

## Kinetics studies of peroxidase enzyme in the presence of ferric oxide and copper oxide at difference temperatures

Maryam Kazemi Nafchi<sup>1</sup>, Behzad Shareghi<sup>2\*</sup>

1. M. Sc. Student of Biochemistry, Shahrekord University, Iran

2. Associated Professor, Shahrekord University, Iran  
(Received: Sep. 27, 2014 - Accepted: May 14, 2018)

## مطالعات سینتیکی آنزیم پراکسیداز در حضور اکسید آهن و اکسید مس در دماهای مختلف

مریم کاظمی نافچی<sup>۱</sup>، بهزاد شارق<sup>۲\*</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه شهرکرد

۲. دانشیار، دانشگاه شهرکرد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۷/۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۲/۲۴)

### Abstract

Peroxidases are a group of oxidoreductases that are produced by a number of microorganisms and plants, and catalyse the reduction of peroxides. Peroxidases are widely used in clinical biochemistry and enzyme immunoassay. Horseradish peroxidase isoenzyme C (HRPC) is one of the characterized peroxidases. The structure of the enzyme is largely alpha helical. Peroxidase enzyme is detox important enzyme that to work process for getting rid of the cells of additional hydrogen peroxide under normal and stress conditions, including contamination with toxic levels of heavy metals, however, severe stress possible influence upon the activity of detoxification enzyme. Kinetics studies of peroxidase enzyme were performed using a spectrophotometer UV-Vis fitted with electronic control system at 35 °C and 45 °C and pH4 and in the presence ferric oxide and copper oxide. Kinetic parameters show that ferric oxide and copper oxide becomes caused the decrease of maximum speed ( $V_{MAX}$ ) and activity of the enzyme. Likely due to the ferri and copper ions have positively charged, these places are on or near the sites of glycosylation of enzyme and by their negatively charged are suitable binding sites for iron and copper. Likely binding of iron and copper are caused more changes of the secondary structure and makes random coil deduction more than alpha helix.

**Keywords:** Horseradish peroxidase, Kinetic parameters, Ferric oxide, Copper oxide, Oxidoreductases.

### چکیده

پراکسیدازها (EC.1.11.1.7) گروهی از آنزیم‌های اکسید و ردوکتازها هستند که توسط تعدادی از میکروارگانیسم‌ها و گیاهان تولید می‌شوند و احیای پراکسیدها را کاتالیز می‌کنند. پراکسیدازها به‌طور وسیعی در بیوشیمی بالینی و آزمایشات ایمنی‌شناسی آنزیمی استفاده می‌شوند. ایزوآنزیم C پراکسیداز ترب کوهی (HRPC) یکی از متداول‌ترین پراکسیدازهای شناخته شده است ساختار این آنزیم به‌طور غالب دارای ماریچج آلفا است. آنزیم پراکسیداز آنزیم مهم سم زدایی است که برای خلاص شدن سلول‌ها از پراکسید هیدروژن اضافی تحت شرایط نرمال و استرس، شامل آلودگی با سطوح سمی فلزات سنگین، به کار می‌رود، به‌رحال استرس شدید ممکن است روی فعالیت سم‌زدایی خود آنزیم اثر بگذارد. مطالعات سینتیکی آنزیم پراکسیداز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis مجهز به سیستم کنترل الکترونیکی در دمای ۳۵ °C و ۴۵ °C و در pH ۴ و در حضور اکسید آهن و اکسید مس انجام گرفت. بررسی پارامترهای سینتیکی نشان می‌دهند که اکسید آهن و اکسید مس باعث کاهش سرعت ماکسیمم ( $V_{MAX}$ ) و فعالیت آنزیم پراکسیداز می‌شوند. احتمال دارد با توجه به این که یون آهن و مس بار مثبت دارد، این مکان‌ها روی جایگاه‌های گلیکوزیله آنزیم یا در کنار آن‌ها قرار دارند و به‌واسطه بار منفی خود مکان‌ای مناسبی برای اتصال آهن و مس هستند. احتمالاً اتصال آهن و مس باعث تغییر بیشتر ساختار دوم شده و باعث می‌شود کسر پیچ‌های تصادفی بیشتر از ماریچج‌های آلفا باشد.

**واژه‌های کلیدی:** پراکسیداز ترب کوهی، پارامترهای سینتیکی، اکسید آهن، اکسید مس، اکسیدو ردوکتازها.

## مقدمه

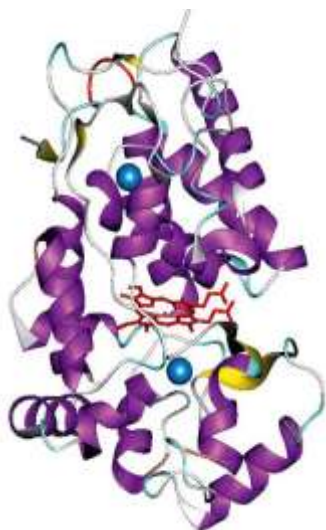
خانندان پراکسیدازها می‌باشد و دارای ایزو آنزیم‌های متعددی است که فراوان‌ترین آن‌ها ایزو آنزیم C می‌باشد. این ایزو آنزیم دارای ساختار غالب ماریپچ آلفا با ۱۸ هلیکس، ۱ صفحه بتا، ۱ سنجاق سر بتا، دو رشته بتا، یک پیچ گاما، ۲۷ میانکنش ماریپچ- ماریپچ، ۴ اتصال دی سولفید و ۲ یون کلسیم است. رزیدوهای کاتالیتیک این آنزیم آسپارژین ۷۲، آرژینین ۳۸ و هیستیدین ۴۲ هستند (Veitch, 2004). نقطه ایزو الکتریک آنزیم ۸/۹ است (Wang et al., 2008). این آنزیم دارای گروه پروستتیک هم است که به خاطر خصوصیات طیفی آن ویژگی‌های منحصر به فردی را برای تکنیک‌های بیوفیزیکی مثل اسپکتروسکوپی فلورسانس مهیا می‌کند (Tayefi-Nasrabadi et al., 2006). در واقع پراکسیدازها اکسیداسیون سوبسترهای مختلف را با استفاده از پراکسید هیدروژن یا دیگر پراکسیدها کاتالیز می‌کنند. چرخه کاتالیتیک پراکسیداز شامل فرم‌های آنزیمی حدواسط مجزا است (Mantha et al., 2002). در مرحله آغازی آنزیم طبیعی فریک توسط پراکسید هیدروژن به فرم یک حدواسط ناپایدار به نام ترکیب I اکسید می‌شود، و در نتیجه پراکسید به آب احیا می‌شود. سپس ترکیب I سوبسترای الکترون دهنده را اکسید می‌کند و به ترکیب II تبدیل می‌شود، و یک رادیکال آزاد رها می‌شود. ترکیب II سپس توسط یک مولکول سوبسترای دوم کاهش می‌یابد، دوباره وضعیت آهن III را ایجاد می‌کند و یک رادیکال آزاد دیگر تولید می‌شود (شکل ۱).

