



ارزیابی مهارت فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز با برهم‌کنش ترکیبات فنولی، فیبر محلول و

پروتئین استخراج شده از عدس سبز

مریم جلیلی صفریان^۱، حسن احمدی گاولیقی^{۲*}، محسن برزگر^۳، مهدی طبرسا^۴، چیبویکه اودنیگوه^۵

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۳- استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۴- دانشیار، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

۵- استاد، گروه تغذیه، دانشکده علوم تغذیه، دانشگاه اتاوا، اتاوا، کانادا.

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۶/۰۷/۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: ۱۵/۰۹/۱۴۰۰

کلمات کلیدی:

عدس سبز،

ترکیبات فنولی،

فیبر محلول،

پروتئین،

ضد دیابتی.

DOI: 10.52547/fsct.19.122.35

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.122.22.5

* مسئول مکاتبات:

Ahmadi_ha@modares.ac.ir

میزان مصرف عدس به دلیل ترکیبات مغذی و خواص عملکردی آن‌ها به طور مداوم رو به رشد بوده است. دانه‌های عدس سرشار از چندین ترکیب زیست فعال با اثر کنترل بر کاهش علائم دیابت، بیماری‌های قلبی-عروقی و پیری می‌باشد. در این مطالعه اثرات عصاره استونی، فیبر محلول و پروتئین استخراج شده از عدس سبز در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر خواص ضد دیابتی با اندازه‌گیری مهار کنندگی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز مورد بررسی قرار گرفت. میزان مهار کنندگی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز خونی توسط عصاره استونی و پروتئین عدس اختلاف معناداری با یکدیگر نداشتند ($p < 0.05$). عصاره استونی بیشترین تاثیر را بر مهار فعالیت آنزیم گلوکوزیداز موشی داشت (۶۷/۰۸ درصد). همچنین کاهش شدت فلئورسانس در اثر افزودن غلظت‌های مختلف عصاره استونی، فیبر محلول و پروتئین عدس (۰/۲۵، ۰/۵۰، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به آنزیم آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز نشان دهنده ایجاد تغییرات در ساختار سوم آنزیم‌ها بود. نتایج نشان داد که هر سه ترکیب استخراج شده از عدس به عنوان یک منبع طبیعی برای مهار فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز محسوب شوند و در تهیه تولید مواد غذایی فراسودمند مورد استفاده قرار گیرند.

۱- مقدمه

امروزه مشکلات ناشی از اضافه وزن، فشار خون و بیماری‌های قلبی-عروقی تبدیل به مهم‌ترین نگرانی در خصوص سلامتی بشر در سراسر جهان شده است [۱]. در سال ۲۰۱۷، ۴۵۱ میلیون فرد بزرگسال مبتلا به دیابت وجود داشته و انتظار می‌رود این تعداد در سال ۲۰۴۵ به ۶۹۳ میلیون نفر افزایش یابد. افزایش جمعیت، پیری، رژیم‌های نادرست، چاقی و شیوه زندگی بی‌تحرک، میزان شیوع دیابت نوع ۲ را افزایش می‌دهد. تغذیه درمانی نقش کلیدی در مدیریت کلی دیابت دارد. تغذیه درمانی می‌تواند دیابت نوع ۲ را ۲-۲۰/۵۵ درصد کاهش دهد [۲]. یکی از راه‌های درمانی کاهش سطح گلوکز بعد از صرف غذا، مهار تخریب الیگو و دی‌ساکاریدها است. این امر می‌تواند با مهار جذب گلوکز از طریق مهار آنزیم‌های هیدرولیز کننده کربوهیدرات نظیر آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز که آنزیم‌هایی حیاتی هستند، انجام شود. این آنزیم‌ها در دیواره روده کوچک قرار دارند و مسئول تجزیه الیگوساکاریدها و دی‌ساکاریدها به مونوساکاریدها به طوری که برای جذب مناسب باشند، هستند. بسیاری از مطالعات پیشنهاد کرده‌اند که مهار این آنزیم‌ها بطور قابل توجهی هضم و جذب کربوهیدرات‌ها را کاهش داده و در نتیجه باعث کاهش میزان قند خون پس از صرف غذا در دیابت غیر وابسته به انسولین می‌شود [۳]. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که مهار کننده‌هایی نظیر ترکیبات فنولی [۴]، فیبرهای رژیمی [۵] و پروتئین [۶]، باعث تاخیر در هضم قند و در نتیجه باعث کاهش میزان جذب گلوکز می‌شوند.

طی مطالعات انجام شده توسط سان و همکاران (۲۰۱۶) نشان داده شده است که پلی‌فنول‌های استخراج شده از سیب نظیر اسیدکلروژنیک، کافئین، اسید تانن، کوئرستین و اپی‌کاتچین فعالیت مهار کنندگی چشم‌گیری در برابر آنزیم آلفا-آمیلاز دارند. این ویژگی مهار کنندگی تا حدودی وابسته به تشکیل پیوند هیدروژنی بین گروه هیدروکسیل پلی‌فنول‌ها و بقایای اسید آمینه در جایگاه فعال آنزیم است. همچنین آن‌ها دریافتند که تغییر در ساختار و ماهیت فضایی فلاونونوئیدها نظیر گلیکوزیدها کردن به دلیل ایجاد ممانعت فضایی و محدودیت در توانایی مولکول‌ها برای وارد شدن به محل آگریز آنزیم آلفا-آمیلاز، میزان مهار

کنندگی کاهش یافت [۷]. همچنین فیبرهای محلول با توانایی مشخص شده برای کاهش سطح قند خون بعد از غذا، مانند بتا-گلوکان و گوار، محلول‌های چسبناکی را در غلظت کم ایجاد می‌کنند. در واقع، این توانایی برای تولید ویسکوزیته است که اساس عملکرد آن‌ها را تشکیل می‌دهد. حضور فیبرهای محلول در محتویات روده هم حرکت آنزیم‌ها به سمت نشاسته و هم حرکت گلوکز آزاد شده به دیواره روده را کند می‌کند. حبوبات غذاهای با گلیسمی کم هستند و می‌توانند سطح گلوکز پس از صرف غذا را کاهش دهند، اما به نظر نمی‌رسد که مبتنی بر توانایی تولید ویسکوزیته باشد [۸]. فیبرهای محلول در مقایسه با فیبرهای نامحلول دارای اثرات بیش‌تری برای درمان دیابت، چاقی، فشار خون بالا و ... است. فیبرهای محلول با به تاخیر انداختن عملکرد ترشحات معده و کاهش عملکرد هضم و جذب باعث تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر بیشتری توسط باکتری‌های روده بزرگ به دلیل قابلیت تخمیر بالا می‌شوند [۲، ۸]. علاوه بر این مشخص شده است که پروتئین‌ها با ایجاد پوشش در اطراف گرانول‌های نشاسته باعث کاهش دسترسی آن‌ها به آمیلازها شده و از این رو قابلیت هضم نشاسته را کاهش می‌دهند [۹].

