داروهای گیاهی، سال هشتم، شماره۳ (ویژه نامه فارسی)، ۱۶۹-۱۷۷
doi: 10.14196/JHD.2018.169

فصل‌نامه داروهای گیاهی
journal homepage: www.jhd.iaushk.ac.ir

بررسی مقایسه‌ای برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی ایزوآنزیم‌های پراکسیداز در گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.)

شیلر شمس[1*]، سارا خاوری نژاد[2]، اکرم عیدی[1]

۱. *گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران؛*

*مسئول مکاتبات (E-mail: Shiler.shams@gmail.com)

۲. *گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران؛*

شناسه مقاله

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۱۰/۱۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۱/۲۰
نوع مقاله: علمی- پژوهشی
موضوع: گیاهان دارویی

کلید واژگان :
- *رزماری*
- *کاتالاز*
- *پراکسیداز*
- *تنش خشکی*
- *پایداری دمایی*

چکیده

مقدمه و هدف: رزماری با نام علمی (*Rosmarinus officinalis* L.) شامل گونه‌هایی است که از ارزش دارویی و غذایی بالایی برخوردار می‌باشند. با توجه به اهمیت سیستم آنزیمی آنتی‌اکسیدانی به عنوان یکی از عوامل مؤثر در افزایش ضریب مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی مختلف، در این تحقیق برخی از خواص بیوشیمیایی آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز گیاه رزماری در سه حالت مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

روش تحقیق: گیاه رزماری پس از تهیه از گلخانه در منزل نگهداری شد و برای حالت زنده به‌طور مستقیم و برای حالت جدا شده از ساقه، ۱۰ روز برگ‌های گیاه در مجاورت هوا قرار گرفت. برای حالت خشک نیز ابتدا ۱۰ روز برگ‌ها در مجاورت هوا قرار گرفت سپس با کمک ماکروویو با توان ۱۰۰٪ و به مدت ۲ دقیقه به طور کامل خشک شد و سپس عصاره‌گیری از هریک به‌صورت جداگانه انجام شد. آنزیم کاتالاز (EC 1.11.1.6) و پراکسیداز (EC 1.11.1.7) از برگ‌های این گیاه با استفاده از بافر فسفات ۰/۱ M با pH ۷/۲ استخراج شدند.

نتایج و بحث: نتایج حاصل از ژل الکتروفورز عصاره رزماری، وجود یک ایزو آنزیم کاتالاز با pH بهینه ۷ و وجود سه ایزو آنزیم پراکسیداز با pH های بهینه ۵ و ۷ در این گیاه را تأیید نمود. در آنزیم پراکسیداز ایزو آنزیم فعال در pH ۵ در مقایسه با ایزو آنزیم فعال در pH ۷ نسبت به افزایش دما در گیاه زنده مقاوم‌تر است. همچنین آنزیم کاتالاز نیز نسبت به پراکسیداز دارای مقاومت بالاتری می‌باشد و طی تنش فعالیت خود را افزایش می‌دهد.

توصیه کاربردی/صنعتی: این پژوهش نشان داد که گیاه رزماری به دلیل وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی چون آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز می‌تواند به عنوان یک منبع ارزان و قابل دسترس برای استخراج این ترکیبات باشد و همچنین نتایج این تحقیق با به دست آوردن راندمان بیشتر مواد مؤثره گیاهی، می‌تواند کمک بزرگی به صنعت داروسازی نماید.

۱. مقدمه

افزایش جمعیت و نیاز مبرم صنایع داروسازی به گیاهان دارویی به‌عنوان مواد اولیه تولید دارو، ناتوانی در تولید مصنوعی پاره‌ای از

داروهای حیاتی توسط صنایع داروسازی و همچنین اهمیت مواد مؤثره گیاهان دارویی در صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی باعث شده که توجه و تحقیق پیرامون این دسته گیاهان به لحاظ کشت، تولید و مصرف از اهمیت خاصی برخوردار باشد. پوشش گیاهی در ایران مخزن عظیمی از گیاهانی است که در امر دارو و درمان کمک‌های فراوانی به مردم کرده است و در زمانی که داروهای مصنوعی با موارد مصرف فراوان و در حاشیه آن عوارض جانبی بی‌شماری که سبب صدمه زدن به‌سلامتی انسان می‌شوند، مورد استفاده سنتی مردم قرار می‌گیرند. گیاهان دارویی یکی از منابع بسیار ارزشمند در گستره وسیع منابع طبیعی ایران هستند که در صورت شناخت علمی، کشت، توسعه و بهره برداری صحیح می‌توانند نقش مهمی در سلامت جامعه، اشتغال‌زایی و صادرات غیرنفتی داشته باشند (Ebrahimkhani ghazi, 2009).

