# بررسی خصوصیات سینتیکی پراکسیداز کدو سبز (*Cucurbita pepo*)

مریم مهاجرانی[۱*] ، افسانه آقایی[۲]

تاریخ دریافت ۹٤/۱۰/۳۰
تاریخ تصویب ۹۵/۷/۵

**چکیده**

***آنزیم پراکسیداز (EC1.11.1.7) جزءپروتئین‌های هم‌دار می‌باشدکه وظیفه اصلی آنها اکسیداسیون سوبستراهای مختلف با استفاده از پراکسید هیدروژن می‌باشد. پراکسیداز کاربرد گسترده‌ای در تشخیص‌های پزشکی و تجربیات آزمایشگاهی مختلف دارد، به همین علت امروزه تلاش زیادی صورت می‌گیرد تا منابع جدیدی از بافت‌های گیاهی با فعالیت پراکسیدازی مناسب معرفی گردد. کدو سبز (Cucurbita pepo) نوعی کدوی تابستانی است که می‌تواند تا حدود یک متر رشد کند و از لحاظ گیاه‌شناسی، کدو سبز یک میوه نارس، حاصل از تورم تخمدان گل آن است. سنجش فعالیت آنزیم وعوامل مؤثر بر***

۱* دانشیار بیوشیمی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران
(نویسنده مسئول m.mohajerani@umz.ac.ir)
۲ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران

***سینتیک آنزیم در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و طول موج ۴۷۰ نانومتر بررسی شد. تعیین دما و pH بهینه، Km و Vmax، و تاثیر نمک بر فعالیت پراکسیداز بر روی میوه گیاه و در مرحله نارس بررسی شد. نتایج حاصل نشان دادکه حداکثر فعالیت آنزیم در دمای بهینه ۵۰ درجه سانتیگراد و pH ۶/۵ می‌باشد. همچنین آنزیم در محدوده pH ۴ الی ۸ از پایداری بالایی برخوردار است. Km و Vmax برای پراکسید هیدروژن در حضور پراکسیداز کدو سبز به ترتیب ۶/۲۵ میلی مولار و ۰/۱ میلی مولار بر دقیقه اندازه‌گیری شد.بررسی تأثیر یون‌های ($Mg^{2+}$, $Cu^{2+}$ $K^{+}$, $Pb^{2+}$, $Ag^{3+}$, $Fe^{2+}$) در غلظت یک میلی مولار در مخلوط واکنش نشان داد سرب و آهن بر فعالیت آنزیم پراکسیداز بیشترین اثر مهاری را دارند.***

***واژه های کلیدی:*** pH بهینه، پراکسیداز، دمای بهینه، سینتیک آنزیم، کدو سبز

**مقدمه**

پراکسیداز یک گلیکوپروتئین آهن‌دار است که باتوجه به منبع آن دارای وزن ملکولی حدود ۳۰ الی ٦۰ کیلو دالتون است. این آنزیم با سوبستراهای زیادی از جمله دیانیزیدین، گایاکول، آسکوربیک اسید،پیروگالولوفنل که برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده می‌شوند واکنش می‌دهد، اما سوبسترای اختصاصی آن پراکسید هیدروژن است. منشا گیاهی آنزیم پراکسیداز هم به شکل محلول و هم در غشا سیتوپلاسمی وجود دارد، اما عملکرد آنزیم در دیواره سلولی گیاه بطور کامل شناخته نشده است. پراکسیدازهای گیاهی نقش زیادی از جمله دخالت در بیوسنتز لیگنین، متابولیسم اکسین، ایجاد مقاومت نسبت به تنش‌های اکسیداتیو، پاسخ به تنش آلودگی هوا، ترمیم زخم و غیره را در گیاهان ایفا می‌کنند (Obrien, (2000. همچنین این آنزیم بعنوان معرف برای تشخیص‌های بالینی نظیر تشخیص و تعیین گلوکز در خون و ادرار، تعیین مقدار اتانول در مایعات بیولوژیک کاربرد دارد. از آنجا که مواد شیمیایی زیادی می‌توانند توسط پراکسیداز تغییر ساختمان دهند، چندین کاربرد جدید برای پراکسیدازها پیشنهاد شده است. از جمله تصفیه فاضلاب‌ها، دخالت در سنتز ترکیبات آروماتیکی مختلف و حذف فنول‌ها و پراکسیدها از مواد زائد صنعتی Nazari et al., (2005).

