیاهان بررسی شدند. سپس به‌وسیله قیچی باغبانی به قطعات کوچکی خردشده و به‌وسیله آسیاب مکانیکی به‌صورت پودر نرم درآمدند. پودرهای به‌دست‌آمده پس از توزین در ظروف درب‌دار پلاستیکی تا زمان عصاره‌گیری، در دمای اتاق نگهداری شدند.

تهیه‌ی عصاره متانولی: حدود ۱۰ گرم پودر گیاهی در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول خالص به مدت ۲۴ ساعت (در ظروف تیره و به دور از نور) خیسانده در فواصل زمانی معینی هم‌زده شد. سپس این مخلوط توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ صاف شد. مایع صاف‌شده با استفاده از دستگاه روتاری‌اواپریتور در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شده و پس از تخلیه از مخزن دستگاه، جهت خشک شدن کامل، بر روی شیشه ساعت به قطر ۱۵سانتی‌متر، پخش‌شده و در زیر هود شیمیایی و در دمای محیط قرار گرفت. عصاره‌های خشک‌شده از روی سطح شیشه ساعت جمع‌آوری و در میکروتیوب تا زمان انجام مراحل بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تخلیص عصاره آنزیم: برای استخراج آنزیم فیتاز از روش گیبسون و یولا با مختصر تغییراتی استفاده شد (۱۱). حدود ۱۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

گرم از دانه گندم رقم سرداری که از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کردستان تهیه شده بود آسیاب گردید. بعد از غربال‌کردن پودر حاصل توسط الک فلزی با قطر منافذ ۰/۵میلی‌متر؛ ۱۰ گرم از پودر غربال‌شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر غذا (با pH=۵/۵ حاوی: استات سدیم ۰/۲۲مولار، کلرید کلسیم ۰/۰۰۱ مولار، و محلولِ توییـن-۲۰، با غلظت ۰/۱ گرم در لیتر) حل شد. پس از هم زدن به مدت ۶۰ دقیقه، بشر حاوی مواد فوق به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت و بعد از این مدت مایع رویی این بشر از کاغذ صافی عبور داده شد و در بشر دوم جمع‌آوری گردید سپس محتویات آن توسط سرنگ از فیلتر PVDF به قطرمنافذ ۰/۴۵ میکرومتر، عبور داده شده و در بشر سومی جمع‌آوری گردید و پس از توزیع در الیکوتهای یک میلی‌لیتری، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ، تا مراحل بعدی نگهداری شد. در مراحل بعدی برای رقیق‌سازی آنزیم از بافر رقیق‌سازی (با pH=۵/۵ حاوی: اسید استیک ۰/۰۱ مولار، استات سدیم ۰/۲۲ مولار، کلرید کلسیم ۰/۰۰۱ مولار، و محلول توییـن-۲۰، با غلظت ۰/۱ گرم در لیتر) استفاده شد.

سنجش اولیه فعالیت آنزیمی فیتاز و تعیین پارامترهای سنتیکی آنزیم: برای سنجش فعالیت آنزیم فیتاز با استفاده از روش Tran و همکاران در سال ۲۰۱۱ (۲۷) با مختصر تغییراتی استفاده شده است. نحوه سنجش آنزیمی به روش نقطه پایان (End point) بود. زمان‌های صفر و ۳۰ دقیقه بعد از شروع واکنش مبنای سنجش جذب نوری مخلوط واکنش بودند. از غلظت‌های مختلف پارا-نیترو فنیل فسفات (p-NPP) به‌عنوان سوبسترا استفاده شد. سنجش در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی و در حجم کل چاهک ۱۵۰ میکرولیتر و با استفاده از میکروپلیت‌خوانِ Tecan مدل Sunrise به ترتیب زیر انجام شد. ترکیبات زیر به ترتیب وارد چاهک شدند، ۱۲۰ میکرولیتر بافر استاتِ سدیم (pH=۵/۵، حاوی: استات سدیم ۲۰۰ میلی‌مولار، کلرید کلسیم ۱ میلی‌مولار) ۱۰ میکرولیتر از آنزیم فیتاز و ۲۰ میکرولیتر از سوبسترای پارا-نیترو فنیل فسفات (p-NPP) در غلظت‌های مختلف. به‌منظور مخلوط شدن کامل این اجزاء باهم میکروپلیت داخل دستگاه به مدت ۵ ثانیه مخلوط شد؛ سپس جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد. پس از ۳۰ دقیقه گرمخانه‌ای کردن در دمای ۴۵درجه سانتی‌گراد برای توقف واکنش ۵۰ میکرولیتر سود ۰/۱ مولار به مخلوط فوق اضافه گردید. آنگاه میکروپلیت درون دستگاه میکروپلیت‌خوان قرار گرفت و جذب آن در طول‌موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد. سنجش‌ها با سه بار تکرار انجام شد. چاهک بلانک حاوی اجزاء کامل چاهک تست غیر از آنزیم بود و به‌جای آنزیم ۱۰ میکرولیتر به حجم بافر استات سدیم در این چاهک اضافه شد. بر این اساس شیب نواحی خطی نمودارهای تغییرات جذب در مقابل زمان در غلظت‌های مختلف سوبسترا، (که در واقع سرعت اولیه (V_o) برای آن غلظت از سوبسترا محسوب می‌شود) بدست آمد و در رسم نمودار ثانویه تغییرات سرعت اولیه واکنش در مقابل غلظت سوبسترا و سایر محاسبات بعدی ملاک مقایسه قرار گرفت.

