

Quantitative investigation of the effect of surfactants and chaotropes on ascorbate peroxidase activity in strawberry and blackberry

Shahriar Saeidian¹, Nabi Khaliliaqdam^{*2}, Mona Motahhari Nia³

1. Associate Prof., Dept. of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran. E-mail: saeedyan@pnu.ac.ir

2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran. E-mail: nkhaliliaqdam@pnu.ac.ir

3. M.Sc. of Molecular and Cellular Biology, Kharazmi University, Tehran, Iran. E-mail: motaharinia.m68bio@gmail.com

Article Info

Article type:

Full Length Research Paper

Article history:

Received: 11.11.2023

Revised: 12.05.2023

Accepted: 01.06.2024

Keywords:

Enzyme,
Inhibition,
Mechanism,
Model

ABSTRACT

Background and Objectives: As one of the antioxidant enzymes, ascorbate peroxidase (APX) has an important role in the defense system of plants against environmental stresses and is effective in regulating the concentration of hydrogen peroxide (H₂O₂) in plant cells. APX decomposes hydrogen peroxide in order to prevent plant damage. During various environmental stresses, antioxidant enzymes such as APX increase in different plant parts such as fruit. Of course, the rate of biosynthesis of this antioxidant enzyme depends on the intensity and duration of stress in the plant. Considering the importance of the presence of this enzyme in plant structures, this study was conducted to investigate the maximum activity of ascorbate peroxidase enzyme at different levels of surfactants and chaotropes.

Materials and Methods: This research was carried out in the research laboratory of Payam Noor University of Kurdistan. In order to prepare the extract from strawberries and blackberries, in the presence of 0.1 M citrate-phosphate buffer with pH 7 and 0.02 phenylmethanesulfonyl fluoride solution as a protease inhibitor, the fruits were homogenized separately. To investigate the effect of different ionic and non-ionic surfactants as well as chaotropes from 0 to 1 sodium dodecyl sulfate (SDS (ionic surfactant), 0 to 30 sodium-cholate (ionic surfactant), 0 to 0.3 sarcosyl (ionic surfactant) 0 to 0.07 Tween 20 and Tween 80 (nonionic surfactant) and 0 to 30 urea and guanidine hydrochloride (chaotropic agents) were used and the activity of ST.APX and BM.APX was measured. Also in the presence of constant concentrations of ascorbate and H₂O₂, the type of APX inhibition was determined by kojic acid. In order to determine the best response of ascorbate peroxidase activity to different levels of the studied treatments, linear and non-linear regression analysis was used. To fit the non-linear regression models, the procedure of ProcNlin was used in the software environment (SAS) using the iterative optimization method and GraphPadPrism software.

Results: Based on the results of this research, for the ascorbate substrate used in the APX measurement in the extracts prepared from strawberry (ST.APX) and blackberry (BM.APX), the optimal pH is 6.7 and the catalytic efficiency of BM.APX, is about 1.6 times higher than ST.APX was obtained. With the increase of ascorbate concentration in constant concentration of H₂O₂, the activity of BM.APX and ST.APX increases, so that the highest level of activity of both plant 0.5 units per mg of protein.

A further increase in substrate concentration was associated with substrate inhibition of BM.APX and ST.APX. The activity curve of APX in both plant species is hyperbolic, which follows the Michaelis-Menten kinetics, which indicates the high tendency of the enzyme to consume ascorbate. The activity of ST.APX and BM.APX is inhibited by kojic acid and it is non-competitive in both. Among the used chaotropes and surfactants, only SDS activated the activity of ST.APX and BM.APX, and the activities of ST.APX and BM.APX showed different sensitivities to the surfactants, chaotropes and kojic acid. Despite the fact that BM.APX showed higher activity than ST.APX in the presence of ascorbate and SDS, in the presence of other factors, the rate of inhibition of BM.APX was higher than ST.APX and showed higher percentages of inhibition. Urea and guanidine hydrochloride as reducing agents showed an inhibitory role on ST.APX and BM.APX. The activity of APX The results also showed that the activity of ST.APX and BM.APX was inhibited by kojic acid and it was non-competitive in both. Among the chaotropes and surfactants used, only SDS activated the activity of ST.APX and BM.APX and its maximum effect occurred at a concentration of 0.2 mM. On the other hand, in other factors, the rate of inhibition and reduction of BM.APX activity was higher than ST.APX, and with the exception of ascorbate peroxidase response to kojic acid and sodium calate in strawberry, the enzyme response followed a monophasic decreasing exponential.

Conclusion: In this research, ascorbate peroxidase takes a more active form by following Michaelis Menten's kinetics and binding the substrate to the active site of the enzyme, and by performing enzyme catalysis, it causes ascorbate consumption in strawberries and blackberries. Ionic surfactants with an activation mechanism such as SDS and an inhibitory mechanism such as sarkosyl and sodium cholate have different effects on ascorbate peroxidase. Non-ionic surfactants such as kojic acid and chaotrope agents reduce the activity of ascorbate peroxidase in both plant species. The position of kojic acid is different from the position of ascorbate due to the non-competitive type of inhibition.

Cite this article: Saeidian, Shahriar, Khaliliaqdam, Nabi, Motahhari Nia, Mona. 2024. Quantitative investigation of the effect of surfactants and chaotropes on ascorbate peroxidase activity in strawberry and blackberry. *Journal of Plant Production Research*, 31 (3), 205-229.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/JOPP.2024.21899.3088

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

بررسی کمی تأثیر سورفاکتانت‌ها و عوامل کائوتروپ بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز در توت‌فرنگی و توت سیاه

شهریار سعیدیان^۱، نبی خلیلی‌اقدم^{۲*}، مونا مطهری‌نیا^۳

۱. دانشیار گروه بیولوژی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران. رایانامه: saeedyan@pnu.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، دانشیار گروه کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران. رایانامه: nkhaliliaqdam@pnu.ac.ir

۳. کارشناسی‌ارشد زیست‌شناسی سلولی ملکولی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران. رایانامه: motaharinia.m68bio@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی- پژوهشی	سابقه و هدف: در میان آلاینده‌های مختلف، سورفاکتانت‌ها و عوامل کائوتروپ، خطرات جدی برای اکوسیستم‌های طبیعی دارند. علاوه بر آن، اجزای سورفاکتانت‌ها و عوامل کائوتروپ می‌توانند از منابع مختلف به خاک و آب وارد شوند و بر روی جانوران و گیاهان اثرگذار باشند. هدف از این پژوهش بررسی تنش حاصله از سورفاکتانت‌ها و عوامل کائوتروپ بر روی آسکوربات پراکسیداز (APX) به عنوان یکی از آنزیم‌های اصلی تنش‌زدا در گیاهان می‌باشد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۲۰	APX به عنوان آنزیم آنتی‌اکسیداتیو، نقش مهمی در سیستم دفاعی گیاهان در برابر تنش‌های محیطی دارد. APX در تنظیم غلظت پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در سلول‌های گیاهی مؤثر می‌باشد. APX، پراکسید هیدروژن را در جهت ممانعت از آسیب و صدمات گیاهی تجزیه می‌کند. هنگام تنش‌های محیطی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل APX در بخش‌های مختلف گیاهی هم‌چون میوه افزایش می‌یابند. میزان سنتز زیستی این آنزیم آنتی‌اکسیدانی به شدت و مدت زمان تنش موجود در گیاه وابسته است. نظر به اهمیت این آنزیم در ساختارهای گیاهی، این مطالعه جهت بررسی بیشینه فعالیت آنزیم APX در سطوح مختلف سورفاکتانت‌ها و عوامل کائوتروپ اجرا گردید.
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۴	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۱۶	
واژه‌های کلیدی: آنزیم، مدل، مکانیسم، مهارکنندگی	
مواد و روش‌ها: این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه پیام‌نور کردستان روی توت‌فرنگی و توت سیاه به اجرا در آمد. جهت تهیه عصاره از میوه‌های تهیه شده، از بافر سیترات-فسفات ۰/۱ مولار با pH ۷ و محلول ۰/۰۲ فنیل متان سولفونیل فلوراید به عنوان مهارکننده پروتئازی استفاده گردید. برای بررسی اثر سورفاکتانت‌های مختلف یونی، غیر یونی و نیز عوامل کائوتروپ از غلظت‌های ۰ تا یک سدیم دودسیل سولفات (SDS) (سورفاکتانت یونی)، ۰ تا ۳۰ سدیم کولات (سورفاکتانت یونی)، ۰ تا ۰/۳ سارکوزیل (سورفاکتانت یونی)،	

۰ تا ۰/۰۷ توین ۲۰ و توین ۸۰ (سورفاکتانت غیریونی) و ۰ تا ۳۰ اوره و گوانیدین هیدروکلرید (عوامل کائوتروپیک) استفاده شد و فعالیت ST.APX و BM.APX مورد سنجش قرار گرفت. هم‌چنین در حضور غلظت‌های ثابت آسکوربات و H_2O_2 ، نوع مهار APX به وسیله کوچیک اسید تعیین گردید. برای تعیین بهترین سطح پاسخ آنزیم APX به سطوح مختلف تیمارهای مورد مطالعه با توجه به کمی بودن تیمارها، از تجزیه رگرسیون خطی و غیرخطی بهره گرفته شد. برای برازش مدل‌های رگرسیون غیرخطی، از رویه Proc nlin در محیط نرم‌افزار (SAS) از روش مطلوب‌سازی تکراری و نرم‌افزار GraphPadPrism بهره گرفته شد.

یافته‌ها: در عصاره‌های تهیه شده از توت‌فرنگی و توت سیاه، pH بهینه ۶/۷ بود و بازدهی کاتالیکی در توت سیاه ۱/۶ برابر بیش‌تر از توت‌فرنگی بود. با افزایش غلظت آسکوربات در غلظت ثابت H_2O_2 فعالیت BM.APX و ST.APX افزایش نشان داد، طوری‌که بالاترین میزان فعالیت آنزیم برای هر دو گیاه BM.APX در غلظت ۰/۵ واحد بر میلی‌گرم پروتئین حاصل شد. بر اساس نتایج، مهار فعالیت ST.APX و BM.APX به وسیله کوچیک اسید از نوع غیررقابتی بود. از میان عوامل کائوتروپ و سورفاکتانت‌های مورد استفاده تنها SDS فعالیت ST.APX و BM.APX را فعال نمود و بیشینه تأثیر آن در غلظت ۰/۲ میلی‌مولار اتفاق افتاد. در سایر عوامل، میزان مهارشوندگی و کاهش فعالیت BM.APX نسبت به ST.APX بیش‌تر بوده و به‌استثنای پاسخ APX به کوچیک اسید و سدیم کولات در توت‌فرنگی در مورد سایر عوامل پاسخ آنزیم از تابع نمایی کاهشی تک‌فازی پیروی کرد.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش APX با پیروی از سینتیک میکائلیس-متن و نیز با اتصال سوبسترا به جایگاه فعال آنزیمی، فرم فعال‌تری به خود گرفته و با انجام کاتالیز آنزیمی موجب مصرف آسکوربات در توت‌فرنگی و توت سیاه می‌گردد. سورفاکتانت‌های یونی با مکانیزم فعال‌کنندگی هم‌چون SDS و مکانیزم مهارکنندگی هم‌چون سارکوزیل و سدیم کولات اثرات متفاوتی بر روی APX اعمال نموده و آنزیم علی‌رغم حساسیت بالاتر در توت سیاه، سرعت فعالیت بیش‌تری نسبت به پراکسیداز موجود در توت‌فرنگی داشت. سورفاکتانت‌های غیریونی نیز همانند عامل کائوتروپ و کوچیک اسید، از طریق مهارکنندگی باعث کاهش فعالیت APX در هر دو گونه گیاهی شد.

استناد: سعیدیان، شهریار، خلیلی‌اقدم، نبی، مطهری‌نیا، مونا (۱۴۰۳). بررسی کمی تأثیر سورفاکتانت‌ها و عوامل کائوتروپ بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز در توت‌فرنگی و توت سیاه. نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی، ۳۱ (۳)، ۲۲۹-۲۰۵.

