مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال پنجم، شماره دوم، پیاپی هجدهم، پاییز ۱۳۹۵ (۱۱-۱)

بررسی سینتیک آنزیمی پراکسیداز در ریشه گیاه کنگر (*Gundelia tournefortii*)

شهریار سعیدیان*
استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه پیام نور، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۱۰ – تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۰۹/۰۷)

چکیده

خصوصیات سینتیکی آنزیم پراکسیداز ریشه کنگر از نظر دمایی، pH و اثر بازدارنده ها بررسی شد. بیشترین فعالیت پراکسیدازی کنگر در pH ۵/۵ تا ٦/۵ بر حسب نوع سوبسترا متغیر می‌باشد. فعالیت در غلظت ثابت H_2O_2 با افزایش غلظت هر کدام از سوبستراهای گایاکل، کتکول و پیروگالل افزایش یافته، طوری‌که در غلظت ۲۲ میلی‌مولار گایاکل به بیشینه یعنی Unit/mg. protein ۲/٤ می‌رسد. در غلظت ثابت گایاکل و غلظت‌های متغیر H_2O_2 بیشینه‌ی فعالیت Unit/mg protein ۲ به دست آمد و Km آن ٤ میلی‌مولار تعیین شد. در٤۰ میلی‌مولار فعالیت آن به ۳۵٪ بیشینه می‌رسد. بازدهی کاتالیتیکی پراکسیداز در غلظت ثابت گایاکل و در غلظت ثابت پراکسید هیدروژن به ترتیب mM^{-1} ۰/۵ و Unit/mg ۰/۵protein محاسبه گردید، در حالیکه بازدهی کاتالیتیک پراکسیداز ریشه در حضور کتکول و پیروگالل به ترتیب ۰/۳۳ و ۰/٦٦ محاسبه گردید. پایداری آنزیم و بیشترین فعالیت پراکسیدازی در ٤۰ درجه سانتی گراد حاصل شد و در گستره‌ی دمایی ۵۰ درجه و ٦۰ درجه فعالیت آنزیمی با گذشت زمان کاهش یافت. سدیم سیانید در غلظت‌های کم اثر مهارکنندگی داشته و در غلظت‌های بالا فعالیت پراکسیداز را به صفر می‌رساند در حالی که سدیم آزید برای مهار پراکسیداز به غلظت‌های بالاتری نیاز دارد. IC50 در حضور سدیم سیانید ۰/۰۰۸ میلی‌مولار و در حضور سدیم آزید ۰/٤ میلی‌مولار می‌باشد، یعنی IC50 در حضور سدیم آزید ۳۱۲ برابر IC50 در حضور سدیم سیانید است. سیانید مهارکننده رقابتی پراکسیداز ریشه کنگر در حضور کتکول و پیروگالل و مهارکننده غیر رقابتی آنزیم در حضور گایاکل است.

واژه‌های کلیدی: پراکسیداز، دما، سینتیک، سدیم سیانید، سدیم آزید.

Kinetic investigations of peroxidase in roots of *Gundelia Tournefortii*

Shahriar Saeidian*
Assistant Professor of Biochemistry, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

(Received: Nov. 1, 2014 - Accepted: Nov. 27, 2016)

Abstract

Kinetic properties of root of peroxidase of Gundelia tournefortii investigated at different pH, temperature and different inhibitors. Maximum activity of peroxidase achieved at pH 5.5-6 in according to type of substrate. Activity of peroxidase increased at constant concentration of H_2O_2 and different concentration of guaiacol, catechol and pyrogallol. The maximum activity in presence of 22mM of guaiacol was earned 2.4 Unit/mg.protein. At constant concentration of guaiacol and different concentration of H_2O_2, V_{max} and K_m were 2 Unit/mg.protein and 4 mM respectively. Activity decreased at high concentration of H_2O_2 so reached to 35% of V_{max} at 40 mM. Catalytic efficiency of peroxidase in presence of constant concentrations of guaiacol and H_2O_2 calculated 0.5 and 0.5 Unit/mg protein mM^{-1} respectively. Stability of enzyme and maximum of activity was earned at 40 ^{0}C. Sodium cyanid and sodium azide showed inhibitory effect on activity with IC50 of 0.008 and 0.4 mM respectively. These results of inhibitors showed that inhibitory effect of Azid is 312 times of inhibitory effect of cyanide. Cyanid is competitive inhibitor of peroxidase in presence of catechol and pyrogallol and noncompetitive inhibitor of enzyme in presence of guaiacol, and Azide is noncompetitive inhibitor of peroxidase of root in gundelia tournefortii in presence of catechol and pyrogallol and uncompetitive inhibitor of enzyme in presence of guaiacol and kojic acid is uncompetitive inhibitor of peroxidase in presence of guaiacol and pyrogallol.

Keywords: peroxidase, Sodium cyanide, Sodium azide, Temperature

* نویسنده مسئول: شهریار سعیدیان E-mail: saeedyan@pnu.ac.ir

مقدمه

پراکسیداز یک گلیکوپروتئین آهن‌دار با وزن ملکولی ۳۰ تا ۶۰ کیلودالتون است که برای سنجش فعالیت آنزیمی آن از سوبستراهایی همچون گایاکول، گایاکل و پراکسید هیدروژن استفاده می‌شود. پراکسیدازها یکی از آنزیم‌های کلیدی در کنترل رشد گیاهان به حساب می‌آید. این آنزیم در ایجاد لیگنین در دیواره سلولی گیاهان، تنظیم سطح اکسین، در متابولیسم اکسیژن و حفاظت از بافت‌های گیاهی در برابر آسیب‌ها به‌ویژه محافظت از گیاه در برابر میکروارگانیزم‌های بیماریزا نقش دارد (Dunford, 91). سیستم‌های دفاعی گیاهان قادر به از بین بردن و یا خنثی کردن رادیکالهای آزاد و حد واسطه‌ای دارای اکسیژن به کمک آنزیم‌هایی همچون پراکسیدازها هستند. پراکسیدازها در تمام طول عمر گیاهان مختلف دارای عملکردهای متفاوتی از جمله مکانیسم‌های دفاعی و پاسخ به تنش‌های محیطی و نظایر آنها هستند. بیش از ۸۰ درصد از کیت‌های ایمونوآنزیمی در برگیرنده پراکسیدازها به‌عنوان آنزیم‌های ردیاب واکنشی هستند و جدیداً نیز پراکسیدازها برای انتقال بیولوژیکی ملکولهای آلی به‌کار می‌روند (Adam, 99). پراکسیدازها به‌عنوان یکی از آنزیم‌های پایداری هستند که در ایجاد تغییرات در کیفیت محصولات فراوری شده نقش دارند (Stanely, 95). قهوه‌ای شدن آنزیمی از عملکرد آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز است که در سطح میوه‌ها و سبزیجات ایجاد می‌گردند (Sanchez-Amat *et al*., 1997).

