

Kinetic studies and quantitative response of lipoxygenase in strawberry during growth and after storage against environmental effects

Shahryar Saeydian¹, Nabi Khaliliaqdam^{2*}, Sattar Qaderi³

¹ Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran, Email: Saeedyan@pnu.ac.ir

² Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran, Email: nkhaliliaqdam@pnu.ac.ir

³ Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran, Email: zagros8844@gmail.com

Article type:	Abstract
Research article	Lipoxygenase is one of enzymes of interest to chemists. This enzyme is a dioxygenase and is responsible for the oxidation of polyunsaturated fatty acids. With special attention to the functioning of this enzyme and its role, the purpose of this investigation is to study the effect of temperature (on 8 levels), organic acids (on 4 levels), inorganic salts (on 3 levels) and determining the concentration of linoleic substrate (on 13 levels) on three types Strawberries (unripe, ripe and stored). The experiment was conducted as a factorial in the form of a completely random design in three replications, and for data analysis, nonlinear regression analysis and interaction effect cutting were used. The results of the research showed that the highest enzyme response to linoleic acid on all three types of unripe, ripe Anbarmani strawberries was 9.42, 9.49 and 10 mM linoleic acid respectively, and based on these results, the level of 10 mM linoleic acid as the level A suitable concentration was considered as the substrate of the enzyme. The results of the effect of temperature on the activity of lipoxygenase enzyme also showed that for all three types of unripe, ripe and stored strawberries, the maximum activity of the enzyme was at 35 degrees Celsius. While the minimum enzyme activity occurred at 80 degrees Celsius for all three types of strawberries. The results of the effect of organic acids on the activity of lipoxygenase enzyme also indicate the significance of this effect. The highest enzyme activity was in the presence of organic compound, tocopherol in all three types of strawberries and the lowest enzyme activity was in the presence of ascorbic acid. The results also confirmed the significant effect of mineral salts on lipoxygenase activity. Thus, the highest enzyme activity in the presence of calcium chloride with a concentration of 0.1 mM and the lowest enzyme activity was related to the concentration of 1 mM calcium chloride. The results generally show the high induction effect of calcium chloride salt, temperature of 35 degrees and the combination of tocopherol with the presence of a substrate with a concentration of 10 mM linoleic acid.
Article history	
Received: 18.03.2024	
Revised: 20.06.2024	
Accepted: 28.06.2024	
Published: 21.03.2025	
Keywords	
Enzyme	
Linoleic acid Model	
Substrate	

Cite this article as: Saeydian, Sh., Khaliliaqdam, N., Qaderi, S. (2025). Kinetic studies and quantitative response of lipoxygenase in strawberry during growth and after storage against environmental effects. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 77(1): 107-123.



©The author(s)

Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch

Doi: <https://doi.org/10.71890/iper.2025.984454>

مطالعات سینتیک و پاسخ کمی لیپواکسیژناز در توت‌فرنگی در طول رشد و پس از انبارمانی در برابر اثرات محیطی

شهریار سعیدیان^۱، نبی خلیلی اقدم^{۲*}، ستار قادری^۳

^۱ گروه زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، رایانامه: Saedyan@pnu.ac.ir

^۲ گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، رایانامه: nkhaliliaqdam@pnu.ac.ir

^۳ گروه زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، رایانامه: zagros8844@gmail.com

نوع مقاله:	چکیده
مقاله پژوهشی	لیپواکسیژناز یکی از آنزیم‌های مورد توجه شیمیدان‌ها است. این آنزیم یک دی‌اکسیژناز بوده و اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع چندگانه را برعهده دارد. این تحقیق با هدف مطالعه اثر دما (در ۸ سطح)، اسیدهای آلی (در ۴ سطح)، نمک‌های معدنی (در ۳ سطح) و تعیین غلظت سوبسترای لینولئیک (در ۱۳ سطح) روی سه نوع توت‌فرنگی نارس، رسیده و در شرایط انبارمانی انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. نتایج تحقیق نشان داد که بیش‌ترین پاسخ آنزیم به لینولئیک اسید روی هر سه نوع توت‌فرنگی نارس، رسیده و انبارمانی به ترتیب برابر ۹/۴۲، ۹/۴۹ و ۱۰ میلی‌مولار لینولئیک اسید بود. نتایج اثر دما بر میزان فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز نیز نشان داد که برای هر سه نوع توت‌فرنگی نارس، رسیده و انبارمانی، بیشینه فعالیت آنزیم در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد بود. درحالی‌که کمینه فعالیت آنزیم در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد برای هر سه نوع توت‌فرنگی اتفاق افتاد. نتایج اثر اسیدهای آلی بر میزان فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز نیز حاکی از معنی‌دار بودن این اثر بود. بیش‌ترین فعالیت آنزیم در حضور ترکیب آلی، توکروفرول در هر سه نوع توت‌فرنگی و کم‌ترین فعالیت آنزیم در حضور آسکوربیک اسید بود. نتایج همچنین موبد اثر معنی‌دار نمک‌های معدنی روی فعالیت لیپواکسیژناز بود. در بین نمک‌ها، بیش‌ترین فعالیت آنزیم در حضور کلرید کلسیم با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار و کم‌ترین در حضور کلرید سدیم با غلظت ۱ میلی‌مولار بود. نتایج بطور کلی بیانگر اثر القائی بالای نمک کلرید کلسیم، دمای ۳۵ درجه و ترکیب توکروفرول با حضور سوبسترای با غلظت ۱۰ میلی‌مولار لینولئیک اسید بود.
واژه‌های کلیدی:	
آنزیم	
سوبسترا	
لیپواکسیژناز	
لینولئیک اسید	
مدل	

استاد: سعیدیان، شهریار؛ خلیلی اقدم، نبی؛ قادری، ستار. (۱۴۰۲). مطالعات سینتیک و پاسخ کمی لیپواکسیژناز در توت‌فرنگی در طول

رشد و پس از انبارمانی در برابر اثرات محیطی. فیزیولوژی محیطی گیاهی، ۷۷ (۱)، ۱۰۷-۱۲۳.

مقدمه

اکسیداسیون لیپید یک واکنش متابولیکی رایج در تمام سیستم‌های بیولوژیکی است که در فرآیندهای تنظیم‌شده رشد و به عنوان پاسخ به تنش‌های غیرزیستی و زیستی ظاهر می‌شود. محصولات آن از فرآیندهای اکسیداسیون لیپید به دست می‌آیند در مجموع اکسی‌لیپین نامیده می‌شوند. اکسیداسیون اولیه لیپید ممکن است توسط واکنش‌های شیمیایی رخ دهد یا از عمل آنزیم‌ها به دست می‌آید. در گیاهان، این واکنش عمدتاً توسط آنزیم‌های لیپوکسیژناز (LOXs) کاتالیز می‌شود. لیپواکسیژناز (EC, 1.13.11.12 LOX, EC) لیپوئات: اکسیژن اکسیدوردوکتاز (دی‌اکسیژناسیون اسیدهای چرب را با استفاده از اکسیژن مولکولی کاتالیز می‌کنند) (Riley et al. 1996; Veldink et al. 1998; Carrer et al., 2021). نقش فیزیولوژیکی لیپواکسیژناز در گیاهان مشخص نیست، اگرچه شواهد قابل توجهی وجود دارد که نشان دهنده دخالت آن در زخم و سایر پاسخ‌های استرسی است (Rosahl, S. 1996; Singh et al., 2022). همچنین اولین گام در مسیری است که منجر به تشکیل تعدادی از ترکیبات طعم و عطر می‌شود و نشان داده شده است که در ایجاد طعم‌های غیرعادی در بسیاری از سبزیجات در طول ذخیره‌سازی کمک می‌کند (Barrett, 1995; Lončarić et al., 2021). اشکال یا ایزوآنزیم‌های متعددی در بسیاری از بافت‌ها وجود دارد که تفاوت‌هایی را در ویژگی‌های منطقه‌ای، pH بهینه، pI و خواص آنزیمی نشان می‌دهند. بیشتر آن‌ها از یک زنجیره پلی‌پپتیدی منفرد از تقریباً ۸۵۰ اسیدآمینه با وزن مولکولی متوسط ۹۶ کیلودالتون تشکیل شده‌اند (Grechkin, 1998; Cao et al., 2016). اگرچه نقش عملکردی LOX گیاه هنوز تا حد زیادی ناشناخته است، متابولیت‌های اسیدهای چرب غیراشباع در رشد و نمو، پیری گیاه و پاسخ به

