تاثیر عصاره متانولی برخی از گیاهان بومی مازندران بر پارامترهای سنتیکی پراکسیداز بروکلی

مریم مهاجرانی* و فاطمه ولیان امیری

ایران، بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱/۲۵

چکیده

بروکلی گیاهی با ارزش غذایی شناخته شده است. کاربرد پراکسیداز بروکلی در بیوشیمی بالینی، فناوری زیستی و صنایع غذایی علاقه برای مطالعه بیشتر این آنزیم را افزایش داده است. ایـن پـژوهش با هدف اندازه گیری پارامترهای سنتیکی پراکسیداز بروکلی و تغییرات انها در مجاورت عصاره متانولی برخی از گیاهان بومی مازندران انجام شد. در این مطالعه عصاره خام کلم بروکلی تازه، پس از هموژن سازی و سانتریفیوژ، بوسیله آمونیوم سولفات، رسوب دهی و سپس دیالیز شد. فعالیت آنزیم با هیدروژن پراکسید و ABTS در بافر سیترات–فسفات و در طول موج ۴۱۴ نانومتر اندازه گیری گردید. فعالیت ویژه آنزیم بترتیب ۰/۵۸ U/mg در عصاره خام و ۳/۶۱ U/mg در عصاره دیالیز شده بدست آورده شد. pH بهینه آنزیم ۴ و دمای بهینه آن۳۰ درجه سلسیوس اندازه گیری شد. عصاره متانولی گیاهان درمنه، زولنگ، رزماری، آقطی، پیرسنبل، ولیک سیاه، دارواش، شقایق و الزی بروش خیساندن تهیه شد. سپس فعالیت آنزیم در غلظت های مختلف از این عصاره ها سنجش شد. نتایج سنتیکی نشان دادند که پراکسیداز بوسیله عصاره های ولیک سیاه، رزماری، شقایق و درمنه، در غلظت ۳۳ میکروگرم بر میلی لیتر بترتیب ۸۸/۲، ۷۹/۵، ۷۸/۶ و ۷۶/۳ درصد، مهار شد. عصاره پیرسنبل هیچ تاثیری برسرعت بیشینه واکنش نشان نداد، در حالی که مقدار K_m آنزیم را ۴ برابر کاهش داد. گیاه الزی مهار جزئی بر روی این آنزیم پراکسیداز نشان داد. بنابراین، مطالعه این گیاهان برای دستیابی به ترکیبات تاثیر گذار بر پراکسیداز بروکلی با کاربردهای دارویی، کشاورزی و صنعتی قابل توصیه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پراکسیداز، بروکلی، پارامترهای سنتیکی، گیاهان بومی، مهارکننده

*نویسنده مسئول، تلفن:۰۱۱۳۵۳۰۲۴۵۵، پست الکترونیکی:m.mohajerani@umz.ac.ir

مقدمه

گیاهان متعلق به خانواده کلمیان (Brassicaceae) بخاطر وجود ترکیبات فعال زیستی فراوان در سراسر جهان شناخته شده‌اند(۲۷). ترکیبات فسفره‌آلی کلم بروکلی *(Brassica oleraceae* Var.*Italica)* فعالیت آنزیم های درگیر در سم زدایی مواد سرطان زا و سایر مواد خارجی جذب شده در بدن را افزایش می دهند. بروکلی همچنین حاوی مقدار زیادی کلروفیل، گلوکز، اینولات و سایر ترکیبات فعال زیستی مانند کاروتنوئیدها، ویتامین C و ترکیبات فنلی می‌باشد(۱۵). گل‌آذین‌های بروکلی بخاطر ویژگی‌های ضدسرطانی‌اش در سراسر جهان مصرف می شود و بخش بزرگی از بازارهای جهانی را بخود اختصاص داده است(۳۳,۱۱).

خالص‌سازی، آنالیز شیمیایی و مطالعه ترکیبات سازنده گیاهان مثل فلاونوئیدها و پلی فنولها، خواص آنتی‌اکسیدانی بالا و اثرات محافظتی برجسته‌ای را بر DNA سلولها نشان داده‌اند. همچنین مطالعات محققین باین موضوع نیز اشاره دارند که هر یک از این ترکیبات به تنهایی مسئول تمام ظرفیت آنتی اکسیدانی یک گیاه

نمی‌باشد. علاوه بر این بسیاری از گیاهان دارویی که مورد استفاده بشر قرار گرفته‌است بصورت عصاره خام و کامل بخشی یا کل اندام های گیاهان می‌باشد(۳۹).

بسیاری از بیماری‌ها مانند سرطان، بیماری‌های کبدی، آلزایمر، دیابت و پارکینسون که با تخریب اکسایشی سلول‌ها در ارتباط می‌باشند، اهمیت استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها را بشدت افزایش داده‌است(۲۴). استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی بعلت اثرات جانبی نامطلوبی که بر سلامت انسان می‌گذارند رو به کاهش بوده و جای خود را به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و گیاهی داده‌اند. امروزه دانشگاه‌ها، مراکز تحقیقاتی و سازمان بهداشت جهانی، برنامه‌های وسیعی جهت استفاده از گیاهان دارویی تدارک دیده‌اند. این مراکز نقش گیاهان دارویی در ارتباط با موارد مختلف در قرن ۲۱ را سرنوشت‌ساز تلقی نموده‌اند(۱۲).

آنزیم‌های پراکسیداز (EC: 1.11.1.7) جزء پروتئین‌های هم‌دار (Heme) بوده که وظیفه اصلی آنها اکسیداسیون سوبستراهای مختلف با استفاده از پراکسید هیدروژن می‌باشد. پراکسیدازهای گیاهی در رشد و تمایز گیاهان بعنوان یکی از آنزیم های کلیدی نقش کنترلی دارند. بدلیل نقش این آنزیم در حذف رادیکال‌های آزاد و بالا بودن قدرت کاتالیتیکی، کاربرد وسیعی در حوزه های مختلف مثل سنتز مواد شیمیایی، پزشکی، در انالیز مواد غذایی و شیمیایی، نمونه های بالینی و محیطی پیدا کرده‌اند(۱۷). پراکسیدازها همچنین کاربردهای زیادی بعنوان کاتالیزور در سنتز رزین های فنولی، تولید مواد شیمیایی و سوخت از خمیر چوب، تولید دیمرهای آلکالوئیدی در رنگ زدایی زیستی و در اکسیداسیون یا تبدیل زیستی ترکیبات آلی دارند. همه این موارد بعلت دارا بودن طیف وسیعی از سوبستراهای ویژه می باشد که این آنزیم کاتالیز آنها را تسهیل می کند. از آنجا که پراکسیداز ترب کوهی دارای کاربرد بسیار گسترده ای است تلاش برای یافتن پراکسیداز از منابع دیگر ادامه دارد تا بتواند کاربرد بهتری در تمام زمینه های ذکر شده و بیوتکنولوژی داشته باشد. بروکلی در بین سبزیجات با فعالیت بالای پراکسیدازی قابل مقایسه با منابع دیگر غنی از پراکسیداز مثل ترب کوهی است. از طرفی این گیاه در مناطق مختلف از جمله ایران قابلیت کشت و تکثیر دارد. در رابطه با تعیین جرم مولکولی، دما و pH بهینه، خواص فیزیولوژیکی و مشخصات سنتیکی انواع آنزیم‌های پراکسیداز تخلیص شده از منابع مختلف ، نظیر کلم، هویج، توت فرنگی، برنج و نخودسبز، پژوهش‌های متعددی صورت گرفته است.