گیاه کنگر مورد استفاده از جنس *gundelia* می‌باشد، (رده *Dicotyledones*، زیررده *Gamopetales*، خانواده *Asteraceae*، جنس *Gundelia* و گونه *Tournefortii*). این گیاه یکی از فراوان ترین گیاهان مناطق کوهستانی و استپی ایران است. انتشار جغرافیایی تقریباً در کلیه مناطق کوهستانی ایران، در دامنه های الوند، بین همدان و تویسرکان، همدان و کرمانشاه، کوه های آذربایجان، بختیاری، لرستان، فارس، کردستان، خراسان و جنوب البرز به‌صورت خودرو به فراوانی می‌روید. در کشورهای اطراف دریای مدیترانه و کشورهای آفریقایی و آسیایی نیز وجود دارد. برگ این گیاه پهن، وسیع، چرمی، محکم با رگبرگ‌های ضخیم و برجسته و مشبک، کم و بیش شامل بریدگی‌های عمیق، قطعات آن در حاشیه دارای دندانه‌های سخت خاری شده، پایینی‌ها در قاعده باریک، ساقه ای بدون دمبرک و تقریباً ممتد و کشیده بر روی ساقه، بالایی‌ها در برگیرنده کپه و بلندتر از آن- برگ‌ها شیرابه دار و متقابل شانه ای یا بن رست است. از نظر آب و هوایی گیاهی بسیار کم نیاز و مقاوم به سرما و خشکی هواست. تغییرات زیاد دما را تحمل می کند. به همین دلیل، پراکنش آن در آسیا و آفریقا بسیار گسترده است. گاهی فراوانی آن در دامنه کوهستان‌های ایران به اندازه‌ای می‌شود که عملاً یک کنگرزار را تشکیل می‌دهد، ولی بیشتر همراه با دیگر گیاهان مانند انواع زولا، هویچ صحرایی و گیاهان پیازی از جمله لاله، سیرها و ... دیده می‌شود. کنگر، خاک‌های عمیق و معدنی ریزشی و لغزشی را که از خرد شدن سنگ‌های کوهستان و جابه‌جا شدن آن‌ها به‌دست می‌آید، می‌پسندد. خاک‌هایی که کنگر در آن‌ها می‌روید، از لحاظ مواد آلی چندان غنی نیستند و هوموس کمی دارند. آب این گونه خاک‌ها به خوبی زه کشی طبیعی می‌شود. با توجه به اینکه کنگر در مناطق سرد کشت می‌شود و پراکسیداز از آنزیم‌هایی است که تحت شرایط تنش از جمله دماهای پایین فعالیتش افزایش می‌یابد، از این رو در پژوهش حاضر مطالعه خصوصیات سینتیکی آنزیم پراکسیداز از نظر دمایی، pH و اثر بازدارنده‌های مختلف در ریشه کنگر مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی

کنگر (گوندلیا تورنفورتی) از کوههای واقع در شهرستان بانه در استان کردستان در بهار سال ۱۳۹۳

نمونه‌برداری شدند و پس از جدا کردن بخش‌های ریشه‌ای آن و شستشو و توزین آن به منظور حفظ رطوبت و جلوگیری از ایجاد تغییرات نامطلوب در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان عصاره‌گیری نگهداری شدند. لازم به تذکر است که نام علمی گیاه کنگر با تطبیق گونه استان در منابع موجود و رستنی‌های گیاهی استان براساس فلور ایرانیکا مشخص شده است.

تهیه عصاره

نمونه‌های نیم کیلویی ریشه کنگر به منظور تهیه عصاره برای دوره‌های سنجش آنزیم هفتگی مورد استفاده قرار گرفته که برای این کار از بافر فسفات سدیم ۰/۲ مولار و pH ۶/۸ استفاده شد و محلول پلی‌وینیل پیرولیدون ۲ درصد نیز به نسبت ۵ میلی‌لیتر بافر استفاده گردید. عصاره حاصله پس از تهیه هموژنات آن به کمک دستگاه خردکن و همزن به کمک دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm به مدت نیم ساعت سانتریفوژ شد. سپس لایه فوقانی پالایش گردید و هموژنات نهایی در حجمهای ۳ میلی لیتری در ۷۰- درجه نگهداری شد تا طی سنجش‌های آنزیمی مورد استفاده قرار گیرند. غلظت پروتیین به روش لوری و با استفاده از پروتیین آلبومین گاوی به‌عنوان استاندارد مورد سنجش قرار گرفت (Lowry *et al*., 1951).