DOI: 10.22069/JOPP.2024.21899.3088



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

غشای سلول، تغییر ساختار و عملکرد پروتئین‌های حیاتی یاخته‌ای، اکسید شدن لیپیدها و در نهایت تغییر ساختار غشاء شده که حاصل آن از بین رفتن یکپارچگی غشاء سلولی است. اکسیدشدن گروه‌های سولفیدریل (SH)، غیرفعال شدن آنزیم‌های سلولی، تخریب رنگدانه‌های کلروفیل و سایر رنگدانه‌های داخل سلولی که با بی‌رنگ شدن یاخته‌ای همراه است و نیز می‌توان به هجده دائمی به مولکول‌های زیستی DNA اشاره داشت که نتیجه آن اختلال در ساختار و عملکرد رشته‌های DNA است (۵، ۶ و ۷). مکانیسم‌های حذف انواع اکسیژن فعال در اندامک‌های سلولی عمدتاً در کلروپلاست و میتوکندری انجام می‌گیرد. در راستای حذف این اکسیژن‌های فعال و رادیکال‌های آزاد، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گایاکول پراکسیداز (GPX)، گلوکاتایون ردوکتاز (GR)، دهیدروآسکوربات- ردوکتاز (DHAR) و آسکوربات پراکسیداز (APX) نقش مهمی را بر عهده دارند (۸). در هنگام تنش‌های مختلف محیطی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل آسکوربات پراکسیداز، دهیدروآسکوربات ردوکتاز، گلوکاتایون ردوکتاز و سوپراکسیددیسموتاز در بخش‌های مختلف گیاهی هم‌چون برگ‌ها افزایش می‌یابند. هر چند که میزان سنتز زیستی این آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به شدت اعمال شده و مدت زمان تنش موجود در گیاه وابسته است. هم‌چنین گونه و مرحله رشد و نمو گیاه نیز در میزان تنش و در نهایت ساخته شدن این مواد مؤثرند (۸). APX نقش حیاتی در مکانیسم‌های دفاعی گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو دارد. این آنزیم، پراکسید هیدروژن را در کلروپلاست، سیتوسول، میتوکندری و پراکسی‌زوم سلول‌های گیاهی از بین می‌برد (۹). دترجنت‌ها، پاک‌کننده‌های غیرصابونی با قدرت تمیزکنندگی بالا بوده که در آب سخت به خوبی کف می‌کنند و بر اساس بار الکتریکی

آسکوربات پراکسیداز (APX) به عنوان یکی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو نقش مهمی در سیستم دفاعی گیاهان در برابر تنش‌های محیطی دارد. APX پروتئینی با ساختار متصل به گروه پروستیک هم بوده که آهن در جایگاه کاتالیتیکی آنزیم اهمیت به‌سزایی دارد. APX در تنظیم غلظت پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در سلول‌های گیاهی مؤثر بوده و H_2O_2 را در جهت ممانعت از آسیب و صدمات گیاهی تجزیه می‌کند. تجزیه آسکوربات-پراکسیداز مسیر آسکوربات-گلوکاتایون در گیاهان انجام می‌شود که در این مسیر عامل دهنده الکترون پیش ماده آسکوربات بوده که عامل حفاظت‌کننده گیاه در برابر تنش اکسیداتیو به‌شمار می‌رود (۱). مطالعات نشان داده است که عوامل متعددی مانند تجمع ایزوتیوسیانات و روی نیز می‌تواند در تشدید تنش اکسیداتیو نقش داشته باشد و باعث القا مسیر گلوکاتایون و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی مانند آسکوربات پراکسیداز شوند (۲ و ۳). با ایجاد تنش‌های محیطی در گیاه از جمله تنش‌های مرتبط با شوری، حضور انواع نمک‌ها، سورفاکتانت‌ها و مهارکننده‌های مختلف، مجموعه‌ای از تغییرات در داخل یاخته به وقوع می‌پیوندد. این عوامل می‌توانند به طور مستقیم بر روی ساختار مولکول‌ها و پروتئین‌ها و به ویژه آنزیم‌های حیاتی سلولی اثر داشته و سبب تغییر ساختار در این مولکول‌های حیاتی گشته و آن‌ها را غیر فعال سازند علاوه بر آن می‌توانند منجر به تغییرات بیوشیمیایی در داخل سلول گردند. به عنوان مثال منجر به شکست در زنجیره انتقال الکترون و ایجاد محصولات آسیب‌دهنده گیاهی هم‌چون اکسیژن فعال $O_2^{\cdot-}$ ، H_2O_2 و OH^{\cdot} گردند. (۴). فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن (ROS=Reactive oxygen species) می‌تواند سبب پدیدار شدن آسیب‌هایی هم‌چون صدمه به

آنزیم‌های اصلی تنش‌زدا در گیاهان می‌باشد. هنگام تنش‌های محیطی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل APX در بخش‌های مختلف گیاهی هم‌چون میوه افزایش می‌یابند. میزان سنتز زیستی این آنزیم آنتی‌اکسیدانی به شدت و مدت زمان تنش موجود در گیاه وابسته است. نظر به اهمیت این آنزیم در ساختارهای گیاهی، این مطالعه جهت بررسی بیشینه فعالیت آنزیم APX در سطوح مختلف سورفکتانت‌ها و عوامل کائوتروپ در توت‌فرنگی و توت سیاه اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه پیام نور کردستان اجرا گردید. در این پژوهش، توت‌فرنگی با نام علمی *Fragaria sp.* و خانواده *Rosaceae* و توت سیاه با نام علمی *Morus nigral* تولید شده در کردستان در فصل بهار استفاده شد. این میوه‌ها پس از شستشو و خشک شدن به طور جداگانه و بلافاصله عصاره‌گیری شدند تا از فعالیت قارچی جلوگیری به‌عمل آید. به منظور تهیه عصاره، میوه‌های تهیه شده در حضور بافر سیترات-فسفات ۰/۱ مولار در pH ۷ و نیز محلول ۰/۰۲ فنیل متان سولفونیل فلوراید به‌عنوان مهارکننده پروتئازی میوه‌ها به‌طور جداگانه هم‌وزنیزه گردیدند. مخلوط هم‌وزنیزه به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰g سانتریفوژ شد (۱۳). رسوب بالایی به مدت نیم ساعت در ۱۵۰۰۰g سانتریفوژ شد و محلول شفاف بالایی به‌عنوان عصاره خام و انجام سنجش‌های بعدی یعنی اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) در توت‌فرنگی (ST.APX) و در توت سیاه (BM.APX) مورد استفاده قرار گرفت (۲۲). جهت اندازه‌گیری کمی پروتئین نمونه‌ها از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد (۱۴) و غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین گاوی محاسبه و بر حسب میلی‌گرم بر گرم گزارش گردید.

سورفکتانت و ساختار شیمیایی در چهار دسته کلی آنیونی، کاتیونی، غیریونی و آمفوتر قرار می‌گیرند. از جمله خاصیت‌های مهم این نوع دترجنت می‌توان به ضدباکتری بودن آن اشاره کرد. دترجنت‌ها یا همان پاک‌کننده‌های غیریونی یکی دیگر از انواع دترجنت‌ها هستند که در ساختار آن‌ها گروه‌های هیدروفیلی خشی وجود دارد. این دسته از پاک‌کننده‌ها قدرت کف‌کنندگی کمی دارند و در مقابل آب‌های سخت، محلول‌های اسیدی یا قلیایی مقاومت بالایی دارند. منظور از خاصیت دترجنتی، خاصیت پاک‌کنندگی آن‌ها در محلول است و این خاصیت از رفتار آبدوست و آب‌گریز دترجنت‌ها نشات می‌گیرد. دترجنت‌ها یا پاک‌کننده‌ها در غلظت‌های پایین برای جداسازی پروتئین‌های غشای داخلی سلول‌ها می‌توانند مورد استفاده قرار بگیرند و با وجود قدرت پاک‌کنندگی بالا و مزایایی که دارند اما برای اکوسیستم‌های طبیعی به‌عنوان یک آلاینده با خطرات جدی در نظر گرفته می‌شوند و در واقع با تخلیه فاضلاب یا پساب، دترجنت‌های موجود در آن‌ها به محیط زیست وارد می‌شوند و اثر منفی بر روی عملکرد منابع آبی می‌گذارند. بنابراین دترجنت‌ها می‌توانند وارد خاک یا سایر منابع آبی شوند و بر روی انواع گونه‌های گیاهی و جانوری تأثیرات نامطلوبی از جمله تخریب ساختارهای مطلوب آنزیمی بگذارند. بر این اساس هدف از این پژوهش بررسی تنش حاصله از سورفکتانت‌ها و عوامل کائوتروپ بر روی آسکوربات پراکسیداز به‌عنوان یکی از آنزیم‌های اصلی تنش‌زدا در گیاهان می‌باشد و هم‌چنین بتوان غلظت‌هایی که باعث از بین رفتن کامل ساختار آنزیمی APX می‌گردد تخمین زده شود (۱۰، ۱۱ و ۱۲).

هدف از این پژوهش بررسی تنش حاصله از سورفکتانت‌ها و عوامل کائوتروپ بر روی آسکوربات پراکسیداز (APX) به‌عنوان یکی از

غیریونی و عوامل کائوتروپ مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این سنجش‌ها از غلظت‌های سورفاکتانتی زیر غلظت بحرانی میسلی استفاده شد تا در حین انجام سنجش‌ها هیچ تجمعی از سورفاکتانت‌های مورد استفاده که منجر به کدر شدن و خطای آزمایش گردد صورت نگیرد. سنجش‌های انجام شده بر روی فعالیت ST.APX و BM.APX در حضور غلظت‌های ثابت آسکوربات و H_2O_2 و در بافر فسفات ۰/۱ مولار فسفات و شرایط pH بهینه ۶/۷ انجام گردید. برای بررسی اثر سورفاکتانت‌های مختلف یونی و غیریونی و نیز عوامل کائوتروپ از غلظت‌های صفر تا یک سدیم دودسیل سولفات (SDS) (سورفاکتانت یونی)، ۰ تا ۳۰ سدیم کولات (سورفاکتانت یونی)، ۰ تا ۰/۳ سارکوزیل (سورفاکتانت یونی)، ۰ تا ۰/۰۷ توین ۲۰ و توین ۸۰ (سورفاکتانت غیریونی) و ۰ تا ۳۰ اوره و گوانیدین هیدروکلرید (عوامل کائوتروپیک) استفاده شد و فعالیت ST.APX و BM.APX مورد سنجش قرار گرفت. به عنوان مثال تیمارهای استفاده شده در کووت‌ها برای سدیم دودسیل سولفات به گونه‌ای بود که در ۱۳ غلظت مختلف یعنی غلظت‌های ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲، ۰/۲۵، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۹ و ۱ میلی‌مولار هر بار به طور جداگانه و برای هر غلظت سه بار سنجش استفاده گردید. در این سنجش‌ها، شرایط در هر دو کووت جهت خوانش جذب در اسپکتروفتومتر به لحاظ غلظت سوستر، سورفاکتانت و مقدار بافر مورد استفاده در هر دو کووت یکسان بوده، و سنجش آنزیمی با افزوده شدن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی ST.APX و BM.APX طی سنجش‌های جداگانه آغاز گردید و تغییرات جذب در طول موج مربوط به آسکوربات مصرفی (۲۹۰ نانومتر) ثبت گردید.