سنجش اثر عصاره‌ها بر روی فعالیت آنزیم فیتاز: در این مطالعه جهت سنجش اثر عصاره‌های گیاهی بر روی فعالیت آنزیم فیتاز نیز از روش اصلاح‌شده‌ی Tran و همکاران در سال ۲۰۱۱ استفاده گردید (۲۷). همه عصاره‌ها چهار غلظت۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، و ۱ گرم در لیتر آزمایش شدند. سنجش‌ها در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی و در حجم کل ۱۵۰ میکرولیتر و با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌خوان به ترتیب زیر انجام شد. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر بافر استات سدیم، ۱۰میکرولیتر محلول فیتاز و ۲۰ میکرولیتر از عصاره (محلول در آب مقطر) اضافه شد. جهت تأثیر ترکیبات موجود در عصاره بر آنزیم، به مدت ۵ دقیقه گرمخانه‌ای شدن انجام شد. برای شروع واکنش، ۲۰ میکرولیتر از سوبسترای پارا-نیترو فنیل فسفات (p-NPP) ۶ میلی‌مولار، به مخلوط واکنش اضافه گردید. پس از ۳۰ دقیقه گرمخانه‌ای کردن در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد برای توقف واکنش ۵۰ میکرولیتر محلول سود ۰/۱ مولار به مخلوط فوق اضافه شد. آنگاه میکروپلیت درون دستگاه میکروپلیت‌خوان قرارگرفته، جذب آن در طول‌موج ۴۰۵ نانومتر، قرائت گردید. تمام سنجش‌ها با سه بار تکرار انجام شدند. هم‌چنین برای سنجش‌های هر میکروپلیت، از کنترل منفی استفاده گردید. در چاهک کنترل منفی بجای عصاره از بافر فسفات استفاده شد. پس از پایان سنجش، جذب پلیت خالی از جذب چاهک‌های متناظر، کسر شد و سپس با تفریق جذب چاهک بلانک از جذب چاهک تست، جذب نهایی محاسبه گردید. سرعت واکنش بر اساس شیب نمودار جذب علیه زمان محاسبه شد. با استفاده از رابطهٔ زیر درصد مهار فیتاز به‌وسیله عصاره بدست آمد. در این معادله عدد منفی بدست آمده نشان‌دهنده فعال‌کنندگی و عدد مثبت نشان‌دهنده مهارکنندگی عصاره متانولی می‌باشد. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار اکسل انجام شد.

درصدمهار={(شیب کنترل منفی)/(شیب عصاره-شیب کنترل منفی)}×۱۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. تأثیرات فعال‌کنندگی یا مهارکنندگی فیتاز، توسط عصاره متانولی گیاهان مختلف.