از طرفی امروزه علاقه محققین زیادی به بررسی تاثیر عصاره های مختلف گیاهی حاوی ترکیبات متنوع طبیعی بر فعالیت انزیم‌ها و از جمله آنزیم پراکسیداز بوجود امده است. برای این منظور فعالیت آنزیم پراکسیداز در حضور پراکسید هیدروژن بعنوان سوبسترا، ABTS ، گایاکول، پیروگالول و کاتکول، بعنوان معرف الکترون دهنده و افزودن عصاره برخی گیاهان در مقالات اندازه‌گیری شده است(۲۲).

گزارش‌هایی در مورد اثر آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نظیر روغن فرار اکالیپتوس، برگ چای، ترنج، میخک و لیمو بعنوان کاهنده فعالیت آنزیم پراکسیداز گزارش شده است(۲۹). در این بررسی ها استفاده از مقدار معین اسانس آویشن، سبب کاهش تغییرات رنگ و درخشندگی میوه توت فرنگی شده و دلیل آن جلوگیری از فعالیت آنزیم پراکسیداز و بالطبع ممانعت از قهوه‌ای شدن میوه توسط اسانس آویشن بیان شد(۱و۲۰).

از آنجا که تلاش برای مطالعه آنزیم پراکسیداز استخراج شده از کلم بروکلی مورد علاقه محققین بوده است، لذا هدف از تحقیق حاضر استخراج این آنزیم از کلم بروکلی و بررسی تاثیر عصاره متانولی گیاهان روئیده در مازندران، شامل درمنه، زولنگ، رزماری، آقطی، پیرسنبل، ولیک سیاه، دارواش، شقایق و الزی، بر فعالیت این آنزیم پراکسیداز بوده است.

مواد و روشها

در جدول ۱ گیاهان مطالعه شده و شماره هرباریوم دانشگاه مازندران و محل جمع آوری هر یک اورده شده است. همه نمونه ها پس از خشک شدن در دمای آزمایشگاه بوسیله آسیاب خانگی پودر گردید. به پودر حاصل با نسبت ۱:۱۰ متانول اضافه گردید. مخلوط حاصل بمدت ۷۲ ساعت روی شیکر همزده و در این مدت دو بار حلال آن تعویض شد. عصاره‌های متانولی جمع‌آوری شده از صافی عبور داده شد و بوسیله دستگاه تبخیر در خلاء تغلیظ و سپس توزین گردید.

جدول ۱- گیاهان مطالعه شده و محل جمع آوری در استان مازندران و شماره هرباریوم دانشگاه مازندران

ردیف	نام معمولی گیاه	نام علمی	محل جمع آوری	شماره هرباریوم دانشگاه مازندران
۱	درمنه	*Artemisia tschernieviana*	بابلسر	۲۲۸۷
۲	زولنگ	*Eryngium caucasicum*	لفور	۳۰۱۴
۳	رزماری	*Rosmarinus officinalis*	بابلسر	۹۰۰۶
۴	آقطی	*Sambucus ebulus*	قائمشهر	۲۵۳۴
۵	پیرسنبل	*Ligularia persica*	قائمشهر	۱۵۰۵
۶	ولیک سیاه	*Crataegus douglasii*	خطیرکوه	۹۰۰۴
۷	شقایق	*Papaver rhoeas*	مرچ	۹۰۰۵
۸	دارواش	*Viscum album*	شیرگاه	۹۰۰۷
۹	الزی	*Allium ursinum*	سنا کوه	۹۰۰۳

استخراج آنزیم پراکسیداز: مقدار ۴۰۰ گرم از گلچه های کلم بروکلی تازه ابتدا بوسیله چاقو به قطعات ریز خرد شد و سپس با ۷۰۰ میلی لیتر بافر سدیم استات ۰/۱ مولار بوسیله مخلوط‌کن هموژنیزه شد. مخلوط حاصل پس از عبور از پارچه تنظیف، بمدت ۱۵ دقیقه (۱۲۰۰۰×g) سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ، رسوبات دور ریخته شد و محلول باقیمانده بمدت ۴ ساعت بوسیله سولفات آمونیوم تا درجه اشباعی ٪۶۰ رسوب داده شد. سپس سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه با همان شرایط قبلی سانتریفیوژ شد. به محلول رویی سولفات آمونیوم تا درجه اشباعی ٪۹۰ اضافه شد؛ پس از ۴ ساعت سوسپانسیون حاصل سانتریفیوژ و این بار رسوبات جمع‌آوری گردید و بمدت ۴۸ ساعت در بافر سدیم استات ۰/۱ مولار دیالیز شد (در طول این مدت بافر دیالیز ۳ بار تعویض شد). تمام مراحل فوق در دمای ۴ درجه سلسیوس انجام شد. مخلوط حاصل از کیسه دیالیز خارج، غلظت آن بروش لوری، با استفاده از آلبومین سرم گاوی بعنوان استاندارد، تعیین و به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند(۱۸،۱۰).

تعیین فعالیت آنزیم پراکسیداز: برای تعیین فعالیت آنزیم پراکسیداز ۲۰۰ میکرولیتر، آب اکسیژنه ۰/۸ میلی‌مولار بعنوان سوبسترا، ۱۰۰ میکرولیتر ABTS (2,2′-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) ۲ میلی‌مولار بعنوان معرف، ۲۶۸۵ میکرولیتر بافر سیترات-فسفات ۰/۱ مولار (pH برابر ۴) و ۱۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی استفاده شد. ABTS بوسیله آنزیم و H_2O_2 به رادیکال $ABTS^{\bullet+}$ سبز رنگ تبدیل شده و مقدار جذب آن در طول موج ۴۱۴ نانومتر بمدت ۳ دقیقه بوسیله اسپکتروفتومتر خوانده شد(۲۶). تمام مراحل فوق در سه تکرار انجام گرفت. سپس با استفاده از معادله‌های (۲-۲) الی (۲-۵) فعالیت کل (Total Activity)، فعالیت ویژه (Specific Activity)، درصد بازیابی فعالیت (Activity Recovery) و درجه خلوص (Purification Fold) آنزیم تعیین شد.

معادله (۱) تعیین فعالیت کل

$$\text{Total activity} = \Delta A.V.Df / \varepsilon.v.l$$

در معادله (۱) ΔA تغییرات جذب آنزیم بازای یک دقیقه، V حجم مورد سنجش، Df فاکتور رقت، ε ضریب خاموشی ABTS (۳۶/۸ بر میلی مولار بر سانتیمتر)، v حجم آنزیم استفاده شده و l طول عبور نور (برابر یک سانتیمتر) میباشد.

معادله (۲) تعیین فعالیت ویژه آنزیم

$$\text{Specific activity} = \text{Total activity} / [\text{Protein}]$$

معادله (۳) درصد بازیابی فعالیت آنزیم

$$\text{Activity Recovery} = 100(TA2 / TA1)$$

معادله (۴) درجه خلوص آنزیم

$$\text{Purification Fold} = SA2 / SA1$$

در معادلات ۳و۴ TA2 و SA2 بترتیب فعالیت کل و فعالیت ویژه آنزیم در مرحله بعد از دیالیز و TA1 و SA1 فعالیت کل و فعالیت ویژه آنزیم در عصاره خام می باشد(۱۳).