رزماری با نام علمی (*Rosmarinus officinalis* L.) و نام محلی اکلیل کوهی یک گیاه خانگی رایج متعلق به خانواده نعناعیان است (Machado, 2012)، که از منطقه مدیترانه سرچشمه گرفته، بومی اروپای جنوبی و آسیا است و در بسیاری از نقاط جهان رشد می‌کند و توسط اروپایی‌ها به‌عنوان گیاه باغچه‌ای معرفی شده است که علت آن برگ‌های دلپذیر و معطر آن می‌باشد. نام رزماری از دو بخش Ros که کلمه لاتین مشتق شده از شبنم و Marinus به معنی دریا و در مجموع به معنای شبنم دریا گرفته شده است (Begum, 2013). رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) یک گونه آن در جنس رزماری است و یک درختچه همیشه سبز، چند ساله (Alnahdi, 2012)، چوبی و معطر با برگ‌های سوزن مانند است و گل‌هایی به رنگ سفید و صورتی و بنفش یا آبی را در فصل بهار نمایان می‌کند. دو نمونه از رایج‌ترین رزماری‌هایی که در شرایط سخت رشد می‌کنند *Rosmarinus officinalis* Arp and R و *Rosmarinus officinalis* Madelene Hill هستند (Begum, 2013). رزماری حاوی تعدادی از فیتوکمیکال‌ها، از جمله رزمارینیک اسید، کافور، اسید کافئیک، اسید اورسولیک و بتولینیک اسید می‌باشد (Barbut, 1985; Nakatani, 2000). اورسولیک اسید موجود در گیاه رزماری یک ترکیب تری ترپنوئید است که به‌طور گسترده به عنوان یک ماده ضد سرطانی با خواص آنتی‌اکسیدانی شناخته می‌شود (Machado, 2012). این ترکیب، یک ماده نگه‌دارنده است و با توجه به ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی آن در داروسازی، مواد غذایی و صنایع آرایشی بهداشتی کاربردهای فراوان دارد و قادر به محافظت از روغن در برابر فرایندهای اکسیداتیو حتی در دماهای بالا می‌باشد (Boutekedjiret, 2003; Cordeiro, 2013).

کاتالاز یا به‌طور صحیح‌تر هیدروپراکسیداز (EC 1.11.1. 6) یکی از کلاس‌های مورد مطالعه در آنزیم‌ها است. بیش از ۳۰۰ توالی کاتالازی در حال حاضر در دسترس است. یک آنزیم تقریباً رایج در تمام موجودات زنده در معرض اکسیژن (مانند سبزی‌ها، میوه و یا حیوانات) می‌باشد که آب اکسیژنه را به اکسیژن و آب تجزیه می‌کند (Chelikani, 2005) و عملکرد آن به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی باعث حفظ سلول‌هایی مانند پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک در برابر آسیب اکسیداتیو می‌گردد. از این آنزیم‌ها همچنین برای مطالعه گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) که در بیان ژن و آپوپتوز نقش دارند، استفاده می‌شود (Doronicheva, 2007). هیدروپراکسیدازها از سه زیر گروه مختلف آنزیمی به نام کاتالاز، کاتالاز- پراکسیدازهای دو عملکردی و پراکسیداز تشکیل شده‌اند (Tayefi Nasrabadi, 2010).

پراکسیداز (EC 1.11.1.7) یک گلیکوپروتئین حاوی آهن می‌باشد و با توجه به منبع آن، دارای وزن ملکولی در حدود ۳۰-۶۰ کیلو دالتون است (Kim, 1980). پراکسیدازهای محلول در انواع پروسه‌های دفاعی مانند واکنش فوق حساسیت، سنتز لیگنین، اتصال فنل‌ها به گلیکوپروتئین‌ها و تولید فیتوالکسین‌ها نقش دارند و مسئول حذف رادیکال‌های آزاد سلول می‌باشد (Seevers, 1971). اگر چه پراکسیدازها در حضور تعدادی از یون‌های فلزی فعال باقی می‌مانند، اما در گزارش‌هایی نیز مهار آن‌ها توسط یون‌های فلزی روشن است (Keyhani, 2003).

۲. مواد و روش‌ها

تمام مواد مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک تهیه گردید.

۲-۱. *آماده سازی نمونه‌های گیاهی*

بعد از تهیه نهال گیاه رزماری از یک گلخانه موجود در کرج، گیاه در داخل گلدان در مقابل نور مستقیم خورشید نگهداری گردید. جمع‌آوری نمونه‌ها با دقت فراوان صورت گرفت و نمونه برداری از بوته‌هایی بود که دارای برگ‌های سبز و تازه هستند. بعد از جمع آوری نمونه‌ها شاخه، برگ‌های سیاه، سوخته، معیوب و ناسالم از سایر شاخه و برگ‌ها جدا شد.