پراکسیدازها به‌طور وسیع در بیوشیمی بالینی و ایمونواسی آنزیمی (Sharma et al., 2002; Chiou et al., 2003) استفاده می‌شوند. بعضی کاربردهای جدید که برای پراکسیدازها پیشنهاد شده است شامل تیمار پسماندهای حاوی ترکیبات فنولی، سنتز مواد شیمیایی آروماتیک مختلف و حذف پراکسید از موادی مانند مواد غذایی و پسماندهای صنعتی (Agostini et al., 2002) می‌باشد.

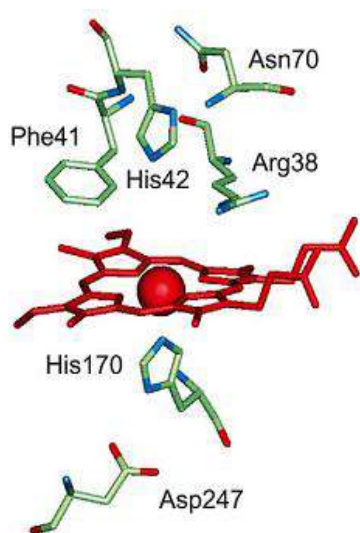
پراکسیدازها (EC 1.11.1.) در طبقه‌بندی آنزیم‌ها در گروه اکسیدوردوکتازها قرار می‌گیرند و توسط تعدادی از میکروارگانیسم‌ها و گیاهان تولید می‌شوند. این آنزیم‌ها دارای گروه هم (heme) بوده و گروه پروستتیک آن‌ها آهن (III) پروتوپورفیرین IX (فری پروتوپورفیرین IX) است. آن‌ها دارای وزن مولکولی از ۳۰۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰۰ دالتون می‌باشند. این آنزیم‌ها عمل احیای پراکسیدها مثل پراکسید هیدروژن و اکسیداسیون مواد آلی و معدنی مختلف را کاتالیز می‌کنند (Veitch, 2004).

فعالیت پراکسیدازی در گیاهان، میکروارگانیسم‌ها و حیوانات شناخته شده و پراکسیدازها نقش‌های مهمی را ایفا می‌کنند. پراکسیدازها با آنزیم‌های دیگر در سیستم‌های چند آنزیمی تولیدکننده پراکسید هیدروژن جفت می‌شوند و برای تعیین بسیاری از ترکیبات، از جمله گلوکز در خون استفاده می‌شوند. تعدادی از کاربردهای پراکسیداز در زیر آمده است:

- ۱) حذف آلودگی‌های فنولی و ترکیبات وابسته (Cheng et al., 2006)
  - ۲) رنگ‌زدایی رنگ‌های سنتزی (Ulson de Souza et al., 2007)
  - ۳) سنتز پلیمر و آلی (Oguchi et al., 1999)
  - ۴) گندزدایی از کود خوکی (Govere et al., 2007; Ye et al., 2009)
  - ۵) کاربرد پراکسیداز در صنایع خمیر کاغذ (Hatakka et al., 2003)
  - ۶) بیوسنسورهای پراکسیدازی (Jia et al., 2002)
  - ۷) کاربرد در کیت‌های تشخیصی و آنالیز (Sharma et al., 2002; Chiou et al., 2003)
  - ۸) ایمونواسی آنزیمی (Li et al., 2008)
  - ۹) پدیدار شدن استراتژی‌هایی در مورد پراکسیدازهای قارچی برای تولید سوخت‌های زیستی (Hammel & Cullen, 2008).
- آنزیم پراکسیداز ترب کوهی شناخته‌شده‌ترین عضو



شکل ۲. ارائه ساختار سه بعدی کریستال اشعه ایکس ایزوآنزیم C پراکسیداز ترب کوهی. گروه هم به رنگ قرمز در بین دامین‌های پروکسیمال و دیستال قرار گرفته که هر یک حاوی یک اتم کلسیم (کره آبی رنگ) می‌باشند. مناطق مارپیچ آلفا و صفحه بتا به ترتیب به رنگ بنفش و زرد نشان داده شده است.



شکل ۳. اسید آمینه‌های کلیدی در منطقه اتصال گروه هم آنزیم HRP. گروه هم و اتم آهن هم با رنگ قرمز مشخص شده است. هیستیدین ۱۷۰، یا هیستیدین پروکسیمال، با اتم آهن هم هماهنگ شده است و در حقیقت مکان هماهنگی مربوطه دیستال بالای صفحه هم خالی است (Veitch, 2004).