ردیف	نام علمی گیاه	خانواده	درصد فعال‌کنندگی و مهارکنندگی			
			غلظت‌های عصاره متانولی هرگیاه (گرم/لیتر)			
			۰/۰۰۱	۰/۰۱	۰/۱	۱
۱	*Alcea kurdica* (Flowers)	Malvaceae	۱۷/۳۲	۲۷/۲۳	۳/۱۹	۰/۰۰
۲	*Alcea kurdica* (Leaves)	Malvaceae	۱/۸۵	۷/۹۴	۶/۱۷	۱۷/۰۶
۳	*Allium stipitatum* Boiss.	Alliaceae	۲/۹۶	۰/۰۰	۵/۸۶	۲۹/۱۷
۴	*Asperugo procumbens* L.	Boraginaceae	-۱۶/۱۵	-۱۵/۰۰	-۸/۰۴	-۳/۹۳
۵	*Astragalus caraganae* Hohen.	Papilionaceae	-۳۳/۷۸	-۵۵/۱۷	-۴۵/۸۱	۰/۲۲
۶	*Astragalus caryolobus* Bge	Papilionaceae	۸/۰۹	۹/۶۶	۰/۳۰	۱۱/۱۴
۷	*Astragalus cyclophyllon* G.Beck	Papilionaceae	۹/۰۷	۹/۵۲	۱/۶۲	۱۸/۴۴
۸	*Astragalus glumaceus* (Leaves)	Fabaceae	-۳/۰۳	۳/۱۶	۴۸/۸۵	۲۴/۶۸
۹	*Astragalus siliquosus* Boiss.subsp.siliquosus	Papilionaceae	۵/۵۰	۳/۰۶	۳/۹۵	۱۹/۳۴
۱۰	*Campanula involucrata* Auch.ex DC.	Campanulaceae	۱۵/۲۷	۰/۰۰	۱۵/۶۰	۴۵/۴۱
۱۱	*Centaurea Behen* L.	Asteraceae	-۲۲/۷۶	-۲۵/۸۸	-۱۹/۸۷	۵/۳۸
۱۲	*Chaerophyllum macropodum* Boiss.	Apiaceae	-۲۹/۲۹	-۱۱/۶۷	-۱۳/۵۹	۸/۰۵
۱۳	*Conium maculatum* L.	Apiaceae	-۳۱/۲۵	-۲۶/۸۶	-۸۱/۲۶	-۲۵/۲۵
۱۴	*Crambe orientalis* L.	Brassicaceae	-۲۰/۱۹	-۱۵/۹۷	-۱۱/۸۳	-۸/۷۸
۱۵	*Cruciata taurica* (Pall.ex Willd) Ehrend	Rubiaceae	-۸۵/۶	-۷/۹۱	۷/۸۹	۴۶/۳۵
۱۶	*Descurainia sophia* (L.) Webb & Berth.	Brassicaceae	-۱۶/۸۱	-۹/۶۹	-۸/۶۶	۲۷/۴۷
۱۷	*Eremostachys macrophylla* Montbr. & Auch	Lamiaceae	-۳/۳۰	۰/۹۵	-۲/۱۱	۱۲/۵۸
۱۸	*Euphorbia denticulate* Lam.	Euphorbiaceae	-۴۱/۹۴	-۲۲/۲۶	-۳۸/۳۹	-۵۸/۶۷
۱۹	*Ferula haussknechtii* Wolff ex Rech.	Apiaceae	-۱/۷۰	-۱۸/۴۳	-۱۶/۷۲	۳۵/۸۳
۲۰	*Fumaria vaillantii* Loisel.	Fumariaceae	۱۹/۲۷	۲/۳۵	۱۱/۷۰	۳۲/۵۴
۲۱	*Heptaptera anatolica* (Boiss.) Tutin	Apiaceae	۱۱/۴۰	۷/۳۸	۲/۵۵	۴۷/۴۴
۲۲	*Hypericum scabrum* L.	Guttiferae	-۵۸/۸۵	-۴۰/۸۷	-۴۲/۷۶	۲۳/۵۲
۲۳	*Leontice leontopetalum* L.	Podophyllaceae	۵/۷۰	۱۱/۵۰	۴/۰۲	۲۸/۹۲