تعیین pH بهینه پراکسیداز: برای تعیین pH بهینه آنزیم از بافرهایی با pH ۳ الی ۶ استفاده شد. برای این منظور از بافر سیترات فسفات ۰/۱ مولار جهت محدوده بافری ۳ تا ۴ و بافر سدیم استات ۰/۱ مولار برای محدوده بافری ۵ تا ۷ استفاده شد. ابتدا در هر لوله آزمایش ۱۰۰ میکرولیتر ABTS ۲ میلی‌مولار، ۲۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۰/۸ میلی‌مولار و ۱۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی استخراج شده ریخته که در نهایت با بافر مورد نظر به حجم ۳ میلی لیتر رسانده شد. سپس تغییرات جذب در هر لوله آزمایش برای مدت ۳ دقیقه در دمای آزمایشگاه در طول موج ۴۱۴ نانومتر ثبت شد(۲۶).

فعالیت نسبی آنزیم طبق معادله (۱) در pH های مختلف محاسبه و با رسم نمودار تغییرات جذب نسبت به pH های مختلف، pH بهینه بدست آورده شد.

معادله (۵) فعالیت نسبی آنزیم

$$A= S/S0 \times 100$$

در معادله (۵)، S تغییرات جذب نوری مخلوط واکنش نسبت به زمان بعد از انکوباسیون در هر pH و S0 تغییرات جذب نوری نسبت به زمان در pH بهینه می‌باشد(۳۴).

تعیین دمای بهینه پراکسیداز: تعیین درجه حرارت بهینه برای فعالیت نسبی آنزیم تحت شرایط استاندارد در دمای ۱۰ الی ۶۰ درجه سانتی‌گراد در بافر سیترات-فسفات ۰/۱ مولار در pH برابر۴ انجام شد. سپس نمودار تغییرات فعالیت نسبی آنزیم نسبت به درجه حرارت با استفاده از معادله (۱)رسم گردید(۲۵).

تعیین پارامترهای سنتیکی K_m و V_{max} پراکسیداز بروکلی: برای تعیین مقادیر K_m و V_{max} فعالیت آنزیم در دما و pH بهینه بازای غلظت‌های مختلف سوبسترا (هیدروژن پراکسید) بررسی گردید. برای این منظور در هر لوله آزمایش مقدار ۱۰۰ میکرولیتر ABTS ۲ میلی‌مولار، ۲۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (در پنج غلظت ۰/۱، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۶ و ۲ میلی‌مولار) و ۱۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی ریخته و در نهایت توسط بافر سیترات فسفات ۰/۱ مولار با pH ۴ به حجم ۳ میلی‌لیتر رسانده شد. تغییرات جذب نوری برای مدت زمان ۳ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در طول موج ۴۱۴ نانومتر ثبت شد(۳۷). سپس نمودارهای میکائیلیس-منتن و لینویور-برگ بر حسب غلظت‌های نهایی سوبسترا رسم شد و از طریق این نمودار مقادیر K_m و V_{max}بدست آورده شد.

سنجش اثر عصاره متانولی گیاهان بر فعالیت آنزیم پراکسیداز: جهت بررسی اثر عصاره‌های متانولی استخراج شده از هر گیاه بر فعالیت آنزیم پراکسیداز، فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف عصاره (۳ تا ۳۳ میکروگرم در میلی لیتر) اندازه‌گیری شد. در لوله آزمایش ۲۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۲-۰/۱ میلی‌مولار هیدروژن پراکسید، ۱۰۰ میکرولیتر ABTS ۲ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره

متانولی گیاه و ۱۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه و در نهایت با بافر سیترات-فسفات ۰/۱ مولار با pH ۴ به حجم ۳ میلی‌لیتر رسانده شد. تغییرات جذب نوری برای ۳ دقیقه و هر ۱۰ ثانیه در طول موج ۴۱۴ نانومتر ثبت شد. در نهایت طبق معادله (۶) درصد مهار پراکسیداز بوسیله هر یک از عصاره‌های متانولی محاسبه گردید.

معادله (۶) تعیین درصد مهار

$$I(\%) = 100.\{1-(A_{sample}/A)\}$$

در معادله (۶) A فعالیت آنزیم بدون عصاره متانولی، A_{sample} فعالیت آنزیم در مجاورت عصاره متانولی و I درصد مهار آنزیم می‌باشد(۳۰).

نتایج

بر اساس نتایج بدست آمده فعالیت کل، فعالیت ویژه، درصد بازیابی فعالیت و درجه خلوص آنزیم از رابطه‌های (۱) تا (۵) بدست آورده شد (جدول۲).

جدول۲- مقدار فعالیت آنزیم پراکسیداز بروکلی در مراحل تهیه عصاره آنزیمی

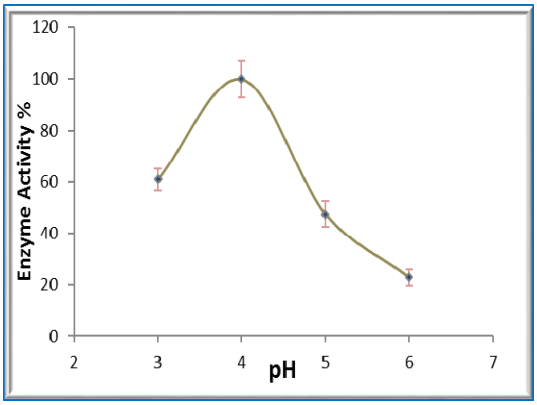
درجه خلوص	بازیابی فعالیت (%)	فعالیت ویژه (U/mg)	پروتئین تام (mg)	فعالیت تام (U)	حجم عصاره (ml)	
۱	۱۰۰	۰/۵۸	۱۶۳۷	۹۵۷/۷	۶۲۰	عصاره خام
۶/۲۲	۳۹/۵۶	۳/۶۱	۱۰۵	۳۷۸/۹۱	۱۰/۵	بعد از دیالیز

نتایج تعیین pH بهینه: تاثیر pH بر آنزیم پراکسیداز بروکلی، با اندازه‌گیری فعالیت نسبی آنزیم در pHهای متفاوت محاسبه شد. طبق شکل (۱) آنزیم حداکثر فعالیت را در pH ۴ از خود نشان داده است؛ که همان pH بهینه آنزیم پراکسیداز بروکلی مورد مطالعه می‌باشد.