دو مکان اتصال کلسیم در موقعیت‌های پروکسیمال و دیستال نسبت به صفحه هم قرار گرفته‌اند و به وسیله شبکه‌ای از باندهای هیدروژنی به ناحیه هم متصل هستند. هر مکان کلسیم به صورت ۷- کوردیناسیون است که با لیگاندهای اکسیژن‌دهنده‌ای که از ترکیب کربوکسیلات‌های زنجیر جانبی اسید آمینه‌ها (آسپارتیک اسید)، گروه هیدروکسیل (سرین، ترئونین)، کربونیل‌های اسکلتی و یک مولکول آب ساختاری (فقط در سمت دیستال) ایجاد می‌شوند. از دست رفتن کلسیم باعث کاهش فعالیت و پایداری گرمایی می‌شود و همچنین تغییرات ظریف در محیط هم که می‌تواند از طریق اسپکتروسکوپی بررسی شود (Veitch, 2004). ساختار آنزیم به طور زیادی دارای مارپیچ آلفا است گرچه یک ناحیه کوچک صفحه بتا نیز وجود دارد. دو دومین پروکسیمال و دیستال دیده می‌شود که گروه هم بین آن‌ها قرار گرفته است. این دومین‌ها احتمالاً در اثر یک دو برابر شدن ژنی منشأ گرفته‌اند (شکل ۲).

HRPC دارای دو نوع مرکز فلز است، یکی آهن (III) پروتوپورفیرین IX (که معمولاً گروه هم گفته می‌شود)، و دیگری دو اتم کلسیم می‌باشد. هر دو برای درستی عملکرد و ساختار آنزیم ضروری هستند. گروه هم از هیستیدین ۱۷۰ (رزیدوی هیستیدین پروکسیمال) با یک اتصال کوردیناسی بین اتم Nε2 زنجیر جانبی هیستیدین و اتم آهن هم، به آنزیم متصل می‌شود. سایت کوردیناسی محوری دوم (به اصطلاح طرف دیستال هم) در مرحله استراحت آنزیم اشغال نشده است اما برای پراکسید هیدروژن در طی چرخش آنزیم در دسترس است (Veitch, 2004). در شکل ۳ اسید آمینه‌های کلیدی در منطقه اتصال گروه هم آنزیم و در جدول ۱ رزیدوهای اسید آمینه نشان داده شده است.

## جدول ۱. رزیدوهای اسید آمینه

آرژینین ۳۸	نقش ضروری در (۱)، تشکیل و پایداری ترکیب I، (۲) اتصال و پایداری لیگاندها و سوبستراهای آروماتیک
فنیل آلانین ۴۱	جلوگیری از دسترسی سوبسترا به اکسیژن فریل ترکیب I
هیستیدین ۴۱	نقش ضروری در (۱)، تشکیل ترکیب I (که پروتون را از پراکسید هیدروژن می‌پذیرد)، (۲) اتصال و پایداری لیگاندها و سوبستراهای آروماتیک
آسپارژین ۷۰	حفظ بازی بودن زنجیر جانبی هیستیدین ۴۲ از طریق زوج هیستیدین ۴۲ آسپارژین ۷۰ (باند هیدروژنی از اکسیژن آمیدی آسپارژین ۷۰ به NH ایمیدازول هیستیدین ۴۲)
پرولین ۱۳۹	قسمتی از موتیف ساختاری 'Pro-X-Pro' (پرولین ۱۳۹- آلانین ۱۴۰- پرولین ۱۴۱ در ایزوآنزیم C)، که در پراکسیدازهای گیاهی حفاظت شده است.

## سوبستراهای آنزیم

یکی از ویژگی‌های برجسته آنزیم پراکسیداز ترب کوهی توانایی آن در اتصال به سوبستراهای مختلف است که در نتیجه آن تحت تأثیر بازآرایی‌های مختلف ساختاری قرار می‌گیرد تا این سوبستراها را در خود جای دهد (Fidy *et al.*, 1989). برای اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم از بیش از دویست سوبسترای مختلف استفاده می‌شود (Silaghi-Dumitrescu).

جدول ۲ سوبستراهای متنوع پراکسیداز ترب کوهی و روش‌های طیف‌سنجی مربوطه ذکر شده است.

## مکانیزم کاتالیتیک

مکانیزم کاتالیز پراکسیداز ترب کوهی و بویژه ایزوآنزیم C به‌طور گسترده‌ای بررسی شده است. بعضی ویژگی‌های مهم چرخه کاتالیتیک آنزیم با فرولیک اسید به‌عنوان سوبسترا در شکل ۴ آمده است.

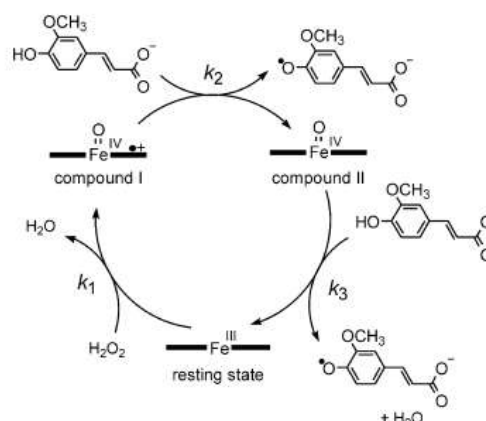
## جدول ۲. سوبستراهای متنوع پراکسیداز ترب کوهی

سوبسترا	روش
۲-آزینو-دی(۳-اتیل-بنزوتیازولین-۶)-سولفونات	طیف‌سنجی نوری
پیروگالول	طیف‌سنجی نوری، طیف‌سنجی فلورسانس، پلاروگرافی، تیتراسنجی
گوایاکول	طیف‌سنجی نوری، زمان سنجی، تیتراسنجی
هیدروکوئینون	پلاروگرافی، طیف‌سنجی فلورسانس، زمان سنجی
۴-آمینو آنتی پیرین	طیف‌سنجی نوری
فنول	طیف‌سنجی نوری، (EPR رزونانس پارامغناطیس الکترون)
فلورسین	طیف‌سنجی فلورسانس
لومینول	طیف‌سنجی فلورسانس
ارتو-دی‌آنیزیدین	طیف‌سنجی نوری
فرولیک اسید	طیف‌سنجی فلورسانس
کافئیک اسید	طیف‌سنجی فلورسانس
مالاشیت گرین	طیف‌سنجی نوری
بنزیدین	زمان سنجی، طیف‌سنجی نوری
آنیلین	طیف‌سنجی نوری
آسکوربات	طیف‌سنجی نوری، زمان سنجی، پلاروگرافی