www.SID.ir

Archive of SID

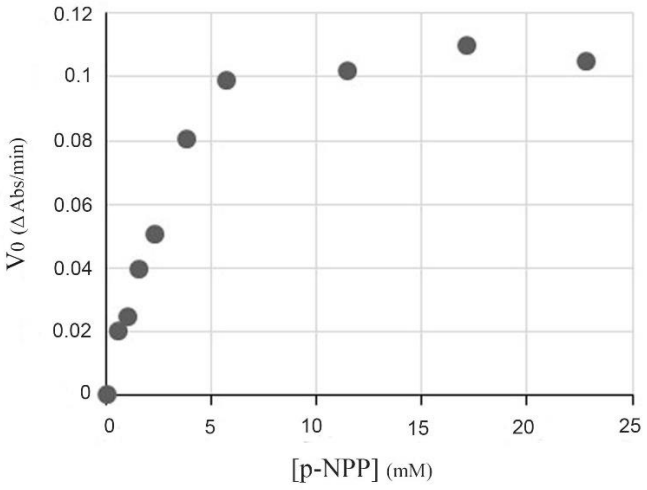
ردیف	نام علمی گیاه	خانواده	درصد فعال‌کنندگی و مهارکنندگی			
			غلظت‌های عصاره متانولی هرگیاه (گرم/لیتر)			
			۰/۰۰۱	۰/۰۱	۰/۱	۱
۲۴	*Linum album* Ky.ex Boiss.	Linaceae	-۵۱/۵۱	-۵۱/۷۱	-۵۱/۳۵	-۳۷/۲۹
۲۵	*Linum glaucum* Boiss.& Noe	Linaceae	۳۴/۹۸	۱/۸۵	۳/۴۲	۱۳/۱۰
۲۶	*Marrubium cuneatum* Russell	Lamiaceae	۴/۹۰	۴/۴۷	۱۲/۱۶	۲۲/۲۸
۲۷	*Nonea hypoleia* Bornm.	Boraginaceae	۲/۴۶	-۶/۶۸	-۱۴/۰۰	۲۳/۷۵
۲۸	*Pedicularis sibthorpii* Boiss	Scrophulariaceae	۰/۰۰	۲/۹۱	۱۳/۱۹	۵۶/۳۵
۲۹	*Peganum harmala* L.var. harmala	Zygophyllaceae	۲۴/۱۷	۲/۴۴	۰/۰۰	۱۱/۱۲
۳۰	*Phlomis persica* Boiss.	Lamiaceae	۱/۸۹	۸/۴۹	۱۲/۷۵	۵۷/۱۰
۳۱	*Rindera lanata* (Lam.) Bge.	Boraginaceae	-۴۴/۸۳	-۶۶/۹۱	-۲۹/۱۸	-۲۰/۹۸
۳۲	*Saccharum ravennae*	Poaceae	-۲۱/۶۰	-۱۶/۳۳	-۸/۲۲	۴۵/۳۴
۳۳	*Scorzonera calyculata* Boiss.	Asteraceae	-۱۱/۱۶	-۱۹/۷۵	۲/۵۰	۳۲/۲۸
۳۴	*Silene commelinifolia* Boiss.	Caryophyllaceae	-۴۴/۳۰	-۲۷/۲۱	-۳۸/۱۱	۴۷/۱۴
۳۵	*Silene latifolia* Poir.	Caryophyllaceae	-۱۳/۱۴	-۸/۷۷	-۶/۷۸	-۹/۱۳
۳۶	*Solenanthus circinatus* Ledeb.	Boraginaceae	۳/۷۸	-۴/۴۷	۲/۱۸	۶۸/۹۹
۳۷	*Stroganowia persica* Busch	Brassicaceae	-۲۴/۹۳	۱۷/۶۳	-۲۲/۵۰	۱۴/۹۶
۳۸	*Stachys lavandulifolia* Vahl	Lamiaceae	۳۴/۵۵	۱۰/۳۶	۱۶/۰۵	۶۹/۲۰
۳۹	*Valeriana sisymbriifolia* Vahl	Valerianaceae	-۴۵/۸۹	-۵۲/۰۷	-۴۲/۸۴	-۲۶/۰۵
۴۰	*Veronica orientalis* Miller	Scrophulariaceae	-۹/۲۸	-۱۸/۹۶	-۳۰/۹۳	۵/۷۱
۴۱	*Vicia hyrcanica* Fisch. & C. A. Mey.	Papilionaceae	-۲/۹۹	-۱۷/۲۸	-۱۹/۳۴	۵/۹۶