عدس (*Lens culinaris Medikus*) حاوی منابع عالی و غنی از پروتئین (۳۰-۲۰ گرم بر ۱۰۰ گرم)، چربی‌های مفید (بیش‌تر از ۲ گرم بر ۱۰۰ گرم)، کربوهیدرات‌ها (۶۰-۴۰ گرم بر ۱۰۰ گرم)، فیبرهای رژیمی و ریزمغذی‌ها می‌باشد. همچنین عدس به عنوان یک منبع کامل غذایی برای افراد مبتلا به سوء تغذیه با ریزمغذی‌ها در نظر گرفته می‌شود [۱۰]. عدس سرشار از چندین ترکیب ضد اکسایشی طبیعی نظیر ترکیبات فنولی است که با کنترل یا کاهش علائم دیابت، بیماری‌های قلبی-عروقی و پیری همراه است [۱۱]. بسیاری از ترکیبات فنولی مختلف، از جمله کاتچین، پروسیانیدین، کوئرستین، میریستین، لوتولین، آپیزین و همچنین دایمر، تریمر و پروآنتوسیانیدین‌های تترامر، در انواع پوسته‌های عدس یافت شده‌اند [۱۲]. علاوه بر این، عدس منبع غنی از پروتئین‌های با کیفیت بالا به میزان متوسط ۲۶ درصد می‌باشد. پروتئین‌های بذر عدس در لپه‌ها ذخیره شده‌اند و ۸۰ درصد پروتئین‌ها را تشکیل می‌دهد [۱۳]. همچنین مطالعات برومر و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که فیبر حبوبات غنی از پکتین است که بیشتر آن‌ها در بخش فیبر محلول یافت می‌شوند. آن‌ها دریافتند

۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. محلول‌رویی به دست آمده از جمع‌آوری شد و توسط دستگاه تیخیر کننده چرخشی تحت خلا در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تا حذف کامل استون تغلیظ شد. سپس نمونه با استفاده از خشک کن (Labconco Corp., Kansas City, MO, USA) خشک گردید. پودر حاصل در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱۴].

۲-۳- تعیین میزان فنل کل

میزان ترکیبات فنولی کل با روش فولین-سیوکالتو اندازه‌گیری شد [۱۵]. در این روش میزان ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره با ۱/۱۶ میلی‌لیتر آب دیونیزه و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین مخلوط شد و پس از طی زمان ۱ تا ۸ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر از محلول سدیم کربنات ۲۰ درصد (W/V) به آن افزوده شد. سپس مخلوط در لوله‌های آزمایش درب‌دار به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت جذب محلول در برابر محلول شاهد با استفاده از دستگاه طیف سنج نوری فرابنفش-مرئی (Agilent-Carry 60) در طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (محلول شاهد، ۲۰ میکرولیتر آب مقطر، جایگزین عصاره شد). منحنی درجه‌بندی با استفاده از غلظت‌های مختلف گالیک اسید (۵۰-۸۰۰ پی‌پی‌ام) رسم شد و معادله $y=0.0012+0.0048R^2=0.9922$ حاصل گردید. میزان ترکیبات فنولی با استفاده از معادله فوق، تعیین و برحسب میلی-گرم گالیک اسید در گرم ماده خشک گزارش گردید.

۲-۴- استخراج فیبر محلول عدس سبز

استخراج آنزیمی طبق روش AOAC 991.43 انجام گرفت [۱۶]. در این روش ۱ گرم از آرد عدس به ۵۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH ۶) اضافه شد و سپس با ۵۰ ماکرولیتر آنزیم آلفا آمیلاز کاملاً مخلوط شد و به مدت ۳۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در حمام شیکردار قرار گرفت. پس از سرد شدن ۱۰۰ ماکرولیتر آنزیم آلفا-آلکالاز (pH ۷/۵) به ترکیب اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. سپس pH مخلوط بین ۴/۸ تا ۴/۲ تنظیم شد و ۲۰۰ ماکرولیتر آنزیم آمیلوگلوکوزیداز اضافه شد. ترکیب به مدت ۳۰ دقیقه در دمای

فیبر محلول و نامحلول عدس دارای مقادیر بالایی از گالاکتورونیک اسید که از ترکیبات سازنده پکتین می‌باشد، است. همچنین ترکیباتی نظیر آرابینوز، گلوکز، گزیلوز، گالاکتوز، مانوز و رامنوز نیز در فیبر محلول و نامحلول عدس یافت شد [۸]. با توجه به تحقیقات صورت گرفته، تاکنون مطالعه‌ای در زمینه بررسی اثر ترکیبات فنولی، فیبر محلول و پروتئین عدس سبز بر مهار فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز صورت نگرفته است. لذا هدف از انجام این پژوهش بررسی میزان ممانعت کنندگی آنزیم آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز توسط ترکیبات فنولی، فیبر محلول و پروتئین عدس می‌باشد.

