

بررسی سینتیک فعالیت پراکسیداز در غلظت های مختلف گایاکول در بنه های زعفران زرعی

عباس رحمانی^{۱*}، نرجس صیقلی^۲، حسن ابراهیم زاده^۳

^۱ دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران
^۲ کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران
^۳ استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: پراکسیدازها دارای عملکردهای زیادی در گیاهان از قبیل تغییرات دیواره سلولی با تنظیم هورمون، مکانیسم های دفاعی، تجزیه ایندول استیک اسید و سازش با استرس می باشد. در شرایط مختلف استرس، پراکسیداز گیاه را در برابر ناملايمات درونی و محیطی محافظت می کند.

مواد و روش ها: پیازهای ریزومی (بنه ها) زعفران مزروعی (*Crocus sativus*) در ماه های تیر و آبان جمع آوری شدند. بنه ها به عنوان منبع عصاره آنزیمی مورد استفاده قرار گرفتند. این عصاره برای مطالعات بیشتر استفاده شد.

یافته ها: نتایج نشان می دهد که در بنه های زعفران مزروعی در هر دو مرحله خواب و بیداری، افزایش غلظت سوبسترای گایاکول بیشتر از ۷۰ میلی مولار با عث کاهش فعالیت پراکسیداز می شود.

نتیجه گیری: از نتایج سینتیک چنین می توان استنباط کرد که حداقل دو ایزوفرم از پراکسیداز در بنه های زعفران وجود دارد و از این رو می تواند در فرایند های مختلف رشد و نمو شرکت نماید.

کلمات کلیدی: پراکسیداز، سینتیک، غلظت های گایاکول، زعفران (*Crocus sativus* L.)

مقدمه

می رویند (۱۵). گیاهان در معرض تنش های مختلف زیستی و غیر زیستی هستند. از جمله این تنش ها تنش اکسایشی می باشد. در مجموع صدماتی را که از گونه های فعال اکسیژن به گیاهان میرسد تنش اکسایشی گویند (۹). این تنش برای گیاهان نسبت به سایر موجودات بخاطر شیوه زندگی و عدم تحرک آن ها خطرناک تر است. تحمیل تنش های زیستی و غیرزیستی ممکن است غلظت بیش از حد گونه های فعال اکسیژن را باعث شوند. این تنش ها باعث افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن و در نتیجه صدمات سلولی و مولکولی به سلول های گیاه می شوند (۳). سیستم های دفاعی گیاهان در برابر این گروه های فعال اکسیژن شامل آنزیم های است که قادر به جابجا کردن، روبش کردن و یا خنثی کردن رادیکال- های آزاد و واسطه های دارای اکسیژن هستند. پراکسیدازها از جمله آنزیم هایی هستند توانایی حذف چنین ترکیبات سمی

اولین زعفرانی که بشر اقدام به کشت آن کرد زعفران زرعی یا *Crocus sativus* می باشد که مصرف عمده ای در صنایع، تغذیه، پزشکی، نساجی و غیره دارد (۸). نام عمومی *Crocus* از کلمه یونانی کروکوس گرفته شده که ریشه آن کلمه عبرانی کارکوم می باشد. البته این اسم در گذشته در مورد گلرنگ و زردچوبه نیز به کار رفته است. سافرون نیز از کلمه عربی زعفران به معنای زرد گرفته شده است و امروزه از نظر گیاهشناسی هم معنی *C. sativus* است. زعفران گیاهی علفی و چند ساله از تیره زنبق است. اکثر گونه های زعفران داخل مناطق مدیترانه ای و یا نواحی خشکتر آن که به نام ایران و توران شناخته میشود،

آدرس نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی،

دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند

Email: Rh.abbas@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۶/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۹/۱۱