اندازه‌گیری و سنجش فعالیت آنزیمی پراکسیداز

فعالیت آنزیم به کمک روش Chance & Maehly (1955) مورد بررسی قرار گرفت طوری که مخلوط مورد سنجش ۳ میلی‌لیتری شامل ۰/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH ۵/۲، ۱ میلی لیتر سوبسترا (گایاکل ۲۰میلی‌مولار، کتکول ۱۵ میلی‌مولار و پیروگالل ۱۵ میلی‌مولار) و یک میلی لیتر آب اکسیژنه ۱۰ میلی‌مولار و ۰/۲ میلی لیتر نمونه آنزیمی بود که محلول پراکسید هیدروژن در زمان شروع واکنش اضافه گردید. اکسید شدن سوبسترا در دمای محیطی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و طول موج ۴۰۰ تا ۴۲۰ نانومتر بر حسب نوع سوبسترا صورت پذیرفت. جهت تعیین pH بهینه آنزیم از دو بافر استات سدیم با دامنه عمل ۴ تا ۵/۵ و بافر فسفات در محدوده ۵/۵ تا ۸ استفاده شد. فعالیت آنزیم در pHهای مختلف به‌طور جداگانه اندازه‌گیری شد و pH بهینه تعیین گردید. قبل از ثبت اطلاعات و در شروع کار دستگاه به کمک محلول شامل بافر و سوبسترای گایاکل کالیبره شده و هر سنجش نیز ۳ بار در دمای آزمایشگاه ۲۵ درجه انجام گردید.

بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن

آنزیم پراکسیداز آنزیمی دو سوبسترایی است که در این کار از سوبستراهای اول (گایاکل، کتکول و پیروگالل) و سوبسترای دوم پراکسید هیدروژن استفاده شده است. در این سنجش غلظت سوبسترای اول ثابت نگه داشته شد و محدوده متغیری از غلظت‌های پراکسیدهیدروژن از ۰ تا ۵۰ mM جهت سنجش فعالیت پراکسیداز در ۴۲۰-۴۰۰ nm مورد استفاده قرار گرفت.

اثر مهارکننده‌ها بر فعالیت پراکسیداز

آزید، سیانید و کوجیک اسید از مهارکننده‌های آنزیم پراکسیداز هستند که چگونگی مهار آنزیم توسط این مهارکننده‌ها مورد بررسی قرار گرفت. سنجش‌ها پس از ۵ دقیقه تیمار آنزیم با مهارکننده انجام شد طوری که اثر بازدارندگی مهارکننده‌ها در غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین نوع مهار فعالیت پلی فنل اکسیداز در حضور مهارکننده‌ها

برای تعیین نوع مهار فعالیت پلی‌فنل اکسیداز در حضور مهارکننده‌های کوجیک اسید، سیانید و آزید از

سه سوبسترای کتکول، گایاکل و پیروگالل استفاده شد. در حضور هر کدام از این سوبستراها به‌طور جداگانه، نوع مهار آنزیم به‌وسیله مهارکننده‌ها تعیین گردید. فعالیت آنزیم بدون حضور مهارکننده (کنترل) و در حضور حداقل ۲ غلظت انتخابی از مهارکننده‌ها مورد سنجش قرار گرفت. غلظت‌های انتخابی کوجیک اسید برای مهار فعالیت آنزیم در حضور سوبستراها، ۰/۳ و ۰/۶ میلی‌مولار، غلظت‌های انتخابی سیانید برای مهار فعالیت آنزیم در حضور سوبستراها، ۰/۰۰۸ و ۰/۰۰۱۲ میلی‌مولار و غلظت‌های انتخابی آزید برای مهار فعالیت آنزیم در حضور سوبستراها، ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌مولار استفاده گردید. برای انجام هر واکنش، غلظت مهارکننده و غلظت ثابت سوبسترا در هر دو کووت یکسان بوده و تنها با افزودن عصاره خام به میزان ۱۵۰ میکرولیتر به کووت مرجع واکنش انجام شده و تغییرات جذب در طول موج ماکزیمم محصول کوینونی مربوط به آن سوبسترا ثبت گردید. در پایان منحنی لاین ویور–برک برای فعالیت آنزیم در عدم حضور مهارکننده‌ها و در حضور غلظت‌های مختلف این مهارکننده‌ها جداگانه برای هر کدام از سوبستراها رسم شده و بدین وسیله نوع مهار آنزیم تعیین گردید.

نتایج و بحث

اطلاعات به دست آمده از سنجش فعالیت پراکسیداز ریشه کنگر در حضور گایاکل نشان می‌دهد که بیشترین فعالیت پراکسیدازی عصاره کنگر در ۵/۵ pH می‌باشد و آنزیم در pH های ۳ و پایین‌تر از آن و نیز ۸ و بالاتر از آن کل فعالیتش را از دست می‌دهد (شکل۱). pH بهینه پراکسیداز در این پژوهش ۵/۵ به دست آمد و pH بهینه پراکسیداز ریشه کنگر در حضور سوبستراهای کتکول و پیروگالل به ترتیب ۶ و ۶/۵ به‌دست آمد که در محدوده pH های گزارش شده برای سایر گونه‌ها یعنی ۴/۸ تا ۸ می‌باشد. به‌عنوان مثال pH بهینه پراکسیداز برگ چای ۵/۵ همانند کنگر، pH بهینه آنزیم پراکسیداز پوسته سویا ۴/۶، pH بهینه پراکسیداز عصاره برگ کلزا (Sabora *et al*., 1387) و pH بهینه پراکسیداز گیاه زعفران ۷/۵ (Ghamsari *et al*., 2007) گزارش شده است. از ویژگی خوب پراکسیداز کنگر می‌توان به پایداری و مقاومت این آنزیم در محدوده pH ۵ تا ۷ اشاره نمود که دامنه کاری نامحدود این آنزیم در کاربردهای صنعتی به‌شمار می‌آید.