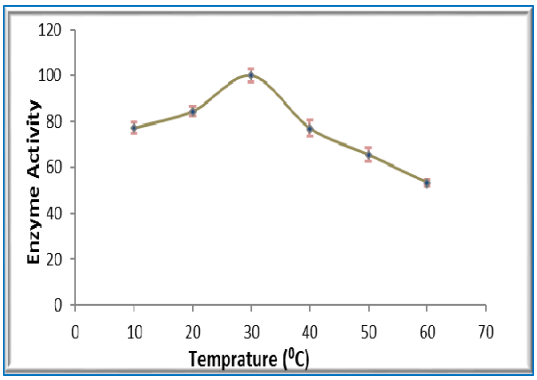
نتایج تعیین دمای بهینه: شکل (۲) میزان تغییر فعالیت نسبی آنزیم پراکسیداز استخراج شده از کلم بروکلی را نسبت به افزایش دما در محدوده ۱۰ الی ۶۰ درجه سلسیوس نشان می‌دهد. مطالعه روند تغییرات بیانگر آن است که بیشترین فعالیت آنزیم در مجاورت آب اکسیژنه و ABTS ، در دمای ۳۰ درجه می‌باشد و با افزایش و یا کاهش این دما فعالیت آنزیم کاهش میابد. بنابراین دمای ۳۰ درجه، دمای بهینه آنزیم می‌باشد.

نتایج تعیین پارامترهای سنتیکی K_m و V_{max} پراکسیداز: برطبق معادله میکائیلیس-منتن در واکنش آنزیمی مورد مطالعه با افزایش غلظت سوبسترای آب اکسیژنه، جذب نوری افزایش یافته و تا زمانی که آنزیم از سوبسترا اشباع شود این روند ادامه می‌یابد. پس از اشباع شدن آنزیم از سوبسترا، جذب نوری مخلوط واکنش دیگر تغییری نمی‌کند (شکل۳).

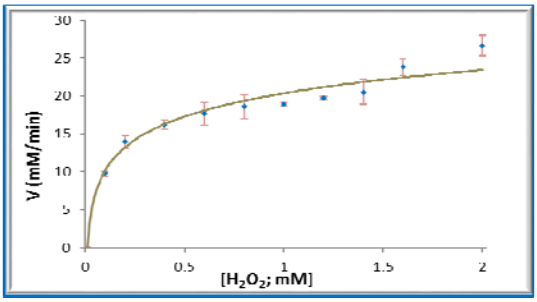
بر طبق شکل ۴ پس از رسم تغییرات معکوس سرعت نسبت به معکوس غلظت آب اکسیژنه، K_m آنزیم پراکسیداز بروکلی ۰/۰۱۲ میلی‌مولار و V_{max} آن ۲۴/۱ میلی‌مولار بر دقیقه بدست آورده شد (شکل ۴).



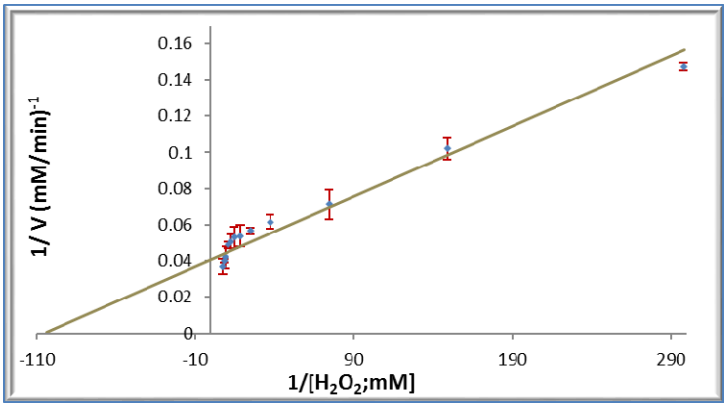
شکل ۱- تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز بروکلی نسبت به تغییر pH (همه اندازه گیری ها سه بار تکرار شد.)



شکل ۲- تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز بروکلی نسبت به تغییر دما(همه اندازه گیری ها سه بار تکرار شد.)



شکل ۳- نمودار میکائیلس-منتن، تغییرات سرعت واکنش آنزیم پراکسیداز بروکلی در غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن. (همه اندازه گیری ها سه بار تکرار شد.)



شکل۴- نمودار لینویور-برگ، معکوس مقادیر سرعت آنزیم پراکسیداز بروکلی به ازای معکوس غلظت‌های مختلف از پراکسیدهیدروژن (همه اندازه گیری ها سه بار تکرار شد.)

نتایج عصاره‌گیری گیاهان: همان طور که در بخش روش ها ذکر شد، عصاره گیری از اندام های گیاهی انجام شد و پس از خشک شدن، توزین و با توجه بمقدار اولیه پودر گیاهی بکار رفته، راندمان عصاره‌گیری بصورت درصد وزنی عصاره خشک شده بمقدار اولیه پودر گیاه در جدول ۳ گزارش شده است.

جدول ۳- راندمان عصاره‌گیری از گیاهان مورد مطالعه بروش خیساندن

ردیف	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹
نام گیاه	درمنه	زولنگ	رزماری	آقطی	پیرسنبل	ولیک سیاه	شقایق	دارواش	الزی
راندمان عصاره گیری (%w/w)	۴۳/۹	۱/۳	۲۰/۳	۳۴/۵	۳۴/۵	۳۶/۹	۹/۳	۲۴/۵	۳۲/۵

نتایج تاثیر عصاره متانولی نمونه های گیاهی بر فعالیت آنزیم پراکسیداز بروکلی: برای مطالعه تاثیر عصاره متانولی گیاهان مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف بر فعالیت آنزیم پراکسیداز بروکلی، بر طبق روش ذکر شده در بخش مواد و روش ها سرعت واکنش آنزیمی در مجاورت عصاره ها (۳تا ۳۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر) اندازه گیری شده و نمودارهای میکائیلس-منتن و لینویور-برگ برای انها ترسیم گردید. مقادیر مشخصات سنتیکی از جمله K_m و V_{max}و نیز میزان در صد مهار آنزیم بوسیله هر یک از عصاره ها در غلظت ۳۳ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش گردیده است.

جدول ۴- مقدار پارامترهای سنتیکی پراکسیداز بروکلی تحت تاثیر عصاره‌ها در غلظت ۳۳ میکروگرم بر میلی لیتر

نام عصاره	K_m^{app} (mM)	V_{max}^{app} (mM/min)	نوع تاثیر	درصد مهار آنزیم
درمنه	۰/۰۱۹	۴/۹	مهار مختلط	۷۶/۳
زولنگ	۰/۰۰۴	۳/۵	مهار نارقابتی	۷۰/۰
رزماری	۰/۰۰۷	۳/۶	مهار غیررقابتی	۷۹/۵
آقطی	۰/۰۱	۱۲/۷	مهار نارقابتی	۲۷/۰
دارواش	۰/۰۲۸	۱۶/۵	مهار رقابتی	۲۸/۷
ولیک سیاه	۰/۰۳۷	۲/۷۴	مهار مختلط	۸۸/۲
شقایق	۰/۰۰۹	۲/۸۵	مهار غیررقابتی	۷۸/۶
پیرسنبل	۰/۰۰۴	۱۴/۷	فعال کننده	_
الزی	۰/۰۰۸	۱۶/۴	مهار جزئی	۱/۷

بحث و نتیجه گیری

امروزه تنوع بیماری‌ها و محدودیت تعداد داروهای شیمیایی، عوارض جانبی، تحمل دارویی و هزینه‌های اقتصادی سنگین تهیه آن‌ها؛ ضرورت توجه به طب سنتی و گیاهان دارویی را دو چندان کرده است. با توجه به اهمیت طب سنتی بخصوص گیاه‌درمانی و همچنین وجود ترکیبات غنی آنتی‌اکسیدانی در گیاهان استفاده شده در این تحقیق، به مطالعه تاثیر عصاره های متانولی این گیاهان بر روی آنزیم پراکسیداز کلم بروکلی پرداخته شد.