در حال حاضر تنها منبع تولید تجاری پراکسیداز ریشه‌های گیاه ترب کوهی است که در کشورهای مختلف دنیا بویژه در اقلیم‌های سرد کشت می‌شود. اما استفاده از ریشه‌های گیاه ترب کوهی محدودیت‌هایی دارد از جمله اینکه این گیاه به آهستگی رشد می‌کند و اصولا به منظور کاربرد در صنایع غذایی کشت می‌شود. کاربرد گسترده آنزیم پراکسیداز باعث شده که محققان بدنبال منابع جدیدی برای تولید این آنزیم با خصوصیات مناسب باشند. چنین پراکسیداز ایده‌آلی باید به فراوانی دردسترس باشد، با سوبستراهای اختصاصی فراوانی بر همکنش داشته باشد و در محدوده وسیعی از pH و دما پایدار باشد (صبورا و همکاران، ۱۳۸۷). کدو سبز نوعی کدوی تابستانی است که می‌تواند تا حدود یک متر رشد کند، اما معمولا در نصف این اندازه و یا کمتر، برداشت می‌شود و به همراه بسیاری از انواع دیگر کدوها، مانند کدو تنبل، در گونه کدو تخم پوست کاغذی با نام علمی *Cucurbita pepo* دسته‌بندی می‌گردد. کدو یک سبزی استوانه‌ای شکل شبیه خیار می‌باشد و غنی از مواد مغذی و از نظر تغذیه‌ای دارای ارزش زیادی است. درمطالعه حاضر از کدو سبز به عنوان منبع آنزیم پراکسیداز استفاده می‌شود. برای بهینه

شدن شرایط واکنش از گایاکول به عنوان اهداکننده‌ی هیدروژن استفاده می‌شود.

## مواد و روش‌ها

کلیه مواد شیمیائی بکار گرفته شده در این مطالعه از نمونه‌های معتبر تجاری نظیر مرک و فلوکا بودند و از نمایندگان ایرانی تهیه شدند و عبارتند از: گایاکول، آب‌اکسیژنه، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، آب مقطر، اسید سیتریک، سیترات سدیم، تریس، اسید هیپوکلراید، پتاس، سدیم بی‌کربنات.

## استخراج و خالص سازی نسبی آنزیم

در ابتدا کدوها (میوه نارس و کشت شده در مازندران) را شسته و سپس رنده شده و به ازای ۷٤ گرم کدو ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه می‌شود. این مخلوط توسط پارچه دو لایه صاف شد تا تکه‌های بزرگ گیاه حذف شود. سپس سوسپانسیون حاصل (g×۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه) سانتریفیوژ شد. جهت رسوب دهی با سولفات آمونیوم اشباع شده ۵۰ درصد، به ازای هر ۱میلی لیتر از محلول صاف شده مقدار۲۹۱ میلی گرم سولفات آمونیوم به تدریج اضافه شده و سپس به آرامی هم زده شد و برای ٤ ساعت در ٤درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس برای بار دوم این مخلوط سانتریفیوژ (g ×۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه) شد. مایع رویی جمع‌آوری شد و جهت رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم اشباع شده ۸۵ درصد، به ازای هر ۱ میلی لیتر از محلول روئی مرحله قبل مقدار ۲۳۰میلی گرم سولفات آمونیوم به تدریج اضافه شده و سپس به آرامی هم زده شد و به مدت ٤ ساعت در یخچال نگهداری شد که بعد از این مدت برای بار سوم مخلوط سانتریفیوژ (g ×۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه) شد و رسوب به دست آمده جمع‌آوری شد. سوسپانسیون به دست آمده را درون کیسه دیالیز ریخته و در دمای ٤ درجه سانتیگراد به مدت یک شبانه روز در آب مقطر دیالیز انجام شد. محلول دیالیز شده حاوی آنزیم پراکسیداز بود که در میکروتیوپ توزیع و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد (An-jum et al., 2011). فعالیت ویژه‌ی آنزیم پراکسیداز در هر مرحله از استخراج از معادله (۱) بدست آورده شد. این محاسبات نشان دهنده کیفیت آنزیم و موثر بودن روش خالص‌سازی آن می‌باشد. مقدار پروتئین در سوسپانسیون به دست آمده در هر مرحله از استخراج به روش لوری مورد اندازه‌گیری قرار گرفت Lowry et al., (1951) .