سنجش فعالیت پراکسیداز در حضور سوبسترای گایاکل و پراکسید هیدروژن

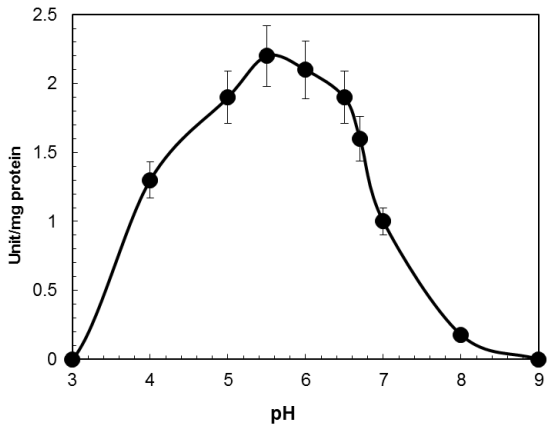
فعالیت پراکسیداز در حضور غلظت ثابت پراکسید هیدروژن (۲۰ میلی‌مولار) و غلظت‌های متغیر گایاکل نشان داد که با افزایش غلظت گایاکل فعالیت پراکسیدازی آنزیم نیز با شدت زیاد افزایش یافته طوری که در غلظت ۲۲ میلی‌مولار به بیشینه مقدار خود یعنی ۲/۴ Unit/mg. protein می‌رسد و با افزایش بیشتر غلظت گایاکل از ۲۵ میلی‌مولار به بالا با کاهش فعالیت پراکسیداز همراه است یعنی به نوعی خود سوبسترا اثر مهارکنندگی بر فعالیت پراکسیدازی را نشان می‌دهد. K_m یا تمایل آنزیم به سوبسترا طی این شرایط ۵ میلی‌مولار تعیین گردید (شکل ۲). با تغییر شرایط یعنی غلظت ثابت گایاکل ۱۵ میلی‌مولار و غلظت‌های متغیر پراکسید هیدروژن فعالیت آنزیم پراکسیداز روند سینتیکی مشابهی نشان داد و با افزایش غلظت پراکسید هیدروژن فعالیت پراکسیداز افزایش یافته تا جایی که در غلظت ۱۶ میلی‌مولار از پراکسید هیدروژن به بیشینه‌ی فعالیت خود رسید. بیشینه‌ی فعالیت پراکسیداز Unit/mg protein ۲ به‌دست آمد و K_m آن معادل ۴ میلی‌مولار تعیین شد (شکل ۳). افزایش بیشتر غلظت پراکسید هیدروژن از ۱۶ میلی‌مولار و به بالا با کاهش فعالیت پراکسیداز همراه بود به گونه‌ای که در ۵۰ میلی‌مولار فعالیت آنزیم به ۳۵٪ بیشینه فعالیت پراکسیداز می‌رسد.

سنجش فعالیت پراکسیداز در حضور سوبستراهای کتکول و پیروگالل

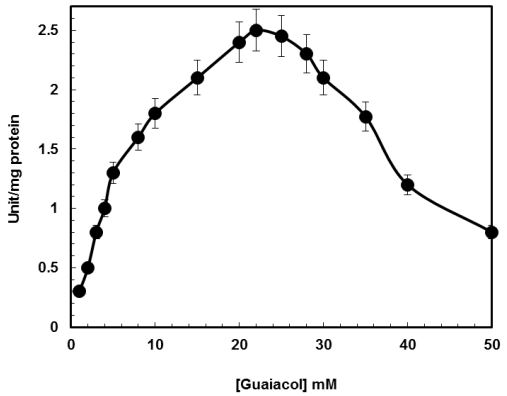
فعالیت پراکسیداز در حضور غلظت ثابت پراکسید هیدروژن (۲۰ میلی‌مولار) و غلظت‌های متغیر کتکول و پیروگالل به‌طور جداگانه نشان داد که با افزایش غلظت کتکول و پیروگالل فعالیت پراکسیدازی آنزیم نیز با شدت زیاد افزایش یافته طوری‌که بیشینه فعالیت پراکسیداز ریشه به‌ترتیب Unit/mg protein ۳/۳ و ۵/۳ حاصل شد و با افزایش بیشتر غلظت کتکول و پیروگالل با کاهش فعالیت پراکسیداز همراه بود یعنی به نوعی خود این سوبستراها نیز همانند گایاکل اثر مهارکنندگی بر فعالیت پراکسیدازی را نشان دادند. K_m یا تمایل آنزیم به سوبسترا طی این شرایط ۱۰ و ۸ میلی‌مولار به ترتیب برای کتکول و پیروگالل تعیین گردید (جدول ۱). با تغییر شرایط یعنی غلظت ثابت کتکول و پیروگالل و غلظت‌های متغیر پراکسید هیدروژن فعالیت آنزیم پراکسیداز روند سینتیکی مشابهی نشان داد و با افزایش غلظت پراکسید هیدروژن فعالیت پراکسیداز افزایش یافت.

جدول ۱. پارامترهای سینتیکی آنزیم پراکسیداز ریشه کنگر

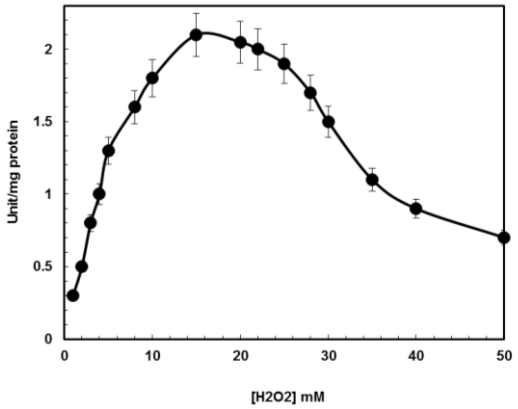
Substrate	Guaiacol	Catechol	Pyrogallol
Optimum pH	5.5	6	6.5
Optimum ionic strength (M)	0.5	0.4	0.4
Optimum Temperature (^oC)	40	40	40
Km (mM)	5	10	8
Vmax (Eu/mg.protein)	2.5	3.3	5.3
Catalytic efficiency (Eu/mg.protein. mM)	0.5	0.33	0.66



شکل ۱. بررسی اثر pH های مختلف بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در حضور گایاکل



