Archive of SID

سومین همایش ملی مباحث نوین در کشاورزی
3rd National Conference on New Concepts in Agriculture
دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه
دانشکده کشاورزی
پنجشنبه ۲۶ آذرماه ۱۳۹۴

بررسی روش‌های کنترل متابولیت‌های ثانویه گیاهی و رابطه آن با کاهش نفخ در دام‌ها

حجت‌الله مظاهری‌لقب[۱]، محمدابراهیم صلواتی*[۲]، و سعیده صلواتی[۳]

۱. دانشیار، رشته زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

۲*. کارشناسی‌ارشد فیزیولوژی دامی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین

۳. عضو هیئت علمی، گروه علمی علوم کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران

* Email: s.salavati@pnu.ac.ir

چکیده

یونجه علاوه بر داشتن عملکرد و خوش خوراکی بالا، با برخوردار بودن از ترکیبات پروتئینی، آلکالوئیدی، فنلی و ساپونین‌های تریترپنوئیدی، تفاوت‌ها و مزیت‌هایی نسبت به سایر علوفه‌ها دارد. علاوه بر ترکیبات پروتئینی، ترکیبات دیگری مثل ترکیبات متابولیکی ثانویه گلیکوسایدی از جمله ساپونین‌ها در گیاه یونجه به وفور یافت می‌شوند. این ساپونین‌ها به عنوان عامل نفخ در دام مطرح شده‌اند. وجود سطح بالای ساپونین از کیفیت غذایی یونجه کم می‌کند. وجود و افزایش بیشتر این ترکیبات در یونجه سبب تلخی گیاه و پائین آمدن خوش خوراکی آن برای دام می‌شود. علاوه بر این، ساپونین‌ها با داشتن خصوصیات آمفی پاتیک مانع از خروج گازهای معدی مثل آمونیاک می‌گردد و لذا باعث تلف شدن دام می‌شود. هدف از این پژوهش بررسی اثر کاهشی ترکیبات ساپونینی توسط آنزیم گیاهانی نظیر بادام و یونجه می‌باشد. آنزیم‌های اختصاصی موجود در بافت‌های گیاهی ترکیباتی با فعالیت بیولوژیکی متفاوت را کاتالیز می‌نمایند. به‌عنوان مثال گلیکوسیلاسیون توسط آنزیم‌ها، باعث کاهش سمیت ساپونین‌ها می‌شود. به همین منظور بافت‌های ریشه و شاخ و برگ در ازت مایع منجمد، و بعد از پودر شدن به وسیله الکل متانول ۸۰٪ مورد عمل استخراج ساپونینی قرار گرفتند. عصاره‌های خام ساپونینی به وسیله بوتانل اشباع از آب و متعاقباً رسوب‌سازی ساپونین‌ها با دی اتیل اتر مورد خالص‌سازی بیشتر قرار گرفتند تا ترکیبات غیرساپونینی حذف گردیدند. فعالیت آنزیمی از طریق کرماتوگرافی لایه نازک و زیر نور فرابنفش ارزیابی شد و مشخص شد که یونجه خود حاوی آنزیم‌های گلیکوسایداز قادر به هیدرولیز ساپونین‌های خودش می‌باشد و نیز آنزیم بادام اثراتی داشت که مقدار آن بسیار اندک بود.

کلمات کلیدی: آنزیم، دام، ساپونین، نفخ.

مقدمه

یونجه با دارا بودن ترکیبات ساپونینی، علاوه بر دارا بودن خواص دارویی و درمانی، باعث ایجاد نفخ در سیستم گوارشی موجود استفاده کننده از آن می‌گردد. این عیب در بعضی مواقع با مرگ موجود همراه بوده است. در صورتی که عاملی بتواند این ترکیب را هیدرولیز نماید و باعث کاهش خاصیت آمفی پاتیکی آن شود، آن را بیشتر قابل استفاده می‌کند.