تعیین pH بهینه: به منظور مشخص نمودن pH بهینه فعالیت آسکوربات پراکسیداز که در کل پژوهش مورد استفاده قرار گیرد، از بافر فسفات ۰/۱ میلی‌مولار در محدوده pH ۳ تا ۱۱ استفاده شد. سنجش فعالیت APX هر بار در حضور غلظت ثابتی از سوسترهای آسکوربات و پراکسیدهیدروژن به طور مجزا و جداگانه برای هر pH و مقدار ثابتی از عصاره انجام گردید. سرعت اولیه هر واکنش آنزیمی از روی شیب خط مماس بر منحنی‌های تغییر غلظت علیه زمان محاسبه گردید. سپس سرعت اولیه واکنش در هر pH علیه pH مربوط به آن رسم گردید. منحنی pH به منظور تعیین pH بهینه برای عصاره حاصل از توت‌فرنگی و توت سیاه به طور جداگانه انجام و رسم گردید و pH بهینه حاصله در کل پژوهش مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین فعالیت آسکوربات پراکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (1. 11. 1. EC 11) با استفاده از روش Nakano and Asada (۱۹۸۷) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (۱۵). برای این سنجش به میزان یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش که دربرگیرنده آسکوربات ۱۰ میلی‌مولار، بافر فسفات پتاسیم یک مولار با ۷/۸ pH، پراکسید هیدروژن با غلظت ۱۰ میلی‌مولار و هم‌چنین ۱۰ میکرولیتر از عصاره خام در داخل کووت به منظور سنجش در دستگاه اسپکتروفتومتر مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با توجه به میزان اکسایش سوسترهای آسکوربات و در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با بهره‌گیری از ضریب خاموشی $2/8 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ اندازه‌گیری شد (۱۶).

اثر سورفاکتانت‌ها و عوامل کائوتروپ بر فعالیت APX: فعالیت آنزیمی ST.APX و BM.APX در حضور غلظت‌های افزایشی سورفاکتانت‌های یونی و

$$Y = \text{intercept} + \text{slope} \times x \quad (1)$$

مدل دو تکه‌ای: که در آن a ، عرض از مبدا، b_1 و b_2 شیب مدل دو طرف نقطه چرخش (Break point) و x_0 ، نقطه چرخش مدل یا حداکثر مقدار عددی y است. مقادیر a و b_1 همیشه مثبت و مقدار b_2 نیز همیشه منفی است. تابع این مدل عبارت است از:

$$\text{if } x < x_0 \quad (2)$$

$$y = a + b_1 x_0$$

$$\text{if } x > x_0 \text{ then } y = a + b_1 x_0 + b_2 (x - x_0)$$

مدل نمایی کاهشی تک‌فازی: مدل نمایی کاهشی در شرایطی استفاده می‌شود که مقدار متغیر تابع (فعالیت آنزیم) با گذشت زمان یا در اثر افزایش مقدار یک نهاده یا ماده تحریک‌کننده کاهش می‌یابد. تغییر در مقدار Y معمولاً در ابتدا سریع رخ می‌دهد ولی هم‌چنان‌که Y به یک مقدار حداکثری نزدیک می‌شود، شیب کاهش در مقدار Y نیز به تدریج کاهش می‌یابد. فرم این مدل عبارت است از:

$$Y = \text{Pleatue} + (Y_{\max} - \text{Pleatue}) \times \exp(-k \times X) \quad (3)$$

که در آن، Pleatue حداکثر مقدار Y است که با افزایش در مقدار X ، Y به آن نزدیک می‌شود، Y_{\max} حداکثر مقدار Y و k ، شیب کاهش مدل است (۱۷).

مدل سنتتیکی مکائلیس متتن: که در آن V_0 سرعت تبدیل سوبسترا به محصول در واحد زمان، $[S]$ غلظت سوبسترا، V_{\max} بیش‌ترین سرعت واکنش آنزیمی، k_m ثابت مکائلیس متتن و IC_{50} معادل $V_{\max}/2$ است. تابع این مدل عبارت است از:

$$V_0 = V_{\max} \times [S] / (k_m + [S]) \quad (4)$$

تعیین نوع مهار فعالیت APX در حضور کوچیک

اسید: در حضور غلظت‌های ثابت آسکوربات و H_2O_2 ، نوع مهار APX به‌وسیله کوچیک اسید تعیین گردید. فعالیت APX بدون حضور کوچیک اسید (کنترل) و در حضور حداقل ۲ غلظت انتخابی از کوچیک اسید (۱ و ۲ میلی‌مولار) مورد سنجش قرار گرفت. برای انجام هر واکنش، غلظت مهارکننده و غلظت ثابت سوبسترا در هر دو کووت یکسان بوده و تنها با افزودن عصاره خام به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به کووت مرجع واکنش انجام شده و تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر بر اساس میزان مصرف آسکوربات ثبت گردید. در پایان منحنی لاین ویور-برک برای فعالیت آنزیم در عدم حضور مهارکننده و در حضور دو غلظت مختلف کوچیک اسید یعنی غلظت‌های ۲ و ۳ میلی‌مولار رسم شد. منحنی لاین ویوربرک به صورت $1/V$ علیه $1/[S]$ یعنی نسبت معکوس سرعت واکنش سینتیکی مصرف سوبسترا علیه نسبت معکوس غلظت‌های صفر، ۲ و ۳ میلی‌مولار کوچیک اسید در حضور غلظت‌های ثابت سوبسترا رسم گردید و بدین‌وسیله نوع مهار آنزیم تعیین گردید. تعیین نوع مهار براساس شیب نمودار یعنی محاسبه پارامتر (K_m/V_{\max}) و نیز محاسبه پارامتر عرض از مبدا $(1/V_{\max})$ انجام گردید.

روش تجزیه و تحلیل: در این پژوهش برای تعیین بهترین سطح پاسخ آنزیم آسکوربات پراکسیداز به سطوح مختلف تیمارهای مورد مطالعه با توجه به کمی بودن تیمارها از تجزیه رگرسیون خطی و غیرخطی بهره گرفته شد. توابع رگرسیون مورد استفاده در این پژوهش عبارت بودند از:

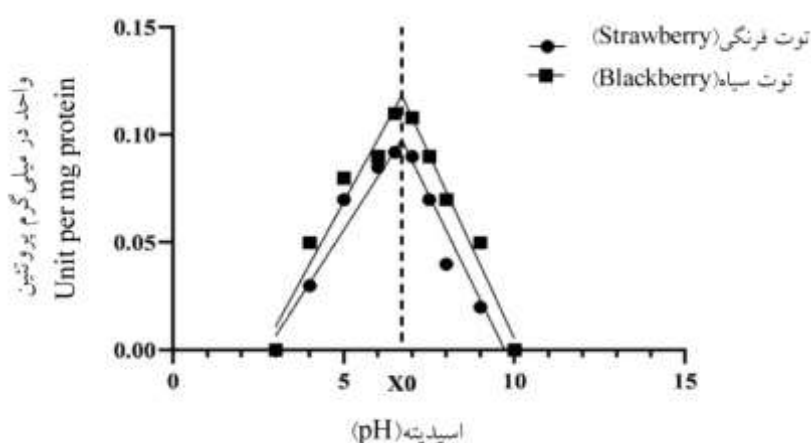
مدل رگرسیون ساده خطی: که در آن، intercept عبارت است از مقدار Y وقتی $x = \text{صفر}$ باشد. Slope نیز شیب تغییرات متغیر Y در برابر متغیر X است. تابع این مدل عبارت است از:

مختلف pH نشان داد که روند تغییرات فعالیت آنزیم در معرض سطوح مختلف اسیدیته و بازی از یک تابع دوتکه‌ای پیروی می‌کند (شکل ۱). بدین ترتیب که با افزایش pH محیط، فعالیت آنزیم تا ۶/۷ pH با شیب ۰/۰۲۴ برای ST.APX و ۰/۰۲۹ برای BM.APX افزایش پیدا می‌کند و پس از رسیدن به نقطه شکست (۶/۷ در هر دو گیاه) با شیب -۰/۰۶ در توت‌فرنگی و -۰/۰۷ (واحد در میلی‌گرم پروتئین بر pH) در توت سیاه فعالیت آنزیم کاهش پیدا می‌کند، طوری که در pH حدود ۱۰ فعالیت هر دو آنزیم به صفر میل کرد. شیب افزایشی فعالیت آنزیم در بخش اول مدل و شیب کاهشی در بخش دوم مدل در ارتباط با BM.APX بیش‌تر از ST.APX بود و این نشان‌دهنده حساسیت بیش‌تر آنزیم APX به pH محیط در توت سیاه نسبت به توت‌فرنگی است. بنابراین pH بهینه BM.APX و ST.APX عدد ۶/۷ حاصل آمد و در سایر سنجش‌های پژوهش به منظور بررسی اثرات آسکوربات و سایر سورفاکتانت‌های یونی، غیریونی، عوامل کائوتروپ و مهارکننده‌ها از این pH بهینه استفاده گردید (جدول ۱).

برای برازش مدل‌های رگرسیون غیرخطی و از رویه Proc nlin در محیط نرم‌افزار SAS (۱۷) از روش مطلوب‌سازی تکراری و نرم‌افزار GraphPadPrism (۱۸) بهره گرفته شد (۱۹). در این روش با هر بار وارد کردن مقادیر اولیه پارامترها، مقادیر نهایی آن‌ها با روش کم‌ترین توان‌های دوم تخمین زده می‌شود و تغییر مقادیر اولیه تا زمانی انجام می‌شود که بهترین برآورد از پارامتر به دست بیاید.

نتایج و بحث

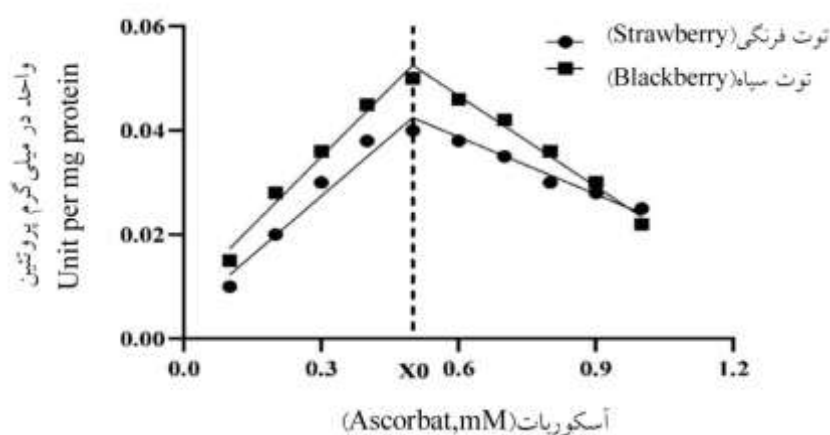
اثر pH بر فعالیت APX در توت‌فرنگی و توت سیاه: به منظور تعیین pH بهینه فعالیت APX با استفاده از غلظت‌های ثابت آسکوربات و H_2O_2 در pHهای ۳ تا ۱۰ فعالیت آنزیم‌های BM.APX و ST.APX اندازه‌گیری شد. میزان مصرف سوسترای واکنش APX یعنی آسکوربات در ۲۹۰ نانومتر نشان داد که در هر سنجش با افزایش pH از ۳ تا ۶/۷، افزایش فعالیت آنزیمی هم برای BM.APX و هم برای ST.APX مشهود است. بررسی کمی فعالیت آنزیم‌های BM.APX و ST.APX در سطوح



شکل ۱- فعالیت آسکوربات پراکسیداز در سطوح مختلف pH در توت سیاه و توت‌فرنگی.
Fig. 1. APX activity in different level of pH in Blackberry and Strawberry.

آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف آسکوربات از یک تابع دوتکه‌ای پیروی می‌کند (شکل ۲). بر این پایه، با افزایش آسکوربات محیط، فعالیت آنزیم تا غلظت آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار با شیب ۰/۰۷۵ در توت‌فرنگی و ۰/۰۸۸ (واحد در میلی‌گرم پروتئین بر میلی‌مولار آسکوربات) در توت سیاه افزایش پیدا می‌کند و پس از رسیدن به نقطه شکست (۰/۵) در هر دو گیاه) با شیب -۰/۰۳۶- در توت‌فرنگی و -۰/۰۵۸- (واحد در میلی‌گرم پروتئین بر میلی‌مولار آسکوربات) در توت سیاه فعالیت آنزیم‌های BM.APX و ST.APX کاهش پیدا می‌کند. شیب افزایش فعالیت آنزیم در بخش اول مدل و شیب کاهش در بخش دوم مدل در BM.APX بیش‌تر از ST.APX بود و این بیانگر حساسیت بیش‌تر آنزیم APX به آسکوربات محیط در توت سیاه نسبت به توت‌فرنگی است. ضمن این‌که بیشینه فعالیت آنزیم در هر دو گیاه نیز در غلظت آسکوربات برابر ۰/۵ درون‌یابی شد (جدول ۱).