قرار گرفت. سوبسترای مورد استفاده ارتو- دی آنیزیدین بود که محلول غلیظ آن با غلظت ۲۰ میلی مولار در آب مقطر دو بار تقطیر تهیه شد. محلول غلیظ پراکسید هیدروژن نیز با غلظت ۱۰۰ میلی مولار در آب مقطر دو بار تقطیر تهیه شد. در این آزمایشات ارتو- دی آنیزیدین به عنوان سوبسترای ثابت با غلظت ۵ میلی مولار در هر نمونه و پراکسید هیدروژن با غلظت‌های ۱-۵ میلی مولار به عنوان سوبسترای متغیر در نظر گرفته شدند. طول موج منتخب ۴۶۰ نانومتر مخصوص پیگیری محصول تولید شده از اکسیداسیون ارتو- دی آنیزیدین است. محلول غلیظ اکسید آهن با غلظت ۱۰۰ میلی مولار در آب مقطر دو بار تقطیر تهیه و اثر غلظت‌های ۰-۳۰ میلی مولار آن، پس از ۵ دقیقه آنکوباسیون با آنزیم، در دماهای ۳۵ °C و ۴۵ °C بر سینتیک آنزیم مورد بررسی قرار گرفت.

#### مطالعه سینتیکی پراکسیداز ترب کوهی در حضور اکسید مس در دماهای مختلف

در این مطالعه از دستگاه اسپکتروفتومتری UV/VIS مدل pharmacia 4000 استفاده شد. غلظت نمونه آنزیم مورد مطالعه ۰/۰۷۵ میلی گرم در میلی لیتر بود. تامپون استات سدیم ۰/۱ مولار با pH ۴ مورد استفاده قرار گرفت. سوبسترای مورد استفاده ارتو- دی آنیزیدین بود که محلول غلیظ آن با غلظت ۲۰ میلی مولار در آب مقطر دو بار تقطیر تهیه شد. محلول غلیظ پراکسید هیدروژن نیز با غلظت ۱۰۰ میلی مولار در آب مقطر دو بار تقطیر تهیه شد. در این آزمایشات ارتو- دی آنیزیدین به عنوان سوبسترای ثابت با غلظت ۵ میلی مولار در هر نمونه و پراکسید هیدروژن با غلظت‌های ۱-۵ میلی مولار به عنوان سوبسترای متغیر در نظر گرفته شدند. طول موج منتخب ۴۶۰ نانومتر مخصوص پیگیری محصول تولید شده از اکسیداسیون ارتو- دی آنیزیدین است. محلول غلیظ اکسید مس با غلظت ۱۰۰ میلی مولار در آب مقطر دو بار تقطیر تهیه و اثر غلظت‌های ۰-۳۰ میلی مولار آن، پس از ۵ دقیقه



شکل ۴. چرخه کاتالیتیک پراکسیداز ترب کوهی با سوبسترای فرولات

## مواد و روش‌ها

### ماده مصرفی

پراکسیداز ترب کوهی و پراکسید هیدروژن ۳۰٪ و اکسید آهن و اکسید مس از شرکت مرک، ارتو- دی آنیزیدین از شرکت سیگما استفاده شد.

### طرز تهیه تامپون استات سدیم

جهت تهیه تامپون استات ۰/۱ مولار مقدار ۱۳/۶۰۸ گرم از استات سدیم در آب مقطر دو بار تقطیر حل شد سپس توسط دستگاه pH متر، pH آن روی ۴ تنظیم گردید و در بالن ۱ لیتری به حجم رسانده شد. علت انتخاب pH ۴ این است که طبق مطالعات گذشته تناسب بالاتری برای یون آهن ۶ کوردینات در pH ۴ نسبت به pH ۷ وجود دارد که طیف جذبی را آشفته نمی کند (Smulevich et al., 1997; Laurenti et al., 2000). تمامی آزمایشات این مطالعه در pH ۴ انجام شد.

### مطالعه سینتیکی پراکسیداز ترب کوهی در حضور اکسید آهن در دماهای مختلف

در این مطالعه از دستگاه اسپکتروفتومتری UV/VIS مدل pharmacia 4000 استفاده شد. غلظت نمونه آنزیم مورد مطالعه ۰/۰۷۵ میلی گرم در میلی لیتر بود. تامپون استات سدیم ۰/۱ مولار با pH ۴ مورد استفاده

چنانچه مشاهده می‌شود طبق نمودار میکائیلیس- منتن، در غلظت ۵ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن، آنزیم به بیشینه سرعت خود یا  $V_{MAX}$  می‌رسد. همان‌طورکه پیداست در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد آنزیم دارای بیشینه سرعت بیشتری نسبت به دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد است. نمودار ۱ (نمودار میکائیلیس) منتن پراکسیداز ترب کوهی را در دماهای ۳۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهد.