سپس گیاه رزماری در سه حالت مختلف (زنده، جداشده از ساقه و خشک) از نظر فعالیت آنزیم پراکسیدازی سنجیده شد. در حالت اول بلافاصله بعد از جدا کردن برگ‌ها از ساقه، در حالت دوم ۱۰ روز قبل برگ‌ها را از ساقه جدا کرده و در داخل یخچال نگهداری شد و در حالت سوم ابتدا گیاه را به صورت زیر خشک شد سپس عصاره‌گیری انجام گرفت.

۲-۲. آماده سازی عصاره

جهت آماده سازی عصاره، ابتدا برگ‌ها از سایر بخش‌های گیاه جدا شدند و به‌منظور از بین بردن آلودگی برگ‌ها سه بار توسط آب یک‌بار تقطیر شسته شو گردید و در ادامه ۲ بار نیز توسط بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH ۷/۲ شستشو شدند. برای تهیه عصاره ۱ گرم از برگ‌های رزماری را از گیاه اصلی جدا نموده سپس برگ‌ها را در ۳ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH ۷/۲ به‌طور دستی در هاون چینی هموژنیزه شدند، در ادامه این نمونه به ترتیب با ۳۰۰۰g برای ۱۰ دقیقه و سپس ۳۵۰۰۰g برای ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی شفاف بوده و عصاره خام نامیده می‌شود و از این عصاره برای انجام آزمایش‌های بعدی استفاده شد (Paknia, 2006).

۲-۳. سنجش پروتئین محلول

در این مرحله اندام هوایی گیاه را در ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات سائیده، سپس نمونه فوق سانتریفوژ گردید و محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم در غلظت پروتئین محلول کل، با استفاده از روش Bradford استفاده شد (Bradford, 1976).

۲-۴. تهیه منحنی pH بهینه فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه رزماری

یا به عبارت دیگر تغییرات فعالیت پراکسیدازی عصاره گیاه رزماری در حضور سوبسترای پراکسید هیدروژن (غلظت ۳۸ میلی مولار) و غلظت ثابتی از اودیانیزیدین (۱/۰۵۲ میلی مولار) در pH های مختلف نشان داده شده است (Tayefi Nasrabadi, 2010). برای تهیه منحنی pH آنزیم پراکسیداز موجود در عصاره رزماری و همچنین تعیین pH بهینه آنزیم، از بافر فسفات-سیترات - بورات (T.S. buffer) ۰/۱ مولار در محدوده pH ۳ الی ۱۲ استفاده شد.

۲-۵. سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز

فعالیت آنزیم پراکسیداز از طریق اندازه‌گیری میزان افزایش جذب اودیانیزیدین در حضور پراکسید هیدروژن توسط آنزیم در طول موج ۴۶۰ نانومتر با احتساب ضریب جذب مولی mM-1CM-1 ۱۱/۳ به روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد. استوک محلول اودیانیزیدین (۱/۰۵۲ mM) با حل اودیانیزیدین در آب مقطر تهیه شد. استوک محلول H_2O_2 (۳۸ mM) به‌صورت روزانه در رقت مناسب از ۳۰٪ H_2O_2 در آب مقطر تهیه شد (Morita, 1988). تمام سنجش‌ها با سه بار تکرار انجام پذیرفت و میانگین نتایج به دست آمده گزارش گردید.

۲-۶. سنجش اثر حرارت بر فعالیت آنزیم پراکسیداز

به‌منظور بررسی اثر حرارت بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در عصاره برگ رزماری در حضور پراکسید هیدروژن از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. سنجش در ۷pH و ۵pH به‌صورت مجزا انجام گرفت. ابتدا عصاره به ترتیب در دماهای ۲۵ تا ۷۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد و سپس بلافاصله به ظرف یخ منتقل گردید و برای مدت ۵ دقیقه در یخ نگهداری شد. ابتدا سه میلی‌لیتر از بافر با pH مورد نظر در کووت ریخته شد. در ادامه به ترتیب ۱۰۰µl از عصاره انکوبه شده و ۱۰۰µl اودیانیزیدین به کووت اضافه شد. پس از صفر کردن دستگاه، پراکسید هیدروژن به مخلوط واکنش اضافه گردید. سپس مقدار جذب در ۲۴۰nm به مدت ۳ دقیقه در فواصل زمانی ۱۰ ثانیه اندازه گیری شد. در ادامه سرعت اولیه واکنش در هر دما محاسبه و منحنی فعالیت بر حسب دما رسم گردید (Bradford, 1976).