۲- مواد و روشها

۲-۱- مواد

عدس سبز از فروشگاه محلی در استان تهران در زمستان ۱۳۹۷ تهیه شد. سپس دانه‌های عدس توسط آسیاب کن سانویو ساخت کشور ژاپن آسیاب شده و از الک مش ۴۰ عبور داده شد و تا زمان استخراج در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. معرف فولین-سیوکالتو، سدیم کربنات، گالیک اسید، دی‌سدیم فسفات، نشاسته محلول، سدیم هیدروکسید و هیدروکلریک اسید از شرکت Merck آلمان، متانول و اتانول از شرکت مجللی ایران، آنزیم آمیلاز مقاوم در برابر حرارت از باسیلوس سرئوس، آنزیم آلفا-آلکالاز از باسیلوس لیکنیفورمیس، آنزیم آمیلوگلوکوزیداز از اسپرژیلوس نیچر، (4-PAHBAH (Hydroxybenzhydrazide) PNPg (4-Nitrophenyl α -D-glucoopyranoside)، آنزیم آلفا-آمیلاز خوکی و پودر روده موش از شرکت سیگما تهیه شد. تمام مواد شیمیایی بالا با خلوص بالا و بدون هیچ گونه خالص‌سازی مجدد مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲- استخراج عصاره استونی عدس سبز

عصاره استونی عدس سبز از آرد عدس (گذرانده شده از الک با مش ۴۰) تحت شرایط نسبت ۱ گرم نمونه به ۴۰ میلی‌لیتر ترکیب ۲۰:۸۰ (حجمی/حجمی) استون: آب مقطر با نگهداری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در محیط تاریک استخراج گردید. عصاره به دست آمده تحت سانتریفوژ در دور g

در نهایت، محلول در دمای اتاق خنک و جذب در طول موج ۴۱۰ نانومتر خوانده شد. از معادله زیر برای ارزیابی درصد مهارکنندگی آنزیم آلفا-آمیلاز استفاده شد:

معادله ۱:

$$\text{درصد مهارت فعالیت آلفاگلوکوزیداز} = 1 - \frac{(A_s - A_c)}{A_c} \times 100$$

که A_s و A_c به ترتیب شیب نمودار جذب نمونه و کنترل بود.

۲-۶-۲- اندازه‌گیری مهارت فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز

میزان بازدارندگی آنزیم آلفا-گلوکوزیداز موشی توسط عصاره استونی، فیبر محلول و پروتئین عدس سبز با استفاده از روش کانولی و همکاران (۲۰۱۴) با اندکی تغییر اندازه‌گیری شد [۱۹]. ۱۰۰ میکرولیتر محلول نمونه (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۲۰۰ میکرولیتر آلفا گلوکوزیداز (۹۰ mU/mL) مخلوط شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۵ میلی مولار PNPg به نمونه اضافه شد و مجدد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد و جذب محلول هر ۲ دقیقه در طول موج ۴۰۵ نانومتر اسکن شد. به جای محلول نمونه از بافر فسفات (pH = ۶/۹) به عنوان شاهد استفاده شد. از معادله زیر برای ارزیابی درصد مهارت فعالیت آلفا-گلوکوزیداز استفاده شد:

معادله ۲:

$$\text{درصد مهارت فعالیت آلفاگلوکوزیداز} = \frac{(A_s - A_c)}{A_c} \times 100$$

که A_s و A_c به ترتیب شیب نمودار جذب نمونه و کنترل بود.

۲-۶-۳- اندازه‌گیری فلوروسانس ذاتی و خارجی

مقادیر خاص آلفا آمیلاز (۳ میلی‌لیتر، ۰/۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و آلفا گلوکوزیداز (۳ میلی‌لیتر، ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۰/۳ میلی‌لیتر از عصاره استونی استخراج شده، فیبر محلول و پروتئین عدس با غلظت‌های مختلف (۰/۲۵، ۰/۵۰، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) ترکیب شد و برای ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد نگهداری شدند. شدت فلوروسانس آنزیم‌ها با طول موج تحریک ۲۹۰ نانومتر و طول موج انتشار ۳۱۰ تا ۵۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۲۰]. میزان اثر فرونشاندن در اثر برخورد مولکولی با استفاده از معادله استرن-ولمر ارزیابی شد:

معادله ۳:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q]$$

۶۰ درجه سانتی‌گراد حمام شیکردار قرار گرفت. پس از سرد شدن، ترکیب تحت سانتی‌فیوژ در دور ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. به محلول رویی به دست آمده ۴ برابر حجم عصاره اتانول ۹۶ درصد اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگه داشته شد. در نهایت برای بدست آوردن فیبر محلول، محلول در ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتی‌فیوژ شد. ترکیب رسوب کرده با استون و اتانول سه بار شسته شد و سپس توسط آن در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید.

۲-۵- استخراج پروتئین عدس سبز

۱۰۰ گرم آرد عدس به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر ترکیب شد و با استفاده از NaOH ۰/۱ مولار pH در نقطه ۹ تنظیم شد. پس از استخراج، بخش غیرمحلول با استفاده از سانتی‌فیوژ (g × ۸۵۰۰) برای ۱۵ دقیقه در ۲۳ درجه سانتی‌گراد جدا گردید. پروتئین موجود در محلول رویی با تنظیم pH ۴/۲ با HCl ۰/۱ مولار رسوب داده شد و برای مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس رسوب تشکیل شده از طریق سانتی‌فیوژ (g × ۱۵۹۰) برای ۳۰ دقیقه جدا شد. پروتئین رسوب داده شده توسط خشک کن انجمادی خشک گردید [۱۷].

۲-۶-۲- آزمون‌های ضد دیابتی

۲-۶-۲-۱- قابلیت بازدارندگی آنزیم آلفا-آمیلاز خوکی

میزان بازدارندگی آنزیم آلفا-آمیلاز توسط عصاره استونی استخراج شده، فیبر محلول و پروتئین عدس سبز طبق روش آلودات و همکاران (۲۰۱۲) اندازه‌گیری شد [۱۸]. به طور خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر محلول نمونه (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر فسفات ۰/۰۲ مول بر لیتر که حاوی ۰/۰۰۷ مول بر لیتر NaCl و pH = ۶/۸) و ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلفا آمیلاز (۰/۵ U/mL) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (حمام آب گرم) گرمخانه‌گذاری شدند؛ سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول نشاسته ۰/۵ درصد (وزنی/وزنی) به آن اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد مجدد گرمخانه‌گذاری شد. جهت غیرفعال‌سازی آنزیم، مخلوط‌ها در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و سپس در دمای اتاق سرد شدند. سپس به مدت ۳ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتی‌فیوژ شد تا نشاسته هضم نشده جدا شود. ۲۰ میکرولیتر از محلول رویی با ۱ میلی‌لیتر محلول رنگی PAHBAH مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد گرم شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ترکیبات استخراج شده از عدس سبز