تعداد زیادی از ترکیبات با خواص آنتی‌اکسیدانی بعنوان فرآورده‌های ثانویه توسط گیاهان ساخته می‌شود. از مهمترین این ترکیبات می‌توان به کاروتنوئیدها، آسکوربیک‌اسید و ترکیبات فنولی اشاره کرد. ترکیبات فنولی گروه وسیعی از متابولیت‌های ثانویه را تشکیل می‌دهند که در گیاهان نقش‌های متعددی را بعهده دارند. ازجمله این نقش‌ها می‌توان به خواص هورمونی، دارویی و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها اشاره کرد. آنتی‌اکسیدان‌های فنولی رایج شامل توکوفرول‌ها، فلاوونوئیدها، کومارین‌ها، مشتقات سینامیک اسید، چالکون‌ها، دی‌ترپن‌های فنولی و اسیدهای فنولی هستند. این ترکیبات از بافت‌ها، DNA و RNA در برابر صدمه اکسیداتیو گونه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌کنند. رزمارینیک اسید نیز یک ترکیب فنولی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی است که در گیاهان تیره‌های گاوزبان و نعناعیان یافت می‌شود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی به طرق مختلف صورت می‌گیرد که ازجمله آن‌ها می‌توان به جاروب کردن رادیکال‌های آزاد، دادن هیدروژن و جمع‌آوری اکسیژن یکتایی اشاره کرد. در تحقیقات بیشماری وجود یک ارتباط مستقیم بین میزان ترکیبات فنولی عصاره‌های گیاهی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها اثبات شده‌است(۷).

آنزیم پراکسیداز جزء پروتئین‌های هم‌دار بوده که وظیفه اصلی آن‌ها اکسیداسیون سوبستراهای مختلف با استفاده از پراکسید هیدروژن می‌باشد. این آنزیم بدلیل نقش در حذف رادیکال‌های آزاد و بالا بودن قدرت کاتالیتیکی کاربرد وسیعی در صنعت پزشکی و عرصه بیوشیمی دارد(۲). همچنین پراکسیدازها اساسا همراه با آنزیم‌های دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرند. از طرفی فرآیند خالص‌سازی پراکسیدازها فرآیندی پرهزینه، طولانی مدت و مشکل است. بنابراین بعلت کاربرد گسترده این آنزیم در زمینه‌های مختلف، لازم است که اشکال متفاوت آن در بافت‌ها و گونه‌های مختلف گیاهی شناسایی شده و انواعی برگزیده شود که در محدوده وسیع و قابل قبولی از pH و دما فعالیت و پایداری دارند(۸و۱۷).

در رابطه با مشخصات سنتیکی انواع آنزیم‌های پراکسیداز تخلیص شده از منابع مختلف، پژوهش‌های متعددی صورت گرفته است. در همه این بررسی‌ها ارتباط مستقیمی بین فعالیت آنزیم پراکسیداز و مقدار عصاره‌های اثر داده شده نتیجه گیری شده است(۲۹). همچنین در گزارش‌هایی اثر غلظت اسانس‌ها بر فعالیت پراکسیداز مورد توجه قرار گرفته و نتیجه‌گیری شده که با افزایش غلظت اسانس فعالیت آنزیم پراکسیداز کاهش می‌یابد(۱). از طرفی محصولات دارای فعالیت بالای آنزیم پراکسیداز، مقاومت‌های بسیار بالایی را نسبت به اسانس‌های اعمال شده نشان داده اند. در واقع در این گونه از محصولات آنزیم پراکسیداز دارای پایداری است. از این رو برطرف کردن پایداری پراکسیداز یک مشکل جدی برای تولید ترکیبات وابسته‌ای است که ارزش اقتصادی دارند(۲۰).

نتایج این تحقیق نشان داد که آنزیم پراکسیداز استخراج شده از کلم بروکلی در pHهای اسیدی فعالیت و پایداری بیشتری داشته و در pH های خنثی و قلیایی فعالیت و پایداری پایینی را از خود نشان می‌دهد. این دستاورد با نتایج مدولی و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مورد حساسیت پراکسیداز میوه مارولا (*Sclerocarya birrea* subsp. Caffra) نسبت به شرایط قلیایی و خنثی مطابقت دارد. از طرف دیگر pH های بسیار اسیدی نیز اثر غیرفعال‌کنندگی مشابه pH های قلیایی دارد(۲۶). در بررسی آنزیم پراکسیداز ترب‌کوهی با استفاده از روش طیف‌سنجی رزونانس رامان نشان داده شد که محیط قلیایی، پیوند هیدروژنی بین دو آمینواسید هیستیدین و آسپاراژین را می‌شکند. از آنجا که این دو آمینواسید در فعالیت آنزیم نقش مهمی ایفا می‌کنند، در نتیجه بنظر می رسد هرگونه تغییر در وضعیت آن‌ها بر اثر تغییرات pH ، آنزیم را غیرفعال می‌کند(۹).

آنزیم استخراج شده از کلم بروکلی در دمای ۳۰ درجه سلسیوس بالاترین فعالیت را نشان داده و افزایش و یا کاهش این دما، سبب کاهش فعالیت این آنزیم شد. این نتایج با بررسی های سامتورک و همکاران در سال ۲۰۱۴ در رابطه با دمای بهینه آنزیم پراکسیداز استخراج شده از کلم قرمز هماهنگی دارد(۳۶).

در تحقیقی که آقاجانی نسب و همکاران بر روی آنزیم پراکسیداز تربچه انجام دادند فعالیت تام و فعالیت ویژه آنزیم ۱/۳۶U/ml و U/mg ۱/۱۹ بدست آورده شد که در مقایسه با نتایج این پروژه که در جدول ۱ آورده شده مقادیرکمتری می باشد(۳).

با توجه به بررسی صادق پور و همکاران در سال ۲۰۱۰ ترکیبات اصلی اسانس گیاه درمنه شامل: داوانون (Davanone) (۶۰٪/۵۶)، سیس کریسانتیل استات (Cis Chrysanthenyl acetate) (۸٪/۶۵)، لیمونن (۵٪/۶۸)، آلفا پینن (۳٪/۷۴)، ایزومر اتری داوانون (Davanone ether isomer) (۳٪/۶) و آلفا توجن (α Thujene) (۳٪/۶) است(۲۳و۳۲). داوانون بعنوان ترکیب اصلی در این گیاه ترپنی است که خواص ضد قارچی و ضد اسپاسم آن اثبات شده است(۲۲). در این تحقیق عصاره متانولی درمنه در غلظت ۳۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر K_m آنزیم را بمقدار mM ۰/۰۱۹ افزایش و V_{max} آن را بمقدار mM/min ۱۳/۶ کاهش داد؛ و نوع مهار این عصاره از نوع مختلط نتیجه گیری شد.