از آن‌جایی که ساپونین‌ها ممکن است یک اثر مهم فیزیولوژیکی روی دام‌های با اهمیت در کشاورزی داشته باشند، این طور استنباط شده است که بایستی واریته‌های با ساپونین کم توسعه یابند. در صورتی‌که این تصور هم وجود دارد که یک واریته تولید کننده ساپونین زیاد نیز ممکن است مطلوب و مورد توجه باشد. این بیان کننده و توجیه کننده این مطلب است که متابولیت‌های ثانویه مثل ساپونین‌ها می‌توانند هم اثرات مضر مثل ایجاد نفخ در دام و هم اثرات مفید مثل خاصیت ضدحشرات و بیماری‌ها را در گیاهان زراعی داشته باشند(۷).

www.SID.ir

Archive of SID

سمیت بعضی از ترکیبات ثانویه گیاهی بستگی به این دارد که آیا آن‌ها گلیکوسیلات شده‌اند یا خیر؟ ثابت شده که عمل گلیکوسیلاسیون سبب کاهش سمیت ساپونین‌ها می‌شود (۹،۸). برخی از قارچ‌ها به دلیل داشتن آنزیم‌هایی قادرند تا غشاء سلولی را از بین ببرند و مقاومت ذاتی نسبت به ساپونین‌ها پیدا کنند.

ساپونین‌ها که نامشان از توانایی به عمل صابونی شدن در محلول‌های آبکی مشتق می‌شوند، گروهی از ترکیبات متفاوت و پیچیده شیمیایی هستند که به‌طور طبیعی در گیاهان و مقدار کمتری در حیوانات آبزی مثل ستاره دریایی و خیار دریایی یافت می‌شوند (۵). این ترکیبات به‌طور زیادی در گونه‌های لگومینوز مثل یونجه یافت می‌شوند (٤). ساپونین‌ها معمولاً به عنوان ترکیبات پیچیده‌ای هستند که مقدار آن‌ها نیز با هم فرق دارد.

از خصوصیات بیولوژیکی ساپونین‌ها می‌توان به قابلیت فعالیت آن‌ها در ضدیت با التهاب، بیماری هیپوکلسترولامیک (کاهش چربی خون)، ضد بارداری، کف‌کنندگی، همولیز گلبول‌های قرمز خون، ممانعت کنندگی از رشد جوجه‌های مرغ در مرغ‌داری‌ها، کاهش تولید تخم‌مرغ، نفخ دام، کاهش در جوانه‌زنی بذر، خاصیت حشره کشی، ضد قارچی، و فعالیت‌های آللوپاتی اشاره کرد.

گیاه یونجه به‌طور ذاتی با داشتن ترکیباتی با اثرات بیولوژیکی بالا مثل ساپونین‌ها، اسیدهای آمینه سمی، فنل‌ها، و دیگر ترکیباتی که مجموعاً مواد آللوکمیک *(Allelochemoc compounds)* نام دارند (٦)، گیاه نسبتاً مقاومی در برابر حمله آفات و بیماری‌ها می‌باشد. از میان ترکیبات فوق، ساپونین‌ها متابولیت‌های ثانویه‌ای به صورت گلیکوسایدهای تری ترپنوئیدی هستند که یا متشکل از یک استروئید با ۲۷ کربن است و یا حاوی هسته ساپوژنینی تریترپنوئید متشکل از یک آگلیکن ۳۰ کربنه با یک یا چند شاخه قندی می‌باشند.

علیزاده (۱۳۷۹) از واریته‌ای از یونجه به‌نام زاپکو *(Szapko)* با داشتن خصوصیت مقاومت به استرس‌های زیستی یاد کرد و چنین افزود که مقدار ساپونین در این نوع یونجه پایین است. لذا وی از این واریته به عنوان واریته‌ای با اهمیت که در تغذیه دام می‌تواند مفید باشد، ذکر کرد و آن را در جهت اصلاح این گیاه نیز توصیه کرد.