میزان فنل کل عصاره استونی استخراج شده، درصد پروتئین و درصد فیبر استخراج شده از عدس سبز در جدول ۱ ارائه شده است. فنول‌های طبیعی اثرات مفید سلامتی را از طریق حذف رادیکال‌ها و فعالیت ضد اکسایشی خود اعمال می‌کنند. این ترکیبات علاوه بر فعالیت ضد اکسایشی می‌توانند به کاهش وزن و کاهش خطر دیابت نوع ۲ کمک کنند [۲۲]. فنل کل عدس سبز $8/69 \pm 166/79$ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم نمونه خشک به دست آمد که نشان دهنده میزان بالای ترکیبات فنلی است. میزان فنل کل به دست آمده با داده‌های گزارش شده توسط ژئو و همکاران (۲۰۱۱) [۱۴] مطابقت دارد. همچنین میزان پروتئین $1/23 \pm 81/27$ گرم پروتئین در ۱۰۰ گرم پروتئین استخراج شده بود [۱۷]. درصد فیبر محلول موجود در عدس سبز $0/78 \pm 2/46$ درصد به دست آمد.

که در آن F_0 حداکثر مقدار پیک شدت فلوروسانس آنزیم و حداکثر مقدار پیک شدت فلوروسانس آنزیم در حضور یکی از ترکیبات استخراج شده از عدس سبز نظیر عصاره استخراجی، فیبر محلول و پروتئین عدس بود. شیب نمودار (K_{sv}) در معادله استرن-ولمر به عنوان شاخصی از اثر فرو نشان کننده برخورد روی فلوروسانس ذاتی آنزیم آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز در نظر گرفته شد [۲۱].

۲-۷- تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه، میزان مهار کنندگی آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز و تغییرات شدت فلوروسانس این دو آنزیم توسط عصاره استونی، فیبر محلول و پروتئین استخراج شده از عدس سبز به صورت آزمایشات فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی گردید. کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد و میانگین آن‌ها به همراه انحراف معیار گزارش شد. تجزیه و تحلیل واریانس با استفاده از نرم افزار Minitab نسخه ۱۶ صورت گرفت. میانگین‌ها به روش آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند.

Table 1 Total phenol content, protein content and soluble fiber of green lentil

Content	Total phenol content (mg GAE/g DW)	Protein content (g/100 g protein)	Soluble fiber (%)
Green lentil	166.79 ± 8.69	81.27 ± 1.23	2.46 ± 0.78

مهار کنندگی آنزیم آلفا-گلوکوزیداز ($1/76 \pm 67/08$ درصد) را نشان داد ($P < 0.05$). بازدارندگی منابع غذایی با توانایی مهار کمتر آلفا-آمیلاز و مهار قوی‌تر آلفا-گلوکوزیداز می‌تواند عوارض جانبی مانند اتساع شکم و نفخ را به حداقل برساند [۲۳]. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که مهار کننده‌های مختلف سازوکارهای متفاوتی را در غیرفعال کردن آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز اعمال می‌کنند. برای آلفا آمیلاز، مکانیسم‌های مهاری پیشنهادی شامل (۱) تشکیل کمپلکس بین مهار کننده (مانند آکاربوز) و آلفا آمیلاز و محدود کردن فعالیت آن یا (۲) کاهش انتشار گلوکز از محل فعال، توسط آب ویسکوز فیبرهای غذایی محلول می‌باشد [۲۴، ۲۵]. عامل اصلی و موثر بر مهار فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز توسط ترکیبات فنولی، مهار هیدروژن است، زیرا آلفا-گلوکوزیداز هیدروژن مورد نیاز برای کاتالیز کردن هیدرولیز پیوند $\alpha(1-4)$ -گلوکوزید را فراهم می‌کند. این بازدارنده با جدا کردن یون هیدروژن آزاد شده از محل کاتالیزوری آلفا-گلوکوزیداز عمل می‌کند [۲۴]. ژانگ و همکاران

۳-۲- فعالیت ضد دیابتی

۳-۲-۱- مهار کنندگی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز

یکی از رویکردهای درمانی در درمان دیابت، کاهش سطح قند خون با مهار آنزیم‌های هیدرولیز کننده کربوهیدرات نظیر آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز می‌باشد. در این مطالعه، تاثیر مهار کنندگی آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز توسط عصاره استونی، فیبر محلول و پروتئین عدس مورد مطالعه قرار گرفت (شکل ۱). تاثیر مهار کنندگی آنزیم آلفا-آمیلاز توسط فیبر عدس ($1/56 \pm 36/09$ درصد) در مقایسه با عصاره استونی ($0/95 \pm 40/02$ درصد) و پروتئین عدس ($1/25 \pm 42/33$ درصد) ضعیف‌تر بود، در حالی که پروتئین بیشترین تاثیر را در مهار فعالیت آنزیم نشان داد. از طرفی دیگر پروتئین عدس ($0/61 \pm 9/71$ درصد) کم‌ترین نقش را در مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز ایفا کرد. عصاره استونی استخراج شده از عدس بالاترین درصد

طریق پیوندهای هیدروژنی و برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک بیش-تر با جایگاه فعال آنزیم آلفا-گلوکوزیداز باعث مهار فعالیت آنزیم می‌شوند. بنابراین وجود گروه‌های هیدروکسیل در ساختار اسید آمینه پروتئین‌ها نقش مهمی در مهار آلفا گلوکوزیداز دارد [۶]. [۲۷]. همچنین نگو و گان (۲۰۱۶) سازوکار پیشنهادی برهم‌کنش و اتصال پپتیدها و پروتئین‌ها با محل فعال آنزیم آلفا آمیلاز و مهار برهم‌کنش آنزیم و سوبسترا را ارائه دادند. در نتیجه سطح تماس آنزیم و سوبسترا کاهش می‌یابد [۲۸]. یکی دیگر از سازوکارهای مهار پروتئین‌ها، اتصال آن‌ها به محل آلوستریک در ساختار آنزیم (مانند محل یون کلسیم و کلرید) و ایجاد یک ترکیب ناپایدار می‌باشد. این تغییر شکل می‌تواند A بیری آنزیم را روی سوبسترا محدود کند [۲۹].