را دارند (۷، ۱۱، ۱۲، ۲۵). هم پراکسیدازهای ویژه گیاهان متعلق به یک ابرخانواده اند که شامل سه کلاس مختلف از پراکسیدازها هستند، پراکسیدازهای کلاس I که درون سلولی اند، پراکسیدازهای کلاس II که توسط قارچ ها آزاد می شوند، پراکسیدازهای گیاهی کلاس III که ترشحی هستند (۱۸). پراکسیدازهای گیاهی کلاس III، در چرخه عملکردی معمول خود، کاتالیز کننده احیا H_2O_2 هستند که این عمل را با گرفتن الکترون از مولکول های دهنده مختلف مانند ترکیبات فنلی، پیش سازهای لیگنین، اکسین و یا سوبستراهای ثانوی انجام می دهند. ژن های کد کننده آن ها از خانواده های بزرگ چند ژنی اند (۱۸، ۲۲) که در همه انواع گیاهان زمینی وجود دارند. اما در جلبک های سبز تک سلولی شناسائی نشده اند. بر اساس ظواهر، پراکسیدازهای کلاس III، احتمالاً از حدود پدیدار شدن بیشتر گیاهانی که متکامل شده اند، بر تعداد نسخه های ژنی افزوده شده است. پراکسیدازهای کلاس III ممکن است نقش حیاتی را در روزهای بسیار مقدماتی از زندگی دانه در طول جوانه زنی بر عهده داشته باشند که این نقش را به واسطه دفاع بر علیه حملات پاتوژن ها و نیز به وسیله شکافتن دیواره سلولی در اطراف منطقه بیرون زدگی ریشچه انجام می دهند (۱۹، ۲۶، ۲۸). پراکسیدازها با تغییر مقدار اندول ۳-استیک اسید (IAA) و به عبارت دیگر، بوسیله کاتابولیسم اکسیداتیو IAA در تنظیم رشد یاخته ها مداخله می نمایند. بعلاوه پراکسیداز با ایجاد اتصال عرضی بین پلی مرهای فنلی دیواره یاخته ای، کشسانی دیواره یاخته را کاهش می دهد (۱). به طور کلی می توان گفت که آنزیم پراکسیداز در محدوده وسیعی از فرایندهای فیزیولوژیکی مانند متابولیسم اکسین، تشکیل لیگنین و سوبرین، ارتباطات متقابل ترکیبات دیواره سلولی، دفاع بر علیه پاتوژن ها یا طویل شدن سلولی شرکت می کند؛ این ویژگی ها را به آسانی می توان در تمام طول عمر گیاهان مختلف از مراحل اولیه رویش بذر تا مرحله پیری تشخیص داد (۲، ۱۳، ۱۴، ۱۶، ۲۰، ۲۳، ۲۷).

مواد و روش ها

تهیه نمونه

بنه های گیاه مورد مطالعه در مزرعه تحقیقاتی دانشکده علوم دانشگاه تهران واقع محمد شهر کرج در ماه های تیر و آبان به تناوب زمانی اوایل، اواسط و اواخر ماه های مذکور که به

منزله دوران خواب و بیداری بنه های مذکور هستند جمع آوری شد. در دوره نمونه ها به طور جداگانه و در بسته های نایلونی مخصوص بسته بندی شده و برچسب حاوی اطلاعات زمان و محل جمع آوری بر روی آن ها نصب و پس از انتقال به آزمایشگاه، پوسته های آن ها در جهت رسیدن به اصل بنه برداشته شد. پس از شستشوی کامل با آب شهر، نمونه بار دیگر با آب مقطر شسته شدند. در هر بار استخراج آنزیم ۱۰ گرم از نمونه ها مورد استفاده قرار می گرفت بنابراین نمونه های جمع آوری شده در بسته های ۱۰ گرمی وزن شدند و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد جهت استفاده در مراحل بعدی آزمایش فریز شدند.

استخراج آنزیم پراکسیداز

برای استخراج عصاره آنزیمی از نمونه ها، از روش Ghamsari و همکاران (۲۰۰۷) استفاده (۱۰) و پس از استخراج عصاره خام از نمونه ها، میزان پروتئین عصاره های استخراج شده بر اساس روش Bradford (۱۹۷۶) اندازه گیری شد (۴). آنزیم پراکسیداز در این عصاره به کمک روش Zia و همکاران (۲۰۰۱) به طور نسبی خالص سازی شد (۲۹). در روش مذکور برای خالص سازی آنزیم از روش نمک زنی و ستون کروماتوگرافی تعویض یونی استفاده شد. آنزیم نسبتاً خالص شده جهت انجام تحقیقات سینتیکی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

به منظور بررسی حضور آنزیم در عصاره های نسبتاً خالص شده توسط ستون کروماتوگرافی تعویض یونی، در تمامی مراحل و در کلیه عصاره های خالص شده فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس روش Chance and Maehly (۵) سنجیده شد.