مقدارپروتئین/سرعت‌واکنش‌آنزیمی =فعالیت‌ویژه‌آنزیم معادله (۱)

**تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم پراکسیداز**

**تعیینpH بهینه فعالیت نسبی آنزیم**

برای تعیینpH بهینه برای فعالیت آنزیم از بافرهایی باpH ۳ تا ۱۱ استفاده شد. برای این منظور از بافر سیترات ۰/۰۵ مولار جهت محدوده بافر ۳ تا ٦، بافر تریس ۰/۰۵ مولار برای محدوده بافری ٦ تا ۹ و بافر کربنات ۰/۰۵ مولار برای محدوده بافری ۹/۵ تا ۱۱ استفاده شد.(Marquez et al., (2008 در هر لوله‌ی آزمایش مقدار ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول (v/v) 1%، ۲۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (v/v) 1/0% و ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم و با بافر مورد نظر به حجم ۳ میلی‌لیتر رسانده شد Soysal and Soyle-mez, (2005). سپس تغییرات جذب در هر لوله آزمایش برای مدت ۵ دقیقه هر ۳۰ ثانیه در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد در طول موج ٤۷۰ نانومتر ثبت شد. فعالیت نسبی آنزیم از معادله (۲) در pH های مختلف محاسبه و با رسم نمودار تغییرات جذب نسبت به pH های مختلف، pH بهینه به دست آورده شد (Marquez et al., (2006.

$$\text{فعالیت آنزیم} = S/S0 \times 100 \qquad \text{معادله (۲)}$$

در این معادله S تغییرات جذب محلول واکنش نسبت به زمان بعد از تاثیر pH و S0 تغییرات جذب نسبت به زمان در حالت پایه می‌باشد .(Shalini et al., (2008

**تعیین دمای بهینه فعالیت نسبی آنزیم**

برای تعیین دمای بهینه فعالیت نسبی آنزیم در دمای ۵ الی ٦۰ درجه سانتیگراد در بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۲ مولار درpH ٦/۵ اندازه‌گیری شد و نمودار فعالیت آنزیم رسم شد .(Marquez et al., (2006

**تعیین Km و Vmax**

برای تعیین مقادیر Km و Vmax فعالیت آنزیم در دما و pH بهینه به ازای غلظت‌های مختلف سوبسترا (آب اکسیژنه) بررسی گردید. در هر لوله‌ی آزمایش مقدار۱۰۰ میکرولیتر گایاکول (v/v) 1% حجم‌های مختلف (۵ الی٤۰۰ میکرولیتر) پراکسید هیدروژن (v/v) 1/0%، ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم دیالیز شده و بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۲ مولار با pH بهینه ٦/۵ به حجم ۳ میلی لیتر رسانده شد، مخلوط گردید. برای تعیین Km غلظت پراکسید هیدروژن از ۰/٦۵ میلی مولار تا ۵۲ میلی مولار در نظر گرفته شد و در هر یک از غلظت‌ها تغییرات جذب برای ۵ دقیقه هر ۳۰ ثانیه در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد در طول موج ٤۷۰ نانومتر ثبت شد. سپس نمودارهای میکائیلیس منتن و لینووربرگ رسم شد و توسط این نمودارها مقادیر Km و Vmaxتعیین شد (Soysal and Soylemez, (2005.

**بررسی اثر یونهای فلزی**

آنزیم پراکسیداز استخراج شده به مدت ٦٠ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد در محلول ۱ میلی مولار از یون‌های مختلف فلزی ($Mg^{2+}$, $Cu^{2+}$ $K^{+}$, $Pb^{2+}$, $Ag^{3+}$, $Fe^{2+}$) انکوبه و سپس فعالیت باقی مانده آنزیم اندازه گیری شد. در هر مورد یک نمونه مخلوط واکنش بدون یون بعنوان شاهد آزمون گردید (Marquez et al., (2008. این یون‌ها بصورت نمک‌های کلرید آهن، نیترات نقره، استات سرب، کلرید پتاسیم، استات مس و کلرید منیزیم مورد استفاده قرار گرفت.