ترکیبات اصلی گیاه زولنگ شامل: بتا سزکوئی فلاندرن (β-sesquiphellandrene) (٪۴۴/۲۱)، لیمونن (٪۱۸/۳۹) و بتا بیس آبولن (β-bisabolene) (٪۶/۰۸) می‌باشد(۲۱). بتا سزکوئی فلاندرن و لیمونن بعنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدان عمل کرده و مهارکنندگی آنها برای پراکسیداز گزارش شده است. هر دو ترکیب دارای خواص ضد سرطانی نیز می‌باشند(۴۰). در این تحقیق عصاره متانولی زولنگ در غلظت ۳۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر میزان K_m و V_{max} آنزیم پراکسیداز بروکلی را بترتیب به میزان mM ۰/۰۰۸ و

۹/۹ mM/min کاهش داد و نوع مهار آن از نوع نارقابتی تعیین شد.

در گیاه رزماری ماده متشکله اصلی برگ و سرشاخه‌ها را روغن فرار تشکیل می‌دهد که مهمترین ترکیبات آن شامل: ۱و ۸ سینئول، آلفا پینن، کامفن آلفا ترپینول، بورنول است که این مواد بخصوص آلفا تریپنول خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد سرطانی بالایی از خود نشان داده‌اند. گروه دیگر از ترکیبات گیاه رزماری ترکیبات پلی فنولیک شامل: فلاوونوئیدها(مانند هموپلانتاجینین، کرسیمارتین) و مشتقات فنولی (اسید رزماریک، رزمانول، اسید کارنوسیک، کارنوزول) می‌باشد که همگی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بوده و سبب مهار پراکسیداسیون لیپیدها شده‌اند (۱۹). کارنوسیک اسید که فراوان‌ترین ترکیب فنولیک دی‌ترپن موجود در برگ‌های رزماری است، بیشترین اثر آنتی‌اکسیدانی را در میان سایر ترکیبات فنولی دی ترپنی نشان داده است (۶). پس از مجاورت عصاره متانولی رزماری بر روی پراکسیداز بروکلی، در غلظت ۳۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر V_{max} آنزیم به میزان ۱۴/۳ mM/min کاهش یافت اما K_m آنزیم ثابت باقی ماند؛ بنابراین نوع تاثیر این عصاره بر آنزیم پراکسیداز بصورت مهار غیر رقابتی نتیجه گیری شد.

از جمله ترکیبات موجود در عصاره آقطی می‌توان به فلاوونوییدها (شامل: روتین، کوئرستین، ایزوکوئرستین)، اسیدهای فنولی، موسیلاژ، تانن، آلکالوئیدها، تری ترپن، پکتین، رزین، ویتامین A و C، آنتوسیانین، ساپونین، کارتنوئیدها، مشتقات کافئیک اسید، ایبولیتین‌ها و مواد فرار اشاره کرد(۳۵). ویتامین‌ث، ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدها بعنوان آنتی‌ویروس در درمان سرماخوردگی، کاهش علایم تب و بعنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند. آنتوسیانین موجود در این گیاه خاصیت ضد سرطانی بسیار بالایی دارد و قدرت آنتی‌اکسیدانی آن حتی از ویتامین E و C نیز بیشتر می‌باشد و مسئول حفاظت در مقابل استرس‌های اکسیداتیو می‌باشد و موجب افزایش پاسخ های ایمنی در طول تقسیم سلولی می شود(۳۸). عصاره آقطی در غلظت ۳۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر سبب کاهش هر دو کمیت K_m و V_{max} به میزان ۰/۰۰۵ mM و ۵/۹ mM/min شد و بنابراین آنزیم پراکسیداز بصورت نارقابتی مهار گردید.

برگ‌های گیاه پیرسنبل دارای ترکیباتی از قبیل سیس اسیمین (Cis-ocimene)، آلفا پینن، بتا پینن، متیل استر لینولنیک اسید می‌باشد. اسیدهای چرب غیراشباع مانند لینولنیک اسید و لینولئیک اسید فراوان‌ترین اسیدهای چرب این گیاه هستند. اسمین یک مونوترپن حلقوی بوده که از پینن بیوسنتز می‌گردد(۲۸). در این بررسی عصاره متانولی گیاه پیرسنبل فعالیت آنزیم پراکسیداز را افزایش داد. این عصاره کاهش K_m به میزان ۰/۰۰۴ mMو از طرفی افزایش V_{max} آنزیم را موجب شده است. بنابراین عصاره متانولی گیاه پیرسنبل یک فعال کننده غیرضروری آنزیم پراکسیداز محسوب می‌شود(۳۱). بر طبق گزارش های قبلی عصاره ولیک شامل: ترکیبات فلاوونوئیدی از قبیل پروآنتوسیانین ها، کوئرستین و روتین می‌باشد. فلاونوئیدها، ترکیبات پلی فنولی هستند که بطور عمده در گیاهان یافت می‌شوند و بعنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدان و ضد رادیکال نقش دارند. عوامل متفاوتی از جمله تعداد گروه‌های هیدروکسیل و ساختار ارتودی‌فنولیک بر روی خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها موثر است. آنتوسیانین‌ها نیز بعنوان فلاونوئید با جذب رادیکال‌های آزاد بعنوان یک ماده آنتی‌اکسیدان و ضد سرطان قوی شناخته شده است(۱۴). در این پروژه عصاره متانولی ولیک سیاه، آنزیم پراکسیداز را بصورت مختلط مهار کرده است؛ بدین صورت که در غلظت ۳۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر K_m آنزیم به میزان ۰/۰۲۶ mM افزایش و V_{max} آن به میزان ۱۷/۶۴ mM/min کاهش نشان داد.

گیاه شقایق دارای ترکیبات مختلفی از جمله ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی است. این ترکیبات در جذب و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و تجزیه پراکسیدها نقش دارند. در

تحقیقی در سال ۲۰۱۰ گزارش شد که عصاره آبی شقایق حاوی ترکیبات فنولی بوده و در نتیجه خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی از خود نشان داد(۳۹و۱۶). در این پژوهش از عصاره متانولی شقایق استفاده شد و مشخص گردید که این عصاره در غلظت ۳۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌تواند آنزیم پراکسیداز را بصورت غیررقابتی مهار نماید؛ با رسم نمودارهای سرعت برحسب غلظت سوبسترا، نتیجه‌گیری شد که K_m آنزیم ثابت بوده ولی V_{max} آن به میزان ۱۰/۵ mM/min کاهش نشان داد.

ترکیبات شیمیایی گیاه دارواش با توجه به محل کشت و رویش آن تغییر می‌کند. این ترکیبات شامل: آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، آنتراکینون‌ها، ساپونین‌ها، ترپنوئیدها و میسکوتوکسین می‌باشد (۴). عصاره متانولی این گیاه بدلیل داشتن فلاونوئیدها سبب مهار آنزیم پراکسیداز شده و این مهار از نوع رقابتی می‌باشد باین صورت که عصاره متانولی دارواش در غلظت یکسان با بقیه عصاره‌ها یعنی ۳۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر سبب افزایش K_m آنزیم به میزان ۰/۰۱۶ mM شده ولی تاثیری بر مقدار V_{max} نشان نداد.

برگ‌های گیاه الزی دارای ترکیباتی از قبیل فنولیک اسید، کوماریک اسید، فرولیک اسید، هیدروکسی بنزوئیک اسید و وانیلیک اسید می‌باشد. اما با وجود چنین ترکیبات آنتی‌اکسیدان در این عصاره متانولی برگ‌های این گیاه در ازمایشات انجام شده K_m و V_{max} آنزیم را تغییر نداده و تاثیر مهاری چندانی بر فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان نداد(۵). این نتیجه شاید به همان خاصیت جمعی ترکیبات آنتی اکسیدان اشاره داشته باشد که در یک مخلوط اثراتی برخلاف انتظار از خود بروز می‌دهند.