برای انجام این کار محلولی با مشخصات زیر تهیه شد:

بافر سدیم استات ۱۰۰ میلی مولار با $pH=5/4$ بریزان ۲/۹۲

میلی لیتر - گایاکول ۸۰ میلی مولار ۵۰ میکرو لیتر -

H_2O_2 ۸۰ میلی مولار ۳۰ میکرو لیتر - نمونه آنزیمی

۵ میکرو لیتر

سپس اکسید شدن گایاکول در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد

و در طول موج ۴۷۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه

گیری شد.

مطالعه تعیین فعالیت پراکسیداز در غلظت های مختلف

گایاکول

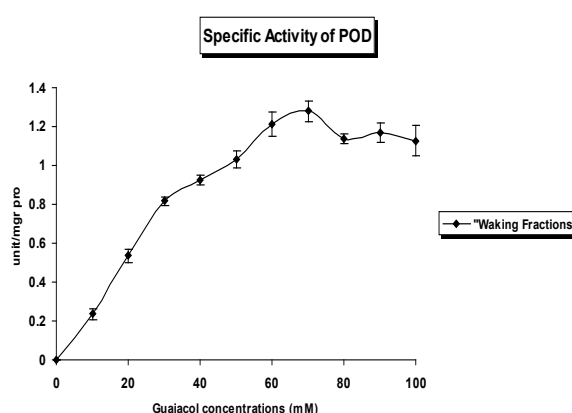
برای بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در غلظت های مختلف گایاکول، چون این آنزیم دارای دو سوبسترا است، در اینجا غلظت سوبسترای اول یعنی H_2O_2 ثابت گرفته شد، سپس محلول هایی با غلظت های ۰، ۱۰، ۲۰، ۱۰۰ میلی مولار از گایاکول تهیه شد و فعالیت آنزیم در این غلظت ها به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت (۱۷).

یافته ها

در این پژوهش غلظت H_2O_2 ثابت گرفته شد (۸۰ میلی مولار) و فعالیت آنزیم در غلظت های مختلف گایاکول در دو مرحله خواب و بیداری بر روی آنزیم نسبتاً خالص شده از زعفران مزروعی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده در جداول ۱ و ۲ و شکل های ۱ و ۲ نشان داده شده است. این نتایج بیانگر آن است که فعالیت پراکسیدازی تا غلظت تقریباً ۸۰ میلی مولار گایاکول در هر دو دوره خواب و بیداری افزایش می یابد ولی غلظت های بالاتر باعث کاهش فعالیت پراکسیدازی می گردد. در این غلظت جایگاههای اتصال سوبسترا به آنزیم اشغال شده بنابراین سرعت فعالیت آنزیم در غلظت های بالاتر این سوبسترا کاهش می یابد. در ادامه نتایج حاصله به کمک نرم افزار سینتیکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. شکل های ۳ و ۴ منحنی های اشباع سینتیکی آنزیم پراکسیداز زعفران مزروعی را در حالت فعال و در حضور غلظت های مختلف سوبسترای گایاکول نشان می دهند. طبق معادلات سینتیکی پیشرفته Strivastava در مورد سوبسترا وقتی منحنی $[S]^{P/v}$ در برابر $1/[S]$ (S غلظت سوبسترا و v سرعت می باشد) به مجانب افقی در $P=2$ و به مجانب صفر در $P=3$ نزدیک شود، نشان دهنده این است که فعالیت کامل آنزیم زمانی بدست می آید دو مولکول سوبسترا به آنزیم متصل باشد یا دو جایگاه اتصال سوبسترا بر روی آنزیم وجود دارد.

غلظت های گایاکول (mM)	فعالیت ویژه ($\Delta OD/min/mg \text{ pro}$)
۰	۰
۱۰	0.23456 ± 0.027
۲۰	0.5352 ± 0.0325
۳۰	0.228 ± 0.1618
۴۰	0.2556 ± 0.92513
۵۰	0.425 ± 1.0315
۶۰	0.605 ± 1.2127
۷۰	1.27971 ± 0.5335
۸۰	1.1374 ± 0.269
۹۰	0.505 ± 1.1683
۱۰۰	0.505 ± 1.1683

جدول ۱- نتایج حاصل از بررسی فعالیت پراکسیداز در غلظت های مختلف سوبسترای گایاکول در نمونه بیداری.