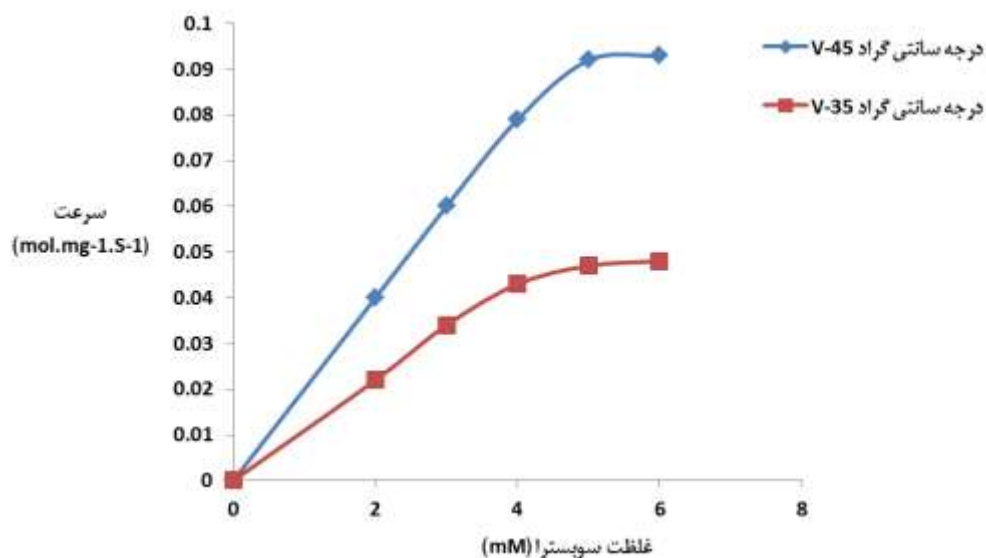
**بررسی نتایج مطالعه سینتیکی پراکسیداز ترب کوهی در حضور اکسید آهن در دماهای مختلف**  
در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف اکسید آهن، در دماهای ۳۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد، بر سینتیک پراکسیداز ترب کوهی بررسی شد. نتایج در نمودارهای ۲ و ۳ آورده شده است. همان‌طورکه مشاهده می‌شود در دماهای ۳۵ °C و ۴۵ °C با افزایش غلظت اکسید آهن، مقدار  $V_{MAX}$  کاهش یافته و مقدار  $K_m$  افزایش یافته است بنابراین اثر مهارکنندگی روی آنزیم دارند و مهار مخلوط را نشان می‌دهند. جدول‌های ۳ و ۴ مقادیر  $K_m$  و  $V_{MAX}$  پراکسیداز ترب کوهی در حضور اکسید آهن نشان می‌دهد.

انکوباسیون با آنزیم، در دماهای ۳۵ °C و ۴۵ °C بر سینتیک آنزیم مورد بررسی قرار گرفت.

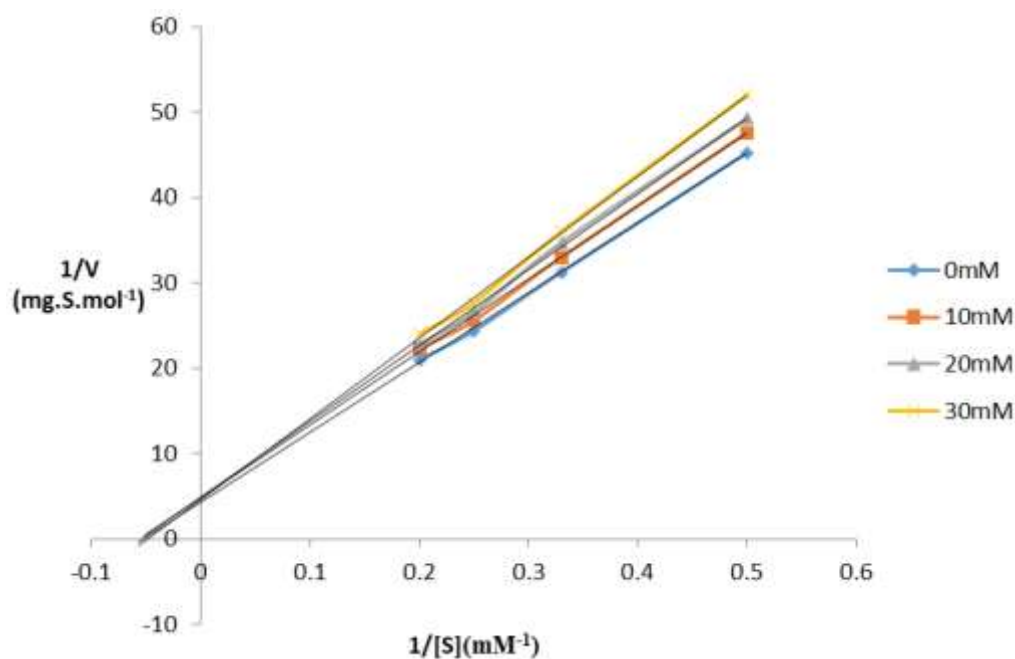
## نتایج

### بررسی نتایج مطالعه سینتیکی پراکسیداز ترب کوهی در دماهای مختلف

سینتیک آنزیم پراکسیداز ترب کوهی همان‌طورکه در فصل دوم اشاره شد، با پیگیری اکسیداسیون وابسته به پراکسید هیدروژن ماده ارتو- دی آنیزیدین در ۴۶۰ نانومتر به دست می‌آید بدین منظور واکنش با افزودن پراکسید هیدروژن آغاز و فعالیت آن اندازه‌گیری می‌شود (Keyhani et al., 2003; Keyhani et al., 2005). در این مطالعات ارتو- دی آنیزیدین به عنوان سوبسترای ثابت، و پراکسید هیدروژن به عنوان سوبسترای متغیر در نظر گرفته شد. محلول غلیظ ارتو دی آنیزیدین با غلظت ۲۰ میلی‌مولار روزانه در آب مقطر دو بار تقطیر تهیه و غلظت ۵ میلی‌مولار آن در هر نمونه استفاده شد. محلول غلیظ پراکسید هیدروژن نیز با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار در آب مقطر تهیه و غلظت ۵-۱ میلی‌مولار آن در آزمایشات استفاده شد. غلظت نمونه آنزیمی مورد استفاده ۰/۰۷۵ میلی‌گرم در میلی لیتر در بافر استات با pH ۴ بوده است.