بیماری‌ها و زخم‌ها نقش دارند. علاوه بر این، LOX در میوه‌ها و سایر محصولات غذایی گیاهی، در تشکیل ترکیبات طعمی فرار نقش دارد (Veldink et al., 1998; Riley et al., 1996; Ealing, 1994). فعالیت LOX در میوه توت‌فرنگی هم در سیستم‌های غشایی (Thompson et al. 1990; Riley et al., 1996) و هم به صورت محلول (Veldink et al., 1996; Ealing, 1994) گزارش شده است. فعالیت آنزیم توسط سنجش‌های رنگ‌سنجی، مانومتری، پلاروگرافی، اسپکتروفتومتری و نظارت بر بستر نشاندار شده مورد سنجش قرار گرفته است (Thompson et al. 1990, Surrey., 1964 Veldink et al. 1998; Shi et al., 2020). مقادیر متفاوت Km و Vmax به دلیل خلوص و تفاوت‌های سنجش است (Thompson et al. 1990; Veldink et al. 1998). در مطالعه حاضر از توت‌فرنگی خام LOX خام برای بررسی اثر اشکال مختلف سوستر و بافرهای سنجش بر فعالیت آنزیم و همچنین پایداری حرارتی آنزیم در طول رشد و پس از شرایط انبارمانی استفاده شد.

مواد و روش‌ها

توت‌فرنگی خام و توت‌فرنگی رسیده رقم کردستان در همان روز برداشت (اردیبهشت ۱۴۰۱) و برای مطالعه به دانشگاه پیام نور کردستان منتقل شد. مقداری از توت‌فرنگی رسیده قبل از همگن شدن (۷ روز) در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) تا مرحله رسیده روی میز نگهداری شد. 20 Tween, EGTA (اتیلن گلیکول تتراستیک اسید)، لینولئیک اسید، سوربیتول، $MgCl_2$ ، PVPP (پلی وینیل پیرولیدون)، DTT (دی تیوتریتول)، PMSF (فیل متیل سولفونیل فلوراید)، بنزامیدین و اسید آمینوکاپروئیک از سیگما خریداری شد. گلیسرول، اسید بوریک، سدیم فسفات، KOH, NaOH و گلیسین از شرکت بیکر (فیلپسبورگ، نیوجرسی). تریس (N-

به عنوان استاندارد استفاده شد. هموژن حاصله برای ارزیابی فعالیت لیپواکسیژناز توت فرنگی خام (RW-LOX)، توت فرنگی رسیده (RP-LOX) و فعالیت LOX توت فرنگی پس از ذخیره سازی (ST-LOX) استفاده شد.

تعیین پروتئین: تعیین پروتئین عصاره بر اساس روش Bradford (۱۹۷۶) انجام شد. منحنی کالیبراسیون با IgG (گاما گلوبولین پلاسما گاوی) به عنوان استاندارد تعیین شد.

اسیدیته بهینه: pH بهینه برای اسید لینولئیک در ۶/۵ رخ می دهد، در حالی که برای اسید لینولئیک ۶/۷۵ است. pH بهینه آنزیم LOX از منابع دیگر در محدوده وسیع ۵.۵ - ۹.۵ pH برآورد شده است. تعیین pH بهینه آنزیم در حضور بافر استات ۰/۱ مولار در pH های مختلف محلول ها انجام شد (Elez-Martínez, et al., 2005; Zhang et al., 2022; Marcus et al., 1988).

دمای مطلوب: اثرات دما (۲۰ - ۷۵ درجه سانتی گراد) بر فعالیت های LOX نیز تعیین شد. با توجه به اینکه توت فرنگی در آب و هوای معتدل و معتدل رشد می کند، دمای مطلوب برای فعالیت LOX بین ۳۰ درجه سانتی گراد تا ۴۰ درجه سانتی گراد، همانطور که در کار حاضر یافت شد، انتظار می رفت. از آنجایی که پردازش حرارتی یا قرار گرفتن طولانی مدت در معرض دماهای بالا احتمالاً تغییرات ارگانولپتیکی نامطلوب را در توت فرنگی ایجاد می کند، استفاده از دمای بالا یک استراتژی موثر برای غیرفعال کردن جزئی LOX است.

آماده سازی بستر: بستر لینولئیک اسید به سه شکل مختلف تهیه شد. در اولین آماده سازی، ۰/۵ میلی متر توپین ۲۰ در ۱۰ میلی لیتر بافر بورات ۰/۱ مولار pH=9 حل شد. سپس ۰/۵ میلی متر اسید لینولئیک در حین اختلاط قطره به قطره اضافه شد. با

MES, trishydroxymethylmethyl glycine)
(مورفولینواتان سولفونیک اسید)، (N-2) EPPS
Hydroxyethylpiperazine-N^o-3-propanesulfonic
MOPS (3-(N-Morpholino) acid)
(Hepes (N-2) - propanesulfonic acid) هیدروکسی-اتیل پپرازین اتان سولفونیک اسید و سدیم استات از آلد ریچ شیمی (شرکت میلوکی آمریکا) خریداری شد.

استخراج آنزیمی: توت فرنگی با آب لوله کشی و سپس آب مقطر شسته شد. چند حلقه ضخیم به صورت عرضی در وسط هر میوه بریده شد. این حلقه ها بلافاصله در محلول ۵۰ میلی مولار فسفات پتاسیم، pH 7.0، حاوی ۰/۱ درصد آسکوربات غوطه ور شدند تا از قهوه ای شدن بافت جلوگیری شود. در مجموع ۵۰۰ گرم توت فرنگی در حالت خام، رسیده و پس از ذخیره سازی توسط فرآیند آسیاب به طور جداگانه مخلوط شدند. مخلوط حاصل با ۸۰۰ میلی متر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار با pH 7.5 مخلوط شد. هموژن خام تحت همزن مکانیکی در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت با استفاده از پنج پالس (هر کدام ۳۰ ثانیه) از دستگاه سونیکاتور (Qsonica، LLC series XL-2000، (USA))، که در تنظیم توان ۵ وات تنظیم شده بود، قرار گرفت. از طریق چهار لایه پنیئر فیلتر شده است. سوسپانسیون حاصل در ۷۰۰۰ x گرم به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب دور ریخته شد و مایع رویی دوباره با سولفات آمونیوم جامد تا ۶۰ درصد اشباع تیمار شد و سپس مایع رویی غیرفعال با سانتریفیوژ در ۷۰۰۰ x گرم به مدت ۲۰ دقیقه جداسازی گردید. رسوب حاصل در حداقل مقدار محلول بافر سدیم فسفات (۵۰ میلی مولار) با pH 7.5 که دو بار در برابر همان بافر به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد دیالیز شده بود، مجدداً معلق شد. عصاره دیالیز شده از نظر محتوای پروتئین با روش Bradford (۱۹۷۶) مورد سنجش قرار گرفت. آلبومین سرم گاوی (BSA)

فعالیت دما و تعیین پایداری حرارتی: برای تعیین دمای بهینه برای فعالیت آنزیم، سنجش LOX در دمای ۲۵-۸۰ درجه سانتی گراد در بافر ۵۰ میلی مولار Tris-HCL، (pH 8.0) با فواصل ۵ درجه سانتی گراد انجام شد. برای ارزیابی پایداری حرارتی، محلول آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب از ۲۵ درجه سانتی گراد تا ۸۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد و سپس واکنش مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در نهایت فعالیت LOX باقی مانده اندازه گیری شد. آزمایش ها در سه تکرار انجام شد. برای تعیین نیمه عمر ($t_{1/2}$)، محلول آنزیمی حاوی ۲۲۰ U/mg تا ۶۰ دقیقه در شرایط بهینه در دماهای ۲۵ درجه سانتی گراد، ۳۰ درجه سانتی گراد، ۳۵ درجه سانتی گراد، ۴۰ درجه سانتی گراد و ۴۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. برای هر بازه ۳۰ دقیقه ای، ۲۰ میکرولیتر از نمونه برای بررسی فعالیت باقیمانده گرفته شد. میزان فعالیت در شروع سنجش ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد. در نهایت، نتایج فعالیت باقیمانده در برابر زمان انکوباسیون به تصویر کشیده شد.