نتایج

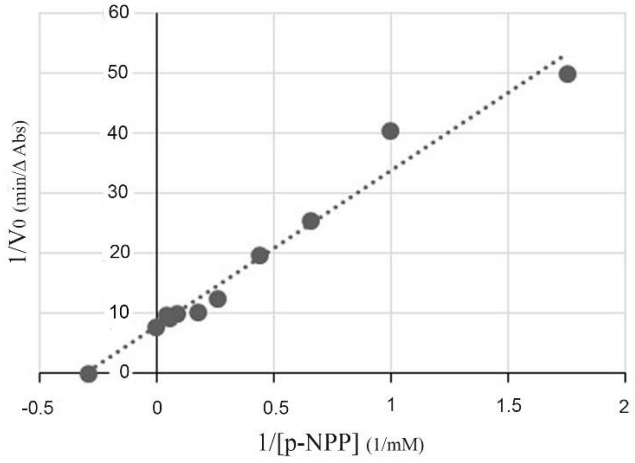
نتایج سنجش اولیه فعالیت آنزیمی فیتاز و تعیین پارامترهای سنتیکی فیتاز: نمودار تغییرات سرعت اولیه واکنش فیتاز در مقابل تغییرات غلظت‌های مختلف سوبسترا تا غلظت ۶ میلی‌مولار، دارای شکل سهمی راست‌گوشه بود که نشان‌دهنده پیروی رفتار فیتاز از مدل میکائیلیس– منتن است (تصویر ۱). در غلظت‌های بالاتر از این مقدار سرعت اولیه واکنش شروع به کاهش می‌نمود که نشانگر نوعی مهار توسط سوبسترا می‌باشد. با استفاده از رویکردهای خطی مانند رویکرد لاینویوور– برک، مقدار K_m برابر با ۰/۱ میلی‌مولار، و مقدار V_{max} برابر با ۰/۹ میلی‌مولار در دقیقه تعیین شدند (تصویر ۲). بر اساس نتایج این بخش از مطالعات غلظت ۶ میلی‌مولار از سوبسترا برای سنجش اثرات فعال‌کنندگی یا مهارکنندگی عصاره‌های گیاهی برای فعالیت آنزیم فیتاز انتخاب شد.

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۱. تغییرات سرعت واکنش فیتاز در مقابل سوبسترای پارانیترو فنیل فسفات.



تصویر ۲. نمودار معکوس مضاعف (لاینویور-برک) برای واکنش فیتاز در مقابل سوبسترای پارانیترو فنیل فسفات.

نتایج سنجش اثر عصاره‌ها بر روی فعالیت آنزیم فیتاز:

در میان گیاهانی که بدین روش بررسی شدند، آن‌هایی که اثرِ مهارکنندگی و فعال‌کنندگی بالاتر از ۵۰ درصد داشته‌اند، به عنوان گیاهان دارای اثرِ مهارکنندگی و فعال‌کنندگی قوی طبقه‌بندی شدند. در این میان چهار گیاه *Pedicularis sibthorpii* Boiss (در غلظت ۱ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر؛ ۵۶/۳۵ درصد)، *Phlomis persica* Boiss (در غلظتِ ۱ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر؛ ۵۷/۱۰ درصد)، *Solenanthus circinatus* Ledeb (در غلظتِ ۱ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر؛ ۶۸/۹۹ درصد)، *Stachys lavandulifolia* Vahl (در غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر؛ ۶۹/۲۰ درصد)، اثر مهارکنندگی بالای ۵۰ درصد، از خود نشان دادند (جدول ۱).

همچنین شش گیاه *Astragalus caraganae* Hohe (در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر؛ ۵۵/۱۷- درصد)، *Hypericum scabrum* L (در غلظت ۰/۰۰۱ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر؛ ۵۸/۸۵- درصد)، *Linum album Ky.ex Boiss* (در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر، به ترتیب ۵۱/۳۵- درصد ۵۱/۷۱- درصد و ۵۱/۵۱- درصد)، *Valeriana sisymbriifolia* Vahl (در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر؛ ۵۲/۰۷- درصد)، *Euphorbia denticulate* Lam (در غلظت ۱ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر؛ ۵۸/۶۷- درصد)، *Rindera lanata* (Lam.)Bge (در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر؛ ۶۶/۹۱- درصد) ، اثر فعال‌کنندگی بالای ۵۰ درصد از خود نشان دادند (جدول ۱). نتایج مربوط به سایر گیاهان و سایر غلظت‌های کارشده به‌طور کامل در جدول (۱) آمده است.

