مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره دهم، بهار ۱۳۹۲

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی تغییرات فعالیت پراکسیداز در غلظت های مختلف H_2O_2 و مقادیر مختلف pH در بنه های زعفران مزروعی در دو دوره خواب و بیداری

عباس رحمانی*[1]، نرجس صیقلی[2]، حسن ابراهیم زاده[3]

[1] دانشجوی دکتری،گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران
[2] کارشناس ارشد،گروه زیست شناسی،دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران
[3] استاد، گروه زیست شناسی،دانشکده علوم پایه، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: پراکسیدازها یکی از آنزیم های مهم هستند که در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی گیاهان شرکت می کنند. پراکسیدازها پروتئین های آهن داری هستند که با استفاده از پراکسید هیدروژن بسیاری از سوبستراهای آلی و غیر آلی را اکسید می کنند. در این تحقیق فعالیت پراکسیداز در عصاره های استخراج شده از بنه های زعفران مزروعی در غلظت های مختلف پراکسید هیدروژن و pH های مختلف بررسی شد.

مواد و روش ها: پیازهای ریزومی (بنه ها) زعفران مزروعی (Crocus sativus .L) در ماه های تیر و آبان به ترتیب به عنوان نمونه های خواب و بیداری 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 داد که pH بهینه فعالیت آنزیم در دوره خواب یک واحد بیشتر از دوره بیداری است. نتایج پیشنهاد می کند که افزایش غلظت H_2O_2 تا ۸۰ میلی مولار باعث افزایش فعالیت آنزیم می شود و در غلظت های بالاتر H_2O_2 فعالیت پراکسیدازی کاهش می یابد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج سینتیکی به نظر می رسد که حداقل دو ایزوفرم از پراکسیداز در بنه های زعفران وجود دارد و از این رو می تواند در پروسه های مختلف رشد و نمو شرکت نماید.

کلمات کلیدی: Crocus sativus L، پراکسیداز، اندازه گیری pH ، غلظت H_2O_2

مقدمه

از نظر گیاه شناسی، زعفران گیاهی پیچیده است بطوری که گل آذین آن تقلیل یافته و اغلب دارای یک گل با پایه بسیار کوتاه در زیر خاک می باشد (۱). بسیاری از قسمت های گیاه از جمله تخمدان در زیر خاک قرار دارند. بنه که در اصل ساقه زیرزمینی گیاه محسوب می شود، یک اندام ذخیره ای و سرشار از نشاسته است. بنه دارای شیارهائی است که از محل آن ها جوانه های نابجا به وجود می آیند (۲). عمر بنه یکسال است و در فاصله بین گل دهی و میوه دهی تحلیل و یک بنه جدید جایگزین آن می گردد. بنه جدید بر روی بنه قدیمی تشکیل می شود که حاصل فعالیت مریستم انتهائی جدیدی است که در مجاورت قاعده دمگل تشکیل می شود. گاهی اوقات برخی از جوانه های جانبی نیز رشد کرده و تعداد بیشتری بنه جدید بر روی بنه قدیمی تشکیل می شود (۱،۲). در پی تنش اکسایشی در گیاهان گونه های فعال اکسیژن [1](ROS) تولید می شود و یا میزان آن ها در گیاه افزایش می یابد. این گونه های فعال اکسیژن شامل آنیون سوپراکسید($O_2^{\cdot-}$) ، هیدروژن پراکسید(H_2O_2) ، اکسیژن یکتایی($O_2^{\cdot}$) و رادیکال هیدروکسیل($OH^{\cdot}$) است که در طول متابولیسم طبیعی در هر یاخته زنده و حتی در شرایط بهینه به عنوان تولیدات متابولیسم طبیعی و در کده های مختلف

1- Reactive oxygen species

آدرس نویسنده مسئول: دانشگاه آزادواحد پرند

Email: rh.abbas@gmail.com.
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۰۶/۲۶
تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۳

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-25]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.10.10.0]