آزمایش مهار لیپوکسیژناز در شرایط آزمایشگاهی: مهار فعالیت لیپوکسیژناز با روش اسپکتروفتومتری گزارش شده توسط Yawer و همکاران تعیین شد (۲۰۰۷). مخلوط واکنش، حاوی محلول ترکیب آزمایشی (محلول مهار)، محلول لیپوکسیژناز در بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH 8.0) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس واکنش با افزودن سوپسترا آغاز شد. پس از ۶ دقیقه، مقدار جذب در طول موج ۲۳۴ نانومتر اندازه گیری شد. از کوئرستین به عنوان مهارکننده استاندارد استفاده شد. درصد مهار فعالیت لیپوکسیژناز به صورت زیر محاسبه شد:

$$\text{مهار (\%)} = (1 - A/B) \times 100$$

بستن فلاسک از هوای اضافی جلوگیری شد. در نهایت، ۱/۳ میلی متر 1 N NaOH اضافه شد و تا زمانی که یک محلول شفاف به دست آمد، هم زده شد. ۹۰ میلی متر بافر بورات اضافه شد و حجم کل با آب به ۲۰۰ میلی متر رسید. آماده سازی سوپسترای دوم بر اساس حل کردن مقدار مساوی اسید لینولئیک (۰/۵ میلی متر) در ۲۰۰ میلی لیتر متانول بدون افزودن مواد شوینده یا بافر بود. در آماده سازی سوم، ۰/۵ میلی متر اسید لینولئیک در ۲۰ میلی متر متانول حل شد و به ۱۸۰ میلی متر مخلوط بافر بورات توین ۲۰ با همین نسبت ها اضافه شد. همچنین، برای تهیه بستر اول، نسبت اسید لینولئیک به توین ۲۰ (۱:۰، ۱:۱، ۱:۱،۵ و ۱:۲) ارزیابی شد.

سنجش LOX: برای تعیین فعالیت LOX از اسپکتروفتومتر جنوی (محدوده ۱۹۰-۸۲۰ نانومتر با پهنای باند ۲ نانومتر) استفاده شد. روش سنجش از رایلی و همکاران (۱۹۹۶) اقتباس شده است. افزایش جذب در ۲۳۴ نانومتر به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به دنبال افزودن ۱ میلی متر محلول سوپسترا به یک کووت حاوی ۱ میلی متر عصاره آنزیمی خام و ۱ میلی متر بافر سنجش (۰/۱ مولار سدیم استات، pH=5.0، ۱۵۰ میلی مولار MES) دنبال شد. pH=6.0، ۵۰ میلی مولار MOPS، pH=7.0، ۰/۲ میلی مولار Hepes-KOH، pH=7.5، ۱۵۰ میلی مولار EPPS-KOH، pH=8.0، ۱۵۰ میلی مولار Tris-HCL، pH=8.5، ۰/۱ مولار بورات، pH=9 و ۵۰ میلی مولار گلیسین-KOH، pH=9.6). فعالیت اختصاصی آنزیم به عنوان مقدار آنزیمی که در یک دقیقه یک واحد تغییر جذب می کند تعریف می شود. با استفاده از همان روش سنجش با تهیه بستر اول با نسبت LA:Tween 20:1:1.5، مقادیر V_{max} و K_m نیز با غلظت های مختلف بستر (۷۲/۱-۴/۶ میلی مولار) تعیین شد.

در جایی که A فعالیت آنزیم بدون بازدارنده است، B فعالیت در حضور بازدارنده است. IC50 به عنوان غلظت عصاره های گیاهی و داروهای شیمیایی مورد نیاز برای مهار فعالیت لیپوکسیژناز تا ۵۰٪ تعیین شد.

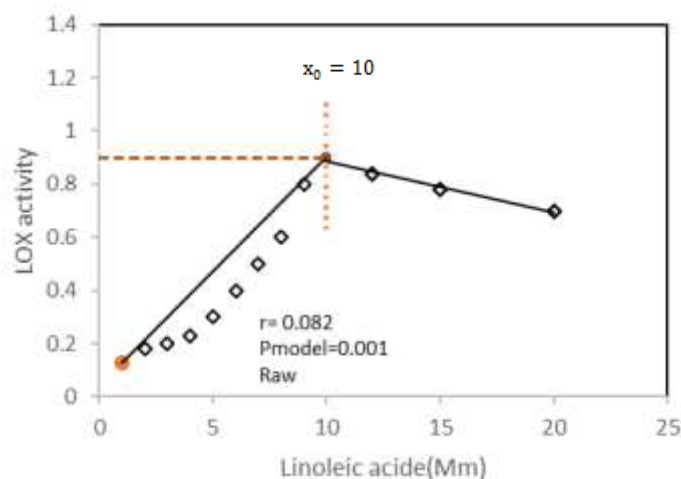
محلی سازی بافت فعالیت LOX: عصاره آنزیمی خام از بافت پریکارپ تهیه شد و برای تمام سنجش های فوق استفاده شد. علاوه بر این، از پوست توت فرنگی، ماده ژل موضعی و میوه کامل برای مقایسه توزیع فعالیت بافت استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری روش های آماری با استفاده از سیستم تجزیه و تحلیل آماری (NC, Cary, SAS Institute) انجام شد. اثر فعالیت ویژه LOX توسط آماده سازی های زیرلایه های مختلف با استفاده از ANOVA با جداسازی میانگین ها توسط آزمون چند دامنه ای Duncan's تعیین شد. تجزیه و تحلیل رگرسیون در نمودار دوگانه متقابل بهترین خط مستقیم برازش را تعیین کرد. همه اندازه گیری ها دو بار انجام شد و نتیجه گزارش شده میانگین آن دو بود. سطح معنی داری برای همه آزمون ها ۵ درصد بود.

اثر یون های فلزی بر فعالیت آنزیم: بررسی اثرات یون های فلزی بر فعالیت لیپوکسیژناز RW-LOX، RP-LOX و ST-LOX، برخی از ترکیبات شیمیایی مانند یون تک ظرفیتی (NaCl)، یون های دو ظرفیتی ($MgCl_2$ ، $FeCl_2$ ، $CaCl_2$ ، $ZnCl_2$) و یون سه ظرفیتی ($FeCl_3$) انتخاب شدند. غلظت های اعمال شده این یون ها در بافر ۵۰ میلی مولار Tris-HCL در pH 7.5 تهیه شدند. غلظت یون های فلزی تهیه شده ۰/۱، ۰/۵ و

۱ میلی مولار بود. مخلوط مورد سنجش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و در نهایت فعالیت RP-LOX، ST-LOX و RW-LOX به طور جداگانه اندازه گیری شد. سنجش مخلوط بدون یون های فلزی به عنوان ۱۰۰ درصد فعالیت در نظر گرفته شد.

نتایج

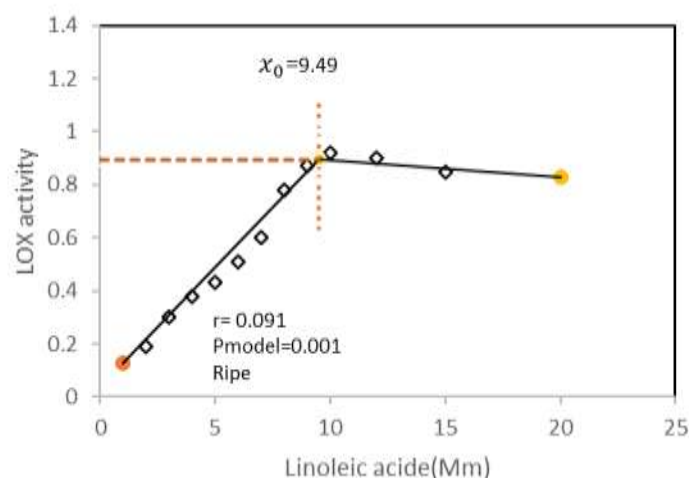
نتایج برازش سطوح مختلف لینولئیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در مرحله نارس توت فرنگی نشان داد که روند اثر لینولئیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز از یک تابع دو تکه ای تبعیت می کند. بدین ترتیب که با افزایش سطوح لینولئیک اسید، فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز تا حد ۱۰ میلی مولار اسید لینولئیک افزایش و پس از آن یک روند نزولی به خود می گیرد. میزان فعالیت متناظر آنزیم لیپوکسیژناز در نقطه $x_0=10$ ، ۰/۹ درون یابی شد (جدول ۱). شیب افزایش فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در قسمت اول مدل، ۰/۰۸۲ و در قسمت دوم مدل، ۰/۰۱۹ واحد پروتئین بر میلی مولار لینولئیک اسید بدست آمد. تغییر روند منحنی برازش سطوح مختلف لینولئیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در مرحله نارس حاکی از پاسخ متفاوت سطوح مختلف لینولئیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز است و با این تفاسیر بیشینه فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در غلظت ۱۰ میلی مولار لینولئیک اسید بود (شکل ۱).