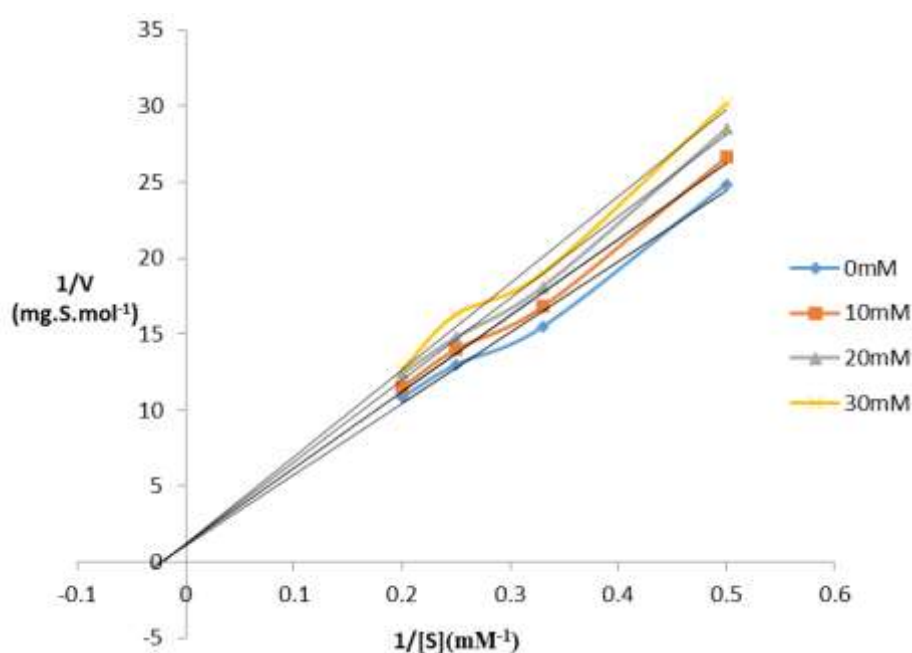
نمودار ۱. نمودار میکائیلیس- منتن پراکسیداز ترب کوهی در دماهای ۳۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد



نمودار ۲. اثر غلظت‌های مختلف اکسید آهن بر سینتیک پراکسیداز ترب کوهی در دمای ۳۵°C

جدول ۳. مقادیر  $V_{MAX}$  و  $K_m$  پراکسیداز ترب کوهی در حضور اکسید آهن در دمای ۳۵ °C

$K_m$ (mM)	$V_{MAX}$ (mol.mg <sup>-1</sup> .S <sup>-1</sup> )	غلظت اکسید آهن (میلی مولار)
۱۸	۰/۲۶	۰
۱۸/۲۰	۰/۲۳	۱۰
۱۸/۵	۰/۲۲	۲۰
۱۸/۵	۰/۲۱	۳۰



نمودار ۳. اثر غلظت‌های مختلف اکسید آهن بر سینتیک پراکسیداز ترب کوهی در دمای ۴۵ °C

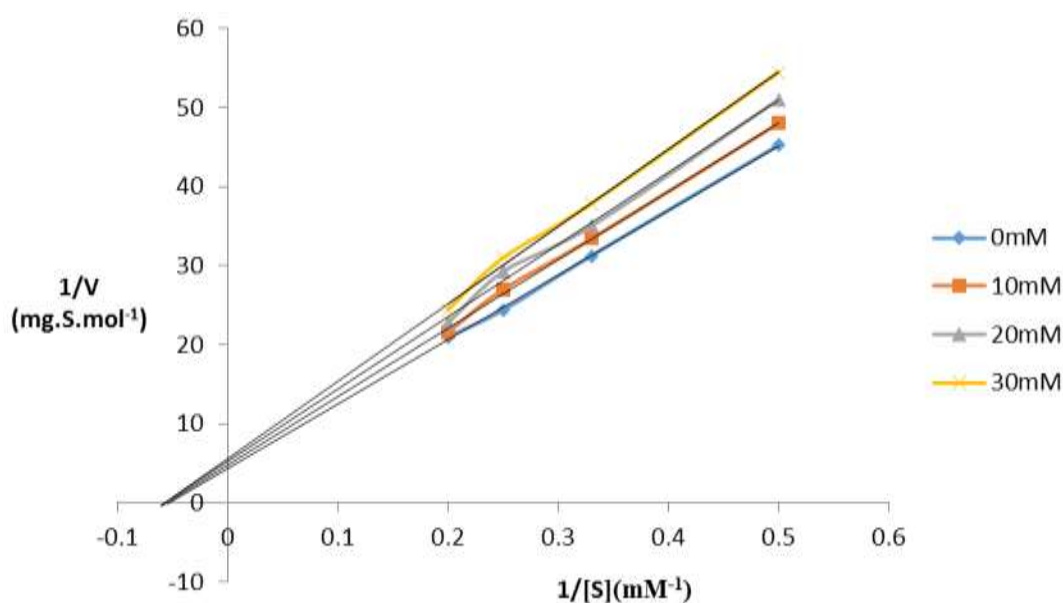
**جدول ۴.** مقادیر  $V_{MAX}$  و  $K_m$  پراکسیداز ترب کوهی در حضور اکسید آهن در دمای  $45^\circ C$ 

$K_m$ (mM)	$V_{MAX}$ ( $mol.mg^{-1}.S^{-1}$ )	غلظت اکسید آهن (میلی‌مولار)
۴۱	۱	۰
۴۱/۳۰	۰/۸۵	۱۰
۴۱/۴۰	۰/۸۱	۲۰
۴۱/۵۰	۰/۸۰	۳۰

در دماهای  $35^\circ C$  و  $45^\circ C$  با افزایش غلظت اکسید مس، مقدار  $V_{MAX}$  کاهش یافته و مقدار  $K_m$  ثابت است بنابراین اثر مهارکنندگی روی آنزیم دارند و مهار غیر رقابتی را نشان می‌دهند. جدول‌های ۵ و ۶ مقادیر  $V_{MAX}$  و  $K_m$  پراکسیداز ترب کوهی در حضور اکسید مس نشان می‌دهد.