۲-۷. تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم کاتالاز عصاره برگ رزماری برای سوبسترای پراکسید هیدروژن

مخلوط واکنش حاوی سه میلی لیتر بافر، پراکسید هیدروژن (۳۸ میلی مولار) و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره است. به منظور تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم نظیر Km و Vmax، فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن در pH ۷ اندازه گیری شد. در این روش برای تهیه رقت‌های پراکسید هیدروژن از تکنیک Serial Dilotion استفاده گردید و سپس افزایش جذب در ۲۴۰nm و در فواصل زمانی ۱۰ ثانیه ثبت شد (Ghenaatian, 2002; Paknia, 2006).

۲-۸. بررسی فعالیت کاتالازی عصاره از طریق الکتروفورز

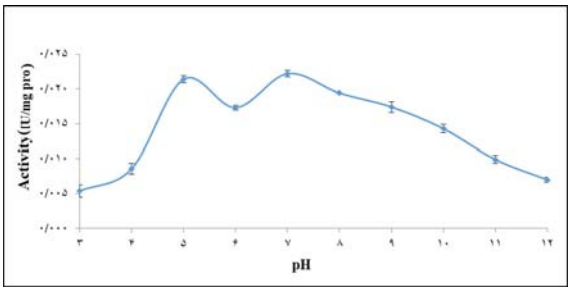
جهت بررسی حداقل تعداد ایزوآنزیم‌های کاتالاز موجود در عصاره رزماری و مطالعه تغییرات مقدار آنزیم در سه حالت نام برده شده از الکتروفورز طبیعی (غیر دناتورانت) با ژل پلی آکریل آمید و رنگ‌آمیزی بر اساس فعالیت آنزیمی طبق روش Woodbury استفاده شد (Paknia, 2006). ژل ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۰/۰۰۳٪ پراکسید هیدروژن انکوبه گردید. آنگاه پس از شستشو با آب دو بار تقطیر به‌وسیله محلول(۱٪)FeCl3 و(۱٪)K3Fe(CN6) به مدت ۱۰ دقیقه رنگ آمیزی گردید (Tayefi Nasrabadi, 2010).

۲-۹. بررسی فعالیت پراکسیدازی عصاره از طریق الکتروفورز

تمامی مراحل مشابه آنزیم کاتالاز است و تنها در نوع رنگ آمیزی اختصاصی باهم متفاوت‌اند. به‌منظور مشاهده‌ی فعالیت پراکسیداز در ژل پلی آکریل آمید بدون دناتوران، ابتدا ژل به مدت ۳۰ دقیقه در داخل ۵۰ میلی لیتر بافر سیترات سدیم ۵۰ میلی مولار با pH ۴/۵ قرار داده شد. در طول این مدت ظرف حاوی ژل تکان داده شد. بعد از اتمام این مرحله بافر را دور ریخته و ۵۰ میلی لیتر بافر سیترات سدیم حاوی پراکسید هیدوژن با غلظت ۰/۰۱۶ مولار به ظرف حاوی ژل اضافه گردید. این بار نیز ژل به مدت ۱۵ دقیقه در حضور پراکسید هیدروژن گرمخانه‌گذاری گردید. در طول این مدت نیز ظرف ظرف تکان داده شد. سپس این محلول را دور ریخته و ژل دو مرتبه با آب دو بار تقطیر شسته شد. سپس ۵۰ میلی لیتر بافر سیترات سدیم حاوی اودیانیزیدین با غلظت ۱/۹ میلی مولار به ژل اضافه گردید. ظرف تا زمان ظهور باندها به‌آرامی تکان داده شد تا بعد از حدود ۵ دقیقه نخستین باند در ژل ظاهر شد (Paknia, 2006).

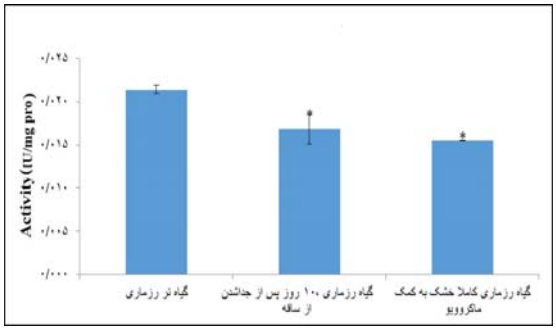
۳. نتایج و بحث

شکل ۱، پروفایل pH یا به عبارت دیگر تغییرات فعالیت پراکسیدازی عصاره گیاه رزماری در حضور سوبسترای پراکسید هیدروژن (غلظت ۳۸ میلی مولار) و اودیانیزیدین (۱/۰۵۲ میلی مولار) در pH های مختلف را نشان می‌دهد. نتایج به دست آمده از این شکل نشان می‌دهد که اولاً فعالیت پراکسیدازی در این گیاه در محدوده وسیعی از pH مشاهده می‌شود. ثانیاً منحنی دارای دو پیک شاخص و مجزا در pH های ۵ و ۷ می‌باشد.