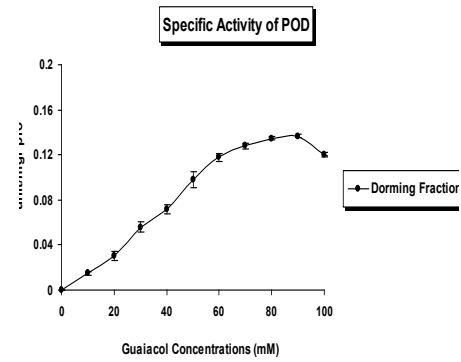
شکل ۱- نمودار حاصل از بررسی فعالیت پراکسیداز در غلظت های مختلف سوبسترای گایاکول در نمونه بیداری.

غلظت های گایاکول (mM)	فعالیت ویژه ($\Delta OD/min/mg \text{ pro}$)
۰	۰
۱۰	0.01577 ± 0.1482
۲۰	0.04027 ± 0.3003
۳۰	0.04562 ± 0.5599
۴۰	0.04051 ± 0.07167
۵۰	0.97678 ± 0.06881
۶۰	0.03603 ± 1.1778
۷۰	0.0244 ± 1.2789
۸۰	0.0133 ± 1.346
۹۰	0.136707 ± 0.01616
۱۰۰	0.01713 ± 1.20267

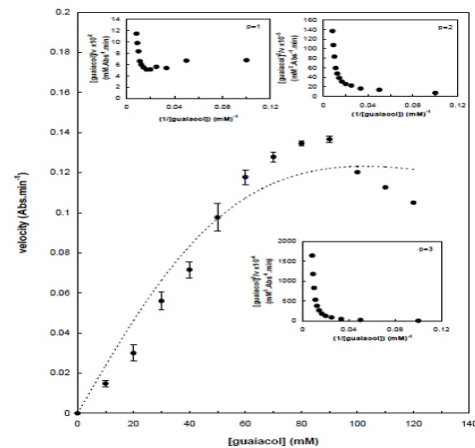
جدول ۲- نتایج حاصل از بررسی فعالیت پراکسیداز در غلظت های مختلف سوبسترا گایاکول در نمونه خواب.

بحث

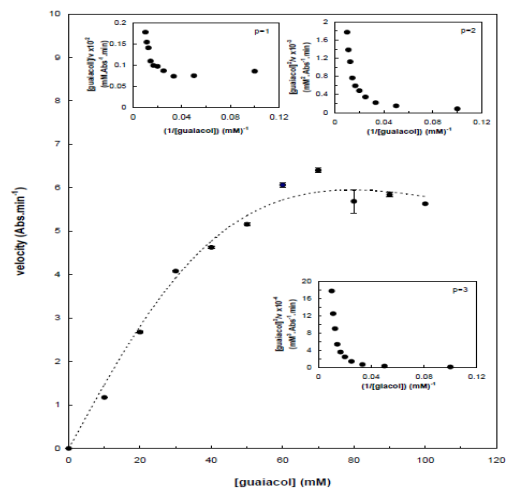
بررسی نتایج نشان می دهد زمانی که گایاکول به عنوان سوبسترای متغیر در نظر گرفته می شود، مرحله اول سرعت واکنش پراکسیدازی در مرحله بیداری به مراتب بیشتر از مرحله خواب است ولی در مرحله دوم واکنش پراکسیدازی سرعت واکنش مرحله خواب کمی بیشتر است. براساس پژوهش های Tong (۱۹۹۸)، Taylor (۱۹۹۹) و Choi (۱۹۹۹) که مدل Bi-Bi پینگ پونگی را برای بررسی سینتیکی آنزیم پراکسیداز استفاده کرده اند، در این پژوهش نیز از این مدل استفاده شد. این مدل بر اساس ثابت تفکیک و مهار سوبسترای می باشد. آنالیز اطلاعات حاصل از این مدل با استفاده از نرم افزار fitting بنام SigmaPlot ver 11 انجام شد (۶، ۲۱، ۲۴). در زمانی که غلظت پراکسید هیدروژن ثابت گرفته می شود در مرحله اول انجام واکنش، V_{1max} ایزوآنزیم اول در مرحله بیداری نسبت به مرحله خواب افزایش قابل توجهی دارد این در حالی است که در مرحله دوم انجام واکنش V_{2max} این ایزوآنزیم در هر دو مرحله خواب و بیداری تقریباً برابر است. ایزوآنزیم دوم نیز دقیقاً از الگوی ایزوآنزیم اول تبعیت می کند. از طرفی میل ترکیبی آنزیم به سوبسترا (K) در قسمت اول واکنش، در مرحله بیداری کمتر از مرحله بیداری است ولی در مرحله دوم واکنش این حالت برعکس شده و میل ترکیبی آنزیم به سوبسترا در مرحله بیداری بیشتر از مرحله خواب است. همین وضعیت در مورد ایزوآنزیم دوم نیز مشاهده گردید. در مجموع این طور می توان خلاصه نمود که در مرحله خواب با توجه به افزایش تمایل آنزیم به سوبسترا در مرحله اول واکنش پراکسیدازی، سرعت واکنش نهائی پایین تر از مرحله بیداری است. ولی در مرحله بیداری با توجه به اینکه تمایل آنزیم به سوبسترا هفت برابر کمتر از مرحله خواب است، سرعت فعالیت آنزیم در این مرحله بطور قابل ملاحظه ای بیشتر از مرحله خواب است. توجهی که در این قسمت پیشنهاد می شود این است که احتمالاً در مرحله خواب آنزیم بیان کمتری نسبت به مرحله بیداری دارد که حتی با وجود میل ترکیبی زیاد آنزیم به سوبسترا، باز هم در نهایت سرعت انجام واکنش پراکسیدازی در مرحله بیداری بسیار بیشتر از مرحله خواب است. این مشاهدات تقریباً در هر دو شکل آنزیمی یکسان است. نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج بدست