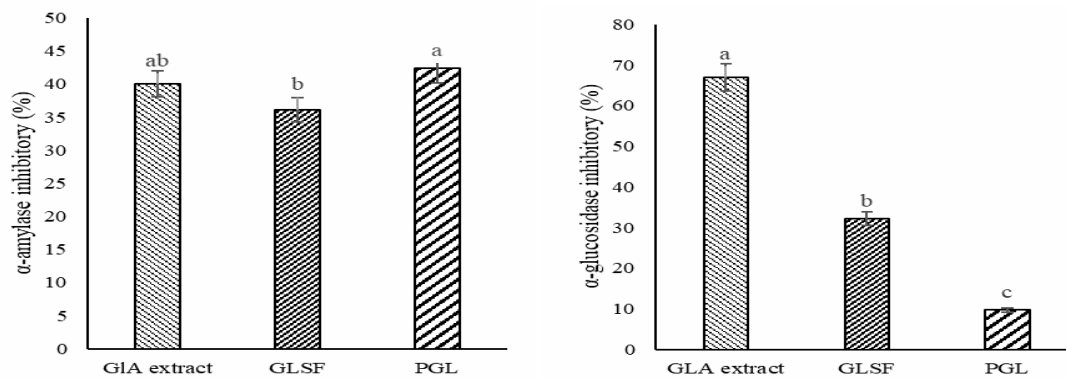


Fig 1 (A) α -amylase and (B) α -glucosidase inhibitory activity of green lentil acetone extract (GLA extract), green lentil soluble fiber (GLSF) and protein green lentil (PGL).

نزدیکی 360 نانومتر را نشان می‌دهد [۷]. گزارش شده است که ترکیبات فنولی با انواع پروتئین‌ها ترکیب شده و کمپلکس ایجاد می‌کنند. براساس رابطه بین فعالیت بازدارندگی و ایجاد کمپلکس با آلفا-آمیلاز، مهار کنندگی تا حدی به تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های هیدروکسیل ترکیبات فنولی و نیروهای آبریز باقی مانده اسید آمینه در محل فعال آلفا-آمیلاز بستگی دارد که منجر به تغییرات کوچک محیطی در بقایای اسید آمینه شده و با افزایش غلظت ترکیبات فنولی، طیف انتشار کاهش می‌یابد [۷]. همچنین مطالعه چن و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد که پروتئین گلوتم می‌تواند به محل‌های فعال و غیرفعال آلفا-آمیلاز متصل شود. اتصال پروتئین به آنزیم‌ها می‌تواند از طریق برهم‌کنش غیر کووالانسی، نظیر نیروهای آبریز و پیوند هیدروژنی تقویت شود. پروتئین‌ها حاوی گروه هیدروکسیل هستند که می‌توانند با تشکیل پیوندهای هیدروژنی به طور قابل توجهی با

(۲۰۱۵) با مطالعه بر اثر ترکیبات فنولی 20 نوع عدس بر مهار فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز در کانادا دریافتند که به دلیل حضور فلاونول‌ها در ترکیبات فنولی عدس مهارکننده‌های خوبی برای آلفا گلوکوزیداز و لیپاز هستند [۲۲]. موجیکا و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که درصد مهار کنندگی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز توسط عصاره فنولی استخراج شده از لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) به ترتیب $25/8$ درصد و $20/8$ درصد بود [۲۶]. همچنین حضور تعداد زیادی گروه‌های عملکردی هیدروکسیل در ساختار فیبر محلول نیز می‌تواند بر مهار فعالیت آنزیمی تاثیر مثبت بگذارد [۵]. از طرفی دیگر، فعالیت مهار کنندگی پروتئین B کن است تحت تاثیر ترکیبات اسید آمینه باشد. تصور می‌شود پروتئین‌ها از

۳-۲-۲- فلئوئورسانس ذاتی و خارجی

در مطالعه حاضر، شدت فلئوئورسانس آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز قبل و بعد از افزودن عصاره استونی، فیبر محلول و پروتئین عدس جهت بررسی برهم‌کنش بین آن‌ها اندازه‌گیری شد (شکل ۲). در پروتئین، تریپتوفان اسید آمینه اصلی ساطع کننده فلئوئورسانس می‌باشد. برهم‌کنش بین آنزیم و سوبسترا، ریز محیط بقایای تریپتوفان را تغییر می‌دهد، بنابراین فلئوئورسانس را کاهش می‌دهد [۳۰]. طیف انتشار فلئوئورسانس برای آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز در $\lambda_{em} = 290$ نانومتر با افزودن عصاره استونی، فیبر محلول و پروتئین عدس به دست آمد (شکل ۲). در همه موارد، کاهش شدت فلئوئورسانس ناشی از خنثی شدن تریپتوفان است. فلوروفور غالب آلفا-آمیلاز گروه ایندول باقی مانده اسید آمینه تریپتوفان است. بقایای هتروسلیک حلقوی ایندول جذب ماورای بنفش را در نزدیکی 290 نانومتر و اوج انتشار فلورسانس در

گوارشی نشان داد که فیبر فعالیت هر دو آنزیم آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز را از طریق ایجاد تغییرات در ساختار سوم این آنزیم-ها با برهم‌کنش غیرکوالانسی مهار می‌کند [۵].

زنجیره‌های جانبی کاتالیزوری آلفا آمیلاز در تعامل باشند، در حالی که حاقه بنزن ممکن است در محل فعال آلفا-آمیلاز در برهم‌کنش آبتگریز شرکت کند [۹]. همچنین کاهش شدت فلورسانس در اثر افزودن فیبر محلول عدس به آنزیم‌های