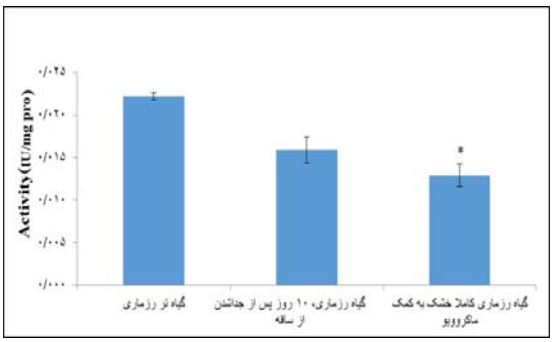


شکل ۱. منحنی pH فعالیت آنزیم پراکسیداز در عصاره برگ رزماری و در حضور سوبسترای اودیانیزیدین. همان‌طور که در شکل مشخص است، pH بهینه برای فعالیت این آنزیم pH های ۵ و ۷ می‌باشد.

سپس این pH ها در دو حالت ۱۰ روز بعد از خشک شدن و خشک شدن کامل (ماکروویو) نیز بررسی گردید (شکل۲ و ۳).



شکل ۲. منحنی مقایسه pH بهینه ۵ در سه حالت مختلف گیاه تر، جدا شده از ساقه (خشک شده به مدت ۱۰ روز) و گیاه کاملاً خشک (ماکروویو). بررسی‌های آماری در سطح احتمال $p < ۰/۰۵$ (درصد معنی داری) به‌صورت ستاره در شکل مشخص است.



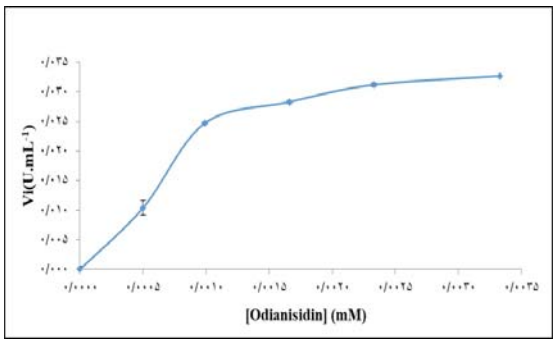
شکل ۳. منحنی مقایسه pH بهینه ۷ در سه حالت مختلف گیاه تر، جدا شده از ساقه (خشک شده به مدت ۱۰ روز) و گیاه کاملاً خشک (ماکروویو) گیاه رزماری. بررسی‌های آماری در سطح احتمال $p < ۰/۰۵$ (درصد معنی داری) به‌صورت ستاره در شکل مشخص است.

جهت بررسی‌های بیشتر، مقادیر بازده کاتالیتیکی (Km و Vmax) آنزیم پراکسیداز عصاره رزماری در این pH نیز اندازه-گیری شد (جدول ۱ و شکل ۴ و ۵).

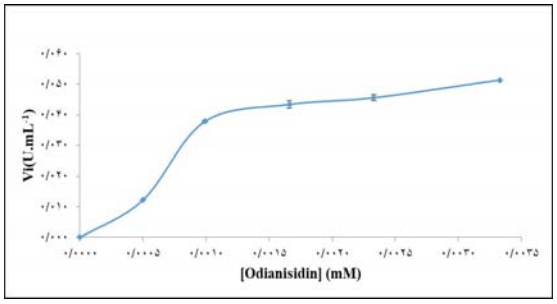
جدول ۱. پارامترهای سینتیکی آنزیم پراکسیداز عصاره برگ تر رزماری برای سوبسترای اودیانیزیدین در pH های بهینه.

pH	K_m(M)	V_{max}/K_m	V_{max} Vi(U.mL^{-1})
۵	۰/۰۰۰۶۲±۰/۰۰۰۱	۳۸/۷۰±۰/۰۳	۰/۰۲۴±۰/۰۰۶
۷	۰/۰۰۰۵۲±۰/۰۰۰۱	۷۲/۱۱±۰/۰۶	۰/۰۳۷۵±۰/۰۰۳

در شکل ۴ و ۵، نیز منحنی میکائلیس- منتن در غلظت‌های تهیه شده از طریق Serial Dilotion اودیانیزین و غلظت‌های ثابت اودیانیزیدین در pH های ۵ و ۷ برای این آنزیم رسم گردید. از روی این منحنی پارامترهای Km و Vmax محاسبه گردید که بر اساس شکل ۴ سرعت ماکزیمم فعالیت آنزیم در pH ۵ برابر با ۰/۰۲۴±۰/۰۰۶Vi(U.mL^{-1}) و Km آنزیم برابر با ۰/۰۰۰۶۲±۰/۰۰۰۱M و بر اساس شکل ۵ سرعت ماکزیمم فعالیت آنزیم در pH ۷ برابر با ۰/۰۳۷۵±۰/۰۰۳Vi(U.mL^{-1}) و Km آنزیم برابر با ۰/۰۰۰۵۲±۰/۰۰۰۱M اندازه گیری شد.