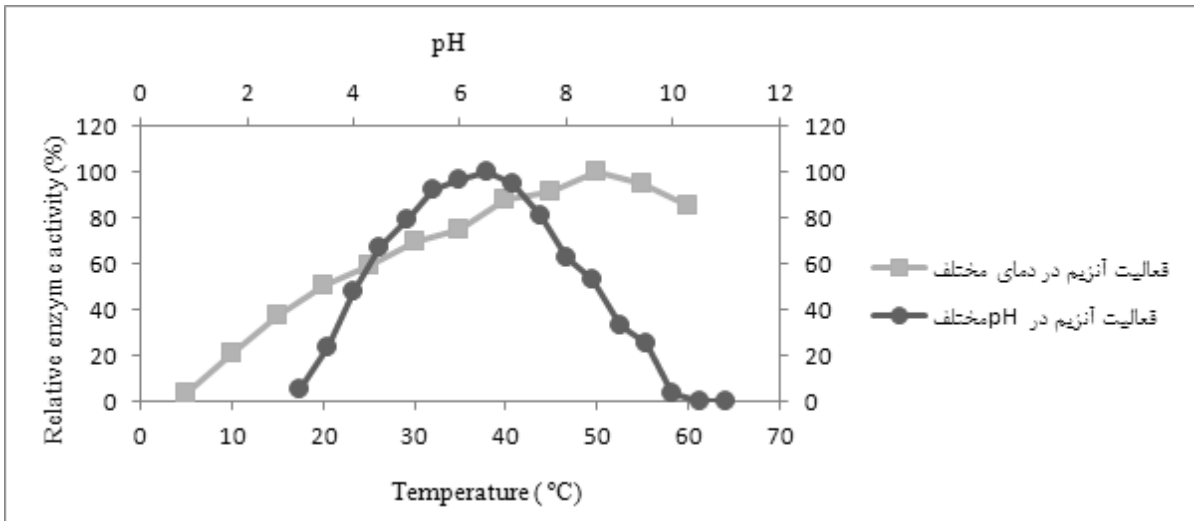
**نتایج**

**فعالیت آنزیم و دما و pH بهینه آنزیم**

فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز در مراحل استخراج از معادله ۲و۱ به دست آمده و در (جدول ۱) آورده شده است.

**جدول ۱: فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز در مراحل استخراج و خالص‌سازی نسبی**

| مراحل استخراج | عصاره خام (پس از دور اول سانتریفیوژ) | سولفات آمونیوم ۵۰٪ (پس از دور دوم سانتریفیوژ) | سولفات آمونیوم ۸۵٪ (پس از دور سوم سانتریفیوژ) | پس از دیالیز |
|---|---|---|---|---|
| فعالیت ویژه آنزیم | ۰/۰۱۷ | ۰/۰۴۷ | ۰/۳۱ | ۱۲۵/۳۸ |




شکل ۱: تاثیر دما وpH بر فعالیت آنزیم پراکسیداز کدو سبز

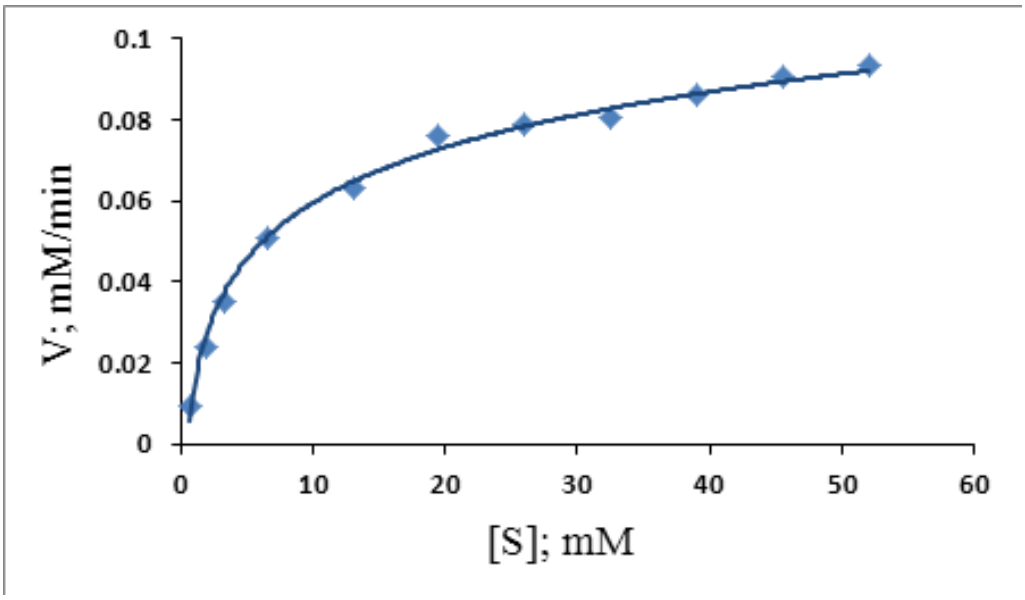
بررسی خصوصیات سینتیکی عصاره آنزیمی نشان داد تغییر فعالیت آنزیم با افزایش pH از ٤ تا ٦/٥ روند افزایشی قابل ملاحظه‌ای داشته و بصورت خطی زیاد می‌شود. اما در حالی که فعالیت آنزیم در گستره pH ٥/٥ تا ۷ در حد نسبتا بالایی حفظ می‌شود، از pH ۷/٥ تا ۹ همبستگی منفی بین افزایش

pHو فعالیت پراکسیدازی دیده می‌شود تا آنجا که محیط‌های بسیار قلیایی موجب افت شدید عملکرد آنزیم می‌گردد (شکل ۱). نتایج اندازه‌گیری‌ها نشان داد که بالاترین میزان فعالیت آنزیم در pH ٦/٥ است.