شکل ۱: برازش اثر سطوح مختلف لینولئیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز اکسیداز در مرحله نارس.

(جدول ۱). شیب افزایش فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در قسمت اول مدل، ۰/۰۹۱ و در قسمت دوم مدل، ۰/۰۰۶ واحد پروتئین بر میلی مولار لینولئیک اسید بدست آمد. تغییر روند منحنی برازش سطوح مختلف لینولئیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در مرحله رسیدگی نیز حاکی از پاسخ متفاوت سطوح مختلف لینولئیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز است و با این تفاسیر بیشینه فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در غلظت ۹/۴۹ میلی مولار لینولئیک اسید درون یابی گردید (شکل ۱)

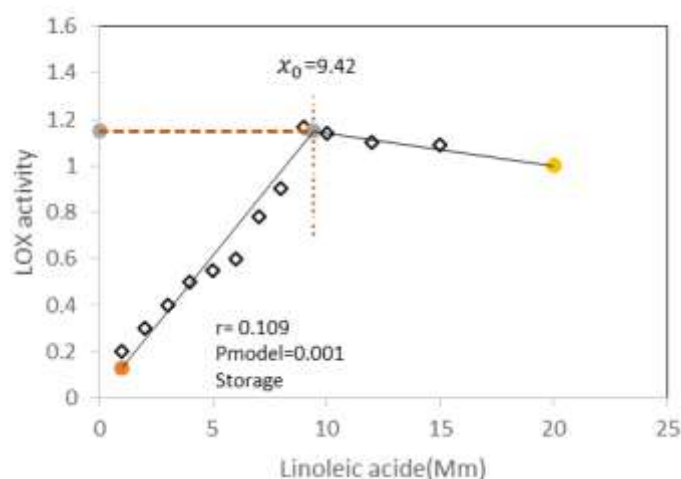
تجزیه رگرسیون غیرخطی سطوح مختلف لینولئیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در مرحله رسیدگی توت فرنگی نیز با توجه به کمی بودن سطوح لینولئیک اسید نشان داد که روند اثر لینولئیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در مرحله رسیدگی پیرو یک تابع دو تکه ای است. بدین ترتیب که با افزایش سطوح لینولئیک اسید، فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز تا حد ۹/۴۹ میلی مولار اسید لینولئیک افزایش و پس از آن تغییرات بصورت کاهشی است. میزان فعالیت متناظر آنزیم لیپوکسیژناز در نقطه $x_0=9.49$ ، درون یابی شد



شکل ۲: برازش اثر سطوح مختلف لینولئیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز اکسیداز در مرحله رسیدگی.

$x_0=9.49$ ، $x_0=8.94$ درون‌یابی شد (جدول ۱). شیب افزایش فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در قسمت اول مدل، 0.109 و در قسمت دوم مدل، 0.014 واحد پروتئین بر میلی‌مولار لینولئیک اسید بدست آمد. تغییر روند منحنی برازش سطوح مختلف لینولئیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در مرحله انبارمانی نیز حاکی از پاسخ متفاوت سطوح مختلف لینولئیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز است و با این تفاسیر بیشینه فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در غلظت 9.42 میلی‌مولار لینولئیک اسید درون‌یابی گردید (شکل ۱).

تجزیه رگرسیون غیرخطی سطوح مختلف لینولئیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در مرحله انبارمانی توت‌فرنگی نیز با توجه به کمی بودن سطوح لینولئیک اسید، نشان داد که روند اثر لینولئیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در مرحله رسیدگی از یک تابع غیرخطی (دوتکه‌ای) پیروی می‌کند. بدین ترتیب که با افزایش سطوح لینولئیک اسید، فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز تا حد 9.42 میلی‌مولار اسید لینولئیک افزایش و پس از آن تغییرات بصورت کاهشی است. میزان فعالیت متناظر آنزیم لیپوکسیژناز در نقطه



شکل ۳: برازش اثر سطوح مختلف لینولئیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز اکسیداز در مرحله انبارمانی.

جدول ۱: نتایج برازش مدل دوتکه‌ای بر اثر سطوح مختلف لینولئیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در مراحل مختلف رسیدگی.

مدل دوتکه‌ای	تیمار	x_0	b_1	b_2	Y'
$Y=a+b_1x_0$	خام	۱۰	0.082	0.019	0.9
$Y=a+b_2x$	رسیده	9.49	0.091	0.006	0.894
	انبار	9.24	0.109	0.014	1.15

در بخش افزایشی مدل ($Y=a+b_1x_0$)، شیب افزایش فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در مرحله انبارمانی بیش‌تر از دو مرحله نارس و رسیدگی بود ($b_1=0.109$). اما در بخش دوم مدل ($Y=a+b_2x$) که بصورت یک روند نزولی بود، شیب کاهش فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز با

بررسی پاسخ فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز به سطوح کمی لینولئیک اسید در هر سه مرحله نارس، رسیدگی و انبارمانی، حاکی از پاسخ متفاوت فعالیت این آنزیم به سطوح مختلف لینولئیک اسید در سه مرحله نارس، رسیدگی و انبارمانی بود (جدول ۱). بدین مضمون که

افزایش سطوح غلظت لینولئیک اسید در مرحله نارس بیش تر از دو مرحله دیگر بود ($b_2=0.019$). برپایه نتایج این بخش از تحقیق، در بخش های دیگر آزمایش از

سطح غلظتی ۱۰ میلی مولار لینولئیک اسید به عنوان بهترین غلظت لینولئیک اسید و همچنین بعنوان سوبسترا استفاده شد.

جدول ۲: تجزیه واریانس اثر دما بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز اکسیداز در مراحل مختلف رسیدگی.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	P _{model}
تکرار	۲	۱۴۲۲	۰/۰۷
دما	۷	۱۸۴۹۱/۶۱	۰/۰۰۱
سطوح انبار	۲	۱۵۶/۲۶	۰/۰۰۱
سطوح انبار × دما	۱۴	۱۳۵/۷۵	۰/۰۰۱
خطا	۴۶	۰/۰۰۶۸	

جدول ۳: مقایسه میانگین اثر متقابل اثر دما بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز اکسیداز در مراحل مختلف رسیدگی.

سطوح دما (درجه سانتی گراد)	انبار	رسیده	خام
۲۵	۱۰۶/۷۰ d	۱۰۳/۳۳ d	۱۰۵/۳۳ c
۳۰	۱۲۰/۷ b	۱۱۹ b	۱۱۶/۳ b
۳۵	۱۴۱ a	۱۳۸/۶۶ a	۱۱۹ a
۴۰	۱۱۵/۷ c	۱۱۰/۳۳ c	۱۰۴/۶۶ c
۵۰	۹۱ e	۸۵/۳۳ e	۸۴/۳۳ d
۶۰	۷۷/۶۶ f	۷۰ f	۶۴ e
۷۰	۲۰/۷ g	۳۸/۳۳ g	۴۱ f
۸۰	۰ h	۱ h	۱/۳۳ g
LSD(0.05)	۱/۴۲	۱/۶۸	۱/۳۷

نیز مشابه با مرحله نارس، بیش ترین فعالیت آنزیم مربوط به دمای ۳۵ درجه سانتی گراد بود و به همین ترتیب در انبارمانی نیز بیشنه و کمینه فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز به ترتیب در دمای ۳۵ و ۸۰ درجه سانتی گراد بدست آمد.