اثر سوبسترای آسکوربات بر فعالیت APX: با افزایش غلظت آسکوربات از ۰ تا ۱۰ میلی‌مولار، رفتار متفاوتی از هر دو آنزیم BM.APX و ST.APX بر اساس نمودار ترسیم شده در شکل ۲ قابل مشاهده است. با افزایش غلظت آسکوربات در غلظت ثابت H_2O_2 و در pH بهینه ۶/۷ فعالیت هر دو آنزیم BM.APX و ST.APX با افزایش همراه است، طوری‌که در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار آسکوربات به بالاترین میزان فعالیت BM.APX یعنی ۰/۰۵ واحد بر میلی‌گرم پروتئین رسید و فعالیت ST.APX نیز ۰/۰۴ واحد بر میلی‌گرم پروتئین را نشان داد. افزایش بیش‌تر در غلظت سوبسترا از ۰/۵ تا ۱ میلی‌مولار با کاهش فعالیت هر دو آنزیم همراه بود که نشان‌دهنده مهار سوبسترای BM.APX و ST.APX در این غلظت‌ها می‌باشد. نتایج آنالیز رگرسیون غیر خطی نیز فعالیت BM.APX و ST.APX را در سطوح غلظتی مختلف آسکوربات نشان داد که روند تغییرات فعالیت



شکل ۲- فعالیت اسکوربات پراکسیداز در سطوح غلظتی مختلف آسکوربات در توت سیاه و توت‌فرنگی.

Fig. 2. APX activity in different level of Ascorbat in Blackberry and Strawberry.

جدول ۱- ضرایب برازش مدل دو تکه‌ای به تغییرات فعالیت APX در سطوح مختلف pH، آسکوربات و SDS در توت‌فرنگی و توت سیاه.

Table 1. Fitted Segmented model coefficients of APX activity vs. different level of pH, Ascorbat and SDS in Blackberry and Strawberry.

Blackberry (توت سیاه)			Strawberry (توت‌فرنگی)			
SDS	Ascorbate	PH	SDS	Ascorbate	PH	
102.4	0.0084	-0.07	100.4	0.0046	-0.06	Intercept (عرض از مبدا)
20.3	0.088	0.029	10.65	0.075	0.024	b_1 (شیب اول مدل)
-18.22	-0.058	-0.034	-8.13	-0.036	-0.032	b_2 (شیب دوم مدل)
0.2	0.5	6.7	0.2	0.5	6.7	X_0 (نقطه چرخش مدل)
0.83	0.97	0.96	0.96	0.96	0.96	R^2

APX از سینتیک میکائلیس متن می‌باشد (۲۱). هر چند که این نتیجه نشان می‌دهد که بخشی از این آنزیم‌ها در داخل عصاره‌های توت‌فرنگی و توت سیاه به صورت غیرفعال وجود دارند که با اتصال سوبسترا به جایگاه فعال آنزیمی APX به فرم فعال تبدیل شده و با انجام کاتالیز آنزیمی موجب مصرف آسکوربات می‌گردند.

تعیین پارامترهای سینتیکی فعالیت APX: پارامترهای سینتیکی فعالیت APX برای هر دو آنزیم BM.APX و ST.APX در pH ۶/۷ در جدول ۲ نشان داده شده است. به منظور تعیین ضریب میکائلیس (K_m) و بیشینه فعالیت آنزیم‌ها (V_{max}) و هم‌چنین کارایی کاتالیتیکی (V_{max}/K_m) از غلظت‌های متغیر آسکوربات و غلظت ثابت H_2O_2 و در pH ۶/۷ مطابق نمودار شکل ۲ استفاده شد. بر این اساس K_m آنزیم‌های BM.APX و ST.APX به ترتیب ۰/۲ و ۰/۱۸ میلی‌مولار تعیین گردید. V_{max} آنزیم‌های BM.APX و ST.APX به ترتیب ۰/۰۵ و ۰/۰۴ واحد بر میلی‌گرم پروتئین تعیین گردید. بر اساس نتایج حاصله از K_m و V_{max} کارایی کاتالیتیکی BM.APX و ST.APX به ترتیب ۰/۲۵ و ۰/۱۶ واحد بر میلی‌گرم بر میلی‌مولار محاسبه گردید.

APX یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های دخیل در سم‌زدایی محیط یاخته از H_2O_2 می‌باشد که تمایل بالایی نسبت به H_2O_2 دارد و H_2O_2 ‌های مازاد مصرفی توسط کاتالاز را خنثی می‌کند (۱۲). فعالیت این آنزیم اولین بار در کلروپلاست و در چرخه گلوکاتیون آسکوربات شناخته شد (۱). بر اساس نتایج این پژوهش برای سوبسترای آسکوربات مورد استفاده در سنجش APX در عصاره‌های تهیه شده از توت‌فرنگی و توت سیاه از pH بهینه ۶/۷ استفاده شد و بر اساس بازدهی کاتالیتیکی حاصله، این بازدهی در مورد APX توت سیاه حدود ۱/۶ برابر بالاتر از توت‌فرنگی حاصل شد ($BM.APX > ST.APX$). گزارش شده است که کارایی کاتالیتیکی فعالیت آسکوربات پراکسیداز در عصاره تهیه شده از زعفران برای سوبسترای آسکوربات ۰/۳۶ و برای سوبسترای H_2O_2 عدد ۴/۱ بر دقیقه به دست آمده است که کارایی کاتالیتیکی APX در حضور آسکوربات حدود ۱۱ برابر می‌باشد (۲۰). آنزیم‌های ST.APX و BM.APX با کارایی کاتالیتیکی بالا آسکوربات را مصرف می‌کنند و منحنی فعالیت هیپربولیک را ایجاد می‌کند که از سینتیک میکائلیس- متن پیروی می‌نمایند. در کار مشابه بر روی آسکوربات پراکسیداز در گونه برنج نیز نتایج گزارش شده بیانگر پیروی

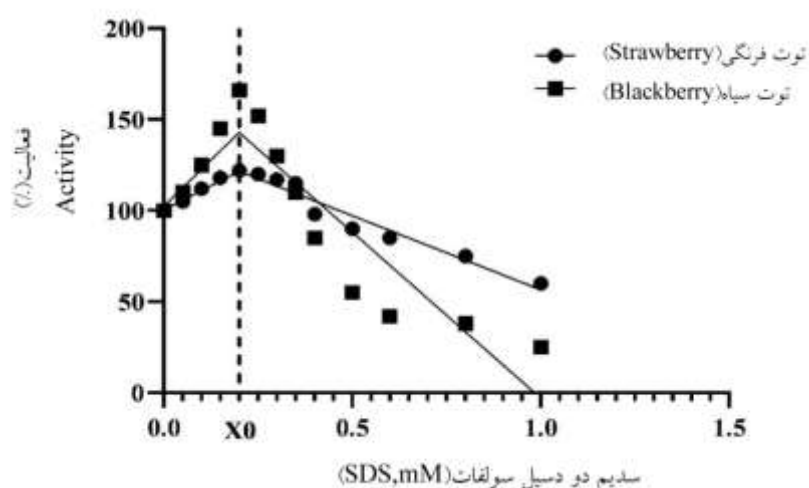
جدول ۲- پارامترهای سینتیکی فعالیت آسکوربات پراکسیداز در توت سیاه (BM.APX) و توت‌فرنگی (ST.APX) در حضور غلظت‌های ثابت پراکسید هیدروژن و غلظت‌های متغیر آسکوربات.

Table 2. Kinetics parameters of APX activity in presence of different concentration of H₂O₂ and Ascorbat in Blackberry and Strawberry.

Catalytic efficiency (unit/mg.mM)	Vmax (unit/mg protein)	Km (mM)	Subestra (سویسترا)	
0.25	0.05	0.2	آسکوربات پراکسیداز	BM.APX
0.16	0.04	0.18		ST.APX

ST.APX نیز در سطوح غلظتی مختلف SDS نشان داد که روند تغییرات فعالیت این آنزیم‌ها متفاوت از هم است (شکل ۳). به نحوی که با افزایش SDS محیط، فعالیت آنزیم تا غلظت SDS برابر ۰/۲ میلی‌مولار در توت‌فرنگی با شیب ۱۰/۶۵ و شیب ۲۰/۲۳ (درصد بر میلی‌مولار SDS) در توت سیاه افزایش پیدا می‌کند و پس از رسیدن به نقطه شکست ۰/۲ در هر دو گیاه با شیب ۸/۱۳- در توت‌فرنگی و ۱۸/۲۲- (درصد بر میلی‌مولار SDS) در توت سیاه فعالیت آنزیم‌ها کاهش پیدا می‌کند که شیب کاهش فعالیت آنزیم BM.APX به مراتب شدیدتر از ST.APX بود و این بیانگر حساسیت بیش‌تر آنزیم آسکوربات پراکسیداز به SDS محیط در توت سیاه نسبت به توت‌فرنگی است (جدول ۱). غلظتی از SDS که باعث مهار ۵۰ درصدی APX گردید در حضور آسکوربات و پراکسید هیدروژن معادل ۰/۴۵ میلی‌مولار برای BM.APX و ۰/۵ میلی‌مولار برای ST.APX است (جدول ۳).

اثر SDS بر فعالیت APX به عنوان سورفاکتانت یونی: به منظور بررسی اثر SDS بر فعالیت BM.APX و ST.APX از غلظت ثابت آسکوربات ۰/۳ میلی‌مولار و غلظت ثابت H₂O₂ استفاده شد. هم‌چنین غلظت SDS استفاده شده زیر ۸ میلی‌مولار یعنی زیر غلظت بحرانی میسلی انتخاب گردید (۲۲). منحنی‌های مربوط به درصد فعالیت BM.APX و ST.APX در شکل ۳ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت SDS فعالیت هر دو آنزیم BM.APX و ST.APX در ابتدا با افزایش ۲۲ درصد برای ST.APX و ۶۶ درصد نسبت به شرایط کنترلی (عدم حضور SDS) برای BM.APX همراه بوده و در ادامه کاهش ۴۰ درصد برای ST.APX و کاهش ۷۵ درصد برای ST.APX همراه است. بیش‌ترین مقدار حاصله برای فعالیت BM.APX و ST.APX برای هر دو آنزیم در ۰/۲ میلی‌مولار از SDS به دست آمد و با افزایش SDS تا ۱ میلی‌مولار با کاهش فعالیت همراه بودند. برازش مدل رگرسیون دو تکه‌ای به داده‌های فعالیت آنزیم‌های BM.APX و



شکل ۳- فعالیت اسکوربات پراکسیداز در سطوح مختلف SDS در توت سیاه و توت فرنگی.

Fig. 3. APX activity in different level of SDS in Blackberry and Strawberry.

جدول ۳- فعالیت آسکوربات پراکسیداز در توت سیاه (BM.APX) و توت فرنگی (ST.APX) در سطوح مختلف سورفاکتانت‌های یونی.

Table 3. APX activity of Blackberry and Strawberry in different concentration of ionic surfactants.