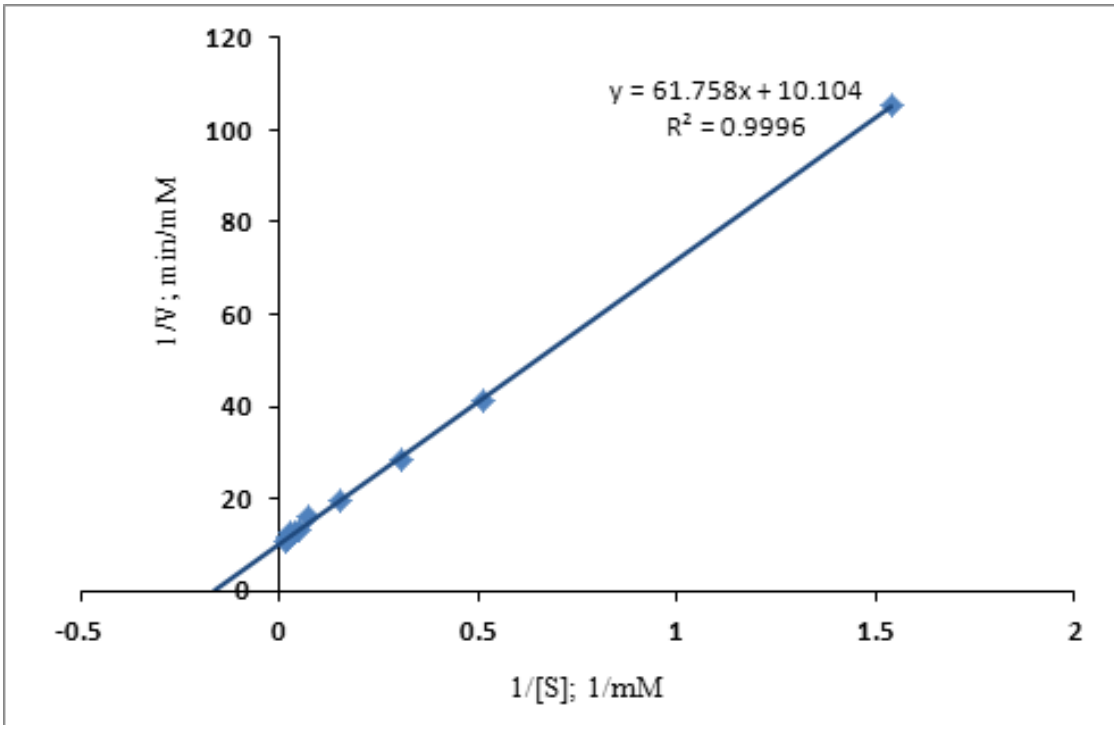
(شکل ۱) میزان تغییر فعالیت آنزیم پراکسیداز استخراج شده را نسبت به افزایش دما در محدوده صفر تا ٦٠ درجه سانتیگراد نشان می‌دهد. در این نمودار بیشترین فعالیت آنزیم که در pH ٦/٥ به دست آمد را ١٠٠ در نظر گرفته و بقیه فعالیت‌ها نسبت به آن محاسبه گردید. مطالعه روند تغییرات بیانگر آنست که در مقایسه با دمای استاندارد (٢٥ درجه سانتیگراد)، افزایش دمای محیط واکنش از صفر تا ٥٠ درجه سانتیگراد باعث افزایش راندمان فعالیت آنزیمی شده است، بطوریکه در دمای ٥٠ درجه سانتیگراد فعالیت آنزیم به حداکثر رسیده و می‌توان آن را بعنوان دمای بهینه فعالیت پراکسیدازی عصاره کدو سبز گزارش نمود.

**تعیین Km و Vmax**

طبق معادله میکائیلیس – منتن با افزایش غلظت سوبسترا جذب مخلوط واکنش افزایش یافته و تا زمانی که آنزیم از سوبسترا اشباع شود این روند ادامه می‌یابد و بعد از اشباع شدن آنزیم از سوبسترا با افزایش غلظت جذب تغییر نمی‌یابد (شکل٢). در (شکل ٢) مقادیر تغییرات سرعت نسبت به غلظت‌های مختلف سوبسترا به وسیله نمودارهای به دست آمده از رسم تغییرات




شکل ٢: نمودار میکائیلس منتن مربوط به فعالیت پراکسیداز در غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن در مقادیر اضافه گایاکول




شکل ۳: نمودار لینوور برگ فعالیت پراکسیداز در غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن در حضور گایاکول. نقطه تلاقی خط رسم شده با محور طول‌ها برابر ۱۶/۰- می باشد که معادل منفی Km/۱ می باشد و ۲۵/۶ میلی مولار به دست می‌آید. نقطه تلاقی خط رسم شده با محور عرضها ۱/۱۰ می باشد که معادل Vmax/۱ بوده و برابر ۱/۰ میلی مول بر دقیقه به دست می آید.