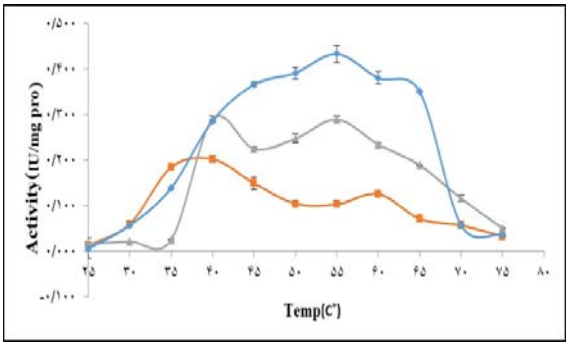


شکل ۴. تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم پراکسیداز عصاره برگ رزماری برای سوبسترای اودیانیزیدین در pH ۵



شکل ۵. تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم پراکسیداز عصاره برگ رزماری برای سوبسترای اودیانیزیدین در pH ۷

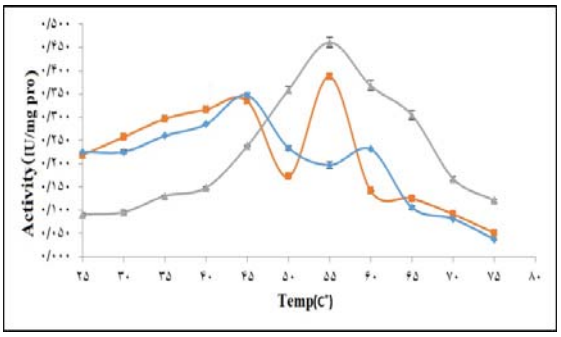
پایداری دمایی ایزو آنزیم پراکسیداز در گیاه رزماری در سه حالت مختلف در شکل ۶، برای pH ۷ و در شکل ۷ برای pH ۵ نشان داده شده است و در نهایت منحنی مقایسه‌ای برای سه حالت فوق رسم گردید (شکل ۸ و ۹).



شکل ۶. بررسی اثر حرارت بر فعالیت آنزیم پراکسیداز عصاره برگ تازه رزماری، گیاه خشک شده به مدت ۱۰ روز و کاملاً خشک (ماکروویو) در حضور سوبسترای اودیانیزیدین و در pH ۷. مربع: نشان دهنده گیاه تر رزماری، مثلث: نشان دهنده گیاه خشک شده به مدت ۱۰ روز، لوزی: نشان دهنده گیاه کاملاً خشک (ماکروویو) است.

شکل ۶ نشان می‌دهد که آنزیم پراکسیداز در گیاه تر رزماری (زنده)، به دنبال افزایش درجه حرارت ابتدا فعالیت باقی مانده آن به‌تدریج به میزان ۰/۲۷ IU/mg pro افزایش می‌یابد. این افزایش تا دمای ۴۰ °C دیده می‌شود. در ادامه با افزایش درجه حرارت فعالیت باقی مانده آنزیم به میزان ۰/۰۵ IU/mg pro کاهش می‌یابد تا دوباره در دمای 55 °C میزان فعالیت آنزیم روند صعودی به خود می‌گیرد و نهایتاً با افزایش دوباره دما میزان فعالیت آنزیم نیز به میزان ۰/۲۳ IU/mg pro کاهش محسوسی پیدا می‌کند. در نتیجه دمای بهینه (Tm) برای آنزیم در گیاه تر رزماری ۴۰ °C و ۵۵°C در pH ۷ در نظر گرفته شد و آنزیم پراکسیداز در گیاه خشک شده به مدت ۱۰ روز رزماری، به دنبال افزایش درجه حرارت ابتدا فعالیت باقی مانده آن به‌تدریج به میزان ۰/۱۸۷ IU/mg pro افزایش می‌یابد. این افزایش تا دمای 40 °C دیده می‌شود. در ادامه با افزایش درجه حرارت فعالیت باقی مانده آنزیم به مقدار ۰/۱ IU/mg pro کاهش محسوسی می‌یابد تا دوباره در دمای ۶۰ °C میزان فعالیت آنزیم روند صعودی به خود می‌گیرد و نهایتاً با افزایش دوباره دما میزان فعالیت آنزیم نیز به میزان ۰/۰۹۳ IU/mg pro کاهش محسوسی پیدا می‌کند. با مقایسه دو قله دمای بهینه آنزیم در این حالت مشاهده می‌کنیم که آنزیم در دمای ۶۰ °C نسبت به دمای ۴۰ °C دارای فعالیت بسیار کمتری است و دارای قله دمایی کوچک‌تری می‌باشد. در نتیجه دمای بهینه (Tm) برای آنزیم در