در نشخوارکنندگان تولید مقادیر بسیار بالایی حباب‌های گازی حاصل از تخمیر مواد غذایی که نهایتاً منجر به نفخ می‌گردد، اختلال در موکوس‌های سلول دیواره روده کوچک که باعث جلوگیری از تحرک، تبادل و انتقال مواد مغذی از دیواره روده می‌شود، تنفس شدید و غیرمنظم، افزایش ترشح بزاق، اسهال و استفراغ، اختلال در عملکرد کبد و کلیه، کاهش تخمیر میکروبی و هضم مواد مغذی در شکمبه در اثر وجود ساپونین‌ها مشاهده شده است. طیور نیز حساسیت بالایی به ساپونین‌ها داشته که تغییر در قابلیت نفوذپذیری سلول‌ها و در نتیجه مسمومیت‌زایی از آن جمله می‌باشد، بیست درصد یونجه در جیره طیور می‌تواند معادل ۰/۳ درصد ساپونین داشته باشد(۱).

مواد و روش‌ها

به منظور اثبات اثرات هیدرولیزی ساپونین‌ها در یونجه، ابتدا بافت گیاه با ازت مایع منجمد، در هاون چینی پودر، ساپونین‌ها از پودر حاصل در الکل ۸۰٪ استخراج و الکل موجود به‌وسیله دستگاه تبخیر کننده چرخشی تبخیر گردید. ساپونین‌ها با بوتانل خالص گردیدند. رسوب حاصل در حداقل حجم متانول حل گردید و با دی اتیل اتر مخلوط گردید تا فقط ساپونین‌ها رسوب یافتند.

www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت آنزیم بتا-دی-گلوکوسایداز بادام با به‌کارگیری ساپونین‌های ریشه و برگ گیاهچه‌های یونجه به‌عنوان سابسترا ارزیابی شد. ارزیابی‌های آنزیمی با ۱۰ میکرو لیتر آنزیم بادام و ۹۰ میکرو لیتر از ساپونین‌های مخلوط و خالص شده با غلظت ۰/۱٪ در ۳۹۰ میکرو لیتر بافر استات با PH=5 و حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ساعت در حالی‌که مورد لغزش و تکان‌های ملایم قرار داشت، خوابانده شد. واکنش با اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر بوتانول اشباع از آب متوقف شد. ساپونین‌ها ۳ بار با بوتانول اشباع مورد عمل استخراج قرار گرفتند. بعد از تبخیر الکل، مواد جامد باقی‌مانده در ۵۰ میکرو لیتر متانول شسته شد. فعالیت آنزیمی از طریق تکنیک کروماتوگرافی لایه نازک و تحت اشعه فرابنفش ارزیابی شد.

به منظور بررسی فعالیت کاتالیزوری آنزیم در گیاه، آنزیم از بافت‌های برگی یونجه با به‌کارگیری بافر تریس حاوی ۱۴ میلی‌مولار مش (MESH)، ۱ میلی‌مولار فتیل متیل سولفونیل فلوراید و ۲ میلی‌مولار EDTA هموژنایز و استخراج گردید. فراکشن ساپونینی Rc بعد از استخراج ساپونین‌های خام ریشه یونجه و خالص‌سازی با بوتانول و در نهایت با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) به‌دست آمد.

نتایج و بحث

آنزیم‌های اختصاصی موجود در بافت‌های گیاهی ترکیباتی با فعالیت بیولوژیکی متفاوت را کاتالیز می‌نمایند. مثلاً گلیکوسیلاسیون توسط آنزیم‌ها، باعث کاهش سمیت ساپونین‌ها می‌شود. گونه‌هایی از حشرات هم قادر به هیدرولیز ساپونین‌های یونجه هستند و یا یونجه خود حاوی آنزیم‌های گلیکوسایداز قادر به هیدرولیز ساپونین‌های خودش می‌باشد. در آزمایش جداگانه‌ای، عصاره آنزیم برگ‌های گیاهچه‌ای یونجه اثرات و فعالیت‌های هیدرولیکی کمی روی ساپونین‌های ریشه و شاخه و برگ نشان داد. با روشن شدن وجود چنین آنزیم‌هایی در یونجه، توجه به تغییراتی که در مراحل رشدی مختلف در هیدرولیز و سنتز ساپونین‌ها ایجاد می‌شود، می‌تواند بیانگر بیان آنزیم‌های متنوع کاتالیزوری در گیاه یونجه طی رشد باشد. طی مراحل رشدی مختلف، ممکن است آنزیم‌هایی فعال شوند و برعکس بعضی از فعال‌ها به حالت غیرفعال درآیند(۳).