نتایج تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف اسیدهای آلی (توکروفرول، بنزوئیک اسید، نیکوتامین و آسکوربیک اسید) بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در سطوح مختلف نارس، رسیدگی و انبارمانی توت فرنگی نشان داد که اثر اسیدهای آلی و سطوح مختلف رسیدگی بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز معنی دار بود. ضمن اینکه اثر متقابل اسیدهای آلی و سطوح

نتایج تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف دمایی بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در سطوح مختلف نارس، رسیدگی و انبارمانی توت فرنگی نشان داد که اثر دما و سطوح مختلف رسیدگی بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز معنی دار بود. ضمن اینکه اثر متقابل دما و سطوح مختلف رسیدگی نیز در سطح یک درصد معنی دار گردید (جدول ۲). بر همین پایه و با توجه به معنی دار شدن اثر متقابل دما و سطوح مختلف رسیدگی، نتایج برش دهی اثر متقابل نشان داد که در مرحله نارس، بیشینه فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و کم ترین فعالیت آنزیم در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد اتفاق افتاد (جدول ۳). در مرحله رسیدگی

مختلف رسیدگی نیز در سطح یک درصد معنی دار شد (جدول ۴). نتایج برش دهی اثر متقابل اسیدهای آلی و سطوح مختلف رسیدگی بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز نیز نشان داد که توکروفرول در هر سه سطح رسیدگی دارای بیشینه تاثیر بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز بوده است (جدول ۵). کمینه فعالیت آنزیم

نیز در هر سه مرحله مورد بررسی مربوط به آسکوربیک اسید بود. اختلاف مقادیر بیشینه و کمینه اثر توکروفرول و آسکوربیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز بسیار زیاد و بعنوان مثال در مرحله نارس حدود ۳۲/۱۴ برابر بیش تر بود.

جدول ۴: تجزیه واریانس اثر اسیدهای آلی بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز اکسیداز در مراحل مختلف رسیدگی.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	P _{model}
تکرار	۲	۰/۰۸	۰/۲۷۴
اسید آلی	۳	۳۱/۴۳	۰/۰۰۱
سطوح انبار	۲	۰/۵۵۵	۰/۰۰۱
سطوح انبار × اسید آلی	۶	۰/۱۵۰	۰/۰۰۱
خطا	۲۲	۰/۰۰۶۲	

جدول ۵: مقایسه میانگین اثر متقابل اثر اسیدهای آلی بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز اکسیداز در مراحل مختلف رسیدگی.

تیمارها	انبار	رسیده	خام
توکروفرول	۳/۷ a	۴/۱ a	۴/۵ a
بنزوئیک اسید	۲/۱ b	۲/۴۶ b	۲/۹۳ b
نیکوتیامین	۰/۳۹۳ c	۰/۴۱ c	۰/۴۴ c
آسکوربیک اسید	۰/۱۱۳ d	۰/۱۲ d	۰/۱۴ d
LSD (0.05)	۰/۱۵۲	۰/۱۳	۰/۱۶

نمک آلی بیشینه اثر بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز مربوط به سطح غلظتی ۱ میلی مولار نمک بود و کمینه اثر در هر سطح غلظتی از هر نمک مربوط به غلظت ۰/۱ میلی مولار نمک بود. بعبارت دیگر غلظت بالاتر نمک اثر بیش تری بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز داشته است. از طرفی در مقایسه بین نمک ها، بیش ترین فعالیت آنزیم در حضور کلرید کلسیم ۰/۱ میلی مولار و کم ترین فعالیت در کلرید سدیم یک میلی مولار بدست آمد. در بین سطوح مختلف رسیدگی (نارس، رسیدگی و انبارمانی) نیز بیش ترین فعالیت آنزیم در تیمار انبارمانی مشاهده شد (جدول ۷).

نتایج تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف نمک های معدنی (کلرید کلسیم، کلرید سدیم و کلرید روی، هر کدام در سه سطح غلظتی) بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در سطوح مختلف نارس، رسیدگی و انبارمانی **توت فرنگی** نشان داد که اثر نمک های معدنی و سطوح مختلف رسیدگی بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز معنی دار بود. همچنین اثر متقابل نمک های معدنی و سطوح مختلف رسیدگی نیز در سطح یک درصد معنی دار شد (جدول ۶). نتایج برش دهی اثر متقابل اسیدهای آلی و سطوح مختلف رسیدگی بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز نیز نشان داد که برای هر

جدول ۶: تجزیه واریانس اثر نمک‌های معدنی بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز اکسیداز در مراحل مختلف رسیدگی.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	P _{model}
تکرار	۲	۱/۸۶	۰/۱۳۴
نمک‌های معدنی	۸	۸۰۷۸/۲۷	۰/۰۰۱
سطوح انبار	۲	۱۷۵۶/۷۶	۰/۰۰۱
سطوح انبار × نمک معدنی	۱۶	۲۰/۶۵	۰/۰۰۱
خطا	۳۲	۱/۸۷	

جدول ۷: مقایسه میانگین اثر متقابل اثر نمک‌های معدنی بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز اکسیداز در مراحل مختلف رسیدگی.

نمک‌های معدنی در انبار	سطوح	انبار	رسیده	خام
CaCl ₂	۰/۱	۱۵۴/۶ a	۱۴۴/۶ a	۱۳۵ a
	۰/۵	۱۳۵/۶ b	۱۲۲ b	۱۱۵ b
	۱	۱۰۸/۳ c	۹۸ c	۹۲ c
ZnCl ₂	۰/۱	۹۴/۶۶ d	۸۸ d	۸۲ d
	۰/۵	۸۵/۳۳ e	۸۰/۶ e	۷۷ e
	۱	۶۶ g	۶۲/۳ g	۵۴ h
NaCl ₂	۰/۱	۸۵/۳ e	۷۹/۳۳ e	۷۰ f
	۰/۵	۷۶/۳۳ h	۷۱/۳۳ f	۶۰ g
	۱	۶۱/۳۳ i	۵۵/۳۳ h	۴۰ i
LSD (0.05)		۱/۶۳	۱/۶۸	۱۶/۱

جدول ۸: تجزیه واریانس فعالیت سینتیکی آنزیم لیپوکسیژناز اکسیداز در مراحل مختلف رسیدگی.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	خام
تکرار	۲	۰/۰۰۱۲**	۰/۱۰۷۷**
تیمار	۲	۰/۰۰۵۲**	۱/۶۱۷**
خطا	۴	۰/۰۰۰۰۴	۰/۰۰۱۱

جدول ۹: مقایسه میانگین پارامترهای سنتیکی آنزیم لیپوکسیژناز اکسیداز در مراحل مختلف رسیدگی.

صفات/تیمار	Catalytic efficiency	V _{max}	K _m
خام	۰/۱۲۶ c	۱/۲۳ a	۶/۶۳۶ a
رسیده	۰/۱۶ b	۰/۹۴ a	۵/۹۶۶ b
انبار	۰/۲۱ a	۰/۸۵ a	۵/۱۶۶ c
LSD (0.05)	۰/۱۵۰	۰/۴۱۸	۰/۷۵۶

نتایج تجزیه واریانس بررسی فعالیت سینتیکی آنزیم لیپوکسیژناز براساس مدل مکائلیس متن نشان داد که اثر مراحل مختلف انبارمانی بر ثابت مکائلیس متن و

کارایی کاتالیتیکی آنزیم معنی دار بود در حالیکه اثر آن بر سرعت واکنش آنزیم معنی دار نشد (جدول ۸). به بیان دیگر براساس نتایج مقایسه میانگین بیشینه ضریب

ثابت مدل در فرم نارس توت‌فرنگی و کمینه آن در زمان انبارمانی میوه توت‌فرنگی رخ داد (جدول ۹) و بالعکس حداکثر کارایی کاتالیتیکی مدل در زمان انبارمانی میوه و کم‌ترین مقدار کارایی کاتالیتیکی در فرم نارس میوه توت‌فرنگی اتفاق افتاد. این درحالی بود که با وجود اختلاف در سرعت واکنش آنزیم در سطوح مختلف انبارمانی، اما اختلاف بین سرعت واکنش آنزیم در حالت‌های مختلف انبارمانی میوه توت‌فرنگی، به لحاظ آماری معنی‌دار نشد.