شکل ۲- نمودار حاصل از بررسی فعالیت پراکسیداز در غلظت های مختلف سوبسترا گایاکول در نمونه خواب.



شکل ۳- منحنی اشباع سینتیکی آنزیم پراکسیداز در حضور غلظت های مختلف سوبسترای گایاکول در دوره خواب. نمودار های کوچک بر اساس معادلات سینتیکی پیشرفته برای تعیین تعداد جایگاه های اتصال سوبسترا بر روی آنزیم رسم شده است.



شکل ۴- منحنی اشباع سینتیکی آنزیم پراکسیداز در حضور غلظت های مختلف سوبسترای پراکسید هیدروژن در دوره خواب. نمودار های کوچک بر اساس معادلات سینتیکی پیشرفته برای تعیین تعداد جایگاه های اتصال سوبسترا بر روی آنزیم رسم شده است.

آمده از پژوهش های Tong (۱۹۹۸)، Taylor (۱۹۹۹) و Choi (۱۹۹۹) مطابقت دارد (۶، ۲۱، ۲۴).

منابع

- (۱) صالحی شانجانی، پ، پراکسیدازهای گیاهی، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، دانشکده علوم، ۱۳۷۵.
- (2) Arora A, Sairam RK, Srivastava GC. Oxidative Stress & Antioxidative System in Plants. *Current Science* 2002; 10, 1227-1238.
- (3) Ashraf M, Harris PJ. Potential Biochemical Indicators of Salinity Tolerance in Plants. *Plant Science*. 2004; 166, 3-16.
- (4) Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Anal Biochem*, 1976; 72, 248-254.
- (5) Chance B, Maehly AC. Assays of Catalases and Peroxidases. In: *Methods in Enzymology*. (Colowick SP, Kaplan NO, eds.) Academic Press, New York, 1955; II, 764-775.
- (6) Choi YJ, Chae EK. Study-State Oxidation Model by Horseradish Peroxidase for the Non Inactivation Zone in the Enzymatic Removal of Pentachlorophenol. *J. Biosci. Bioeng.* 1999; 88, 368-373
- (7) De Marco A, Guzzardi P, Jamet E. Isolation of Tobacco Isoperoxidases Accumulated in Cell-Cultivation Medium and Characterization of Activities Related to Cell Wall Metabolism. *Plant Physiol*, 1999; 120, 371-382.
- (8) Ebrahimzadeh H, Abrishamchi P. Changes in IAA, Phenolic Compounds, Peroxidase, IAA Oxidase, and Polyphenol Oxidase in Relation to Flower Formation in *Crocus sativus*: *Russian Journal of Plant Physiology*, 2001; 48(2), 190-195.
- (9) Elstner EF. Mechanisms of Oxygen Activation in Different Compartments of Plant Cells. In: Pell EJ, Steffen KL, eds. *Active Oxygen Species, Oxidative Stress and Plant*. Rockville, Maryland: The American Society of Plant Physiologists, 1991; 13-25.
- (10) Ghamsari L, Keyhani E, Golkhoo Sh. Kinetics Properties of Guaiacol Peroxidase Activity in *Crocus sativus* L. Corm during Rooting Iranian Biomedical Journal, 2007; 11(3), 137-146
- (11) Grmbow HJ, Langenbeck SB. The Relationship Between Oxidase Activity, Peroxidase Activity, Hydrogen Peroxidase and Phenolic Compounds in the Degradation of Indole-3-Acetic Acid in vitro, *Planta*, 1983; 157: 131-137
- (12) Keyhani J, Keyhani E, Kamali J. Thermal Stability of Catalases Active in Dormant Saffron (*Crocus sativus* L.) Corms. *Mol Biol Rep*. 2002; 29, 125-128.