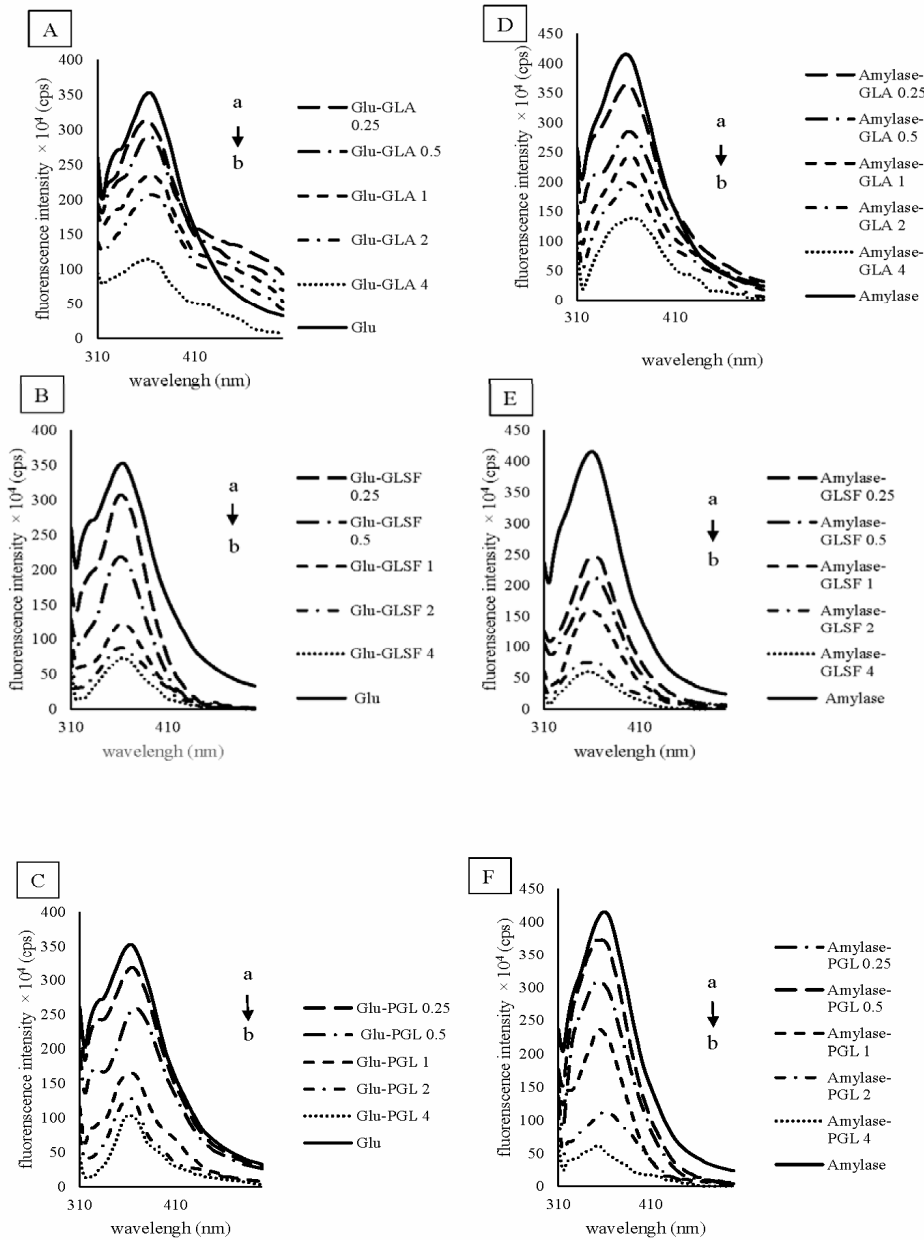


Fig 2 Intrinsic tryptophan fluorescence of α -amylase and α -glucosidase suspensions with different concentrations of green lentil acetone extract (GLA extract) (a-e: 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/mL), green lentil soluble fiber (GLSF) (A-E: 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/mL) and protein green lentil (PGL) (A-E: 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/mL). (A): α -glucosidase-GLA extract; (B): α -glucosidase-PGL; (C): α -glucosidase-LSF. (D): α -amylase-GLA extract; (E): α -amylase-PGL; (F): α -amylase. Glu: α -glucosidase.

بالاتری نسبت به سایر مخلوط‌ها دارند. این رفتار می‌تواند به دلیل اختلال بیشتر در میزان انتشار فلئورسانس اسید آمینه تریپتوفان در نتیجه تعداد بیشتر برخوردهای مولکولی در حضور فیبر محلول و پروتئین در مقایسه با ترکیبات فنولی باشد. فعل و انفعالات بین مولکولی این بسپارهای زیستی می‌تواند ناشی از برخورد پروتئین-پروتئین و یا پروتئین-پلی ساکارید باشد [۲۱].

میزان اثر فرونشاندن برخورد را می‌توان با معادله استرن-ولمر ارزیابی کرد. شکل ۳ کاربرد معادله ۳ در انتشار فلئورسانس سیستم مخلوط آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز با عصاره استونی، فیبر محلول و پروتئین را عدس نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می‌شود، مخلوط فیبر محلول و پروتئین عدس با آنزیم آلفا-آمیلاز و فیبر عدس با آنزیم آلفا-گلوکوزیداز اثر فرونشاندن از طریق برخورد را با قدر بیشتری ایجاد کردند، زیرا میزان K_{sv}