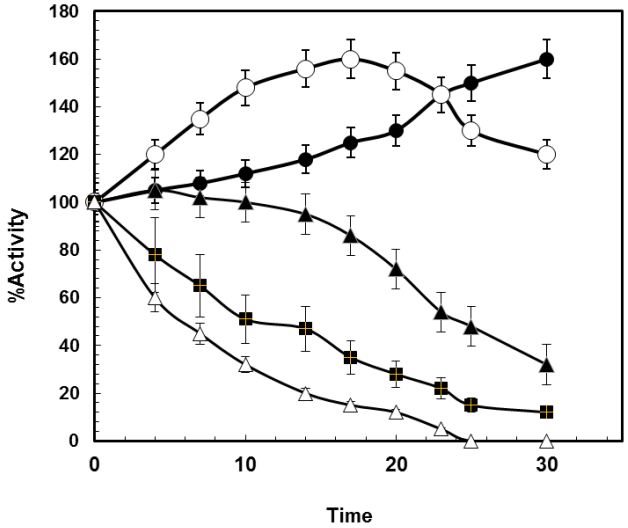
شکل ۲. بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در حضور غلظت ثابت پراکسید هیدروژن ۱۰ (میلی‌مولار) و غلظت‌های مختلف گایاکل



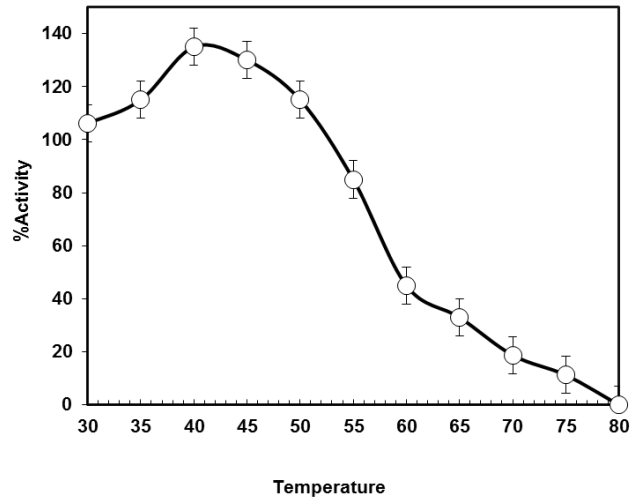
شکل ۳. بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در حضور غلظت ثابت گایاکل ۲۰ (میلی مولار) و غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن

اثر دما بر فعالیت پراکسیداز

فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت شرایط دمایی متغیر و زمان انکوباسیون در دماهای متغیر مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن در شکل‌های ۴ و ۵ آمده است. نتایج حاصله نشان می‌دهد که فعالیت پراکسیداز با افزایش دما از ۴۵ درجه سانتی‌گراد و نیز با افزایش زمان دمادهی کاهش نشان می‌دهد. به‌منظور بررسی پایداری دمایی آنزیم، عصاره‌های آنزیمی به‌طور مجزا در دماهای ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد در تیمار زمانی ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ دقیقه‌ای نگهداری شدند و باقیمانده فعالیت آنها نسبت به شاهد یعنی فعالیت آنزیم در ۲۵ درجه سانتی‌گراد مورد مقایسه قرار گرفت. نتیجه حاصله اینکه پایداری آنزیم و بیشترین فعالیت پراکسیدازی طی ۳۰ دقیقه تیمار آنزیم در ۳۰ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد حاصل شد و در گستره دمایی ۵۰ درجه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیمی عصاره با گذشت زمان کاهش یافت. در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تاثیر شرایط نامطلوب دمای محیط بر ساختار فعال آنزیم در مدت کوتاه‌تری ظاهر شده و فعالیت آنزیم در کمتر از ۱۰ دقیقه به ۳۰ درصد فعالیت اولیه‌ی نمونه شاهد رسید. تیمار عصاره حاوی پراکسیداز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های ۰ تا ۳۰ دقیقه با افزایش تدریجی فعالیت آنزیم همراه است در حالی‌که این افزایش فعالیت پراکسیدازی در دمای ۴۰ درجه تا ۱۰ دقیقه انکوباسیون صورت می‌پذیرد و تیمار بیشتر تا ۳۰ دقیقه آنزیم در دمای ۴۰ درجه با کاهش فعالیت آنزیم همراه است. در تیمار آنزیم در دماهای ۵۰ و ۶۰ درجه با افزایش زمان انکوباسیون به‌تدریج فعالیت پراکسیداز را کاهش می‌دهد طوری که پس از ۲۰ دقیقه انکوبه کردن آنزیم فعالیت پراکسیداز را تا ۹۰٪ کاهش می‌دهد. افزایش فعالیت پراکسیداز در ۳۰ درجه تا ۳۰ دقیقه باعث افزایش فعالیت آنزیم تا۱۶۰٪ می‌گردد درحالیکه بیشترین افزایش فعالیت پراکسیداز پس از ۱۸ دقیقه انکوباسیون در ۴۰ درجه تا۱۵۰٪ صورت می‌پذیرد و پس از آن انکوباسیون آنزیم تا ۳۰ دقیقه در ۴۰ درجه سانتی‌گراد باعث کاهش فعالیت پراکسیداز به حدود ۱۲۰٪ فعالیت اولیه می‌رسد، یعنی با کاهش کم و تدریجی فعالیت پراکسیداز ریشه کنگر همراه است. لذا می توان نتیجه گرفت که این آنزیم در برابر گرما نسبتاً مقاوم است چرا که نگهداری آنزیم تا دمای ۴۰ درجه حتی با افزایش فعالیت و افزایش مقاومت نیز همراه است و افزایش درجه حرارت محیط واکنش و محیط نگهداری در ۴۵ درجه و به بالا باعث تخریب ساختار واکنش‌گر آنزیم شده و فعالیت آن را کاهش داده است. دمای بهینه آنزیم نیز ۴۰ درجه سانتی‌گراد حاصل گردید. از آنجا که پراکسیداز موجود در کنگر در دماهای ۳۰ و ۴۰ درجه از خود مقاومت بیشتر نشان داده به گونه‌ای که حتی با افزایش فعالیت همراه هستند لذا در بسیاری از کارهای کاربردی در صنعت هم می تواند مورد استفاده و بهره‌برداری هم قرار گیرد.