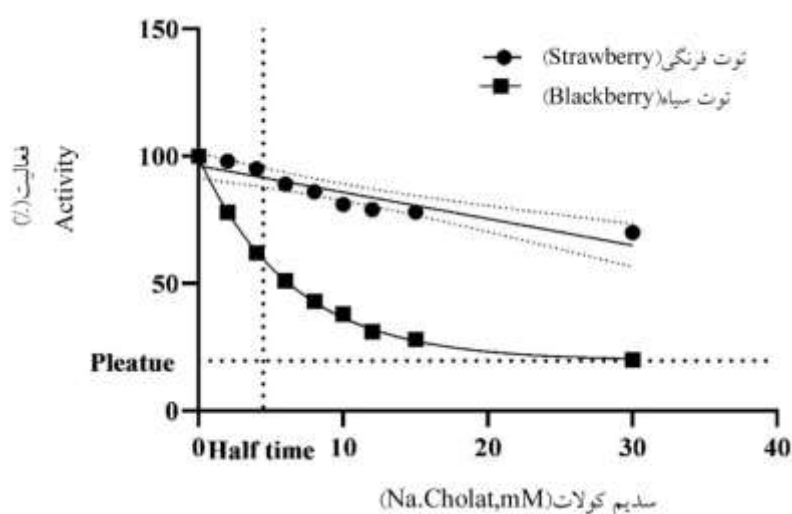
IC50	(نوع اثر)		(سطوح غلظتی)			
	Effect type		Concentration levels			
	(مهارکنندگی) Inhibitor	(فعال‌کنندگی) Activator	(mM)			
0.45	75%	66%	0-1	(سدیم دو دسیل سولفات)	BM.APX	(سورفاکتانت‌های یونی) Ion surfactants
0.5	44%	20%		SDS	ST.APX	
4.46	80%	-	0-30	(سدیم کولات)	BM.APX	
10	30%	-		Na.Cholat	ST.APX	
25	72%	-	0-0.3	(سارکوسیل)	BM.APX	
15	45%	-		Sarkosyl	ST.APX	

اکسیژن یا به عبارتی همان میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی است، این عدد برای توت سیاه $950 \mu\text{mol TE/g}$ و برای توت فرنگی $100 \mu\text{mol TE/g}$ گزارش شده است (۲۲ و ۲۳). با توجه به بالاتر بودن میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در توت سیاه نسبت به توت فرنگی میزان فعالیت APX و همچنین درصد فعال شدن این BM.APX نسبت به ST.APX توجیه‌پذیر است.

SDS به عنوان سورفاکتانت آنیونی در حضور سوپسترای آسکوربات و H_2O_2 اثر فعال‌کنندگی روی فعالیت ST.APX و BM.APX نشان داده است. میزان فعال‌کنندگی SDS بر روی APX در توت فرنگی و توت سیاه متفاوت است به گونه‌ای که به لحاظ درصد فعال‌کنندگی رابطه $\text{BM.APX} > \text{ST.APX}$ حاکم است. بر اساس میزان (Oxygen Radical Absorbance Capacity) ORAC که ظرفیت جذب رادیکال

یک مدل نمایی کاهشی تک‌فازی پیروی می‌کند (شکل ۴). روند تغییرات فعالیت آنزیم ST.APX بدین معنی است که با افزایش غلظت سدیم کولات در محیط، میزان فعالیت آنزیم به میزان ۱/۰۴ درصد بازای افزایش هر میلی‌مولار سدیم کولات کاهش پیدا می‌کند (جدول ۳). از طرف دیگر پاسخ درصد فعالیت آنزیم ST.APX به غلظت‌های مختلف سدیم کولات در محیط، تابع یک مدل نمایی منفی تک‌فازی بود که در آن کمینه فعالیت آنزیم در غلظت ۱۵/۵۵ میلی‌مولار سدیم کولات به دست آمد. ضمن این‌که غلظت لازم از سدیم کولات (Half time) برای رساندن فعالیت سدیم کولات BM.APX به ۵۰ درصد حداکثر مقدار خود نیز، غلظت ۴/۴۶ میلی‌مولار و برای ST.APX مقدار ۱۰ میلی‌مولار درونیابی شد (جدول ۳). بدین معنی که در این غلظت‌ها، درصد فعالیت آنزیم به نصف حداکثر فعالیت خود در زمانی که غلظت سدیم کولات صفر باشد، کاهش پیدا می‌کند. شیب کاهش فعالیت آنزیم نیز مقدار ۰/۱۵ بر میلی‌مولار غلظت سدیم کولات درونیابی شد و هرچه بزرگ‌تر باشد، بیانگر تندی شیب کاهش و پاسخ سریع‌تر آنزیم به سطوح مختلف تیمار است (جدول ۴).

اثر سدیم کولات بر فعالیت APX به عنوان سورفاکتانت یونی: به منظور بررسی اثر سدیم کولات بر فعالیت BM.APX و ST.APX از غلظت ثابت آسکوربات ۰/۳ میلی‌مولار و غلظت ثابت H_2O_2 استفاده شد. منحنی‌های مربوط به درصد فعالیت BM.APX و ST.APX در شکل ۴ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت سدیم کولات فعالیت هر دو آنزیم BM.APX و ST.APX نسبت به شرایط کنترلی (عدم حضور سدیم کولات) با کاهش ۳۰ درصد برای ST.APX و کاهش ۸۰ درصد برای BM.APX همراه است. کم‌ترین مقدار حاصله برای فعالیت BM.APX و ST.APX برای هر دو آنزیم در ۱۵ میلی‌مولار از سدیم کولات به دست آمد. لازم به ذکر است که غلظت بحرانی میسلی سدیم کولات ۱۵ میلی‌مولار است. غلظتی از کوچیک اسید که باعث مهار ۵۰ درصدی APX گردید در حضور آسکوربات و پراکسید هیدروژن معادل ۴/۴۶ میلی‌مولار برای BM.APX و ۱۰ میلی‌مولار برای ST.APX است. روند تغییرات فعالیت آنزیم ST.APX از یک تابع رگرسیون خطی ساده پیروی نموده و تابع یک رگرسیون ساده کاهشی است و در BM.APX نیز از



شکل ۴- فعالیت آسکوربات پراکسیداز در سطوح غلظتی مختلف سدیم کولات در توت سیاه و توت فرنگی.

Fig. 4. APX activity in different concentration of Sodium cholat in Blackberry and Strawberry.

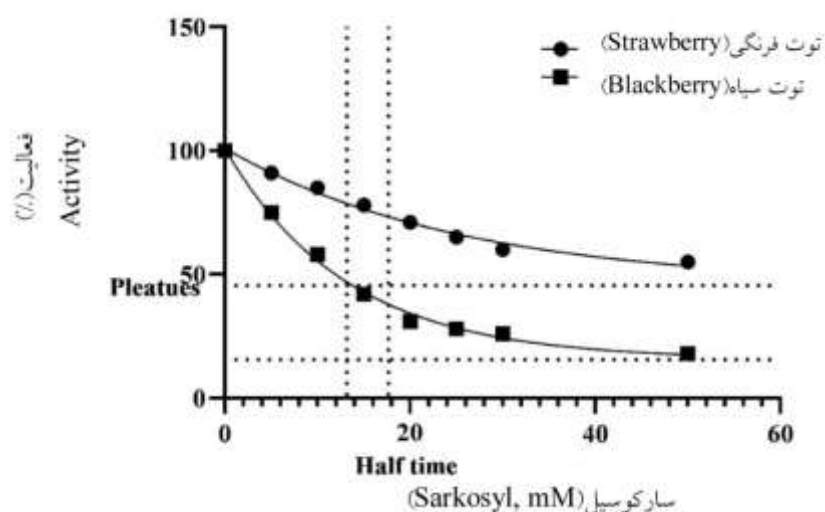
جدول ۴- ضرایب برازش مدل نمایی تک‌فازی به تغییرات فعالیت آسکوربات پراکسیداز در توت سیاه (BM.APX) و توت‌فرنگی (ST.APX) در غلظت‌های مختلف سورفاکتانت‌ها.

Table 4. Fitted one phase exponential decay model coefficients of APX activity at different concentration of surfactants in Blackberry and Strawberry.

Blackberry (توت سیاه)					Strawberry (توت‌فرنگی)					
Kojic acid	Sykosyl	Na.Cholat	Urea	Gn.Hcl	Kojic acid	Sykosyl	Na.Cholat	Urea	Gn.Hcl	
98.97	100.9	99.62	102.2	103.3	-	101	-	103.6	103.3	Pleatue (کمینه فعالیت عامل)
9.91	15.6	19.63	0.91	-3.56	-	45.61	-	15.55	17.13	K (شیب مدل)
0.703	0.075	0.155	0.157	0.119	-	0.039	-	0.098	0.056	Halftime (نیمه عمر)
0.985	13.18	4.46	4.41	5.82	-	17.68	-	7.04	12.23	Span (دامنه بیشینه و کمینه فعالیت)
89.06	85.33	79.99	99.15	106.8	-	55.4	-	87.75	86.43	Y _{max} (بیشینه فعالیت عامل)
0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	-	0.99	-	0.99	0.99	R ²

در محیط در هر دو گیاه نیز پیرو یک تابع نمایی منفی تک‌فازی بود (شکل ۵) که در آن کمینه فعالیت در ST.APX در غلظت ۴۵/۶ و در BM.APX در غلظت ۱۵/۶ میلی‌مولار سارکوزیل اتفاق افتاد. تفاوت زیاد این اعداد در دو گیاه بیانگر پاسخ نسبتاً متفاوت دو گیاه به حضور سارکوزیل در محیط رشد است. بدین معنی که حساسیت آنزیم ST.APX به مراتب کم‌تر از BM.APX بود، به نحوی که عملاً تا غلظت ۱۵/۶ میلی‌مولار سارکوزیل تغییر بسیار کمی در کاهش فعالیت APX در توت‌فرنگی دیده می‌شود، در حالی که روند کاهشی در فعالیت APX در توت سیاه تا غلظت ۱۵/۶ میلی‌مولار سارکوزیل قابل توجه می‌باشد. لازم به ذکر است که غلظت بحرانی میسلی سارکوزیل ۱۵ میلی‌مولار می‌باشد. شیب کاهش فعالیت آنزیم نیز در دو گیاه متفاوت و برابر ۰/۰۴ در توت‌فرنگی و ۰/۰۷۵ در توت سیاه بر میلی‌مولار سارکوزیل بود (جدول ۴).

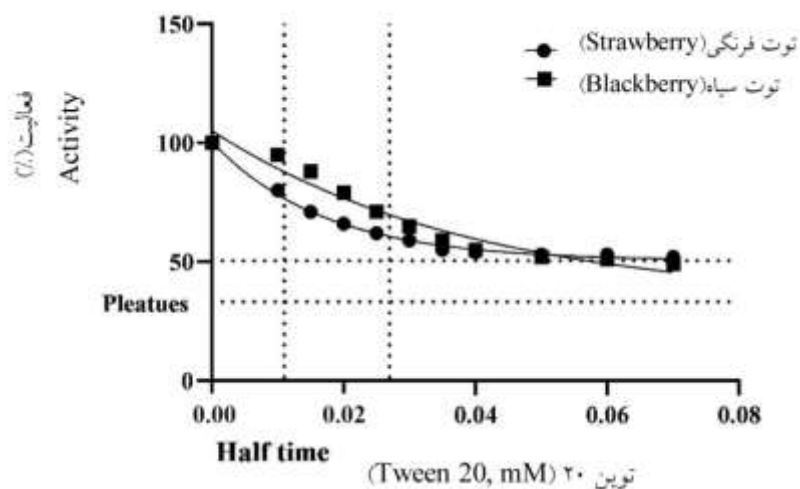
اثر سارکوزیل بر فعالیت APX به عنوان سورفاکتانت یونی: منحنی‌های مربوط به درصد فعالیت BM.APX و ST.APX در حضور سارکوزیل در شکل ۵ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت سارکوزیل فعالیت هر دو آنزیم BM.APX و ST.APX نسبت به شرایط کنترلی (عدم حضور سارکوزیل) با کاهش ۴۵ درصد برای ST.APX و کاهش ۷۲ درصد برای BM.APX همراه است. غلظتی از کوچیک اسید که باعث مهار ۵۰ درصدی APX گردید در حضور آسکوربات و پراکسید هیدروژن معادل ۲۵ میلی‌مولار برای BM.APX و ۱۵ میلی‌مولار برای ST.APX است (جدول ۳). به عبارت دیگر فعالیت APX در توت‌فرنگی در یک سطح معین از سارکوزیل بسیار زودتر از APX در توت سیاه به نصف حداکثر فعالیت خود در غلظت صفر سارکوزیل، اتفاق می‌افتد. عکس‌العمل درصد فعالیت آنزیم APX به غلظت‌های مختلف سارکوزیل



شکل ۵- فعالیت اسکوربات پراکسیداز در سطوح غلظتی مختلف سارکوسیل در توت سیاه و توت‌فرنگی.
 Fig. 5. APX activity in different concentrations of sarkosyl in Blackberry and Strawberry.