یافت های از جمله کلروپلاست، میتوکندری و پراکسیزوم و در هر محلی که زنجیره ترابری الکترون وجود دارد تولید می شوند (۱۶،۱۵). 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. آنزیم هایی مثل پراکسیداز (POD)، سوپراکسیددیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) است که به صورت ایزوفرم های مختلف در یاخته ها ظاهر می شوند و ویژگی های متفاوت دارند و این گروه های فعال اکسیژن را روبش می کنند (۹،۱۲). پراکسیدازهای گیاهی در چرخه فعالیت معمول خود، کاتالیز کننده احیا H_2O_2 هستند (۱۰،۷).فعالیت پراکسیداز را به آسانی می توان در تمام طول عمر گیاهان مختلف از مراحل اولیه جوانه زنی تا مرحله پیری از طریق کنترل طویل شدن یاخته ای، مکانیسم های دفاع و چندین عملکرد دیگر تشخیص داد. پراکسیدازها در بسیاری از فرایند های سلولی از قبیل متابولیسم اکسین، تشکیل چوب، اتصالات عرضی در دیواره سلول گیاهی، پاسخ به تنش های محیطی و نظایر آن شرکت می کند (۱۳). مطالعات پیرامون این آنزیم به طور قابل ملاحظه ای انجام شده و در حال حاضر نیز در حال انجام است. تمامی محققینی که بر روی این آنزیم تحقیق می کنند، همگی متفق القولند که تعیین دقیق نقش فیزیولوژیک این آنزیم بسیار مشکل است و هنوز نیازمند مطالعات و تحقیقات بیشتر است (۷،۱۱،۹). دلایل عدم موفقیت در تعیین نقش دقیق پراکسیدازها را می توان در وجود تعداد زیاد ایزوآنزیم ها در گیاهان، اختصاصی نبودن سوبستراهای مختلف برای هر یک از این ایزوفرم ها، عدم وجود یک ارتباط دقیق بین ساختار و عملکرد (علی رغم وجود ۴۰ الی ۶۰ درصد شباهت در ترادف آمینواسیدی) و همچنین عدم تلاش مستمر برای مطالعه ویژگی و شرایط واکنش این آنزیم در زیوه دانست (۱۲،۶،۱۴).به دلیل اهمیت نقش این آنزیم، بررسی تغییرات این آنزیم در گیاه دارای اهمیت زیادی است که در این تحقیق سعی شده است برخی از جنبه های این تغییرات در دوره های مختلف زندگی این گیاه بررسی شود.

مواد و روش ها

تهیه نمونه

بنه های زعفران مزروعی (Crocus sativus L.) کاشته شده در مزرعه تحقیقاتی دانشکده علوم دانشگاه تهران واقع در حومه جاده تهران-کرج در دو ماه تیرماه و آبان ماه که سمبل دوران خواب و بیداری بنه های مذکور هستند جمع آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه، از اضافات خاکی پاک گردید و سپس پوسته های آن ها در جهت رسیدن به اصل بنه برداشته شد. پس از شستشوی کامل، بنه ها در مقیاس های ۱۰گرمی توزین و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند تا در مراحل بعدی آزمایشات مورد استفاده قرار گیرند.

استخراج آنزیم پراکسیداز

عصاره بنه های زعفران در هر دو دوره خواب بیداری بر اساس روش Ghamsari و همکاران (۲۰۰۷) استخراج (۷) و پس از آن میزان پروتئین عصاره های استخراج شده بر اساس روش Brad-ford (۱۹۷۶) اندازه گیری شد (۳). این عصاره جهت انجام تحقیقات سینتیکی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

فعالیت آنزیم پراکسیداز در دو مرحله خواب و بیداری بر اساس روش (Chance and Maehly,. ۱۹۵۵) سنجش شد (۴).

بافر سدیم استات ۱۰۰ میلی مولار با pH=۵/۴، 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

اکسید شدن گایاکول در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و در طول موج ۴۷۰ نانو متر اندازه گیری می شود.

تعیین pH بهینه فعالیت پراکسیداز

جهت تعیین pH بهینه فعالیت پراکسیداز در دو مرحله فیزیولوژیکی خواب و بیداری از دو بافر سیترات-فسفات (با دامنه عمل ۲/۶ - ۷) و بافر فسفات (با دامنه عمل ۵/۷ – ۸) استفاده شد (۶).