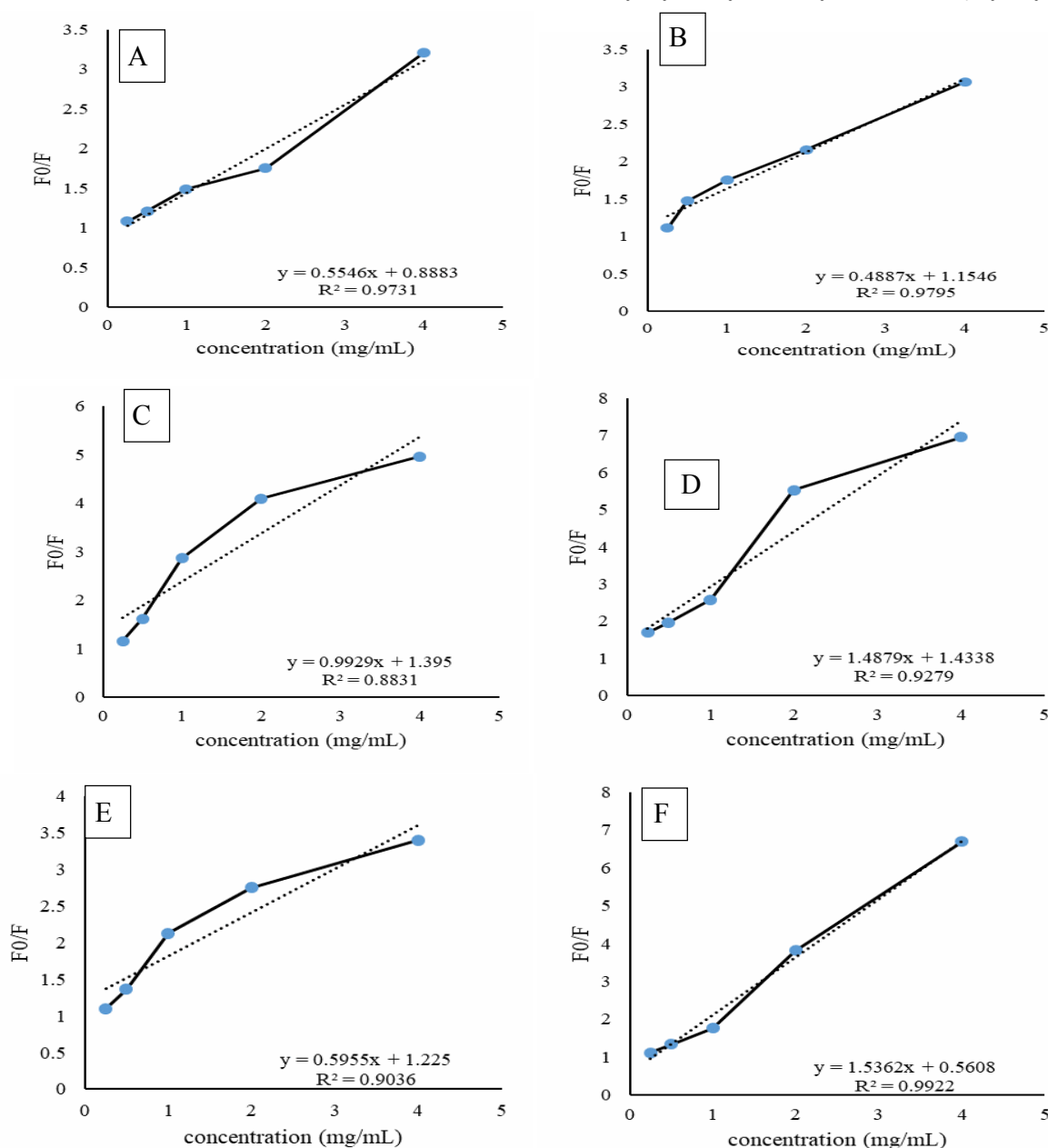


Fig 3 The quenching constant of the interaction between (A): α -glucosidase-GLA extract; (B): α -amylase-GLA extract; (C): α -glucosidase-LSF; (D): α -amylase-LSF; (E): α -glucosidase-PGL and (F): α -amylase-PGL.

۴- نتیجه گیری

در این مطالعه میزان ممانعت عصاره استونی، فیبر محلول و پروتئین عدس استخراج شده از عدس سبز در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره استونی استخراج شده و پروتئین به ترتیب دارای بیشترین و کمترین اثر بر مهار فعالیت آلفا-گلوکوزیداز (۶۷/۰۸ درصد و ۹/۷۱ درصد) بودند. همچنین در میزان مهار فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز توسط عصاره استونی و فیبر محلول اختلاف معناداری وجود نداشت. علاوه بر این، افزودن فیبر محلول و پروتئین عدس به آنزیم آلفا-آمیلاز و فیبر عدس به آنزیم آلفا-گلوکوزیداز اثر فرونشاندن فلونورسانس از طریق برخورد را بیشتر نشان داد. به طور کلی، استفاده از عدس به دلیل دارا بودن ترکیبات ارزشمند ضد دیابتی می‌تواند برای سلامت افراد جامعه مفید باشد.

۵- منابع

- [1] Qi, S., and Zhou. D. 2013. Lotus seed epicarp extract as potential antioxidant and anti-obesity additive in Chinese Cantonese Sausage. *Meat Science*, 93: 257-262.
- [2] Bozbulut, R., and Sanlier. N. 2019. Review. Promising effects of β -glucans on glyceamic control in diabetes. *Trends in Food Science & Technology*, 83: 159-166.
- [3] Rasouli, H., Hosseini-Ghazvini, M. B., Adibi, H., & Khodarahmi, R. 2017. Differential α -amylase/ α -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes. *Food & Function*, 8: 1942-1954.
- [4] Xiao, J., Kai, G., Ni, X., Yang, F., & Chen, X. 2011. Interaction of natural polyphenols with α -amylase in vitro: molecular property-affinity relationship aspect. *Molecular BioSystems*, 7: 1883-1890.
- [5] Hua, M., Sun, Y., Shao, Z., Lu, J., Lu, Y., & Li, Z. 2020. Functional soluble dietary fiber from ginseng residue: Polysaccharide characterization, structure, antioxidant, and enzyme inhibitory activity. *Food Biochemistry*, 1-11.
- [6] Di Stefano, E., Oliviero, T., and Udenigwe, C. C. 2018. Functional significance and structure-activity relationship of food-derived α -glucosidase inhibitors. *Current Opinion in Food Science*, 20: p. 7-12.
- [7] Sun, L., Chen, W., Meng, Y., Yang, X., Yuan, L., & Guo, Y. 2016. Interactions between polyphenols in thinned young apples and porcine pancreatic α -amylase: Inhibition, detailed kinetics and fluorescence quenching. *Food Chemistry*, 208: 51-60.
- [8] Brummer, Y., Kaviani, M., and Tosh, S. M. 2015. Structural and functional characteristics of dietary fibre in beans, lentils, peas and chickpeas. *Food Research International*, 67: 117-125.
- [9] Chen, X., He, X., Zhang, B., Sun, L., Liang, Z., & Huang, Q. 2019. Wheat gluten protein inhibits α -amylase activity more strongly than a soy protein isolate based on kinetic analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129: 433-441.
- [10] Siva, N., Thavarajah, D., Johnson, C. R., Duckett, S., Jesch, E. D., & Thavarajah, P. 2017. Can lentil (*Lens culinaris Medikus*) reduce the risk of obesity? *Journal of Functional Foods*, 38: 706-715.
- [11] Neta, I. M. R. and Castro, R. J. S. 2019. Enzyme-assisted extraction of biocomponents of lentils (*Lens culinaris* L.): Effect of process parameters on the recovery of compounds with antioxidant properties. *Biocatalysis and Biotransformation*, 38: 1-10.
- [12] Yeo, J. D. and Shahidi, F. 2020. Identification and quantification of soluble and insoluble-bound phenolics in lentil hulls and their antioxidant potential. *Food Chemistry*, 315: 126202.
- [13] Khazaei, H., Subedi, M., Nickerson, M., Martinez-Villaluenga, C., Frias, J., & Vandenberg, A. 2019. Review: Seed Protein of Lentils: Current Status, Progress, and Food Applications. *Foods*, 8: 1-23.
- [14] Zou, Y., Chang, S. K. C., Gu, Y., & Qian, S. Y. 2011. Antioxidant Activity and Phenolic Compositions of Lentil (*Lens culinaris* var. *Morton*) Extract and Its Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 2268-2276.
- [15] Slinkard, K. and Singleton, V. L. 1997. Total phenol analysis: automation and