بحث

لیپواکسیژناز دسته‌ای از آنزیم‌های حاوی آهن به حساب آمده که فرایند کاتالیز اکسیژناسیون اسیدهای چرب از نوع غیراشباع را بر عهده دارند. آنزیم لیپواکسیژناز در گیاهان، جانوران و قارچ‌ها وجود دارند. بیش‌تر لیپواکسیژنازهای گزارش شده در جانوران، لیپواکسیژناز مختص اسیدآراشیدونیک هستند. آنزیم فسفولیپاز، فسفولیپیدهای استریفیه داخل غشای سلولی را به اسید آراشیدونیک تبدیل نموده که خود از نوع غیراستریفیه می‌باشند. در ادامه آنزیم سیکلواکسیژناز اسید آراشیدونیک را به پروستاگلاندین تبدیل نموده که پیش‌سازی برای بیوسنتز دیگر پروستاگلاندین‌ها به حساب می‌آیند. آنزیم لیپواکسیژناز موجب تبدیل آراشیدونیک اسید به لکوترین‌ها می‌شود. از این رو مطالعه در مورد جزئیات مکانیسمی این دسته از آنزیم‌ها و متابولیسم محصولات پراکسیدی آن‌ها و همچنین بررسی مهارکننده‌های مناسب برای آنزیم‌های مذکور بسیار حائز اهمیت می‌باشد. در این مطالعه، از میان بافرهای سنجش ارزیابی شده، (Tris-HCl pH 7.5) از نظر فعالیت ویژه LOX خام بهترین بود. بافرهای MOPS (pH 7.0) و MES (pH 6.0) نیز در حد مناسبی جهت انجام فعالیت آنزیمی مناسب نشان دادند، در حالی که

بافرهای Glycine-KOH (pH 9.0) و Borate (pH 9.0) کم‌ترین فعالیت آنزیم را داشتند. بررسی سینتیکی آنزیم لیپواکسیژناز به جهت خالص‌سازی انسانی از لوکوسیت‌های انسانی نیز با استفاده از بافر Tris-HCl (pH 7.5) انجام شده است (Richards et al., 1997; Park et al., 2020). مقدار pH بهینه در حدود ۶-۶/۵ در چندین مطالعه گزارش شده است (Thomson et al., 1990, Lauriere et al. 1993, Ealing, 1994). آنالیز فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز دانه کنجد نیز نشان داد که pH بهینه آنزیم ۷ است و فعالیت آنزیم در محدوده pH‌های اسیدی و قلیایی کاهش یافته است (Marvian-Hosseini and Asoodeh, 2014). مقدار بسیار کم فعالیت در بافر بورات ممکن است به دلیل (pH 9.0) و ماهیت آن (بافر غیرآلی) باشد. پنج بافر با مقادیر pH مختلف که برای فعالیت خاص LOX ارزیابی شدند، همگی مقادیر متفاوتی را نشان دادند، و بافر Tris-HCl برای آنالیزهای بعدی انتخاب شد. اولین آماده‌سازی با نسبت ۱:۱ لینولئیک اسید: توئین ۲۰ و ۱:۱ لینولئیک اسید: توئین ۲۰ به ترتیب فعالیت ویژه ۰/۸۳ و ۰/۷۵ واحد بر میلی‌گرم پروتئین را نشان دادند. بنابراین از نتایج می‌توان چنین استنباط کرد که وقتی اسید لینولئیک و لینولئیک میسل‌هایی با مقدار کافی توئین ۲۰ تشکیل می‌دهند، مناسب‌ترین آن‌ها برای واکنش هستند، در حالی که مقادیر بسیار زیاد و کم ماده شوینده (توئین ۲۰) می‌تواند باعث حلالیت انتشار شود. بر اساس این نتایج، سوسترهای با نسبت ۱:۱ لینولئیک اسید: توئین ۲۰ و اسید لینولئیک: توئین ۲۰ برای بقیه آنالیزها انتخاب شد. لیپواکسیژنازها نقش بارزی در طی جوانه زنی داشته که منجر به اکسیداسیون خاص لیپیدهای ذخیره‌ای و شروع مصرف لیپیدها به عنوان منبع انرژی و کربن مورد نیاز جهت رشد گیاه دارند. در گیاهان، اسید لینولئیک و لینولئیک به عنوان بسترهای LOX عمل می‌کنند.

LOX واسطه بیوسنتز JA است و به عنوان بیومارکر استرس در برابر استرس‌های قارچی، باکتریایی، آفات و عوامل غیر زنده از جمله نمک، گرما، سرما، خشکسالی و تشعشع عمل می‌کند. علاوه بر این، LOX همچنین باعث جوانه زدن بذر، رشد و تشکیل گامتوفیت نر می‌شود (Singh et al., 2022). نتایج برازش سطوح مختلف لینولئیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در مرحله نارس توت‌فرنگی بیانگر این موضوع است که با افزایش سطوح غلظتی لینولئیک اسید، فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز تا حد ۱۰ میلی‌مولار اسید لینولئیک با افزایش همراه بوده و در ادامه یک روند نزولی را نشان می‌دهد (شکل ۱). درون‌یابی میزان فعالیت متناظر آنزیم لیپوکسیژناز نشان‌دهنده تغییر روندی است که منحنی برازش سطوح غلظتی لینولئیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در مرحله نارس نشان می‌دهد که بیانگر پاسخ متفاوت سطوح مختلف لینولئیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در مرحله نارس بوده، به گونه‌ای که بیشینه فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در غلظت ۱۰ میلی‌مولار لینولئیک حاصل آمد.

همین بررسی‌ها در مرحله پس از ذخیره سازی و انبارمانی توت‌فرنگی بر اساس کمی بودن سطوح لینولئیک اسید یک روند تابع غیرخطی (دو تکه-ای) را نشان داد که درون‌یابی میزان فعالیت متناظر آنزیم لیپوکسیژناز بیانگر تغییر روند منحنی برازش در مرحله انبارمانی و نیز بیانگر پاسخ متفاوت سطوح مختلف لینولئیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز می‌باشد. بر اساس نتایج حاصله پاسخ فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز به سطوح کمی لینولئیک اسید در هر سه مرحله نارس، رسیدگی و انبارمانی، بیانگر پاسخ متفاوت فعالیت این آنزیم به سطوح مختلف لینولئیک اسید در هر سه مرحله است به گونه‌ای که شیب

کاهش فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز با افزایش سطوح غلظت لینولئیک اسید در مرحله نارس بیش‌تر از دو مرحله دیگر بود ($b_2=0.019$). برپایه نتایج این بخش از تحقیق، در بخش‌های دیگر آزمایش از سطح غلظتی ۱۰ میلی‌مولار لینولئیک اسید به‌عنوان بهترین غلظت لینولئیک اسید و همچنین به‌عنوان سوبسترا استفاده شد. در بررسی پایداری حرارتی آنزیم در دماهای مختلف در شرایط خام، لیپواکسیژناز در توت‌فرنگی نارس به سرعت در دمای ۸۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد غیرفعال شد که دلیلی بر حفظ ساختار آنزیمی لیپوکسیژناز و مقاومت ساختاری آنزیم در دماهای بالا است به گونه‌ای که در دمای ۷۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد ساختار آنزیم کامل دنا توره شده و فعالیت آنزیم از بین می‌رود. بر اساس نتایج حاصله LOX خام در محدوده دمای اتاق فعال است و فعالیت بیش‌تری تا دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به دست می‌آید که به طور طبیعی روی سوبستراها عمل می‌کند. با افزایش زمان نگهداری، اثر حرارتی بر ساختار LOX منجر به کاهش کم‌تری در فعالیت آنزیم در مقایسه با RP-LOX و RP-LOX شد، بنابراین با افزایش زمان نگهداری تا ۷ روز، پایداری آنزیم افزایش یافت. نتایج تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف دمائی بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در سطوح مختلف نارس، رسیدگی و انبارمانی توت‌فرنگی نشان داد که اثر دما و سطوح مختلف رسیدگی بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز معنی‌دار بود. ضمن اینکه اثر متقابل دما و سطوح مختلف رسیدگی نیز در سطح یک درصد معنی‌دار گردید. بر همین پایه و با توجه به معنی‌دار شدن اثر متقابل دما و سطوح مختلف رسیدگی، نتایج برش‌دهی اثر متقابل، بیانگر این

مساله است که در مرحله نارس، بیشینه فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و کم‌ترین فعالیت آنزیم در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد اتفاق افتاد. در مرحله رسیدگی نیز مشابه با مرحله نارس، بیش‌ترین فعالیت آنزیم مربوط به دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد بود و به همین ترتیب در انبارمانی نیز بیشینه و کمینه فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز به ترتیب در دمای ۳۵ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد بدست آمد. لذا می‌توان نتیجه گرفت که این آنزیم در برابر گرما نسبتاً مقاوم است چرا که نگهداری آنزیم تا دمای ۳۵ درجه حتی با افزایش فعالیت و افزایش مقاومت نیز همراه است و افزایش درجه حرارت محیط واکنش و محیط نگهداری در ۴۵ درجه و به بالا باعث تخریب ساختار واکنش‌گر آنزیم شده و فعالیت آن را کاهش داده است. دمای بهینه آنزیم نیز ۳۵ درجه سانتی‌گراد حاصل گردید. از آنجا که لیپواکسیژناز موجود در توت‌فرنگی در دماهای ۳۰ تا ۴۰ درجه از خود مقاومت بیش‌تر نشان داده به گونه‌ای که حتی با افزایش فعالیت همراه هستند لذا در بسیاری از کارهای کاربردی در صنعت هم می‌تواند مورد استفاده و بهره‌برداری هم قرار گیرد.