مطالعه تعیین فعالیت پراکسیداز در غلظت های مختلف H_2O_2

پراکسیداز آنزیمی دو سوبسترائی است. در مرحله اول این پژوهش، ابتدا غلظت یکی از سوبسترا ها (در اینجا گایاکول) ثابت گرفته شد و در غلظت های مختلف H_2O_2 فعالیت پراکسیداز در دو مرحله فیزیولوژیکی خواب و بیداری بررسی شد (۱۴).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-25]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.10.10.0]

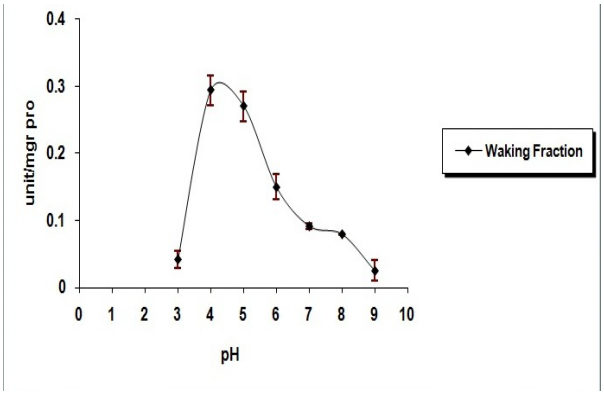
یافته ها

نتایج حاصل از تعیین pH بهینه فعالیت آنزیم پراکسیداز

pH مناسب فعالیت برای دوره خواب پنج و برای دوره بیداری چهار بدست آمد که در جدول های ۱ و ۲ و شکل های ۱ و ۲ قابل مشاهده است.

جدول ۱ - نتایج حاصل از تعیین pHبهینه فعالیت پراکسیداز در دوره

pH	فعالیت ویژه (ΔOD/min/mg protein)
2	-
3	0/012868 ±0/041642
4	0/294 ±0/022601
5	0/270133 ±0/2217
6	0/150367 ± 0/018508
7	0/091613 ±0/003641
8	0/07907 ±0/000828
9	0/025 ±0/015503



شکل ۱- نمودار تعیین pHبهینه فعالیت پراکسیداز در دوره بیداری.

جدول ۲- نتایج حاصل از تعیین pH بهینه فعالیت پراکسیداز در دوره خواب

pH	فعالیت ویژه (ΔOD/min/mg protein)
2	-
3	0/111233 ±0/007234
4	0/237067 ± 0/019404
5	0/4 ±0/008622
6	0/2499 ±0/013836
7	0/077237 ±0/000142
8	0/032357±0/000753
9	0/008117 ± 0/000819

نتایج حاصل از مطالعه فعالیت آنزیم پراکسیداز در غلظت های مختلف سوبسترای H_2O_2

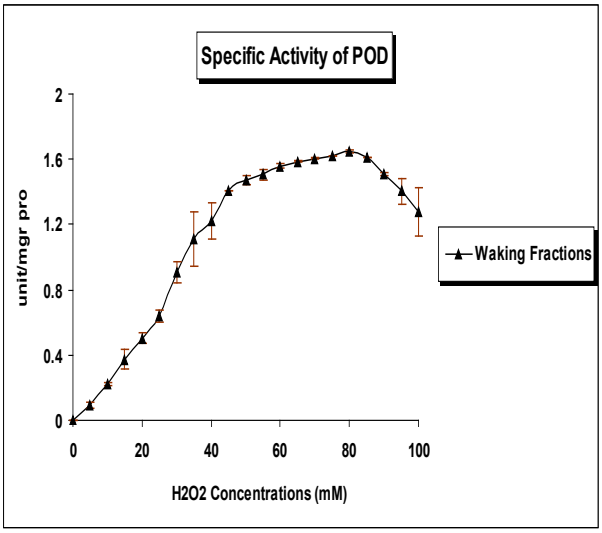
پراکسیداز آنزیمی دو سوبسترائی است. در مرحله اول این پژوهش، غلظت یکی از سوبسترا ها (در اینجا گایاکول) ثابت گرفته شد (۸۰ میلی مولار) و در غلظت های مختلف H_2O_2 فعالیت پراکسیداز در دو مرحله فیزیولوژیکی خواب و بیداری بر روی آنزیم نسبتاً خالص شده از زعفران مزروعی بررسی شد. نتایج بدست آمده در جدول های ۳ و ۴ و شکل های۳ و ۴ نشان داده شده است. این نتایج حاکی از آن است که فعالیت پراکسیدازی تا غلظت تقریباً ۸۰ میلی مولار پراکسید هیدروژن در هر دو دوره خواب و بیداری افزایش می یابد ولی غلظت های بالاتر باعث کاهش فعالیت پراکسیدازی می گردد. شکل های۵ و ۶، منحنی های اشباع سینتیکی آنزیم پراکسیداز زعفران مزروعی را در حالت فعال و در حضور غلظت های مختلف سوبسترای پراکسید هیدروژن نشان می دهند. برای محاسبه انحراف معیار از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۸ استفاده شد. در ضمن این نتایج توسط نرم افزار پیشرفته سینتیکی (Sigmaplot ver ۱۱) تفسیر شدند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-25]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.10.10.0]

جدول ۳- نتایج حاصل از بررسی فعالیت پراکسیداز در غلظت های مختلف سوبسترا H_2O_2 در نمونه بیداری.