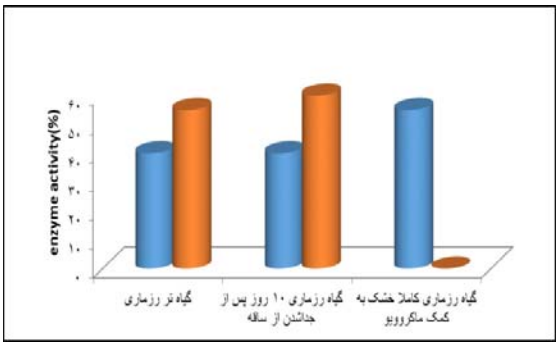
گیاه خشک شده به مدت ۱۰ روز رزماری۴۰°C و ۶۰°C در pH ۷در نظر گرفته شد و در نهایت آنزیم پراکسیداز در گیاه کاملاً خشک رزماری (ماکروویو)، به دنبال افزایش درجه حرارت ابتدا فعالیت باقی مانده آن به‌تدریج به میزان IU/mg pro ۰/۴۳ افزایش می‌یابد. این افزایش تا دمای۵۵°C دیده می‌شود. در ادامه با افزایش درجه حرارت فعالیت باقی مانده آنزیم به میزان IU/mg pro ۰/۳۹۵کاهش می‌یابد. در نتیجه دمای بهینه (Tm) برای آنزیم در گیاه کاملاً خشک رزماری (ماکروویو) رزماری 55°C در pH ۷در نظر گرفته شد.



شکل ۷. بررسی اثر حرارت بر فعالیت آنزیم پراکسیداز عصاره برگ گیاه تر رزماری، خشک شده به مدت ۱۰ روز و گیاه کاملاً خشک (ماکروویو) در حضور سوبسترای اودیانیزیدین و در pH ۵. مربع: نشان دهنده گیاه تر رزماری، مثلث: نشان دهنده گیاه خشک شده به مدت ۱۰ روز، لوزی: نشان دهنده گیاه کاملاً خشک (ماکروویو) است.

شکل ۷ نشان می‌دهد که آنزیم پراکسیداز در گیاه تر رزماری (زنده) به دنبال افزایش درجه حرارت ابتدا فعالیت باقی مانده آن به‌تدریج به میزان IU/mg pro ۰/۱۱۵ افزایش می‌یابد. این افزایش تا دمای 45°C دیده می‌شود. در ادامه با افزایش درجه حرارت فعالیت باقی مانده آنزیم به میزان IU/mg pro ۰/۱۴۴کاهش می‌یابد تا دوباره در دمای ۶۰°C میزان فعالیت آنزیم روند صعودی به خود می‌گیرد و نهایتاً با افزایش دوباره دما میزان فعالیت آنزیم نیز به میزان IU/mg pro ۰/۱۹۴کاهش محسوسی پیدا می‌کند. با مقایسه دو قله دمای بهینه آنزیم در این حالت مشاهده می‌کنیم که آنزیم در دمای ۶۰°C نسبت به دمای ۴۵°C دارای فعالیت بسیار کمتری است و دارای قله دمایی کوچک‌تری می‌باشد. در نتیجه دمای بهینه (Tm) برای آنزیم در گیاه تر رزماری ۶۰°C و۴۵°C در pH ۵ در نظر گرفته شد و آنزیم پراکسیداز در گیاه خشک شده به مدت ۱۰ روز رزماری، به دنبال افزایش درجه حرارت ابتدا فعالیت باقی مانده آن به‌تدریج به میزان IU/mg pro ۰/۱۱۶ افزایش می‌یابد. این افزایش تا دمای۴۵°C دیده می‌شود. در ادامه با افزایش درجه حرارت فعالیت باقی مانده آنزیم به میزان IU/mg pro ۰/۱۶۲ کاهش بسیار محسوسی پیدا می‌کند تا دوباره بلافاصله در دمای 55°C میزان فعالیت آنزیم روند صعودی به خود می‌گیرد و نهایتاً با افزایش دوباره دما میزان فعالیت آنزیم نیز به میزان IU/mg pro ۰/۳۲۹ کاهش محسوسی پیدا می‌کند. در نتیجه دمای بهینه (Tm) برای آنزیم در گیاه خشک شده به مدت ۱۰ روز رزماری ۴۰°C و ۶۰°C در pH ۵ در نظر گرفته شد و در نهایت آنزیم پراکسیداز در گیاه کاملاً خشک رزماری (ماکروویو)، به دنبال افزایش درجه حرارت ابتدا فعالیت باقی مانده آن به‌تدریج به میزان IU/mg pro ۰/۳۶۸ افزایش می‌یابد. این افزایش تا دمای55 °C دیده می‌شود. در ادامه با افزایش درجه حرارت فعالیت باقی مانده آنزیم به میزان IU/mg pro ۰/۳۴۰ کاهش می‌یابد. در نتیجه دمای بهینه (Tm) برای آنزیم در گیاه کاملاً خشک رزماری (ماکروویو) رزماری°C ۵۵ در pH ۵ در نظر گرفته شد. انحراف معیار برای هر یک از نقاط این منحنی‌ها محاسبه شده است اما به دلیل ناچیز بودن مقدار آن در برخی از نقاط، در منحنی‌های زیر مشخص نیست.