خود در غلظت صفر توین ۲۰، اتفاق می‌افتد. پاسخ درصد فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز به غلظت‌های مختلف توین ۲۰ در محیط در هر دو گیاه مشابه سایر سورفاکتانت‌ها پیرو یک تابع نمایی منفی تک‌فازی بود (شکل ۹) که در آن کمینه فعالیت آنزیم در توت‌فرنگی در غلظت ۰/۰۴ میلی‌مولار از توین ۲۰ دیده می‌شود که فعالیت هر دو آنزیم BM.APX و ST.APX تقریباً به حد ثابت ۵۰ درصد فعالیت اولیه آنزیم‌ها در عدم حضور توین ۲۰ رسیدند. نزدیکی زیاد این اعداد در دو گیاه بیانگر پاسخ نسبتاً یکسان دو گیاه به حضور توین ۲۰ در محیط رشد است. بدین معنی که حساسیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در توت‌فرنگی با توت سیاه یکسان بود. شیب کاهش فعالیت آنزیم نیز در دو گیاه متفاوت و برابر ۵۸/۹۰ در توت‌فرنگی و ۲۵/۱۱ در توت سیاه بر میلی‌مولار توین ۲۰ بود (جدول ۵).

اثر توین ۲۰ بر فعالیت APX به عنوان سورفاکتانت غیر یونی: توین ۲۰ زیر غلظت بحرانی میسلی (۰/۸ میلی‌مولار) (۲۴) اثر مهارکنندگی بر فعالیت هر دو آنزیم BM.APX و ST.APX نشان داد (شکل ۶). نتایج حاصله نشان داد که فعالیت هر دو آنزیم BM.APX و ST.APX در توین ۲۰ با کاهش همراه بود، طوری که در غلظت ۰/۰۴ تا ۰/۰۷ میلی‌مولار به کم‌ترین میزان فعالیت خود یعنی ۵۲ درصد برای هر دو آنزیم ST.APX و BM.APX نسبت به شرایط کنترل یعنی عدم حضور توین ۲۰ همراه بود. غلظتی از توین ۲۰ که باعث مهار ۵۰ درصدی APX گردید در حضور آسکوربات و پراکسید هیدروژن معادل ۰/۰۲۵ میلی‌مولار برای BM.APX و ۰/۰۱۵ میلی‌مولار برای ST.APX است (جدول ۶). به عبارت دیگر فعالیت آنزیم در توت‌فرنگی در یک سطح معین از توین ۲۰ بسیار زودتر از توت سیاه به نصف حداکثر فعالیت

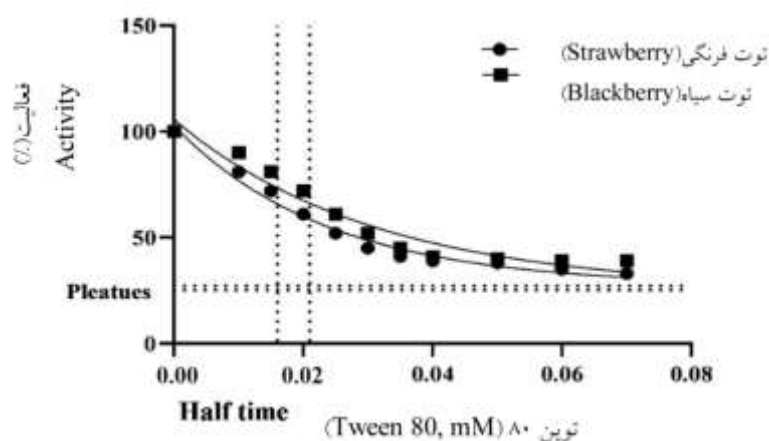


شکل ۶- فعالیت آسکوربات پراکسیداز در سطوح مختلف توین ۲۰ در توت سیاه و توت‌فرنگی.

Fig. 6. APX activity in different concentrations of Tween 20 in Blackberry and Strawberry.

بسیار زودتر از توت سیاه به نصف حداکثر فعالیت خود در غلظت صفر توین ۸۰، اتفاق می‌افتد. عکس‌العمل درصد فعالیت آنزیم APX به غلظت‌های مختلف توین ۸۰ در محیط در هر دو گیاه نیز پیرو یک تابع نمایی منفی تک‌فازی بود (شکل ۱۰) که در آن کمینه فعالیت ST.APX در غلظت ۲۷/۱۸ و در BM.APX در غلظت ۲۵/۲۲ میلی‌مولار توین ۸۰ اتفاق افتاد. اختلاف جزئی این اعداد در دو گیاه نسبت به سایر سورفاکتانت‌ها بیانگر پاسخ نسبتاً مشابه دو گیاه به حضور توین ۸۰ در محیط رشد است. بدین معنی که حساسیت آنزیم APX در توت‌فرنگی تا حدودی مشابه توت سیاه بود. شیب کاهش فعالیت APX در دو گیاه متفاوت و برابر ۴۱/۸۶ در توت‌فرنگی و ۲۵/۲۲ در توت سیاه بر میلی‌مولار توین ۸۰ بود (جدول ۵).

اثر توین ۸۰ بر فعالیت APX به عنوان سورفاکتانت غیر یونی: توین ۸۰ زیر غلظت بحرانی میسلی (۰/۱ میلی‌مولار) (۲۴) اثر مهارکنندگی بر فعالیت هرو آنزیم BM.APX و ST.APX نشان داد (شکل ۷). نتایج حاصله نشان داد که فعالیت هر دو آنزیم BM.APX و ST.APX در توین ۸۰ با کاهش همراه بود، طوری که در غلظت ۰/۰۴ تا ۰/۰۷ میلی‌مولار به کم‌ترین میزان فعالیت خود یعنی ۳۹ درصد برای هر دو آنزیم ST.APX و BM.APX نسبت به شرایط کنترل یعنی عدم حضور توین ۸۰ همراه بود. غلظتی از توین ۸۰ که باعث مهار ۵۰ درصدی APX گردید در حضور آسکوربات و پراکسید هیدروژن معادل ۰/۰۲ میلی‌مولار برای BM.APX و ۰/۰۱۵ میلی‌مولار برای ST.APX است (جدول ۶). به عبارت دیگر فعالیت آنزیم در توت‌فرنگی در یک سطح معین از توین ۸۰



شکل ۷- فعالیت آسکوربات پراکسیداز در سطوح مختلف توین ۸۰ در توت سیاه و توت فرنگی.

Fig. 7. APX activity in different concentrations of Tween 80 in Blackberry and Strawberry.

جدول ۵- ضرایب برازش مدل نمایی کاهشی تک‌فازی به تغییرات آسکوربات پراکسیداز در توت سیاه (BM.APX) و

توت فرنگی (ST.APX) در سطوح مختلف Tween 20 و Tween 80.

Table 5. Fitted one phase expotential decay model coefficients of APX activity at different concentrations of Tween 80 and Tween 20 in Blackberry and Strawberry.

Blackberry (توت سیاه)		Strawberry (توت فرنگی)		
Tween 80	Tween 20	Tween 80	Tween 20	
102.9	105.2	105.8	100.6	Y_{max} (بیشینه فعالیت عامل)
25.22	33.23	32.14	50.41	Pleatue (کمینه فعالیت عامل)
41.86	58.9	75.71	25.11	K (شیب مدل)
0.016	0.011	0.021	0.027	Halftime (نیمه عمر)
80.56	71.99	75.71	50.24	Span (دامنه بیشنه و کمینه فعالیت)
0.99	0.95	0.99	0.98	R^2

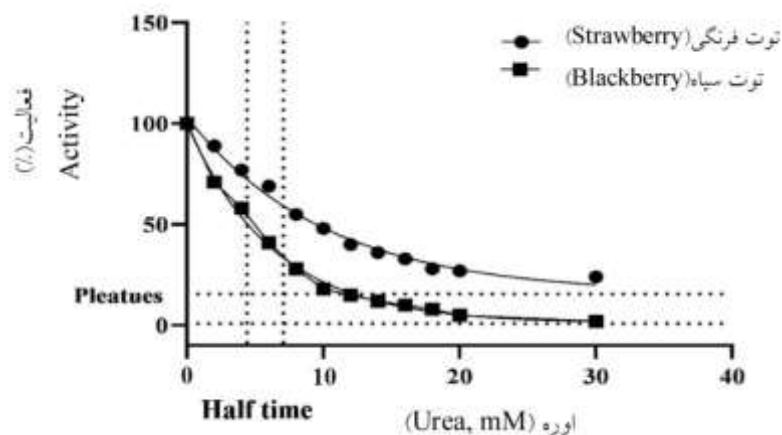
جدول ۶- فعالیت آسکوربات پراکسیداز در توت سیاه (BM.APX) و توت فرنگی (ST.APX) در سطوح مختلف سورفاکتانت‌های غیر یونی.

Table 6. APX activity different level of non-ionic surfactants of Blackberry and Strawberry.

IC50	(نوع اثر)		(سطوح غلظتی)		
	Effect type		Concentration levels		
	(مهارکنندگی)	(فعال‌کنندگی)	(mM)		
	Inhibitor	Activator			
0.025	51%	-	0-0.07	Tween 20	BM.APX
0.015	48%	-			ST.APX
0.02	60%	-	0-0.07	Tween 80	BM.APX
0.015	67%	-			ST.APX

اثر اوره بر فعالیت APX به عنوان عامل کائوتروپ: اوره در واکنش با BM.APX و ST.APX نقش مهارکنندگی بروز داد (شکل ۸). پاسخ درصد فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به غلظت‌های مختلف اوره در محیط در هر دو گیاه پیرو یک تابع نمایی منفی تک‌فازی بود که در آن کمینه فعالیت APX در توت‌فرنگی در غلظت ۱۵/۵۵ و در توت سیاه در غلظت ۹/۱ میلی‌مولار اوره اتفاق افتاد. این خصوصیت در توت‌فرنگی بیانگر حساسیت کم‌تر آنزیم APX در توت‌فرنگی به اوره نسبت به توت سیاه است. بر اساس نتایج حاصله غلظتی از اوره که باعث مهار ۵۰ درصدی APX گردید، در حضور آسکوربات و پراکسید هیدروژن معادل ۶ میلی‌مولار برای

اثر اوره بر فعالیت APX به عنوان عامل کائوتروپ: اوره در واکنش با BM.APX و ST.APX نقش مهارکنندگی بروز داد (شکل ۸). پاسخ درصد فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به غلظت‌های مختلف اوره در محیط در هر دو گیاه پیرو یک تابع نمایی منفی تک‌فازی بود که در آن کمینه فعالیت APX در توت‌فرنگی در غلظت ۱۵/۵۵ و در توت سیاه در غلظت ۹/۱ میلی‌مولار اوره اتفاق افتاد. این خصوصیت در توت‌فرنگی بیانگر حساسیت کم‌تر آنزیم APX در توت‌فرنگی به اوره نسبت به توت سیاه است. بر اساس نتایج حاصله غلظتی از اوره که باعث مهار ۵۰ درصدی APX گردید، در حضور آسکوربات و پراکسید هیدروژن معادل ۶ میلی‌مولار برای



شکل ۸- فعالیت اسکوربات پراکسیداز در توت سیاه و توت‌فرنگی در سطوح مختلف اوره.

Fig. 8. APX activity in different level of Urea in Blackberry and Strawberry.

جدول ۷- فعالیت آسکوربات پراکسیداز در توت سیاه (BM.APX) و توت‌فرنگی (ST.APX) در سطوح مختلف عوامل کائوتروپ.