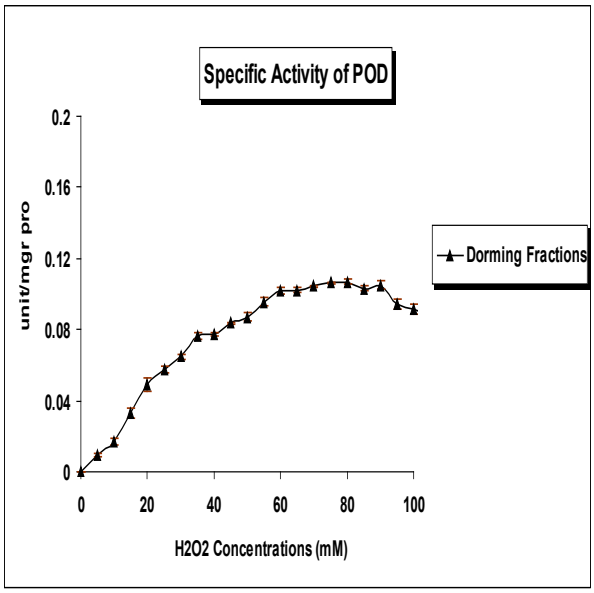
غلظتهای H_2O_2(mM)	فعالیت ویژه (ΔOD/min/mg pro)	غلظتهای H_2O_2(mM)	فعالیت ویژه (ΔOD/min/mg pro)
0	0	55	1/50665 ± 0/03005
5	0/09415 ± 0/01605	50	1/55995 ± 0/01095
10	0/22125 ± 0/01125	65	1/58745 ± 0/00495
15	0/37225 ± 0/05985	70	1/60515 ± 0/00516
20	0/50395 ± 0/03245	75	1/6212 ± 0/0034
25	0/63625 ± 0/03605	80	1/6455 ± 0/0075
30	0/90685 ± 0/06325	85	1/61165 ± 0/0015
35	1/1092 ± 0/1666	90	1/5115 ± 0/0115
40	1/2221 ± 0/1086	95	1/4038 ± 0/771
45	1/4085 ± 0/026	100	1/28125 ± 0/14857
50	1/4717 ± 0/0317		



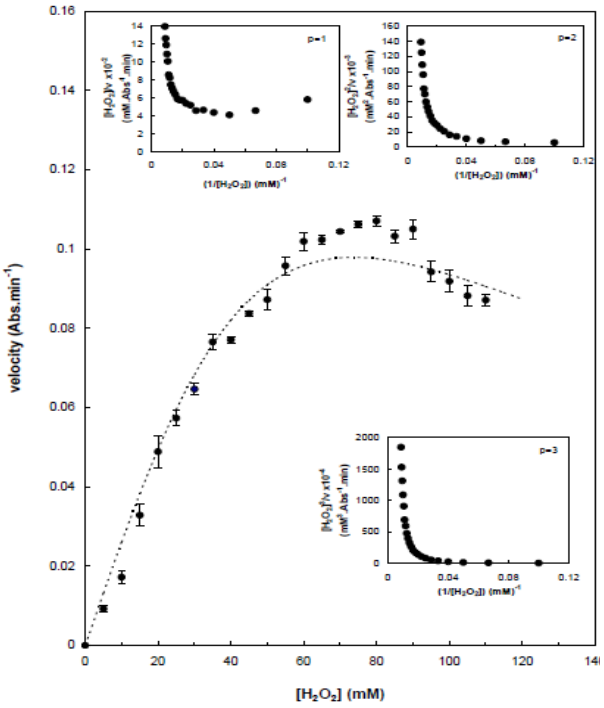
شکل ۳- نمودار حاصل از بررسی فعالیت پراکسیداز در غلظت های مختلف سوبسترا H_2O_2 در نمونه بیداری.

جدول ۴-نتایج حاصل از بررسی فعالیت پراکسیداز در غلظت های مختلف سوبسترا H_2O_2 در نمونه خواب.