شکل ٤. بررسی فعالیت پراکسیداز در دماهای مختلف و زمانهای مختلف تیمار و نگهداری آنزیم در شرایط دمایی {O: ۴۰ درجه؛ ●: ۳۵ درجه؛ ▲: ۵۰ درجه؛ ■: ۶۰ درجه؛ Δ: ۷۰ درجه}



شکل ۵. بررسی فعالیت پراکسیداز در دماهای مختلف در حضور گایاکل و پراکسید هیدروژن

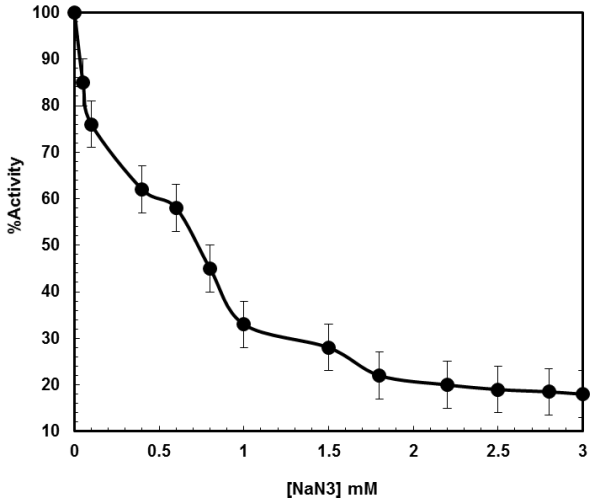
اثر بازدارنده‌های سیانید، آزید و کوجیک اسید

مقایسه اثر غلظت‌های مختلف سدیم سیانید و سدیم آزید و اثر مهارکنندگی آنها در دامنه غلظتی ۰ تا ۳ میلی‌مولار و در حضور گایاکل در شکل‌های ۶ و ۷ نشان داده شده است. نتایج حاصله نشان می‌دهد که سدیم سیانید در غلظت‌های کم اثر مهارکنندگی خود را نشان می‌دهد طوری‌که در غلظت ۰/۱ مولار بیش از ۹۰٪ فعالیت پراکسیداز را کاهش می‌دهد و در غلظت‌های بالاتر فعالیت پراکسیداز را به صفر می‌رساند و ساختار آنزیم را جهت انجام واکنش بیولوژیکی به‌طور کامل بر هم می‌ریزد در حالی که سدیم آزاید برای مهار پراکسیداز به غلظت‌های بالاتری نیاز دارد. افزایش غلظت سدیم آزاید تا ۳ میلی‌مولار فعالیت پراکسیداز را به حدود۸۰ ٪ فعالیت اولیه کاهش می‌دهد. IC50 مربوط به غلظت مهارکننده‌ای که باعث کاهش فعالیت پراکسیداز تا ۵۰ ٪ گردد در حضور سدیم آزید ۰/۰۰۸ میلی‌مولار محاسبه گردید در حالی‌که IC50 در حضور سدیم آزید ۰/۴ میلی‌مولار می‌باشد یعنی IC50 در حضور سدیم آزید ۳۱۲ برابر IC50 در حضور سدیم آزید

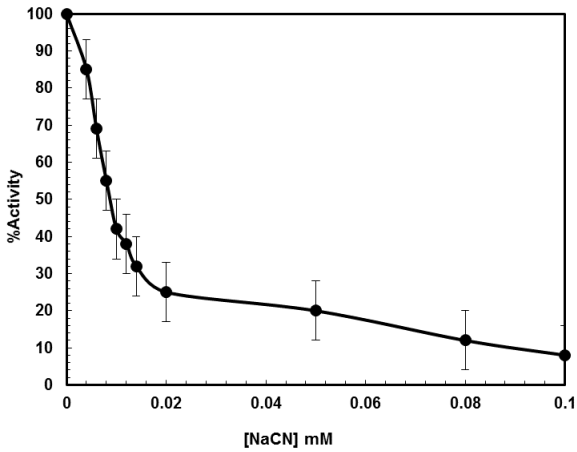
است. سدیم سیانید و سدیم آزید اثر بازدارندگی خود را بر فعالیت پراکسیداز از طریق میان‌کنش با اتم آهن بخش هم آنزیم اعمال می‌کنند و میزان IC50 حاصله هم نشان داد که سدیم سیانید میل ترکیبی بیشتری برای اتصال به آهن موجود در هم آنزیم نسبت به آزید نشان می‌دهد. IC50 مربوط به غلظت مهارکننده کوجیک اسید که باعث کاهش فعالیت پراکسیداز تا ۰٪ گردد در حضور گایاکل ۰/۸، در حضور کتکول ۰/۹۵ و در حضور پیروگالل ۰/۹ میلی‌مولار محاسبه گردید (جدول ۲).

جدول ۲. پارامتر IC50 و نوع مهار آنزیم پراکسیدازی ریشه کنگر در حضور مهارکننده‌های مختلف

		کتکول	گایاکل	پیروگالل
IC50	سدیم سیانید	۰/۰۰۹	۰/۰۰۸	۰/۱۲
نوع مهار		رقابتی	غیررقابتی	رقابتی
IC50	سدیم آزید	۰/۵	۰/۴	۰/۶
نوع مهار		غیررقابتی	نارقابتی	غیررقابتی
IC50	کوجیک اسید	۰/۹۵	۰/۸	۰/۹
نوع مهار		رقابتی	نارقابتی	نارقابتی



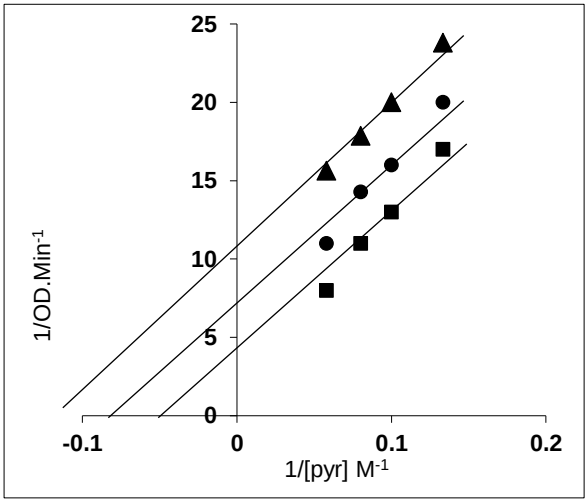
شکل ٦. بررسی فعالیت پراکسیداز در حضور غلظت‌های مختلف مهارکننده سدیم آزید