با توجه به نتایج بدست آمده عصاره گیاهان درمنه، زولنگ، رزماری، آقطی، دارواش، ولیک سیاه، شقایق و الزی سبب مهار آنزیم پراکسیداز بروکلی شده و در این بین عصاره ولیک سیاه با مهار ۸۸/۲ درصد، رزماری با مهار ۷۹/۵ درصد ، درمنه با مهار ۷۶/۳ درصد و شقایق با مهار ۷۸/۶ درصد اثر مهاری بالایی را نشان دادند. در تمام گیاهان ذکر شده که سبب مهار آنزیم پراکسیداز شدند ترکیبات فلاونوئیدی، مشتقات فنولی و ترپنی وجود دارد. از جمله ترکیبات فلاونوئیدی که در گیاهان فوق وجود دارد می توان به آنتوسیانین‌ها، کوئرستین و روتین در گیاه ولیک سیاه، کوئرستین و لوتئولین، در رزماری لوتئولین و تریسین در گیاه شقایق اشاره کرد. رزماریک اسید، کارنوسیک اسید و آلفا تریپنول از جمله مشتقات فنولی هستند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی دارند و سبب مهار آنزیم پراکسیداز می‌گردند. بطور کلی با افزایش ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در گیاهان خاصیت آنتی‌کسیدانی آن‌ها افزایش مییابد. ترکیب آنتی‌اکسیدان قوی دیگری که در این گیاهان مشاهده شده است یعنی لیمونن که یک ترپن حلقوی بوده و در گیاهانی نظیر درمنه و زولنگ وجود دارد.

در این مطالعه مشخصات سنتیکی، pH، و درجه حرارت بهینه آنزیم پراکسیداز بروکلی تعیین شد، در واکنش انزیمی که در آن از آب آکسیژنه و ABTS استفاده شد. بر اساس این دست آوردها نتیجه گیری شد که تلاش برای تحقیقات بیشتر در مورد عصاره های مختلف گیاهان ولیک سیاه، رزماری، شقایق و درمنه مازندران بتواند بعنوان یک موضوع مناسب برای پژوهش‌های آینده پیشنهاد شوند. این پژوهش ها می‌توانند با هدف دستیابی به مهارکننده‌های جدید آنزیم پراکسیداز از بروکلی با کاربردهای دارویی، کشاورزی و صنعتی انجام گردند.

سپاسگزاری

از آنجایی که بودجه بندی این تحقیق از سوی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه مازندران تامین اعتبار شده است باین وسیله از ایشان تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

۱- احتشام‌نیا، ع.، رضایی‌نژاد، ع.، موسوی‌زاده، س.ع. و علیخانی-کوپایی، م. ۱۳۹۰. بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در برخی میوه ها با کاربرد اسانس های گیاهی آویشن باغی، مورد و مرزه خوزستانی. دو فصلنامه فن آوری تولیدات گیاهی، ۱۱: ۳۳-۴۲ .

۲- آریان، ز.، مرآتی، م.ج.، ابراهیم زاده، ح.، هادیان، ج. و میرمعصومی، م. ۱۳۹۷. تحلیل اثر تنش شوری و سالیسیلیک اسید بر برخی ویژگی های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica*. Jamzad).مجله پژوهشهای گیاهی، ۳۱(۱): ۱۰۵-۱۱۵.

۳- آقاجانی نسب، م.، پژهان، ن. و باستانی، ع. ۱۳۸۲. جداسازی و خالص سازی ایزوآنزیم‌های پراکسیداز از تربچه. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، ۴۷: ۹-۱۴.

۴- پیام نور، و.، امیریان، ح. و رزمجو، ف. ۱۳۹۷. اثر میزبان های مختلف بر تغییرات متابولیت های ثانویه داروواش اروپایی (*Viscum album* L.). نشریه پژوهش های علوم و فناوری چوب و جنگل، ۲۵: ۱۹-۳۲.

۵- روغنی، م. و بلوچ نژاد مجرد، ت. ۱۳۸۹. اثر ضد دردی مصرف خوراکی سیر کوهی در موش صحرایی نر دیابتی. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ۴: ۶۴-۷۰.

۶- علیزاده، ل.، نایب‌زاده، ک. و شاهین، ر. ۱۳۹۲. بررسی اثرات آنتی اکسیدانی عصاره ی رزماری و چویر در مقایسه با آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ بر روند اکسیداسیون روغن حین فرآیند سرخ کردن عمیق. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۴: ۱۳۵-۱۴۳.

۷- کیارستمی، خ.و مصفا، ت. ۱۳۹۴. بررس خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه اسطوخودوس در شرایط کشت درون‌شیشه ای. مجله پژوهش‌های گیاهی، ۴: ۸۳۵-۸۴۳.

۸- مرآتی، م.ج.، نیکنام، و.، حسن پور، ح. و میرمعصومی، م. ۱۳۹۴. مقایسه تاثیر تنش شوری بر رشد و پاسخ های آنتی اکسیدانی در اندام های مختلف گیاه پونه معطر (*Mentha pulegium* L.). مجله پژوهشهای گیاهی، ۲۸(۵):۱۰۹۷-۱۱۰۷.

9- Amiour, S. D. and Hambaba, L. 2016. Effect of pH, temperature and some chemicals on polyphenoloxidase and peroxidase activities in harvested Deglet Nour and Ghars dates. *Postharvest Biology and Technology*, 11: 77-82.

10- Ashraf, H. and Husain, Q. 2010. Use of DEAE cellulose adsorbed and cross linked white radish (*Raphanus sativus*) peroxidase for the removal of α-naphthol in batch and continuous process. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(1): 27-31.

11- Bachiega, P., Salgado, J. M., de Carvalho, J. E., Ruiz, A. L., Schwarz, K., Tezotto, T. and Morzelle, M. C. 2016. Antioxidant and antiproliferative activities in different maturation stages of broccoli (*Brassica oleracea* Italica) biofortified with selenium. *Food Chemistry*, 190: 771-776.

12- Boxall, A. B., Johnson, P., Smith, E. J., Sinclair, C. J., Stutt, E. and Levy, L. S. 2006. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6): 2288-2297.

13- Chakraborty, A. and Mahajan, A. 2014. Cellulase Activity Enhancement of Bacteria Isolated from Oil-Pump Soil Using Substrate and Medium Optimization. *American Journal of Microbiological Research*, 2(2): 52-56.

14- Chandrasekhar, J., Madhusudhan, M. and Raghavarao, K. 2012. Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Food and Bioproducts Processing*, 90: 615- 623.

15- Chaudhary, A., Sharma, U., Vig, A. P., Singh, B. and Arora, S. 2014. Free radical scavenging, antiproliferative activities and profiling of variations in the level of phytochemicals in different parts of broccoli (*Brassica oleracea* italica). *Food Chemistry*, 148: 373-380.