- and lipase inhibitory activity of the phenolic substances in two black legumes of different genera. *Food Chemistry*, 214: 259–268.
- [24] Kim, K. T., Rioux, L. E., and Turgeon, S. L. 2014. Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry*, 98: 27–33.
- [25] Tong, D. P., Zhu, K. X., Guo, X. N., Peng, W., & Zhou, H. M. 2018. The enhanced inhibition of water extract of black tea under baking treatment on α -amylase and α -glucosidase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107: 129-136.
- [26] Mojica, L., Meyer, A., Berhow, M. A., & de Mejía, E. G. 2015. Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, in vitro inhibition of α -amylase and α -glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. *Food Research International*, 69: 38-48.
- [27] Karimi, A., Azizi, M. H., and Ahmadi Gavlighi, H. 2020. Fractionation of hydrolysate from corn germ protein by ultrafiltration: In vitro antidiabetic and antioxidant activity. *Food Science and Nutrition*, 8: 2395–2405.
- [28] Ngoh, Y. Y., and Gan, C. Y. 2016. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and α -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. *Pinto*). *Food Chemistry*, 190: 331–337.
- [29] Admassu, H., Gasmalla, M. A. A., Yang, R., & Zhao, W. 2018. Identification of bioactive peptides with alpha-amylase inhibitory potential from enzymatic protein hydrolysates of red seaweed (*Porphyra spp.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66: 4872–4882.
- [30] Cardullo, N., Muccilli, V., Pulvirenti, L., Cornu, A., Pouységu, L., Deffieux, D., Quideau, S., Tringali, C. 2020. C-glucosidic ellagitannins and galloylated glucoses as potential functional food ingredients with anti-diabetic properties: a study of α -glucosidase and α -amylase inhibition. *Food Chemistry*, 313: 126099.
- comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28: 49–55.
- [16] Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2003. AOAC official method 991.43 total, soluble, and insoluble dietary fiber in foods, in: W. Horwitz (Ed.), *Official Methods of Analysis of the AOAC International*, Rev. 2 (17th ed.), AOAC International, Gaithersburg, MD.
- [17] Jarpa-Parra, M., Bamdad, F., Wang, Y., Tian, Z., Temelli, F., Han, J., & Chen, L. 2014. Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. *LWT - Food Science and Technology*, 57: 461-469.
- [18] Alu'datt, M. H., Ereifej, K., Abu-Zaiton, A., Alrababah, M., Almajwal, A., Rababah, T., & Yang, W. 2012. Antioxidant, antidiabetic, and antihypertensive effects of extracted phenolics and hydrolyzed peptides from barley protein fractions. *International Journal of Food Properties*, 15: 781–795.
- [19] Connolly, A., Piggott, C. O. and FitzGerald, R. J. 2014. In vitro α -glucosidase, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory properties of brewers' spent grain protein hydrolysates. *Food Research International*, 56: 100–107.
- [20] Zheng, Y., Tian, J., Yang, W., Chen, S., Liu, D., Fang, H., Zhang, H., Ye, X. 2020. Inhibition mechanism of ferulic acid against α -amylase and α -glucosidase. *Food Chemistry*, 317: 126346.
- [21] Perez, A. A., Carrara, C. R., Sánchez, C. C., Patino, J. M., & Santiago, L. G. 2009. Interactions between milk whey protein and polysaccharide in solution. *Food Chemistry*, 116: 104–113.
- [22] Zhang, B., Deng, Z., Ramdath, D., Tang, Y., X. Chen, P., Liu, R., Liu, Q., Tsao, R. 2015. Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α -glucosidase and pancreatic lipase. *Food Chemistry*, 172: 862–872.
- [23] Tan, Y., Chang, S. K. C., and Zhang, Y. 2017. Comparison of α -amylase, α -glucosidase



Evaluation of inhibitory effect of alpha-amylase and alpha-glucosidase by interaction phenolic compounds, soluble fiber, and protein extracted from green lentils

Jalili Safaryan, M.¹, Ahmadi Gavlighi, H.^{2*}, Barzegar, M.³, Tabarsa, M.⁴, Udenigwe, Ch.⁵

1. PhD student, Department of Food Science and Technology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3. Professor, Department of Food Science and Technology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
4. Associate Professor, Department of Seafood Processing, Tarbiat Modares University, Nur, Iran.
- 5- Professor, Department of Nutrition, Ottawa University, Ottawa, Canada.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2021/ 11/ 07
Accepted 2021/ 12/ 06

Keywords:

Green lentils,
Phenolic compounds,
Soluble fiber,
Protein,
Anti-diabetic.

DOI: 10.52547/fsct.19.122.35

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.122.22.5

*Corresponding Author E-Mail:
Ahmadi_ha@modares.ac.ir

ABSTRACT

Lentil consumption has been constantly growing due to its nutritional composition and functional properties. Lentil seeds are rich in several bioactive compounds with an effect on decreasing the symptoms of diabetes, cardiovascular disease, and aging. In this study, the effects of acetone extract (GLA extract), soluble fiber (GLSF), and protein (PGL) extracted from green lentils (concentration of 50 mg/ml) on anti-diabetic properties were investigated by measuring the inhibitory activity of alpha-amylase and alpha-glucosidase. There was no significant between the inhibitory activity of alpha-amylase activity by GLA extract and PGL ($p < 0.05$). Also GLA extract had the greatest effect on inhibition of glucosidase activity (67.08%). Fluorescence quenching had studied the changes in the tertiary structure of alpha-amylase and alpha-glucosidase using different concentrations (0, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00 mg/mL) of GLA extract, GLSF, and PGL. The results showed that all three compounds extracted from green lentils play as a natural source to inhibit the activity of alpha-amylase and alpha-glucosidase enzymes and be used in the production of functional foods.