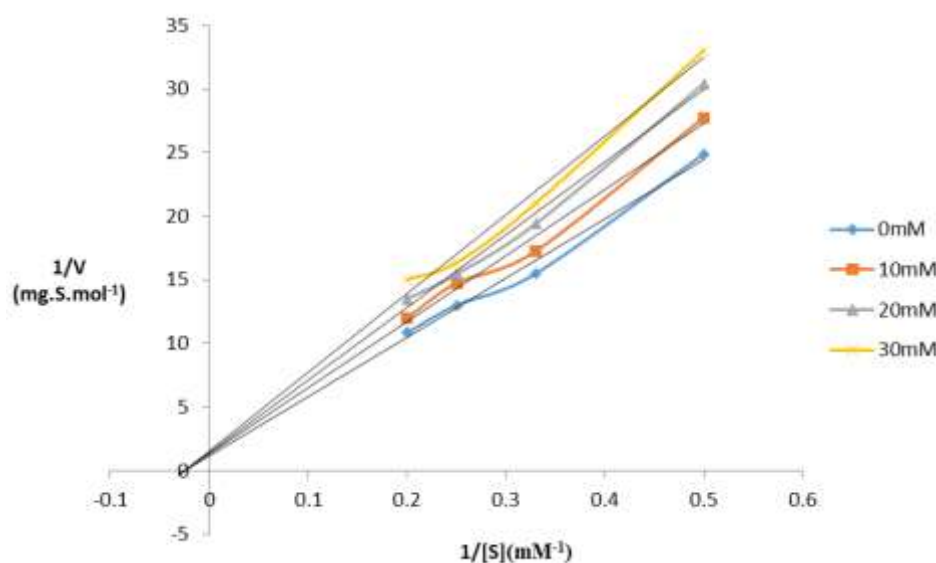
#### بررسی نتایج مطالعه سینتیکی پراکسیداز ترب کوهی در حضور اکسید مس در دماهای مختلف

در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف اکسید مس، در دماهای  $35^\circ C$  و  $45^\circ C$  بر سینتیک پراکسیداز ترب کوهی بررسی شد. نتایج در نمودارهای ۴ و ۵ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود

**نمودار ۴.** اثر غلظت‌های مختلف اکسید مس بر سینتیک پراکسیداز ترب کوهی در دمای  $35^\circ C$ **جدول ۵.** مقادیر  $V_{MAX}$  و  $K_m$  پراکسیداز ترب کوهی در حضور اکسید مس در دمای  $35^\circ C$ 

$K_m$ (mM)	$V_{MAX}$ ( $mol.mg^{-1}.S^{-1}$ )	غلظت اکسید مس (میلی‌مولار)
۱۸	۰/۲۶	۰
۱۸	۰/۲۲	۱۰
۱۸	۰/۲۰	۲۰
۱۸	۰/۱۹	۳۰





نمودار ۵. اثر غلظت‌های مختلف اکسید مس بر سینتیک پراکسیداز ترب کوهی در دمای ۴۵ °C

جدول ۶. مقادیر  $V_{MAX}$  و  $K_m$  پراکسیداز ترب کوهی در حضور اکسید مس در دمای ۴۵ °C

$K_m$ (mM)	$V_{MAX}$ ( $mol.mg^{-1}.S^{-1}$ )	غلظت اکسید مس (میلی مولار)
۴۱	۱	۰
۴۱	۰/۸۳	۱۰
۴۱	۰/۷۵	۲۰
۴۱	۰/۶۸	۳۰

مارپیچ‌های آلفا باشد ( Mulrooney *et al.*, 2005; Grossoehme *et al.*, 2007).

تغییرات ساختاری ایجادشده توسط یون آهن و مس در آنزیم احتمالاً کوردیناسیون کلسیم را به هم ریخته و کمک به از دست رفتن فعالیت توسط آهن و مس می‌کند. قسمتی از تغییرات طیفی مشاهده شده در آهن و مس ممکن است به خاطر جابجا شدن کلسیم‌ها باشد. مس یون فلزی است که به‌وفور در طبیعت و محیط زندگی ما پراکنده شده است و دارای اثرات مهاری بر فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها می‌باشد. یون مس از طریق گروه‌های سولفیدریل (-SH) به آنزیم‌ها و پروتئین‌ها متصل شده و ساختار آن‌ها را بر هم زده و غیر فعال می‌کند (Yoon *et al.*, 2007). اغلب فلزات سنگین در واکنش‌های بیولوژیکی سلول‌های زنده دخالت و فعالیت‌های متابولیکی آن‌ها را مختل می‌نمایند.

## بحث و نتیجه‌گیری

آنزیم پراکسیداز ترب کوهی حاوی دو یون کلسیم ساختاری است که برای فعالیت و پایداری آنزیم ضروری هستند. کلسیم دیستال از طریق آسپاراتات ۴۳ به هیستیدین ۴۲ متصل است و کلسیم پروکسیمال از طریق ترئونین ۱۷۱ به هیستیدین ۱۷۲ متصل شده است. کاهش کلسیم مکان دیستال باعث تغییر کونفورماسیون شده و وضعیت اسپینی آهن را تغییر می‌دهد (Huang *et al.*, 2003). با توجه به این که یون آهن و مس بار مثبت دارد، مکان‌های اتصالی این یون‌ها روی جایگاه‌های گلیکوزیله آنزیم یا در کنار آن‌ها قرار دارند و به‌واسطه بار منفی خود مکان‌های مناسبی برای اتصال آهن و مس هستند اتصال آهن و مس نیز احتمالاً باعث تغییر بیشتر ساختار دوم شده و باعث می‌شود کسر پیچ‌های تصادفی بیشتر از

و مبین مهار مخلوط می‌باشد، همچنین با افزایش غلظت اکسید مس، مقدار  $V_{MAX}$  کاهش یافته و مقدار  $K_m$  ثابت است بنابراین اثر مهار غیر رقابتی را روی آنزیم نشان می‌دهند.