بحث

آنزیم فیتاز اغلب در بذر و دانه گرده گیاهان عالی از قبیل غلات، دانه‌های روغنی و مغزدارها یافت شده و به میزان کمتر در ریشه گیاهان وجود دارد (۱۲). فعالیت فیتازی در موقع جوانه زدن بذر و دانه گرده به کار می‌آید. در بذر گیاهان به هنگام جوانه زدن فعالیت فیتازی افزایش سریعی نشان می‌دهد (۹). بیشترین فعالیت فیتازی در غلاتی چون چاودار، جو و گندم از ۱۰۰ تا ۷۰۰۰ واحد فعالیت در کیلوگرم، گزارش شده است (۲۶).

جانوران تک معدی از قبیل خوک، طیور و ماهی به دلیل فقدان فیتاز در سیستم گوارشی خود قادر به استفاده از فیتات موجود در جیره غذایی خود نمی‌باشند؛ بنابراین برای تأمین فسفات معدنی موردنیاز، آنزیم فیتاز به جیره آن‌ها افزوده می‌شود. از طرفی افزودن فسفر به جیره، به‌صورت معدنی و قابل‌جذب دارای اثرات زیان‌بارتری بوده و گزینه مناسبی نیست (۲،۱۹). همچنین هزینه زیاد تخلیص فیتاز و افزودن آن به جیره غذایی خود یکی دیگر از مشکلات است (۲۲). نکته قابل‌توجه آن است که زمان کم حضور فیتات در سیستم گوارشی پرندگان و محدودیت pH حاکم بر سیستم گوارشی آن‌ها، اجازه تجزیه کامل را به آن نخواهد داد و فیتازهای افزودنی تنها قادر به تجزیه ۳۵ درصد فیتات جیره خواهند بود (۲۵).

از روش‌های مختلفی برای سنجش فعالیت فیتاز استفاده شده است و مقادیر K_m گزارش شده برای آن‌ها از ۱۰ تا ۶۵۰ میکرومولار متغییر است. فیتازهای گیاهی نیز از نظر سنتیک

www.SID.ir

Archive of SID

تفاوت قابل‌توجهی نشان می‌دهند. در این پژوهش از روش میکرو برای سنجش و تعیین پارامترهای سنتیکی استفاده شده است و مقدار K_m تعیین‌شده (۱۰۰ میکرومولار) در محدوده مقادیر گزارش شده برای فیتازهای گیاهی است که K_m آن‌ها از ۳۰ تا ۳۰۰ میکرومولار متغیر می‌باشد (۱۸).

هزینه زیاد تخلیص و تجاری‌سازی آنزیم‌ها و از دست دادن فعالیت مناسب ویژه می‌تواند یکی از مشکلات افزودن آنزیم فیتاز به غذای جانوران باشد. از طرف دیگر استفاده از فیتاز با منشأ گیاهی در جیره غذایی جانوران تک معده‌ای از قبیل خوک، طیور، ماهی و همچنین شناسایی عوامل دارای اثر فعال‌کنندگی یا مهارکنندگی فعالیت آنزیم فیتاز که افزودن (برای فعال‌کننده) یا حذف (برای مهارکننده) منابع گیاهی آن‌ها از جیره غذایی می‌تواند باعث افزایش فعالیت فیتازی، جذب فسفر و کم کردن اثرات زیان‌بار آن و کاهش هزینه مربوط به افزودن آنزیم به جیره غذایی جانوران شود. در همین راستا و برای اولین بار با توجه به نتایج این پژوهش (جدول ۱) در میان گیاهان غربالگری شده چهار گیاه دارای خاصیت مهارکنندگی و شش گیاه دارای خاصیت فعال-کنندگی بالایی ۵۰ درصد بر روی فعالیت فیتاز بودند. افزودن گیاهان دارای اثر فعال‌کنندگی یا عصاره آن‌ها به جیره غذایی می-تواند یک‌راه تشدید فعالیت فیتاز موجود در منابع گیاهی جیره غذایی بوده و یک راه‌حل با منشاء طبیعی باشد. همچنین می‌توان با حذف گیاهانی دارای خاصیت مهارکنندگی از جیره غذایی باعث افزایش فعالیت فیتاز طبیعی موجود در گیاهان و دانه‌های آن‌ها شد. موارد فوق طبعاً نیاز به تحقیقات بیشتر و پژوهش‌های در همین راستا دارد. لازم به ذکر است که غربالگری عصاره متانولی گیاهان و اثر مهاری یا فعال‌کنندگی گونه‌های گیاهی ذکرشده در این مطالعه بر روی آنزیم فیتاز برای اولین بار بررسی‌شده و مطالعه مشابهی تاکنون صورت نگرفته است.