ارزیابی آنزیمی روی ساپونین‌های خالص شده به‌عمل آمد، عصاره آنزیمی یونجه فعالیت هیدرولیتیکی روی فراکشن RC با Rf=0.17 داشت اما هیچ فعالیتی بر روی سویا ساپونین I نداشت. آنزیم بادام نیز اثراتی داشت اما مقدار آن بسیار پایین بود. چند هیدرولیز معدود به صورت باند (لکه) تاریک با اندازه Rf=0.93 ایجاد شد (ساپوژنین‌ها). به نظر رسید این باند که از هیدرولیز نسبی ساپونین ریشه به‌نام مدیکوساید-آ که تولید کننده باند زرد رنگی در Rf=0.59 است، حاصل شده باشد. یک باند زردرنگ و ناشناخته در مجموع ترکیبات برگی هیدرولیز شد. اکثر باندهای ساپونینی تغییر نکرده بودند، و این نشان‌دهنده کارایی کم این آنزیم است. نتایج ارزیابی‌های جداگانه‌ای تأثیر پایین آنزیم مورد مطالعه را بر روی ساپونین‌های برگ و ریشه یونجه تأیید کردند(۷).

نتیجه‌گیری کلی

۵- کاربرد سایر آنزیم‌های مشابه در گیاهان مختلف و یا حشرات برای پیدا کردن آنزیم‌هایی با فعالیت بیولوژیکی هیدرولیز-کنندگی ساپونین‌ها توصیه می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

٦- در صورتی‌که عاملی بتواند ترکیبات ساپونینی را هیدرولیز نماید و باعث کاهش خاصیت آمفی پاتیکی آن شود، آن را بیشتر قابل استفاده می‌کند.

منابع

۱. برمکی، س. ۱۳۹۰. برخی بازدارنده‌ها (تانن‌ها، ساپونین‌ها، کاناوانین) در تغذیه دام و طیور. دسترسی در سایت اینترنتی http://www.novin-damparvaran.blogfa.com

۲. علیزاده، م. ع. ۱۳۷۹. مقایسه واریته‌های یونجه در عکس‌العمل به قارچ فوزاریوم (*Fusarium spp*) در شرایط آزمایشگاه. مجله‌ی پژوهش و سازندگی ٤٩، ٥١-٤٩.

۳. مظاهری‌لقب، ح. ۱۳۸٤. بیان فعالیت کاتالیزوری آنزیم گیاه یونجه (*Medicago sativa L.*)، *چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی ایران*. سخنرانی.

4. Bowyer, P., Clarke, B. R., Lunness, P., Daniels, M.J. and Osbourn, A. E.1995. Host Range of a Plant Pathogenic Fungus Determined by a Saponin Detoxifying Enzyme. Science 267: 371-374.

5. Fenwick, G. R., K. R. Price, C. Tsukamoto and K. Okubo. 1991. Saponins in Toxic substances in crop plants. Cambridge: Royal society of chemistry: 285-327.

6. Gorski, P. M., Miersch, J. and Ploszynski, M. 1991. Production and Biological Activity of Saponins and Canavanine in Alfalfa Seedling. 17: 1135-1143.

7. Mazahery-Laghab, H. 1997. Endogenous resistance to insect pests in alfalfa: engineering for enhanced resistance. PhD thesis. Durham Univ. UK.

8. Osbourn, A. 1996. *Saponins and plant defence a soap story*. Trends Plant Sci. 1: 4-9

9. Roddick, J.G. and Drysdale, R.B. 1984. estabilization of liposome membrane by the steroidal Glycoalkaloid α-Tomatine. Phytochem. 23: 543-547.

www.SID.ir