جذب نسبت به زمان بدست آمده است. از رسم نمودار لینوور و برگ Km پراکسیداز کدو سبز ۶/۲۵ میلی مولار و ۰/Vmax۱ میلی مولار بر دقیقه بدست آورده شد (شکل۳).

نتایج تاثیر یون‌های فلزی مختلف بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در (جدول ۲) خلاصه شده است. برخی از یون‌های فلزی مورد آزمایش اثر مهاری کمی داشتند در حالی که یون‌های آهن و سرب اثرات مهاری بیشتری بر فعالیت آنزیم داشتند. این بدان معنی است که اثر مهاری در غلظت یکسان بستگی به ساختار شیمیایی یون‌های فلزی دارد (صبورا و همکاران، ۱۳۸۷).

## بحث و نتیجه‌گیری

آنزیم پراکسیداز از مهمترین آنزیم‌های خانواده اکسیدوردوکتازها بوده که از گروه هم‌پروتئین‌های گلیکوپروتئینی می‌باشد. این آنزیم کاربردهای فراوانی در زمینه‌های تشخیص آزمایشگاهی به روش ایمونواسی در تکنیک الایزا، اندازه‌گیری هورمون‌ها از جمله تیروکسین، انسولین، استروژن، پروژسترون و سم باکتری‌ها دارد علاوه بر آن در تشخیص آنتی‌ژن‌های بافتی و فعال کردن ماکروفاژها در برابر تومورهای سرطانی در انواع روش‌های پاتولوژی،

**جدول ۲: اثر یونهای فلزی بر فعالیت آنزیم پراکسیداز**

| یونهای فلزی | فعالیت نسبی آنزیم |
|---|---|
| $AgNO_3$ | ۹۴/۵۴ |
| $MgCl_2$ | ۹۲/۵۵ |
| KCl | ۹۲/۴۶ |
| $Cu(CH_3COO)_2$ | ۹۰/۹۷ |
| $Pb(CH_3COO)_2$ | ۸۴/۳۲ |
| $FeCl_2$ | ۸۳/۰۳ |

هماتولوژی و ایمونولوژی کاربرد دارد. در ضمن جهت تعیین میزان گلوکز در سرم و ادرار، کلسترول، اوره و اسید اوریک با استفاده از کیت‌های آنزیمی نیز مورد استفاده قرارمی‌گیرد Azevedo et al.,. (2003)

از سال‌های دور پژوهشگران متعددی در مورد پراکسیدازها و کاربردهای آنها مطالعه کرده‌اند. ویژگی‌های سینتیکی ایزوزیم‌های خالص شده یا عصاره خام نقش مهمی در نوع کاربرد آنزیم ایفا می‌کند. پراکسیدازها اساسا همراه باآنزیم‌های دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرند وخالص‌سازی آنها فرآیندی پرهزینه، طولانی مدت ومشکل است. در صورتیکه کاربرد آنها در فرآیندهایی که بمنظور حفظ محیط زیست انجام می‌گیرد، نظیر رفع آلودگی فاضلاب‌های نفتی و صنایع نساجی و پلاستیکی، مستلزم کاهش هزینه‌ها، صرف زمان کمتر و سهولت استخراج می‌باشد. بنابراین به علت کاربرد گسترده این آنزیم در زمینه‌های متفاوت لازم است که اشکال متفاوت آن در بافت‌ها وگونه‌های مختلف گیاهی شناسایی شده وانواعی برگزیده شود که در محدوده وسیع و قابل قبولی از pH و دما فعالیت و پایداری دارند. نتایج ما نشان داد که بطور کلی آنزیم استخراج شده از گیاه *Cucurbita pepo* درpH های خنثی و نسبتا قلیایی فعالیت و پایداری بیشتر و در pH های اسیدی تحمل کمتری را نشان می‌دهد. این دستاورد با نتایج هاینر و همکاران در سال ۲۰۰۱ در مورد حساسیت ایزوزیم ۲ پراکسیداز ترب کوهی نسبت به شرایط اسیدی، مطابقت دارد Hiner et al., (2001). از طرف دیگرpH های بسیار قلیایی (بالاتر از ۹) نیز اثر غیر فعال کننده‌ای مشابه pH های اسیدی دارد. در بررسی آنزیم پراکسیداز ترب کوهی