غلظتهای H_2O_2(mM)	فعالیت ویژه (ΔOD/min/mg protein)	غلظتهای H_2O_2(mM)	فعالیت ویژه (ΔOD/min/mg protein)
0	0	55	0/09575 ± 0/002276
5	0/00926 ± 0/009	60	0/1019 ± 0/002278
10	0/01722 ± 0/001681	65	0/1023 ± 0/001277
15	0/0328 ± 0/002814	70	0/10438 ± 0/000441
20	0/04887 ± 0/00396	75	0/10627 ± 0/000679
25	0/05731 ± 0/001938	80	0/10767 ± 0/001228
30	0/06464 ± 0/001433	85	0/10322 ± 0/001611
35	0/07652 ± 0/002083	90	0/104967 ± 0/002382
40	0/07711 ± 0/00753	95	0/09423 ± 0/00257
45	0/08371 ± 0/00599	100	0/09467 ± 0/002708
50	0/08719 ± 0/002658	-	-



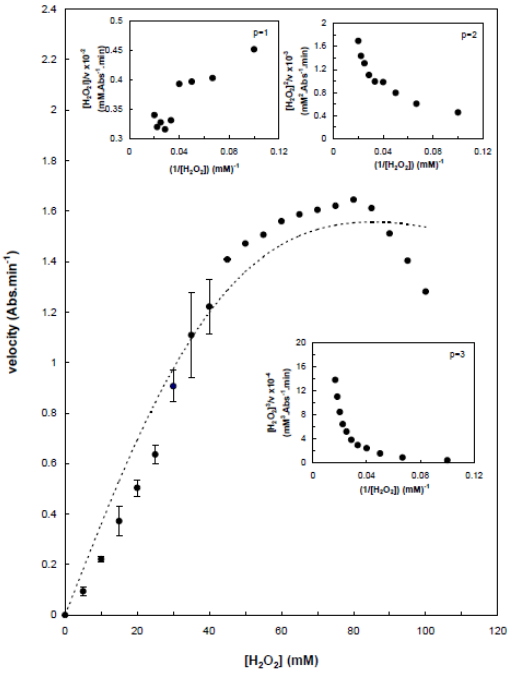
.شکل۴- نمودار حاصل از بررسی فعالیت پراکسیداز در غلظت های مختلف سوبسترا H_2O_2 در نمونه خواب.



شکل ۵- 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-25]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.10.10.0]



شکل ۶- منحنی اشباع سینتیکی آنزیم پراکسیداز در حالت طبیعی و در حضور غلظت های مختلف سوبسترای پراکسید هیدروژن در دوره بیداری. نمودار های کوچک بر اساس معادلات سینتیکی پیشرفته برای تعیین تعداد جایگاه های اتصال سوبسترا بر روی آنزیم رسم شده است.