نتیجه‌گیری نهایی: نتایج این پژوهش نشان داد که چهار گیاه *Phlomis persica* Boiss، *Pedicularis sibthorpii* Boiss، *Solenanthus Circinatus* Ledeb، *Stachys lavandulifolia* Vahl فعالیت مهارکنندگی؛ و شش گیاه *Astragalus caraganae* Hohe، *Hypericum scabrum* L، *Linum album* Ky.ex Boiss، *Valeriana sisymbriifolia* Vahl، *Euphorbia denticulate* Lam، *Rindera lanata* (Lam.)Bge، فعالیت فعال‌کنندگی بالایی ۵۰ درصد را بر روی آنزیم فیتاز داشته‌اند. لذا جداسازی و خالص‌سازی عوامل بالقوه مؤثر در این گیاهان و تأثیر آن‌ها بر روی فیتاز می‌تواند موضوع مناسبی برای پژوهش‌هایی آینده باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان، بدین‌وسیله از آقای مهندس حسین معروفی عضو هیئت‌علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کردستان به دلیل کمک‌های کارشناسی در جمع‌آوری و شناسایی علمی نمونه‌های گیاهی، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Balwani, I., Chakravarty, K., Gaur, S. (2017). Role of phytase producing microorganisms towards agricultural sustainability. Biocatal Agric Biotechnol, 12, 23-29. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.08.010
2. Bekalu, Z. E., Madsen, C. K., Dionisio, G., Brinch-Pedersen, H. (2017). Aspergillus ficuum phytase activity is inhibited by cereal grain components. PloS one, 12(5), e0176838. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176838 PMID: 28472144
3. Benamar, H., Rached, W., Derdour, A., Marouf, A. (2010). Screening of Algerian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. J Biol Sci, 10, 1-9. https://scialert.net/abstract/?doi=jbs.2010.1.9
4. Chen, R., Xue, G., Chen, P., Yao, B., Yang, W., Ma, Shi, J. (2008). Transgenic maize plants expressing a fungal phytase gene. Transgenic Res, 17, 633-643. https://doi.org/ 10.1007/s11248-007-9138-3 PMID: 17932782
5. Cowieson, A. J., Ruckebusch, J. P., Sorbara, J. O. B., Wilson, J. W., Guggenbuhl, P., Tanadini, L., Roos, F. F. (2017). A systematic view on the effect of microbial phytase on ileal amino acid digestibility in pigs. Anim Feed Sci Technol, 231, 138-149. http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.anifeedsci.2017.07.007
6. Dersjant-Li, Y., Plumstead, P., Awati, A., Remus, J. (2018). Productive performance of commercial growing and finishing pigs supplemented with a Buttiauxella phytase as a total replacement of inorganic phosphate. Animal Nutrition, 4, 351-357. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.02.002
7. Dersjant-Li, Y., Wealleans, A. L., Barnard, L. P., Lane, S. (2017). Effect of increasing Buttiauxella phytase dose on nutrient digestibility and performance in weaned piglets fed corn or wheat based diets. Anim Feed Sci Technol, 234, 101-109. http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.09.008
8. De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M. R., Mc Sweeney, P. L., Faccia, M., Giovine, M., Gobbetti, M. (2003). Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from Lactobacillus sanfranciscensis CB1. Int J Food Microbial, 87, 259-270. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00072-2

www.SID.ir

Archive of SID

9. Dvorakova, J. (1998). Phytase: sources, preparation and exploitation. Folia Microbial, 43, 323-338. https://doi.org/10.1007/bf02818571 PMID: 9821286

10. Esakkiraj, P., Sandoval, G., Sankaralingam, S., Immanuel, G., Palavesam, A. (2010). Preliminary optimization of solid-state phytase production by moderately halophilic Pseudomonas AP-MSU 2 isolated from fish intestine. Ann Microbial, 60, 461-468. https://doi.org/ 10.1007/s13213-010-0064-x

11. Gibson, D. M., Ullah, A. H. (1988). Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds. Arch Biochem Biophys, 260, 503-513. https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90475-4

12. Jain, J., Singh, B. (2016). Characteristics and biotechnological applications of bacterial phytases. Process Biochem, 51, 159-169. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.12.004