به طور مشابه با نتایج این تحقیق، آنالیز انجام شده بر روی لیپواکسیژناز دانه کنجد نشان داد که دمای اپتیمم آنزیم با توجه به آزمایشات انجام شده ۳۵ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته می‌شود. آنزیم در محدوده دمایی ۲۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد پایداری نشان داد در حالیکه کاهش شدید فعالیت آنزیم در ۶۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (Emin, 2008). مقایسه خواص بازدارندگی اسید بنزوئیک، اسید اسکوربیک و اسید نیکوتین و توکوفرول بر فعالیت لیپوکسیژناز

توت‌فرنگی RP-LOX, RW-LOX و ST-LOX با استفاده از اسید لینولئیک به عنوان یک سوبسترا نشان داد که همه ترکیبات میل ترکیبی به کمپلکس سوبسترا-آنزیم نشان دادند. اسید اسکوربیک بالاترین فعالیت مهار LOX را دارد. مقدار IC_{50} روند RP-LOX > ST-LOX > RW-LOX را نشان داد. آلفا-توکوفرول کم‌ترین فعالیت بازدارنده لیپواکسیژناز را دارد، به ترتیب ۴/۶، ۴ و ۳/۷ میلی‌مولار برای RW-LOX, RP-LOX و ST-LOX حاصل شد. فعالیت مهار لیپوکسیژناز ترکیبات شیمیایی و ترکیب استاندارد به ترتیب اسید اسکوربیک < DL- α < اسید نیکوتینیک < اسید بنزوئیک < توکوفرول کاهش یافت. خطوط موازی برای مهار LOX توسط اسید اسکوربیک در RW-LOX, RP-LOX و ST-LOX مشاهده شد. این اسید ماهیت مهارکننده‌های غیررقابتی را نشان داد. اسید بنزوئیک و اسید نیکوتین و DL- α -توکوفرول مهارکننده‌های غیر رقابتی بودند. نتایج تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف اسیدهای آلی (توکوفرول، بنزوئیک اسید، نیکوتامین و اسکوربیک اسید) بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در سطوح مختلف نارس، رسیدگی و انبارمانی توت‌فرنگی نشان داد که اثر اسیدهای آلی و سطوح مختلف رسیدگی بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز معنی‌دار بود. ضمن اینکه اثر متقابل اسیدهای آلی و سطوح مختلف رسیدگی نیز در سطح یک درصد معنی‌دار شد. نتایج برش‌دهی اثر متقابل اسیدهای آلی و سطوح مختلف رسیدگی بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز نیز نشان داد که توکوفرول در هر سه سطح رسیدگی دارای بیشینه تاثیر بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز بوده است. کمینه فعالیت آنزیم نیز در هر سه

مرحله مورد بررسی مربوط به آسکوربیک اسید بود. اختلاف مقادیر بیشینه و کمینه اثر توکروفرول و آسکوربیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز بسیار زیاد و بعنوان مثال در مرحله نارس حدود ۳۲/۱۴ برابر بیش تر بود. به طور مشابه در گیاه سویای تحت تنش نیکل نیز کاربرد آسکوربیک اسید باعث کاهش فعالیت لیپوکسیژناز و در نتیجه کاهش میزان پراکسیداسیون لیپید شد (Saeidi-Sar et al., 2007). از آنجایی که برخی از یون های فلزی به عنوان کوآنزیم یا کوفاکتور برای آنزیم های مختلف مانند LOX شناخته شده اند.

نتایج بررسی اثر یون های فلزی بر فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز نشان داد که یون دو ظرفیتی مانند CaCl_2 فعال کننده لیپواکسیژناز می باشد و به ویژه در غلظت ۰/۱ میلی ولار CaCl_2 فعالیت لیپواکسیژناز افزایش یافت و در مقایسه با شاهد (بدون یون های فلزی) به ۱۳۵، ۱۴۸ و ۱۲۸ درصد رسید. با افزایش غلظت CaCl_2 تا ۰/۵ و ۱ میلی مولار، فعالیت لیپواکسیژناز کاهش یافت، اما فعالیت آن ها بالاتر از شاهد بود. فعالیت ST-LOX، RP-LOX و RW-LOX لیپواکسیژناز در حضور ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی مولار NaCl کاهش یافت، بنابراین برای RW-LOX به ۷۰، ۶۰ و ۴۰ درصد و برای RP-LOX به ۸۰، ۷۱ و ۵۵ درصد و برای ST-LOX به ترتیب به ۸۵، ۷۶ و ۶۲ درصد رسید. حداکثر فعالیت لیپوکسیژناز برای توت فرنگی پس از ذخیره سازی در حضور کلرید کلسیم و حداقل فعالیت لیپوکسیژناز برای RW-LOX در حضور NaCl ۱ میلی مولار به دست آمد. طبق نتایج حاصله، یون های تک ظرفیتی و سه ظرفیتی مهارکننده های لیپواکسیژناز و یون های دو ظرفیتی به جز ZnCl_2 فعال کننده های لیپواکسیژناز هستند. فعال شدن لیپوکسیژناز توت فرنگی در حضور یون های فلزی به ترتیب

$\text{NaCl} < \text{ZnCl}_2 < \text{CaCl}_2$ بود. نتایج سایر محققان نیز موید این نتایج بود (Aberomand et al., 2013). بر اساس آنالیز لیپواکسیژناز دانه کنجد توسط Marvian Hosseini and Asoodeh (۲۰۱۴) اثر یون دو ظرفیتی آهن (Fe^{2+}) بر افزایش فعالیت آنزیم با توجه به کاهش جذب در طول موج ۶۶۰ نانومتر مشاهده گردید، در حالیکه فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز در حضور کاتیون آهن (Fe^{3+}) کاهش یافت و همچنین فعالیت آنزیم با انکوباسیون در حضور یون روی افزایش و در حضور یون کبالت کاهش یافت. در نمودار مایکلیس متون توت فرنگی فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز در حالت میوه نارس، داده ها برای تعیین بهترین برازش خط هذلولی نظری تجزیه و تحلیل شد. نتایج مقایسه، ثابت میکائیلیس آنزیم ۶/۵ میلی مولار با مقدار $V_{\max}$ 0.9 واحد بر میلی گرم پروتئین در توت فرنگی نارس است.

ثابت میکائیلیس آنزیم در توت فرنگی رسیده ۵/۸ میلی مولار با مقدار $V_{\max}$ 0.95 واحد بر میلی گرم پروتئین به دست آمد، اما این پارامترهای سینتیکی در توت فرنگی پس از انبارمانی به ترتیب به ۵ میلی مولار و ۱/۱ واحد بر میلی گرم پروتئین برای ثابت میکائیلیس و بیشینه سرعت آنزیمی در حضور اسید لینولئیک به عنوان سوبسترا رسید. پارامترهای سینتیکی در توت فرنگی نارس، توت فرنگی رسیده و پس از انبارمانی در حضور اسید لینولئیک به عنوان سوبسترای دوم برآورد شد. بنابراین، ثابت میکائیلیس آنزیم ۶/۸ میلی مولار با مقدار $V_{\max}$ 0.81 واحد بر میلی گرم پروتئین در توت فرنگی نارس و ثابت میکائیلیس آنزیم در توت فرنگی رسیده ۶/۲ میلی مولار با مقدار $V_{\max}$ 0.92 واحد در میلی گرم پروتئین است و این پارامترهای سینتیکی در توت فرنگی انبارمانی شده به ۵/۴ میلی مولار و ۰/۹۹ واحد در میلی گرم پروتئین برای ثابت میکائیلیس و $v_{\max}$ رسید. تاییدیه این

فرایند جوانه زنی و رشد در گیاهان نقش بسزایی دارند و بر همین اساس بررسی فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاه ضروری می باشد. فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز برای هر سه نوع توت فرنگی نارس، رسیده و انبارمانی، دمای ایتیم یکسانی داشته و پایداری آنزیم تا دماهای بالا مشاهده گردید که بیانگر پایداری نسبی دمایی لیپوکسیژناز است. افزایش زمان انبارمانی موجب کاهش فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز نسبت به زمانهای رسیده و نارس گردید که اهمیت لیپوکسیژناز را در مراحل رشد اولیه تا زمان رسیدگی نشان می دهد. اثرات مختلف مهارکنندگی و فعال کنندگی یون های فلزی بر روی فعالیت لیپوکسیژناز بیانگر حساسیت ساختاری آنزیم در جهت طراحی و کنترل فعالیت لیپوکسیژناز در زمانهای مختلف رشد خواهد بود.