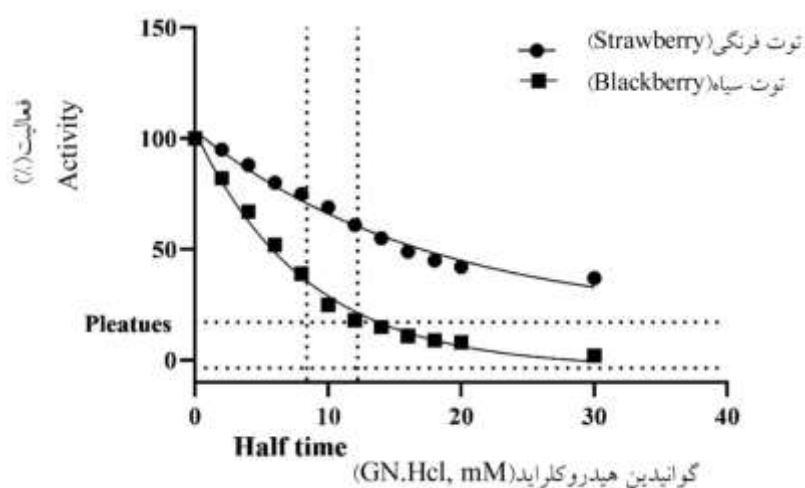
Table 7. APX activity in different level of Chaotropes agents in Blackberry and Strawberry.

IC50	(نوع اثر)		(سطوح غلظتی)		
	Effect type		Concentration levels		
	(مهارکنندگی)	(فعال‌کنندگی)	(mM)		
	Inhibitor	Activator			
6	98%	-	0-30	(اوره)	BM.APX
8	76%	-	0-30	Urea	ST.APX
6	50%	-	0-30	(گوانیدین هیدروکلراید)	BM.APX
10	90%	-	0-30	Gn.Hcl	ST.APX

(عوامل کائوتروپ)
Chaotropes factors

آنزیم‌های BM.APX و ST.APX به غلظت‌های مختلف گوانیدین هیدروکلراید در محیط در هر دو گیاه پیرو یک تابع نمایی منفی تک‌فازی بود طوری که فعالیت هر دو آنزیم BM.APX و ST.APX در حضور گوانیدین هیدروکلراید با کاهش همراه بود، و در غلظت ۳۰ میلی‌مولار به کم‌ترین میزان فعالیت خود یعنی ۳۷ درصد و ۲ درصد به ترتیب برای ST.APX و BM.APX نسبت به شرایط کنترل یعنی عدم حضور گوانیدین هیدروکلراید رسیدند. این خصوصیت در توت‌فرنگی بیانگر حساسیت کم‌تر ST.APX در این گیاه به گوانیدین هیدروکلراید نسبت به BM.APX است. شیب کاهش فعالیت آنزیم نیز در دو گیاه متفاوت و برابر ۰/۰۵۶ در توت‌فرنگی و ۰/۱۲ در توت سیاه بر حسب میلی‌مولار گوانیدین هیدروکلراید بود که هرچه بزرگ‌تر باشد بیانگر، تندی شیب کاهش و پاسخ سریع‌تر آنزیم به سطوح مختلف تیمار است (جدول ۴).

اثر گوانیدین هیدروکلراید بر فعالیت APX به عنوان عامل کائوتروپ: اثر مهارکنندگی گوانیدین هیدروکلراید در واکنش با BM.APX و ST.APX در شکل ۹ نشان داده شده است. بر اساس نتایج حاصله غلظتی از گوانیدین هیدروکلراید که باعث مهار ۵۰ درصدی APX گردید، در حضور آسکوربات و پراکسید هیدروژن معادل ۶ میلی‌مولار برای BM.APX و ۱۰ میلی‌مولار برای ST.APX است. یعنی غلظت لازم از گوانیدین هیدروکلراید (Half time) برای رساندن فعالیت APX به ۵۰ درصد حداکثر مقدار خود نیز در توت سیاه به مراتب کم‌تر از توت‌فرنگی بود (جدول ۷). به عبارت دیگر فعالیت آنزیم در توت سیاه در یک سطح معین از گوانیدین هیدروکلراید بسیار زودتر از توت‌فرنگی به نصف حداکثر فعالیت خود در زمان عدم حضور اوره، اتفاق می‌افتد. مانند پاسخ متفاوت تغییرات فعالیت آنزیم در سطوح مختلف اوره در دو گیاه توت سیاه و توت‌فرنگی، پاسخ درصد فعالیت



شکل ۹- فعالیت اسکوربات پراکسیداز در سطوح مختلف گوانیدین هیدروکلراید.

Fig. 9. APX activity in different level of GN.Hcl in Blackberry and Strawberry.

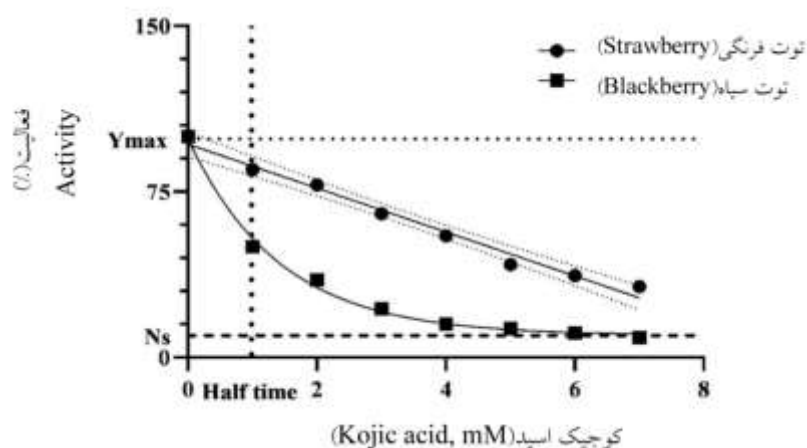
سیاه نسبت به این آنزیم در توت‌فرنگی است. سورفاکتانت‌های غیریونی مورد استفاده در این مطالعه از لحاظ حجم مونومری آنها بسیار بزرگتر از سدیم کولات هستند و بر این اساس ممکن است که مهار ایجاد شده در فعالیت این آنزیم به خاطر جلوگیری از دسترسی قرارگرفتن سوبسترا به جایگاه فعال آنزیم و به عبارتی ایجاد ممانعت فضایی توسط این دترژنت‌ها باشد. غلظت استفاده شده پاک‌کننده‌های غیریونی زیر غلظت بحرانی میسلی است که در این محدوده غلظتی، فعالیت آسکوربات پراکسیدازی مهار می‌گردد. مهار فعالیت APX در غلظت‌های بالاتر سورفاکتانت صورت گرفت که می‌تواند به واسطه به دام افتادن آنزیم و یا سوبسترا در میسل‌های دترژنت باشد. اوره به عنوان یک عامل احیاکننده نقش مهمی بر روی ST.APX و BM.APX نشان داد. فعالیت آنزیم APX در حضور عوامل احیاکننده هم‌چون مرکاپتواتانل و اوره مهار می‌گردد که دلیل آن هیدرولیز پل‌های دی سولفیدی در ساختار آنزیم آسکوربات پراکسیداز است (۳۰، ۳۱، ۳۲ و ۳۳).

اثر کوچیک اسید بر فعالیت APX: کوچیک اسید در واکنش با BM.APX و ST.APX اثر مهارکنندگی نشان داد (شکل ۱۰). نتایج حاصله نشان داد که کوچیک اسید هم برای BM.APX و هم برای ST.APX از نوع مهارکننده غیرقابلی است (جدول ۷). غلظتی از کوچیک اسید که باعث مهار ۵۰ درصدی APX گردید در حضور آسکوربات و پراکسید هیدروژن معادل ۰/۹ میلی‌مولار برای BM.APX و ۳ میلی‌مولار برای ST.APX است (جدول ۸). بدین معنی که در این غلظت، درصد فعالیت آنزیم به نصف حداکثر فعالیت خود در زمانی که غلظت کوچیک اسید صفر باشد، کاهش پیدا می‌کند. فعالیت هر دو آنزیم BM.APX و ST.APX در حضور کوچیک اسید با کاهش همراه بود، طوری

نتایج نشان داد که از میان عوامل کائوتروپ و سورفاکتانت‌های مورد استفاده تنها SDS فعالیت APX در توت‌فرنگی و توت سیاه را فعال کردند و فعالیت‌های ST.APX و BM.APX حساسیت‌های مختلفی را به سورفاکتانت‌ها و عوامل کائوتروپ و مهارکننده کوچیک اسید مورد استفاده نشان دادند. نتایج پژوهش نشان داد که علی‌رغم این‌که BM.APX نسبت به ST.APX در حضور آسکوربات و SDS فعالیت بالاتری را بروز داد، اما در حضور سورفاکتانت‌ها و عوامل کائوتروپ و نیز مهارکننده کوچیک اسید میزان مهارشوندگی و کاهش فعالیت BM.APX نسبت به ST.APX بیش‌تر بوده و درصد‌های مهارشوندگی بیش‌تری را نشان داد. این نتیجه می‌تواند بیانگر حساسیت بالاتر ساختار آنزیم APX در توت سیاه بوده که در حضور مهارکننده‌ها و سورفاکتانت‌ها با اتصال این عوامل به آنزیم از طریق تغییر در جایگاه فعال آنزیم و تغییر ساختار سوم آنزیمی زمینه کاهش فعالیت آسکوربات پراکسیدازی در توت سیاه را فراهم نموده، طوری که میزان مهارشوندگی آن را افزایش داده است و در مقابل ساختمان محکم‌تر و با ثبات‌تری نسبت به APX در توت سیاه برای APX در توت‌فرنگی پیش‌بینی می‌شود که در مقابل این عوامل با حساسیت کم‌تری همراه بوده و با درصد کم‌تری از مهارشوندگی همراه است. در تأیید این موضوع مکانیزم‌های مختلفی برای فعال‌سازی آنزیم‌های مختلف اکسیدازی توسط SDS، ارائه گردیده که همگی در تأیید نقش فعال‌کنندگی SDS با واسطه تغییرات کنفورماسیونی در سطح آنزیم است (۲۵، ۲۶، ۲۷، ۲۸ و ۲۹). مهار مشاهده شده در حضور سدیم‌کولات می‌تواند به خاطر اتصال این سورفاکتانت حجیم به سطح آنزیم باشد. شدت مهار انجام شده بر روی BM.APX بیش‌تر از ST.APX است که بیانگر حساس بودن بالاتر APX در توت

در محیط، میزان فعالیت آنزیم به میزان ۹/۹۲ درصد به‌ازای هر میلی‌مولار کوچیک اسید کاهش پیدا می‌کند (جدول ۴). از طرف دیگر پاسخ درصد فعالیت APX به غلظت‌های مختلف کوچیک اسید در محیط پیرو یک تابع نمایی منفی تک‌فازی بود که در آن کمینه فعالیت ST.APX در غلظت ۹/۹۱ میلی‌مولار کوچیک اسید و برای BM.APX در ۴ میلی‌مولار به‌دست آمد. شیب کاهش فعالیت آنزیم نیز مقدار ۰/۷۰ بر میلی‌مولار غلظت کوچیک اسید درون‌یابی شد و هرچه بزرگ‌تر باشد بیانگر، تندی شیب کاهش و پاسخ سریع‌تر آنزیم به سطوح مختلف تیمار است (جدول ۹).

که در غلظت ۵ تا ۷ میلی‌مولار به کم‌ترین میزان فعالیت خود یعنی ۳۲ درصد و ۹ درصد به ترتیب برای ST.APX و BM.APX نسبت به شرایط کنترل یعنی عدم حضور کوچیک اسید رسیدند. نتایج بررسی فعالیت آنزیم APX در دو گیاه توت سیاه و توت‌فرنگی در سطوح مختلف کوچیک اسید بیانگر پاسخ متفاوت BM.APX و ST.APX به سطوح مختلف کوچیک اسید بود. بدین‌ترتیب که روند تغییرات فعالیت آنزیم ST.APX از یک تابع رگرسیون خطی ساده و در BM.APX از یک مدل نمایی کاهش تک‌فازی پیروی می‌کند (شکل ۱۰). فعالیت ST.APX تابع یک رگرسیون ساده کاهش‌ی است. بدین معنی که با افزایش غلظت کوچیک اسید



شکل ۱۰- فعالیت اسکوربات پراکسیداز در سطوح مختلف کوچیک اسید در توت سیاه و توت‌فرنگی.