با استفاده از روش طیف سنجی رزونانس رامان نشان داده شدکه محیط قلیایی، پیوند هیدروژنی بین دو اسید آمینه هیستیدین و آسپارژین را می‌شکند. این دو اسید آمینه درفعالیت آنزیم نقش مهمی ایفا می‌کنند. در نتیجه بنظر می‌رسد هر گونه تغییر در وضعیت آنها آنزیم را غیر فعال می‌کند. امروزه تلاش زیادی صورت می‌گیرد تا منابع جدیدی از بافت-های گیاهی با فعالیت پراکسیدازی مناسب معرفی گردد. در نتیجه آنزیم پراکسیداز کدو سبز می‌تواند به عنوان یک منبع گیاهی در نظر گرفته شود. طبق مطالعات مارکوز و همکاران در سال ۲۰۰۸ pHبهینه پراکسیدازهای منابع گیاهی مختلف در ناحیه‌ی ۳/۵ الی ٦/۵ می‌باشد. pHبهینه برای پراکسیداز برگ درخت خرما ۵، برای پراکسیداز بادام زمینی ۳/٦ و برای وانیل ۳/۸ می‌باشند Ma´rquez et al., (2008). دراین پژوهش pHبهینه پراکسیداز کدوسبز ٦/۵ تعیین شده که با گزارشات مارکوز و همکاران مطابقت دارد.

در مطالعات قبلی دمای ٤۵ درجه سانتیگراد بعنوان بهترین دما برای آنزیم پراکسیداز برگ چای و پوسته سویا گزارش شده است Ma´rquez et al., (2008). در این پژوهش حداکثر فعالیت آنزیم پراکسیداز کدو سبز در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به دست آورده شد. مقدار Km برای پراکسیداز گوجه فرنگی ٤ میلی مولار، برای پراکسیداز نخود سبز ۷/۲ میلی مولار و برای پراکسیداز سویا ۰/۵۸ میلی مولار گزارش شده است Soysal and Soylemez, (2005). در این پژوهش مقدار Km برای پراکسیداز کدو سبز ٦/۲۵ میلی مولار تعیین شد.

فلزات بطور طبیعی به گروه وسیعی از پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و ترکیبات با وزن مولکولی پایین متصل می‌شوند. چنین اتصالی می‌تواند اثرات عمیقی روی جذب، انتقال،ذخیره و ترشح مواد داشته باشد برای مثال مهمترین اثر یون‌های فلزی بر روی پروتئین‌ها، معمولا افزایش پایداری ساختمانی آنها و پایداری ساختار فضایی مورد نیاز برای عملکرد زیستی و یا شرکت در فرآیندهای کاتالیزی آنهاست. از اینرو تأثیر یون‌های فلزی تک ظرفیتی و دو ظرفیتی و سه ظرفیتی در رابطه با تغییر فعالیت آنزیم بررسی شد. درمطالعات گذشته گزارش شده است که یون‌های فلزات واسطه با اسیدهای آمینه در جایگاه فعال پراکسیداز می توانند اتصال برقرار کنند و فعالیت آنزیم را افزایش دهند. برعکس اگر چنین اتصالاتی بتواند از برهمکنش با سوبسترا جلوگیری کند موجب مهار آنزیم می‌شوند. یون‌های فلزات واسطه در غلظت‌های کم موجب اثرات فعال سازی شده درحالیکه در غلظت‌های بالا به دلیل تشکیل کمپلکس اثرات مهاری دارند. به طوریکه یون نیکل در غلظت ۲ میلی مولار

اثر پایدار کننده داشته اما در غلظت ۸ میلی مولار به طور واضحی اثر مهارکنندگی بر روی آنزیم پراکسیداز نشان داده است Nazari et al., (2005). در مطالعات دیگری یون کبالت در غلظت ۰٫۶ میلی مولار موجب پایداری آنزیم شده است (Nazari et al., 2007).

فعالیت آنزیم پراکسیداز در مجاورت یون‌هایی مثل نقره، مس و پتاسیم افزایش می‌یابد. فعالیت آنزیم پراکسیداز از این جهت افزایش می‌یابد تا به عنوان اسمولیت سازگار و آنزیم ضد رادیکال‌های آزاد اکسیژن، ضمن محافظت از ماکرومولکول‌ها و غشاهای سلول، آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن که در اثر ازیاد یون‌ها به وجود آمده را خنثی کند (کریمی، ۱۳۸۷). در این مطالعه نیز افزایش نسبی فعالیت آنزیم در حضور این یون‌های کاتیونی نشانگر خواص ضد اکسیدانی آنزیم پراکسیداز می‌باشد.