شکل ۷. بررسی فعالیت پراکسیداز در حضور غلظت‌های مختلف مهارکننده سدیم سیانید

تعیین نوع مهار آنزیم پراکسیداز ریشه کنگر در حضور مهارکننده سیانید

با توجه به اینکه سدیم سیانید ویژگی مهارکنندگی آنزیم پراکسیدازی را نشان می‌دهد، اثر این مهارکننده را بر فعالیت آنزیم تعیین نمودیم. به منظور تعیین نوع مهار آنزیم به‌وسیله سدیم سیانید سنجش‌های مختلفی را در حضور غلظت‌های مختلف گایاکل به‌عنوان سوبسترا انجام گردید. در این سنجش‌ها یک‌بار در عدم حضور سدیم آزید و در دو سنجش مختلف، در حضور دو غلظت مختلف از کوجیک اسید یعنی ۰/۰۰۸ میلی‌مولار و ۰/۰۰۱۲ میلی‌مولار سدیم سیانید، فعالیت آنزیم، با افزایش غلظت سوبسترای گایاکل مورد بررسی قرارگرفت. نهایتاً با محاسبه سرعت اولیه واکنش‌های آنزیمی، نمودار لاین ویوربرک یعنی عکس فعالیت بر حسب min^{-1} را علیه 1/[Guaiacol] بر حسب (mM^{-1}) رسم گردید که در شکل ۸ آمده است. بهترین خطوط ممکن از حد فاصل نقاط به‌دست آمده رسم گردید، که این خطوط همگی روی محور Xها یکدیگر را قطع می‌کنند. نمودار به‌دست آمده به‌طور خاص بیانگر مهار از نوع غیر رقابتی می‌باشد چرا که منحنی‌ها بیانگر عدد K_m یا ضریب میکائیلیس یکسان برای سه منحنی رسم شده در حضور و عدم حضور مهارکننده کوجیک اسید هستند و نیز با توجه به محل برخورد با محور Yها یعنی محور عکس فعالیت واکنش آنزیمی به تدریج با افزایش غلظت مهارکننده، سرعت واکنش آنزیمی کاهش می‌یابد که همگی بیانگر مهار غیر رقابتی هستند (جدول ۲). مهار آنزیم در حضور سوبستراهای کتکول و پیروگالل و در حضور مهارکننده سیانید نشان داد که سیانید مهارکننده رقابتی پراکسیداز ریشه کنگر (شکل ۸) در حضور کتکول و مهارکننده رقابتی این آنزیم در حضور پیروگالل است.



شکل ۸. منحنی‌های لاین ویوربرک بدست آمده برای اکسیداسیون کتکول در حضور غلظت‌های متغیرسدیم سیانید. نوع مهار ایجاد شده از نوع رقابتی می‌باشد.

[■ در عدم حضور سدیم سیانید (کنترل)، ● سدیم سیانید ۰/۰۰۸ میلی مولار، ▲ سدیم سیانید ۰/۰۰۱۲ میلی‌مولار]

تعیین نوع مهار آنزیم پراکسیداز ریشه کنگر در حضور مهارکننده آزید

با توجه به اینکه سدیم آزید ویژگی مهارکنندگی آنزیم پراکسیدازی را نشان می‌دهد، اثر این مهارکننده را بر فعالیت آنزیم تعیین نمودیم. به منظور تعیین نوع مهار آنزیم به‌وسیله سدیم آزید سنجش‌های مختلفی را در حضور غلظت‌های مختلف گایاکل به‌عنوان سوبسترا انجام گردید. در این سنجش‌ها یک بار در

عدم حضور سدیم آزید و در دو سنجش مختلف، در حضور دو غلظت مختلف از کوجیک اسید یعنی ۰/۲ میلی‌مولار و ۰/۴ میلی‌مولار سدیم آزید، فعالیت آنزیم، با افزایش غلظت سوبسترای گایاکل مورد بررسی قرارگرفت. نهایتاً با محاسبه سرعت اولیه واکنشهای آنزیمی، نمودار لاین ویوربرک یعنی عکس فعالیت بر حسب min^{-1} را علیه [Guaiacol] / 1 بر حسب (mM^{-1}) رسم گردید که در شکل ۸ آمده است . بهترین خطوط ممکن از حد فاصل نقاط به‌دست آمده رسم گردید، که این خطوط همگی به موازات همدیگر محور Xها را قطع می‌کنند. نمودار به‌دست آمده به‌طور خاص بیانگر مهار از نوع نارقابتی می‌باشد چرا که منحنی‌ها بیانگر عدد K_m یا ضریب میکائیلیس متفاوتی بوده که با افزایش مهارکننده به تدریج از میزان عدد Km کاسته می شود و نیز با توجه به محل برخورد با محور Yها یعنی محور عکس فعالیت واکنش آنزیمی به تدریج با افزایش غلظت مهارکننده، سرعت واکنش آنزیمی کاهش می یابد که همگی بیانگر مهار نارقابتی هستند. مهار آنزیم در حضور سوبستراهای کتکول و پیروگالل و در حضور مهارکننده آزید نشان داد که آزید مهارکننده غیررقابتی پراکسیداز ریشه کنگر در حضور کتکول و مهارکننده غیررقابتی این آنزیم در حضور پیروگالل است (جدول ۲).