نتایج حاصل از مطالعات مربوط به فعالیت سینتیکی آنزیم پراکسیداز در حضور اکسید آهن و اکسید مس بیانگر این است که با افزایش غلظت اکسید آهن  $V_{MAX}$  کاهش و  $K_m$  افزایش یافته است

## REFERENCES

- Agostini, E.; Hernandez Ruiz, J.; Arnao, M. B.; Milrad, S. R.; Tigier, H. A.; Acosta, M.; (2002). A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy root cultures: inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits. *Biotechnology and applied biochemistry*, 35(1): 1-7.
- Chiou, C. C.; Chang, P. Y.; Chan, E. C.; Wu, T. L.; Tsao, K. C.; Wu, J. T.; (2003). Urinary 8- hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. *Clinica chimica acta*, 334(1-2): 87-94.
- Cheng, J.; Ming Yu, S.; Zuo, P.; (2006). Horseradish peroxidase immobilized on aluminum pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. *Water Research*; 40(2): 283-290.
- Fidy, J.; Paul, K. G.; Vanderkooi, J. M.; (1989). Differences in the binding of aromatic substrates to horseradish peroxidase revealed by fluorescence line narrowing. *Biochemistry*; 28(19): 7531-7541.
- Govere, E. M.; Tonegawa, M.; Bruns, M. A.; Wheeler, E. F.; Kephart, K. B.; Voigt, J. W.; Dec J.; (2007). Using minced horseradish roots and peroxides for the deodorization of swine manure: A pilot scale study. *Bioresource Technology*; 98(6): 1191-1198.
- Grossoehme, N. E.; Mulrooney, S. B.; Hausinger, R. P.; Wilcox, D. E.; (2007). Thermodynamics of  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , and Zn- binding to the urease metallochaperone UreE. *Biochemistry*; 46(37): 10506-10516.
- Hammel, K. E.; Cullen, D.; (2008). Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current Opinion in Plant Biology*; 11(3): 349-355.
- Hatakka, A.; Lundell, T.; Hofrichter, M.; Maijala, P.; (2003). Manganese peroxidase and its role in the degradation of wood lignin. *ACS Publications*, 230-245.
- Huang, Q.; Laberge, M.; Szigeti, K.; Fidy, J.; Schweitzer Stenner, R.; (2003). Resonance Raman spectroscopy study of change of iron spin state in horseradish peroxidase C induced by removal of calcium. *Biopolymers*; 72(4): 241-248 .
- Jia, J.; Wang, B.; Wu, A.; Cheng, G.; Li, Z.; Dong, S.; (2002). A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: self-assembling gold nanoparticles to three -dimensional sol-gel network. *Analytical Chemistry*; 74(9): 2217-2223.
- Keyhani, J.; Keyhani, E.; Einollahi, N.; Minai-Tehrani, D.; Zarchipour, S.; (2003). Heterogeneous inhibition of horseradish peroxidase activity by cadmium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*; 1621(2): 140 -148.
- Keyhani, J.; Keyhani, E.; Zarchipour, S.; Tayefi-Nasrabadi, H.; Einollahi, N.; (2005). Stepwise binding of nickel to horseradish peroxidase and inhibition of the enzymatic activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*; 1722(3): 312-323.
- Laurenti, E.; Suriano, G.; Ghibaudi, E. M.; Ferrari, R. P.; (2000). Ionic strength and pH effect on the Fe (III)-imidazolate bond in the heme pocket of horseradish peroxidase: An EPR and UV-visible

- combined approach. *Journal of Inorganic Biochemistry*; 81(4): 259-266.
- Li, X. M.; Yang, X. Y.; Zhang, S. S.; (2008). Electrochemical enzyme immunoassay using model labels. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*; 27(6): 543-553.
- Mantha, R.; Biswas, N.; Taylor, K. E.; Bewtra, J. K.; (2002). Removal of nitroaromatics from synthetic wastewater using two-step zero-valent iron reduction and peroxidase-catalyzed oxidative polymerization. *Water Environment Research*; 74(3): 280-287.
- Mulrooney, S. B.; Ward, S. K.; Hausinger, R. P.; (2005). Purification and properties of the Klebsiella aerogenes UreE metal-binding domain, a functional metallochaperone of urease. *J. Bacteriol*; 187: 3581-3585.
- Oguchi, T.; Tawaki, S.; Uyama, H.; Kobayashi, S.; (1999). Soluble polyphenol. *Macromolecular Rapid Communications*; 20(7): 401-403.
- Sharma, S. K.; Sehgal, N.; Kumar, A.; (2002). A quick and simple biostrip technique for detection of lactose. *Biotechnology Letters*; 24(20): 1737-1739.
- Silaghi-Dumitrescu, R. L.; (1996). HRP: A summary of its structure, mechanism and substrate diversity. *LABPV-Peroxidase Biotechnology and Application*, 1-17.
- Smulevich, G.; Paoli, M.; De Sanctis, G.; Mantini, A. R.; Ascoli, F.; Coletta, M.; (1997). Spectroscopic evidence for a conformational transition in horseradish peroxidase at very low pH. *Biochemistry*; 36(3): 640-649.
- Tayefi-Nasrabadi, H.; Keyhani, E.; Keyhani, J.; (2006). Conformational changes and activity alterations induced by nickel ion in horseradish peroxidase. *Biochimie*; 88(9): 1183-1197.
- Ulson De Souza, S. M. A. G.; Forgiarini, E.; Ulson De Souza, A. A.; (2007). Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *Journal of Hazardous Materials*; 147(3): 1073-1078.
- Veitch, N. C.; (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*; 65(3): 249-259.
- Wang, Z.; Li, M.; Su, P.; Zhang, Y.; Shen, Y.; Han, D.; Ivaska, A.; Niu, L.; (2008). Direct electron transfer of horseradish peroxidase and its electrocatalysis based on carbon nanotube / thionine / gold composites. *Electrochemistry Communications*; 10(2): 306-310.
- Ye, F. X.; Zhu, R. F.; Li, Y.; (2009). Deodorization of swine manure slurry using horseradish peroxidase and peroxides. *Journal of Hazardous Materials*; 167(1-3): 148-153.
- Yoon, K. -Y.; Hoon Byeon, J.; Park, J. -H.; Hwang, J.; (2007). Susceptibility constants of Escherichia coli and Bacillus subtilis to silver and copper nanoparticles. *Science of the Total Environment*; 373(2): 572-575.
- Experimental Animal Biology*; 1(1): 2015.