با وجود اینکه یون آهن در ساختمان آنزیم موجود می‌باشد اما یون آهن در محلول موجب کاهش فعالیت آنزیم شده و این به دلیل تداخل در تجزیه‌ی پراکسید هیدروژن با یون آهن در محلول می‌باشد. در شرایط سمیت آهن عدم خنثی شدن رادیکال‌های اکسیژن و باقیماندن پراکسید هیدروژن در محلول می‌تواند دلیل کاهش فعالیت آنزیم باشد (پیوندی، ۱۳۹۰). دراین مطالعه نیز در مجاورت یون‌های آهن و سرب حدود ۲۰% فعالیت آنزیم از دست رفته است که اثر مهاری واضحی را بر روی فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان داد.

از تحقیق حاضر نتیجه‌گیری می‌شود که آنزیم پراکسیداز قابلیت جداسازی و خالص‌سازی از گیاه کدو سبز را دارد و ادامه تحقیقات در جهت بهینه‌سازی مراحل خالص‌سازی و شناسایی ایزوانزیم‌های آن با الکتروفورز و وسترن بلات توصیه می‌گردد. از طرفی محدوده فعالیت بیشینه این آنزیم در دماها و pHای است که پراکسیدازهای استخراج شده از منابع گیاهی دیگر فعالیت دارند بنابراین به علت کاربرد گسترده این آنزیم در زمینه‌های مختلف، مشکل بودن، پرهزینه و طولانی مدت بودن فرایند خالص‌سازی، کدو سبز می‌تواند یک منبع ارزان و قابل دسترس برای آنزیم پراکسیداز باشد.

**سپاسگزاری**

نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه مازندران به خاطر حمایت‌های مالی در طی انجام این پروژه کمال تشکر را دارند.

## منابع

Saboura, A., Parsiavash, L., Mousavinezhad, S.Z. & Kiarostami, KH; (2008).Kinetic properties of peroxidase from leaves of *Brassica napus* L. Var. Okapi. Iranian journal of biology. 21(4): 587-599.(in Persian)

Peyvandi, M., Jamakani kamali, Z. & Mirza, M; (2012). The effect of nano Fe chelate and Fe chelate on the growth and activity of some antioxidant enzymes of *Satureja hortensis*.New cellular & molecular biotechnology journal. 2(5): 25-32.(in Persian)

Karimi, H., Abdolzadeh, A. & Sadeghipour, H.R; (2009). Effects of potassium nutrition on *Sesbania aculeate* plants grown in greenhouse under salinity. Journal of agricultural sciences and natural resources. 15(6):158-169. (in Persian)

Anjum Zia, M., Kousar, M., Ahmed, I., Nasir Iqbal, H. M. & Zahid Abbas, R. (2011). Comparative study of peroxidase purification from apple and orange seeds. African Journal of Biotechnology 10(33): 6300-6303.

Azevedo, A. N., Martins, V. C., Prazeres, D. M. F.,Vojinovic, V., Cabral, J. M. S.& Fonseca, L. P. (2003). Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. Biotechnology Annual Review 9: 199-247.

Hiner, A.N., Hernandez-Ruiz, J., Rodriguezlopez, J.N., Arnao M.B., Varon R., Garciacanovas, F. & Acosta, M. (2001). The inactivation of horseradish peroxidase isoenzyme A2 by hydrogen peroxide: an example of partial resistance due to the formation of a stable enzyme intermediate. Journal of Biolgical Inorganic Chemistry 6(5-6): 504–16.

Lowry, O.H., Rosbrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193: 265-275.

Marquez, O., Waliszewski, K. N., Oliart, R. M. & Pardio, V. T. (2008). Purification and characterization of cell wall-boundperoxidase from vanillabean

LWT- Food Science and Technology 41: 1372-1379.

Nazari, K., Mahmoudi, A., Khodafarin, R., Moosavi-Movahedi, A.A. & Mohebi, A. (2005). Stabilizing and suicide-peroxide protecting effect of Ni2+on horseradish peroxidase. Journal of Iranian Chemical Society 2: 232-237.

Nazari, K. & Moosavi-Movahedi, A. A. (2007). A differential scanning calorimetry study on the interaction of Co+2 with horseradish peroxidase Quarterly. Journal of Applied chemistry 1: 7-10.

Obrien, P. J. (2000). Peroxidases Chemico-Biological Interactions 129: 113-139.

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

Soysal, C. & Soylemez, Z. (2005). Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment. Journal of Food Engineering 68: 349-356.