16- Danijela, A. K., Miti, S. S., Miti, M. N., Aleksandra, R. Z., Jasmina, M. V., Dordevic, A. S. and Randelovic, S. S. 2010. Phenolic contents, antioxidant and antimicrobial activity of *Papaver rhoeas* L. extracts from Southeast Serbia. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(17): 1727- 1732.

17- Fortea, M.A., Lopez-Miranda, S., Serrano-Martinez, A., Hernandes-Sanchez, P., Zafrilla, M.P., Martinez-cacha, A. and Nunez-Delicado, E. 2011. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of red alga (*Mastocarpus stellatus*) peroxidase. *Food Chemistry*, 127: 1091-1096.

18- Gong, Z., Li, D., Liu, C., Cheng, A., and Wang, W. 2015. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and

peroxidase from chestnut kernel. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2): 1095-1099.

19- Habtemariam, S. 2016. The therapeutic potential of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes for Alzheimer's disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-14.

20- Hamid, M. and Rehman, K. 2009. Potential application of peroxidase. *Food Chemistry*, 115: 1177- 1186.

21- Hashemabadi, D., Kaviani, B., Erfatpour, M. and Larijani, K. 2010. Comparison of essential oils compositions of eryngo (*Eryngium caucasicum* Trautv.) at different growth phases by hydrodistillation method. *Plant Omics*, 3(4): 135- 139.

22- Kadnikova, E. N. and Kosti, N. M. 2002. Oxidation of ABTS by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase encapsulated into sol–gel glass. Effects of glass matrix on reactivity. *Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 18: 39-48.

23- Karen, C. M., Litz, J. P., Scherpelz, K. P., Dossa, P. D. and Vosburg, D. A. 2009. A concise, biomimetic total synthesis of (+)-Davanone. *American Chemical Society*, 2217-2218.

24- Kay, C.D., Holub, B.J. 2002. The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on postprandial serum antioxidant status in human subjects. *British Journal of Nutrition.* 88(4): 389-397.

25- Márquez, O., Waliszewski, K. N., Oliart, R. M. and Pardio, V. T. 2008. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. *LWT - Food Science and Technology*. 41(8): 1372-1379.

26- Mdluli, K.M. 2005. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. Caffra). *Food Chemistry*. 92(2): 311-23.

27- Medina, S., Dominguez-Perles, R., Moreno, D.A., Garcia-Viguera, C., Ferreres, F., Gil, J.I., Gil-Izquierdo, A. 2015. The intake of broccoli sprouts modulates the inflammatory and vascular prostanoids but not the oxidative stress-related isoprostanes in healthy humans. *Food Chemistry*. 173: 1187-1194.

28- Mohadjerani, M., Hosseinzadeh, R. and Hosseini, M. 2011. Chemical composition and antibacterial properties of essential oil and fatty acids of different parts of *Ligularia persica* Boiss. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 6(3):357-365.

29- Ponce, A.G., del Valle, C.E. and Roura, S.I. 2004. Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 37(2): 199-204.

30- Rebuglio Vellosa, J.C., Khalil, N.M., Gutierres, V.O., Aparecida, V., Furlan, M., Brunetti, I.L.and Oliveira, O.M.M.F. 2009. *Salacia campestris* root bark extract: peroxidase inhibition, antioxidant and antiradical profile. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 45: 99- 107.

31- Saboury, A. 2009. Enzyme inhibition and activation: a general theory. *Journal of Iranian Chemical Society*. 6(2): 219-229.

32- Sadeghpour, O., Asghari, G. and Shams Ardekani, M. 2010. Composition of Essential Oil of *Artemisia persica* Boiss. from Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 3(1), 65-67.

33- Sánchez-Vega, R., Elez-Martínez, P. and Martín-Belloso, O. 2015. Influence of high-intensity pulsed electric field processing parameters on antioxidant compounds of broccoli juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 29: 70-77.

34- Shalini, G. R., Shivhare, U., and Basu, S. 2008. Thermal inactivation kinetics of peroxidase in mint leaves. *Journal of Food Engineering*. 85(1), 147-153 .

35- Shokrzadeh, M. and Saravi, S.S. 2010. The chemistry, pharmacology and clinical properties of *Sambucus ebulus*: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*. 18;4(2):95-103.

36- Somturk, B., Kalin, R. and Ozdemir, N. 2014. Purification of peroxidase from red cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata f. rubra) by affinity chromatography. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 173(7), 1815-1828.

37- Soysal, Ç.d. and Söylemez, Z. 2005. Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment. *Journal of Food Engineering, 68*(3), 349-356.

38- Thole, J.M., Kraft, T.F.B., Sueiro, L.A., Kang, Y-H., Gills, J.J., Cuendet, M. and Lila, M.A. 2006. A comparative evaluation of the anticancer properties of European and American elderberry fruits. *Journal of Medicinal Food*. 9(4), 498-504 .

39- Todorova, T., Pesheva, M., Gregan, F. and Chankova, S. 2015. Antioxidant, antimutagenic, and anticarcinogenic effects of *Papaver rhoeas* L. extract on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of medicinal food.* 18(4):460-7.

40- Tyagi, A.K.; Prasad, S.; Yuan, W.; Li, S. and Aggarwal, B.B. 2015. Identification of a novel compound (beta-sesquiphellandrene) from turmeric (*Curcuma longa*) with anticancer potential: comparison with curcumin. *Investigational New Drugs*. 33(6): 1175- 1186.

Effect of methanolic extract of some endemic plants from Mazandaran on kinetic parameters of Broccoli's peroxidase

Mohadjerani M. and Valiyan Amiri F.

Dept. of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, I.R. of Iran.

Abstract

Broccoli has been well known as a plant of high nutritional value. Application of broccoli peroxidase in different areas of clinical biochemistry, biotechnology and food industry enhances the interest for further study on the enzyme. The objective of this study was to evaluate the kinetic parameters of broccoli's peroxidase and their variations in the presence of methanolic extract of some endemic plants from Mazandaran. In this investigation, the crude extract from broccoli was homogenized, centrifuged, precipitated by ammonium sulfate and dialyzed. The enzyme activity was monitored in 414 nm with H_2O_2 and ABTS in phosphate-citrate buffer. The specific activity of the peroxidase was determined 0.58 U/mg in crude extract and 3.61 U/mg in dialysate. The optimum pH and temperature of the enzyme were obtained 4 and 30°C respectively. The extract of *Artemisia tschernieviana*, *Eryngium caucasicum*, *Rosmarinus officinalis*, *Sambucus ebulus*, *Ligularia persica*, *Crataegus douglasii*, *Papaver rhoeas*, *Viscum album* and *Allium ursinum* were prepared by maceration method. The enzyme activity was measured in presence of the extracts in different concentrations. The kinetic results shown that the extract of *Crataegus douglasii*, *Rosmarinus officinalis*, *Papaver rhoeas* and *Artemisia tschernieviana* in 33 µg/ml concentration inhibited the enzyme as 88.2, 79.5, 78.6 and 76.3% respectively. The extract of *Ligularia persica* shown no effect on maximum velocity of reaction while reduced the K_m value by 4 times. *Allium ursinu* showed a partial inhibition on the peroxidase. Therefore, study on these plants for achieving to effectors on broccoli's peroxidase, with pharmaceutical, agricultural and industrial applications could be recommended.

Key words: Peroxidase, Broccoli, Kinetic parameters, Endemic plants, Inhibitor