- (13) Kjalke M, Anderson MB, Schneider P, Christensen B, Schulein M, Welinder KG. Comparison of Strure and Activities of Peroxidase from *Coprinus cinereus*, *Coprinus macrorhizus* and *Roystonea rega* *Biochim. Biophys. Acta*, 1992; 1120, 248-256.
- (14) Liskay A, Kenk B, Schopfer P. Evidence for the Involvement of Cell wall Peroxidase in the Generation of Hydroxyl Radicals Mediating Extension Growth. *Planta*, 2003; 217, 658-667
- (15) Mathew B. The *Crocus* – A Revision of the Genus *Crocus* (Iridaceae), 1982; 11-12.
- (16) Malecka A, Jarmuszkiewicz W, Tamoaszewska B. Antioxidative Defence to Lead Stress in Subcellular Compartments of Pea Root Cells. *Acta Biochemica Polonica*, 2001; 48(3), 687-698.
- (17) Mika A, Luthje S. Properties of Guaiacol Peroxidase Activities Isolated from Corn Root Plasma Membranes. *Plant Physiol*, 2003; 132, 1489-1498.
- (18) Passardi F, Longet D, Penel C, Dunand C. The class III Peroxidase Multigenic Family in Rice and its Evolution in Land Plants. *Phytochemistry*, 2004; 65, 1879-1893
- (19) Raven EL. Understanding Functional Diversity and Substrate Specificity in Haem Peroxidases: What Can We Learn from Ascorbate Peroxidase? *Nat. Prod. Rep*, 2003; 20, 367-381
- (20) Scialabba A, Bellani LM, Dell'Aquila A. Effects of Ageing on Peroxidase Activity and Localization in Radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Eur J Histochem*, 2002; 46, 351-358
- (21) Taylor N, Wu KE, Bewtra JK. Kinetic Model for Removal of Phenol by Horseradish Peroxidase with PEG. *J. Environ. Eng.* 1999; 125, 451-458.
- (22) Tognolli M, Penel C, Greppin H, Simon P. Analysis and Expression of the Class III Peroxidase Large Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 2002; 288, 129-138
- (23) Turrens JF, Freeman BA, Crapo JD. Hypoxia Increases H₂O₂ Release by Lung Mitochondria and Microsomes. *Arch. Biochem. Biophys*, 1982; 217, 411-421
- (24) Tong Z, Qingxiang Z, Hui H, Quin L, Yin Z. Kinetic Study on the Removal of Toxic Phenol and Chlorophenol from Wastewater by Horseradish Peroxidase, *Chemosphere*, 1998; 37, 1571-1577
- (25) Winston GW, Cederbum AI. Oxyradical Production by Purified Components of Liver Microsomal Mixed-Function Oxidase System I: Oxidation of Hydroxyl Radical Scavenging Agents, *J. Biol Chem*, 1993; 258, 1508-1513.
- (26) Yamasaki H, Sakihama Y, Ikehara N. Flavonoid-Peroxidase Reaction as a Detoxification Mechanism of Plant Cells against H₂O₂. *Plant Physiol*, 1997; 115, 1405-1412
- (27) Yildirim O, Aras S, Ergul A. Response of Antioxidant System to Short-term NaCl stress in Grapevine root stock-1616c & *Vitis vinifera* L. cv. Razaki. *Acta Biologica Cracoviensia*, 2004; 46, 151-158.