Fig. 10. APX activity in different level of Kojic acid in Blackberry and Strawberry.

جدول ۸- فعالیت اسکوربات پراکسیداز در توت سیاه (BM.APX) و توت‌فرنگی (ST.APX) در سطوح غلظتی مختلف کوچیک اسید.

Table 8. APX activity in different level of kojic acid in Blackberry and Strawberry.

IC50	نوع اثر Effect type			سطوح غلظتی Concentration levels (mM)	
	فعال‌کنندگی Activator	مهارکنندگی Inhibitor	نوع مهار		
1	(غیررقابتی) Non competitive	91%	-	0-7	BM.APX (کوچیک اسید) kojic acid
3	(غیررقابتی) Non competitive	91%	-		ST.APX

جدول ۹- ضرایب برازش مدل مدل رگرسیون خطی ساده به تغییرات فعالیت آسکوربات پراکسیداز در توت‌فرنگی در غلظت‌های مختلف سدیم کولات و کوچیک اسید.

Table 9. Fitted simple linear regression model coefficients of APX activity in different concentrations of sodium cholat and kojic acid in Blackberry and Strawberry.

P_{model}	Kojic acid	Na.Cholat	Model parameters (پارامترهای مدل)
0.001	96.49 ± 2.07	96.30 ± 3.72	Intercept (عرض از مبدا)
0.001	-9.92 ± 1.04	-1.04 ± 0.02	Slope (شیب)
	0.98	0.85	R^2

نتیجه‌گیری

آسکوربات پراکسیداز به عنوان آنزیم از بین برنده مازاد پراکسید هیدروژن در سلول و حذف‌کننده رادیکال‌های آزاد در توت سیاه و توت‌فرنگی؛ فعالیت پراکسیدازی را بروز داده که نشان دهنده اهمیت این آنزیم در گونه‌های گیاهی است. آسکوربات پراکسیداز با پیروی از سینتیک میکائلیس متن و نیز با اتصال سوبسترا به جایگاه فعال آنزیمی، فرم فعالتری به خود گرفته و با انجام کاتالیز آنزیمی موجب مصرف آسکوربات در توت‌فرنگی و توت سیاه می‌گردد. سورفاکتانت‌های یونی با مکانیزم فعال‌کنندگی هم‌چون SDS و مکانیزم مهارکنندگی هم‌چون سارکوزیل و سدیم کولات اثرات متفاوتی بر روی آسکوربات پراکسیداز اعمال نموده که این آنزیم علی‌رغم حساسیت بالاتر در توت سیاه دارای سرعت فعالیت بیش‌تری نسبت به پراکسیداز موجود در توت‌فرنگی می‌باشد. سورفاکتانت‌های غیریونی هم‌چون عامل کائوتروپ کوچیک اسید از طریق مهارکنندگی باعث کاهش فعالیت آسکوربات پراکسیداز در هر دو گونه گیاهی می‌گردند. جایگاه کوچیک اسید با توجه به غیررقابتی بودن نوع مهاری که نسبت به آسکوربات پراکسیداز اعمال می‌کند متفاوت از جایگاه آسکوربات است. بر اساس نتایج حاصله SDS تا غلظت ۰/۴ میلی‌مولار تأثیری بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز ندارد. بر این اساس غلظت مطلوب سورفاکتانت برای

هیپربولیک بودن فعالیت ST.APX و BM.APX

بیانگر تمایل بالای آنزیمی برای مصرف آسکوربات را نشان می‌دهد. با افزایش غلظت سوبسترای آسکوربات و اتصال بالای آن به ST.APX و BM.APX به احتمال فراوان زمینه تغییر ساختار در APX را فراهم کرده و در ادامه با کاهش فعالیت آنزیمی، مهار سوبسترای مشاهده می‌گردد (۳۴). فعالیت APX در توت‌فرنگی و توت سیاه به وسیله مهارکننده کوچیک اسید مهار شد. نوع مهار ایجاد شده بر حسب نوع میوه متفاوت است که نشان می‌دهد نوع مهار آنزیم APX در حضور کوچیک اسید کاملاً غیر وابسته به نوع گیاه است، طوری که مهار APX در توت‌فرنگی و توت سیاه در هر دو از نوع غیررقابتی است. در پژوهش مشابه بر روی پراکسیداز گیاه کنگر، کوچیک اسید بر روی این آنزیم در حضور سوبسترای پیروگالل مهار غیر رقابتی و در حضور کتکول مهار رقابتی را نشان داد. نتایج نشان می‌دهد که APX می‌تواند بر اساس نوع مهار در برابر کوچیک اسید هم وابسته به گونه و هم وابسته به نوع سوبسترا باشد. غیر رقابتی بودن مهار APX توسط کوچیک اسید نشان می‌دهد که جایگاه اتصال آسکوربات بر روی آنزیم، متفاوت از جایگاه اتصالی است که کوچیک اسید به عنوان مهارکننده بر روی آن قرار می‌گیرد.

غلظت‌های بیشتر از این مقادیر می‌تواند تأثیر نامطلوبی بر روی عملکرد آسکوربات پراکسیداز داشته باشد. تمامی سورفاکتانت‌ها در غلظت‌های بالا قادر به از بین بردن ساختار آنزیمی بوده و فعالیت و عملکرد آنزیم را به کلی از بین خواهند برد.

تأثیر کم‌تر از ۲۵ درصد بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز برای سدیم کولات ۴ تا ۵ میلی‌مولار، برای سارکوزیل، ۶ میلی‌مولار، برای توین ۲۰ و توین ۸۰ غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار و برای اوره و گوانیدین غلظت ۴ میلی‌مولار قابل نتیجه‌گیری است. طوری که

منابع

- Dixon, D. P., Cummins, I., Cole, D. J., & Edwards, R. (1998). Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 1, 258-266.
- Hosseini, Z., & Pourakbar, L. (2013). Investigation of interaction between zinc and organic acid (malic acid, citric acid) on antioxidant responses in *Zea mays* L. *Iranian Journal of Plant Biology*, 5 (16), 1-12. [In Persian]
- Tavakoli Zanyani, F., Shabani, L., & Razavizadeh, R. (2013). Activation of defense responses under isothiocyanate stress in oilseed rape plantlets. *Iranian Journal of Plant Biology*, 5 (16), 81-92 [In Persian]
- Hasanuzzaman, M., Anwar, M., Teixeira da Silva, J., & Fujita, M. (2012). Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: Antioxidant defense is a key factor. Springer, New York, USA, pp. 261-351.
- Johnson, S. M., Doherty, S. J., & Croy, R. R. D. (2003). Biphasic superoxide generation in potato tubers: a self-amplifying response to stress. *Plant Physiology*, 13, 1440-1449.
- Kawano, T. (2003). Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Reports*, 829-837.
- Peltzer, D., Dreyer, E., & Polle, A. (2002). Differential temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species. *Plant Physiology and biochemistry*, 40, 141-150.
- Chaves, M. M., Maroco, J. P., & Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought –from genes to the whole plant. *Function of Plant Biology*, 30, 239-264.
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions, *Plant Physiology*, 141, 391-396.
- Bajpai, D. (2007). Laundry detergents: an overview. *Journal of Oleo Science*, 56 (7), 327-340.
- Lomax, E. G. (1996). Amphoteric surfactants. CRC Press.
- Schick, M. J. (1987). Nonionic surfactants. Physical Chemistry. CRC Press.
- Hosseini, Z., & Pourakbar, L. (2013). Investigation of interaction between zinc and organic acid (malic acid, citric acid) on antioxidant responses in *Zea mays* L. *Iranian Journal of Plant Biology*, 5 (16), 1-12. [In Persian]
- Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2020). Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harbal Protocol*, 1 (4), 102269.
- Nakano, Y., & Asada, K. (1987). Purification of ascorbat peroxidase in spinach chloroplasts, its inactivation in Ascorbate-Depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radica, *Plant Cell Physiology*, 28 (1), 131-140.
- Kavousi, H. R., & Barandeh, F. (2017). Effect of Cadmium on changes of some enzymatic and none enzymatic antioxidant defense systems in lentil seedlings (*Lens culinaris* Medik.), *Iranian Journal of Pulses Research*, 7 (2), 125-137.
- SAS. (2009). Statistical analysis system, Version: 9.2. Carry NC.
- Motulsky, H. (1999). Analyzing data with GrapPad Prism, A companion to GraphPad Prosm version 3, GraphPad software, Inc.

19. Khaliliaqdam, N., & Talebzade, S. J. (2022). Prediction of Rate of Leaf Appearance, Leaf Area Index and Growth Stages in Corn and Sunflower plants. *Journal of Crop Production*, 15 (1), 205-228.
20. Ishikawa, T., Yoshimura, K., Tamoi, M., Takeda, T., & Shigeoka, S. (1997). Alternative mRNA splicing of 3'-terminal exons generates ascorbate peroxidase isoenzymes in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *Biochemical Journal*, 328, 795-800.
21. Lu, Z., Takano, T., & Liu, S. (2005). Purification and characterization of two ascorbate peroxidases of rice (*Oryza sativa* L.) expressed in *Escherichia Coli*. *Biotechnology Letter*, 27, 63-67.
22. Li, C., Huang, W. Y., Wang, X. N., & Liu, W. X. (2013). Oxygen Radical Absorbance Capacity of Different Varieties of Strawberry and the Antioxidant Stability in Storage. *Molecules*, 18, 1528-1539.
23. Rabia, Sh., Arifa, Sh., & Rakesh, K. M. (2011). Cyclic voltammetry and viscosity measurements of aggregated assemblies of anionic surfactants with nonionic surfactants and triblock copolymers. *Colloid and Polymer Science*, 289, 43-51.
24. Wang, S. Y., & Lin, H. S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48 (2), 140-146.
25. Dąbrowska, G., Kata, A., Goc, A., Szechyńska-Hebda, M., & Skrzypek, E. (2007). Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botany*, 49 (1), 7-17.
26. Espin, J. C., & Wichers, H. J. (1999). Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47 (9), 3518-25.
27. Mohammad, A. (2017). Alsenaidy. Biophysical evaluation of amyloid fibril formation in bovine cytochrome c by sodium lauroyl sarcosinate (sarkosyl) in acidic conditions. *Journal of Molecular Liquids*, 241, 722-729.
28. Saeidian, Sh., Keyhani E., & Keyhani, J. (2007). Effect of Ionic Detergents, Nonionic Detergents, and Chaotropic Agents on Polyphenol Oxidase Activity from Dormant Saffron (*Crocus sativus* L.) Corms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55 (9), 3713-3719.
29. Alexander, N. P., Hiner, J. N., Rodriguez-Lopez, M. B., Arnao Emma, L. R., Francisco, G. C., & Manuel, A. (2000). Kinetic study of the inactivation of ascorbate peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochemistry Journal*, 348, 321-328.
30. Gasowska, B., Kafarski, P., & Wojtasek, H. (2004). Interaction of mushroom tyrosinase with aromatic amines, o-diamines and oaminophenols. *Biochimica Biophysica Acta*, 4 (3), 170-177.
31. Shweta, S., Santosh, K., & Tonmoy, R. (2016). Aggregation Behaviour of Sodium Cholate and Sodium Deoxycholate under the Influence of Drug (Disprine) in Aqueous Solution at Various Temperatures. *Science Research*, 4 (1), 112-119.
32. Yadav, P., Yadav, T., Kumar, S., Rani, B., Kumar, S., & Jain, M. (2014). Partial purification and characterization of ascorbate peroxidase from ripening ber (*Ziziphus mauritiana* L) fruits. *African Journal of Biotechnology*, 13 (31), 3323-3331.
33. Sanchez Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Canovas, F., & Garcia-Carmona, F. (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica Biophysica Acta*, 22 (1), 1-11.
34. Saeidian, S. (2016). Kinetic investigations of peroxidase in roots of *Gundelia Tournefortii*. *Experimental Animal Biology*, 5 (2), 1-11.