بحث

بررسی نتایج حاصل از تعیین pH بهینه فعالیت پراکسیداز و نمودارهای حاصل از آن ها نشان دهنده تفاوت در pH بهینه فعالیت پراکسیداز در دو دوره خواب و بیداری است بطوری که pH بهینه فعالیت در مرحله خواب پنج و مرحله بیداری چهار می باشد. پیش از این De Marco و همکاران (۱۹۹۱) پیشنهاد کردند که تغییرات pH می تواند سهم نسبی فعالیت ایزوپراکسیدازهای مختلف را نسبت به فعالیت کل تغییر و باعث ظهور قله های مختلف فعالیت در pH های مختلف گردد، بطوریکه قله متعلق به فعالیت بیشینه آنزیم مربوط به بیشینه فعالیت آن ایزوفرم در آن pH است. پژوهش های مختلفی جهت تعیین pH بهینه فعالیت پراکسیداز در گیاهان مختلف صورت گرفته است بطور مثال pH بهینه فعالیت پراکسیداز در سویا، ۶/۸ ، میوه هندوانه در حضور سوبسترای گایاکول، ۵/۵ و در گونه ای نخل به نام Roystonena rega ، ۷الی ۸ بدست آمده است (۸). در بیشتر مطالعات انجام شده، اغلب پراکسیدازها در دامنه pH ۴ الی ۸ دارای فعالیت بهینه می باشند که نتایج حاصل از این پژوهش با گزارشات فوق مطابقت دارد. با توجه به تفاوت در pH بهینه فعالیت پراکسیداز در مرحله خواب و بیداری، احتمال حضور دو فرم آنزیمی متفاوت در مرحله خواب و بیداری قابل پیش بینی است. براساس پژوهش های Tong و همکاران (۱۹۹۸)،Taylor و همکاران (۱۹۹۹) وChoi و همکاران (۱۹۹۹)، که مدل Bi-Bi پینگ پونگی را برای بررسی سنتیکی آنزیم پراکسیداز استفاده کرده اند، در این پژوهش نیز از این مدل استفاده شد. این مدل بر اساس ثابت تفکیک و مهار سوبسترائی می باشد. هنگامی که سوبسترای گایاکول ثابت گرفته شد و فعالیت آنزیم در غلظت های مختلف پراکسید هیدروژن بررسی شد، $V_{1\ max}$ ایزوآنزیم اول در مرحله بیداری بسیار بیشتر از مرحله خواب بدست آمد. در این مرحله از ارزیابی برخلاف مرحله ارزیابی سوبسترا H_2O_2، $V_{2\ max}$ مرحله بیداری ایزوآنزیم اول بیشتر از مرحله خواب می باشد که این نتایج با توجه به افزایش سرعت واکنش در مرحله بیداری قابل توجیه است. همچنین K_1 ایزوآنزیم اول در مرحله بیداری بیشتر از مرحله خواب است. این نتایج در ایزو آنزیم دوم معکوس است، یعنی در این قسمت K_2 مرحله بیداری کمتر از خواب است. توجیه این مطلب را چنین می توان بیان کرد که علی رغم اینکه هر دو سوبسترا از یک مدل سنتیکی پیروی می کنند، ولی چون گایاکول و پراکسید هیدروژن دو ماده مختلف هستند بنابراین می توانند الگوهای رفتاری متفاوتی از خود نشان دهند. باید توجه داشت که در این مرحله V_{max} در مرحله بیداری بطور قابل ملاحظه ای نسبت به مرحله بیداری افزایش یافته است. نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج بدست آمده از پژوهش های بالا مطابقت دارد (۱۲، ۱۱، ۵). با توجه به اهمیتی که این آنزیم در گیاه دارد و همچنین افزایش فرایندهای متابولیسمی یاخته های زنده دوره بیداری به دلیل پویایی بیشتر نسبت به یاخته های دوره خواب و متعاقب آن تشکیل ترکیبات سمی مانند H_2O_2 و رادیکال های آزاد و همچنین نیاز در سایر قسمت ها ، افزایش بیان و فعالیت پراکسیداز را توجیه می کند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-25]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.10.10.0]

منابع

(۱) ارفع خجسته، وجیهه.(۱۳۸۶) بررسی سنتیکی و ساختاری سوپراکسید دیسموتاز در حضور برخی اسمولیت های گیاهی در بنه های زعفران مزروعی، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم، دانشگاه تهران.

(۲) صبورا، عذرا. (۱۳۸۱)، بررسی تنوع ایزوزیمی، پروتئین و فلاونوئیدهای زعفران های ایران. رساله دکتری. دانشکده علوم. دانشگاه تهران.

(3) 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.

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

(5) De Marco A, Guzzardi P and Jamet E. Isolation of tobacco isoperoxidases accumulated in cell-uspension culture medium and characterization of activities related to cell wall metabolism. PlantPhysiol, 1999; 120: 371-382.

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

(7) Kjalke M., Anderson M.B, Schneider P, Christensen B, Schulein M, Welinder K.G. Comparison of strure and activities of peroxidase from Coprinus cinereus , Coprinus macrorhizus and Roystonena rega Biochim. Biophys. Acta, 1992;1120 : 248-256.

(8) Liszkay 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.

(9) Mathe C, Barre A, Jourda C and Dunand C. Evolution and expression of class III peroxidases: Arch.Biochem.Biophys, 2010; v. 500(1):58-65.

(10) Taylor N, Wu K.E, Bewtra J.K.. Kinetic model for removal of phenol by horseradish peroxidase with PEG. J.Environ. Eng., 1999;125 : 451-458.

(11) 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.

(12) Turrens J.F, Freeman B.A, Crapo, J.D. Hyproxia increases H_2O_2 release by lung mitochondria and microsomes.Arch. Biochem. Biophys, 1982; 217: 411-421.

(13) Yamasaki H, Sakihama Y and Ikehara N. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H_2O_2. PlantPhysiol,1997; 115: 1405-1412

(14) 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 Biological Cracoviensia151-158 :46 ;2004 ،.

(15) Zheng Y. Q, J. X. Liu, J. N. Wang, and L. Xu. Effects of Crocin on Reperfusion-induced Oxidative/Nitrative Injury to Cerebral Microvessels after Global Cerebral Ischemia: Brain Res, 2007;1138:86-94.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-25]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.10.10.0]