13. Jorquera, M., Martinez, O. S. C. A. R., Maruyama, F., Marschner, P., de la Luz Mora, M. (2008). Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. Microbes Environ, 23, 182-191. https://doi.org/10.1264/jsme2.23.182

14. Konietzny, U., Greiner, R. (2002). Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). Int J Food Sci Tech, 37, 791-812. https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00617.x

15. Kumar, V., Sinha, A. K., Makkar, H. P., Becker, K. (2010). Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. Food Chem, 120, 945-959. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.052

16. Lee, L. Y., Mitchell, A. E. (2018). Determination of D-myo-inositol phosphates in "activated" raw almonds using anion exchange chromatography coupled with tandem mass spectrometry LC-MS/MS. J Sci Food Agric, 99, 117-123. https://doi.org/10.1002/jsfa.9151 PMID: 29808577

17. Lei, X. G., Ku, P. K., Miller, E. R., Yokoyama, M. T., Ullrey, D. E. (1993). Supplementing corn-soybean meal diets with microbial phytase maximizes phytate phosphorus utilization by weanling pigs. J Anim Sci, 71, 3368-3375. https://doi.org/10.2527/1993.71123368x PMID: 8294289

18. Lei, X. G., Porres, J. M., Mullaney, E. J., Brinch-Pedersen, H. (2007). Phytase: source, structure and application. Polaina, J., MacCabe, A. P. (eds.). (1st ed.) Springer. Dordrecht, Netherlands. p. 505-530.

19. Lei, X. G., Porres, J. M. (2003). Phytase enzymology, applications, and biotechnology. Biotechnol let, 25, 1787-1794. PMID: 14677699.

20. Lott, J. N., Ockenden, I., Raboy, V., Batten, G. D. (2000). Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: a global estimate. Seed Sci Res, 10, 11-33. https://doi.org/10.1017/S0960258500000039

21. Muslim, S. N., Ali, A. N. M., AL-Kadmy, I. M., Khazaal, S. S., Ibrahim, S. A., Al-Saryi, N. A, Aziz, S. N. (2017). Screening, nutritional optimization and purification for phytase produced by Enterobacter aerogenes and its role in enhancement of hydrocarbons degradation and biofilm inhibition. Microb Pathog, 115, 159-167. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.047 PMID: 29269246

22. Nelson, T. S., Shieh, T. R., Wodzinski, R. J., Ware, J. H. (1968). The availability of phytate phosphorus in soybean meal before and after treatment with a mold phytase. Poultry Sci, 47, 1842-1848. https://doi.org/10.3382/ps.0471842

23. Nuobariene, L., Cizeikiene, D., Gradzeviciute, E., Hansen, A. S., Rasmussen, S. K., Juodeikiene, G., Vogensen, F. K. (2015). Phytase-active lactic acid bacteria from sourdoughs: Isolation and identification. LWT-Food Sci Technol, 63(1), 766-772. http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.018 PMID: 26397032

24. Reddy, N. R., Sathe, S. K., Salunkhe, D. K. (1982). Phytates in legumes and cereals. Adv Food Res, 28, 1-92. https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60110-X PMID: 6299067

25. Selle, P. H., Ravindran, V. (2007). Microbial phytase in poultry nutrition. Anim Feed Sci Tech, 135, 1-41. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.010

26. Singh, B. (2017). Purification and characterization of a protease-resistant phytase of Aspergillus oryzae SBS50 whose properties make it exceptionally useful as a feed supplement. Int J Biol Macromol, 103, 458-466. http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.05.077 PMID: 28527994

27. Tran, T. T., Hatti-Kaul, R., Dalsgaard, S., Yu, S. (2011). A simple and fast kinetic assay for phytases using phytic acid–protein complex as substrate. Anal Biochem, 410, 177-184. https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.10.034 PMID: 21050837

28. Waldroup, P. W., Ammerman, C. B., Harms, R. H. (1965). The utilization of phosphorus from animal protein sources for chicks. Poultry Sci, 44, 1302-1306. https://doi.org/10.3382/ps.0441302

29. Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Rémy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., van Loon, A. P. (1999). Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. Appl Environ Microb, 65, 367-373. PMID: 9925555

30. Zarei, M.A. (2007). Phytase Activity in the Grain of 6 Varieties of Wheat Cultivated in Kurdistan Province. Int J Poult Sci, 6, 634-636. https://doi.org/10.3923/ijps.2007.634.636

www.SID.ir