تعیین نوع مهار آنزیم پراکسیداز ریشه کنگر در حضور مهارکننده کوجیک اسید

با توجه به اینکه کوجیک اسید مهارکننده آنزیم‌های اکسیدازی بوده، اثر این مهارکننده را بر فعالیت آنزیم تعیین نمودیم. به منظور تعیین نوع مهار آنزیم به‌وسیله کوجیک اسید سنجش‌های مختلفی را در حضور غلظت‌های مختلف گایاکل به‌عنوان سوبسترا انجام گردید. در این سنجش‌ها یک بار در عدم حضور کوجیک اسید و در دو سنجش مختلف، در حضور دو غلظت مختلف از کوجیک اسید یعنی ۰/۳ میلی‌مولار و ۰/۶ میلی‌مولار کوجیک اسید، فعالیت آنزیم، با افزایش غلظت سوبسترای گایاکل مورد بررسی قرارگرفت. نهایتاً با محاسبه سرعت اولیه واکنش‌های آنزیمی، نمودار لاین ویوربرک یعنی عکس فعالیت بر حسب min^{-1} را علیه [Guaiacol] / 1 بر حسب (mM^{-1}) رسم گردید که در شکل ۹ آمده است. بهترین خطوط ممکن از حد فاصل نقاط به‌دست آمده رسم گردید، که این خطوط همگی روی محور X ها یکدیگر را قطع می‌کنند. نمودار به‌دست آمده به‌طور خاص بیانگر مهار از نوع غیر رقابتی می‌باشد چرا که منحنی‌ها بیانگر عدد K_m یا ضریب میکائیلیس یکسان برای سه منحنی رسم شده در حضور و عدم حضور مهارکننده کوجیک اسید هستند و نیز با توجه به محل برخورد با محور Yها یعنی محور عکس فعالیت واکنش آنزیمی به تدریج با افزایش غلظت مهارکننده، سرعت واکنش آنزیمی کاهش می یابد که همگی بیانگر مهار غیر رقابتی هستند. مهار آنزیم در حضور سوبستراهای کتکول و پیروگالل و در حضور مهارکننده کوجیک اسید نشان داد که کوجیک اسید مهارکننده رقابتی پراکسیداز ریشه کنگر در حضور کتکول و مهارکننده نارقابتی این آنزیم در حضور پیروگالل است (جدول ۲).

به‌طور کلی، مهار سوبسترایی آنزیم پراکسیداز ریشه کنگر در حضور سوبستراهای گایاکل، کتکول و پیروگالل مشاهده شد به عبارتی افزایش زیاد غلظت محصولات با مهار آنزیم همراه است که به نوعی با سوبسترا بر سر قرارگیری در جایگاه فعال رقابت می‌کند. فعالیت پراکسیداز ریشه کنگر به‌وسیله مهارکننده‌های کوجیک اسید، سیانید و آزید مهارشد. نوع مهار ایجاد شده بر حسب نوع سوبسترا متفاوت است که این ویژگی در مورد برخی پراکسیدازهای گونه‌های دیگر نیز گزارش شده است. در مهار فعالیت پراکسیداز و طی اکسیداسیون سوبستراهای فنلی، نتایج حاصله نشانگر این مطلب است که نوع مهار آنزیم پراکسیدازی در حضور مهارکننده‌ها کاملاً وابسته به سوبسترا است. طوری که در حضور

سوبسترای گایاکل از الگوی غیر رقابتی و نارقابتی، در حضور سوبسترای پیروگالل از الگوی رقابتی، نارقابتی و غیررقابتی و در حضور سوبسترای کتکول از الگوی مهار رقابتی و غیررقابتی پیروی می‌کند. دماهای مختلف بر فعالیت پراکسیدازی اثرات متفاوتی اعمال می‌کند. طوری‌که دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد دمای مطلوب برای فعالیت آنزیم در حضور هر سه سوبسترای گایاکل، کتکول و پیروگالل محسوب می‌گردد. نکته دیگر اینکه در محدوده دمایی ۳۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد، فعالیت پراکسیدازی بسیار مطلوب می‌باشد، اما در دمای ۴۵درجه به بالا بیشتر رو به غیرفعال شدن رفته و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نیز کاملاً غیرفعال می‌گردد و ساختار فضائیش را از دست می‌دهد. در کل آنزیم پراکسیداز ریشه کنگر خصوصیات متفاوتی در حضور سوبستراهای مختلف از خود نشان داد طوری‌که بر اساس نوع سوبسترا دارای pH متفاوت، دمای مطلوب مختلف و نوع مهار آنزیمی متنوعی را در حضور بازدارنده‌ها نشان می‌دهد. نتایج حاصله با نتایج تحقیقات مشابه در گونه‌های مختلف گیاهی نزدیکی بسیاری را نشان می‌دهد (Saeidian, 2016).

سپاسگزاری

این طرح در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه پیام نور استان کردستان به انجام رسیده است و حمایت مالی آن نیز از طرف دانشگاه پیام نور صورت گرفته است.

REFERENCES

Adam, W.; Lazarus, M.; Saha-Moller, C.R.; Weichold, O.; Hoch, U.; Schreier, P.; (1999). Biotransformations with peroxidases. Advance Biochemical Engineering; 63: 74-108.

Dunford, H.B.; (1991). Horseradish peroxidase: structure and kinetic properties. In: Everse J, Everse KE, Grisham MB (eds.) Per¬oxidase in Chemistry and Biology (pp. 1–24) CRC Press, Boca Raton, FL.

Stanley, D.W.; Bourne, M.C.; Stone, A.P.; Wismer, W.V.; (1995). Low temperature blanching effects on chemistry, firmness and structure of canned green beans and carrots. Journal of Food Science; 60: 327-333.

Ghamsari, L.; Keyhani, E.; Golkhoo, Sh.; (2007). Kinetics Properties of Guaiacol Peroxidase Activity in Crocus sativus L. Corm during Rooting, Iranian Biomedical Journal; 11(3): 137-146.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J.; (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Chance, B.; Maehly, A.C.; (1955) Assays of catalases and peroxidases. In: Methods in Enzymology. (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., eds.) Academic Press, New York, Vol II. pp. 764-775.

Sabora, O.; Parsiavash L.; Moosavi nezhad S.Z.; Kiarostami, Kh.; (2008) Magazin of Biology of Iran. 21, 4.

Sanchez-Amat, A.; Solano, F.; (1997). A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine alteromonas shares catalytic capabilities. Biochem. Biophys. Res. Comm; 240: 787-792.

Saeidian, Sh.; (2016). Modifications of cresolase activity of Crataegus Spp in presence of Detergents, Inhibitors, Ionic detergents and Metal Ions. International Journal of Scientific Engineering and Applied Science; 2(3).