تحقیق این است که افزایش زمان انبارمانی موجب کاهش فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در پوست میوه های سه رقم انار باغملک شد (دهقانی نژاد و همکاران، ۱۳۹۹). مطالعات قبلی مقادیر ثابت میکائیلیس را از ۰/۱۵ تا ۴/۱ میلی مولار و مقادیر V_{max} از ۰/۱۸۶ تا ۷/۴ واحد بر میلی مولار گزارش کرده اند (Thompson et al. 1990, Veldink et al. 1998, Daoud19, Biacs, 1998) مقادیر با سطح خلوص آنزیم و تفاوت در روش سنجش متفاوت است.

نتیجه گیری نهایی

لیپوکسیژنازها آنزیم های اکسیدوردوکتاز موجود در گیاهان و حیوانات، مجموعه ای از آنزیم های ردوکس دی اکسیژناز به عنوان بیومارکر استرس در برابر استرس های قارچی، باکتریایی، آفات و غیر زنده (نمک، گرما، سرما، خشکسالی و تشعشع) بوده که در

References

- Aberomand, M., Kheirollah, A., Nikzamir, A., Malekasgar, A.M. and Alimohammadi, M. (2013). The Inhibitory Effect of KCN, NAN3 and Some Bivalent Ions on Lipoxxygenase Activity of the Purified Human Placental, Iranian. Journal of Pharmaceutical Sciences. 9: 39-45.
- Barrett, D. M. (1995). Theerakulkait, C. Quality indicators in blanched, frozen, stored vegetables. Food Technology. 49: 62-65.
- Biacs, P.A. and Daoud, H. (1987). Characterization of strawberry lipoxxygenase. In: Stumpf PK, Mudd JB, Nes ND, eds. Metabolism, Structure, and Function of Plant Lipids, NY: Plenum Press, 8:425-429.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochemistry. 72: 248-254.
- Cao, S., Chen, H., Zhang, C., Tang, Y., Liu, J. and Qi, H. (2016). Heterologous Expression and Biochemical Characterization of Two Lipoxxygenases in Oriental Melon, Cucumis melo var. makuwa Makino. PloS one, 11(4): e0153801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153801>
- Ealing, P.M. (1994). Lipoxxygenase activity in ripening strawberry fruit pericarp tissue. Phytochem. 36: 547-552.
- Elez-Martínez, P., Soliva-Fortuny, R.C., Gorinstein, S. and Martín-Belloso, O. (2005). Natural antioxidants preserve the lipid oxidative stability of minimally processed avocado purée. Journal of Food Science. 70(5): 325-329.
- Emin Y. (1998). Kinetic Studies with Crude Tomato Lipoxxygenase. Turk Journal Agriculture Forestry. 25:291-296.
- Grechkin A. (1998). Recent developments in biochemistry of the plant lipoxxygenase pathway. Prog. Lipid Res. 37: 317-352.
- Izumi, T., Rådmark, O., Jörnval, H. and Samuelsson, B. (1991). Purification of two forms of arachidonate 15-lipoxxygenase from human leukocytes. European Journal Biochemistry. 18:202(3):1231-8. Doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16495.x. PMID: 1662607.

- Jacobo-Velázquez, D. A., Hernández-Brenes, C., Cisneros-Zevallos, L. and Benavides, J. (2010). Partial purification and enzymatic characterization of avocado (*Persea americana* Mill, cv. Hass) lipoxygenase, Food Research International. 43: 1079-1085.
- Karrer, D., Gand, M., & Rühl, M. (2021). Engineering a lipoxygenase from cyclocybe aegerita towards long chain polyunsaturated fatty acids. AMB Express, 11(1):37. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01195-8>
- Lauriere, C., Droillard, M.J., Rouet-Mayer, M.A. and Bureau, J.M. (1993). Membrane-associated and soluble lipoxygenase isoforms in strawberry pericarp. Plant Physiology. 103:1211-1219.
- Lončarić, M., Strelec, I., Moslavac, T., Šubarić, D., Pavić, V., & Molnar, M. (2021). Lipoxygenase Inhibition by Plant Extracts. Biomolecules, 11(2):152. <https://doi.org/10.3390/biom11020152>
- Marvian-Hosseini, Z., Asoodeh, A. (2017). Biochemical characterization of purified lipoxygenase from sesame (*Sesamum indicum*). International Journal of Food Properties, 20(1): 948-958.
- Marcus, L., Prusky, D. and Jacoby, B. (1998). Purification and characterization of avocado lipoxygenase, Phytochemistry, 27(2): 323-327.
- Park, J. Y., Kim, C. H., Choi, Y., Park, K. M. and Chang, P. S. (2020). Catalytic characterization of heterodimeric linoleate 13S-lipoxygenase from black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). Enzyme and Microbial Technology, 139:109595. <https://doi.org/10.1016/j.enzmtec.2020.109595>
- Richards, K. M. and Marnett, L. J. (1997). Leukocyte 12-lipoxygenase: expression, purification, and investigation of the role of methionine residues in turnover-dependent inactivation and 5, 8, 11, 14-eicosatetraenoic acid inhibition. Biochemistry, 36(22): 6692-6699. <https://doi.org/10.1021/bi963051a>
- Riley, J.C.M., Willemot, C. and Thompson, J.E. (1996). Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening strawberry fruit. Postharvest Biology Technology. 7: 97-107.
- Robinson, D.S., Wu, Z., Domoney, C., Casey, R. (1995). Lipoxygenases and the quality of foods. Food Chemistry. 54: 1, 33-43.
- Rosahl, S. (1996). Lipoxygenases in plants: their role in development and stress responses. Z. Naturforsch. 51: 123-138.
- Saeidi-Sar, S., Khavari-Nejad, R. A., Fahimi, H., Ghorbanli, M. and Majd, A. (2007). Interactive effects of gibberellin A3 and ascorbic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in Glycine, Russian Journal of Plant Physiology. 54:74-70.
- Singh, P., Arif, Y., Miszczuk, E., Bajguz, A. and Hayat, S. (2022). Specific Roles of Lipoxygenases in Development and Responses to Stress in Plants. Plants (Basel). 4; 11(7):979. Doi: 10.3390/plants11070979. PMID: 35406959; PMCID: PMC9002551.
- Surrey, K. (1964). Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity. Plant Physiology. 39: 65-70.
- Svendsen, A. (2004). Enzyme Functionality Design, Engineering, and Screening; Marcel Dekker, Inc: New York, USA.
- Thompson, J.E., Todd, J.F. and Paliyath, G. (1990). Characterization of a membrane-associated lipoxygenase in strawberry fruit. Plant Physiology. 94: 1225-1232.
- Veldink, G.A., Suurmeijer, C.N.S.P., Perez-Gilbert, M., van der Hijden, H.T.W.M. and Vliegthart, J.F.G. (1998). Purification, product characterization and kinetic properties of soluble strawberry lipoxygenase. Plant Physiology Biochemistry. 36: 657-663.
- Yawer, M. A., Ahmed, E., Malik, A., Ashraf, M., Rasool, M. A. and Afza, N. (2007). New lipoxygenase-inhibiting constituents from Calligonum polygonoids. Chemistry and Biodiversity, 4: 1578-1585.
- Zhang, B., Chen, M., Xia, B., Lu, Z., Khoo, K.S., Show, P.L. and Lu, F. (2022). Characterization and Preliminary Application of a Novel Lipoxygenase from *Enterovibrio norvegicus*. Foods, 11:2864. <https://doi.org/10.3390/foods11182864>