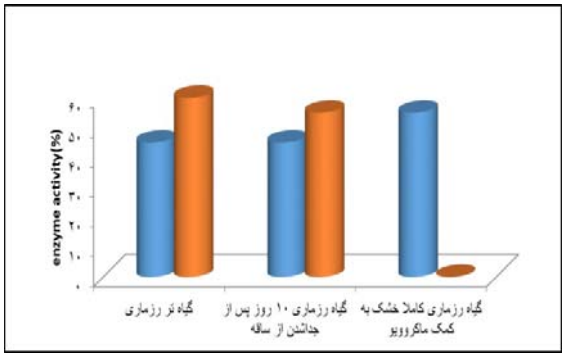
شکل ۸ نشان می‌دهد که آنزیم پراکسیداز در pH ۷ برگ تر (زنده) گیاه رزماری، دارای دمای بهینه۴۰°C و°C ۵۵ است، اما گیاه خشک شده به مدت ۱۰ روز دارای دمای بهینه ۴۰°C و ۶۰°C است. در حالتی که گیاه کاملاً خشک رزماری (ماکروویو) تنها در دمای۵۵°C بیشترین فعالیت را از خود نشان می‌دهد.



شکل ۸. مقایسه دمای بهینه آنزیم پراکسیداز در pH ۷ در سه حالت مختلف گیاه رزماری.

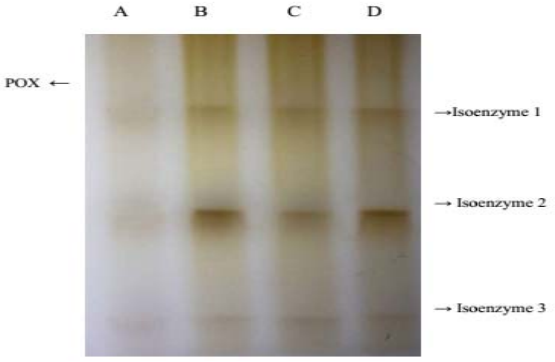
شکل (۹) نشان می‌دهد که آنزیم پراکسیداز در pH ۵ برگ تر (زنده) گیاه رزماری، دارای دمای بهینه ۴۵°C و ۶۰°C است، اما گیاه خشک شده به مدت ۱۰ روز رزماری دارای دمای بهینه ۴۵°C و ۵۵ °C است، در حالتی که گیاه کاملاً خشک رزماری

(ماکروویو) تنها در دمای 55°C بیشترین فعالیت را از خود نشان می‌دهد.



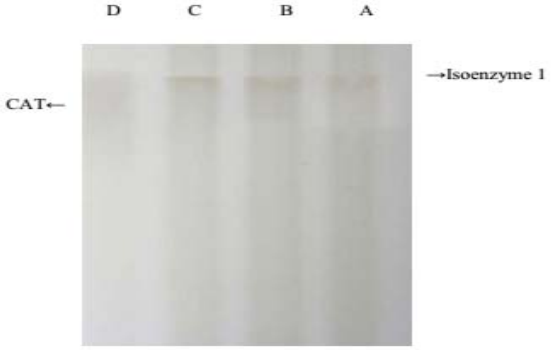
شکل ۹. مقایسه دمای بهینه آنزیم پراکسیداز در pH ۵ در سه حالت مختلف گیاه رزماری

از آنجایی که آنزیم پراکسیداز در سه حالت مختلف در pH ۷ دارای حداکثر دو دمای بهینه می‌باشد، دمای بهینه هر یک از حالت‌ها با دو رنگ در منحنی‌ها مشخص گردید. انحراف معیار برای هر یک از نقاط این منحنی محاسبه شده است، اما به دلیل ناچیز بودن مقدار آن در برخی از نقاط، در منحنی مشخص نیست.



شکل۱۰. تفکیک ایزو آنزیم‌های پراکسیداز در ژل پلی آکریل آمید (۱۰٪) و رنگ آمیزی اختصاصی توسط اودیانیزیدین. A) آنزیم پراکسیداز (مارکر). B)۳۰ میکرولیتر عصاره بوته ۱ گیاه تر. C) ۳۰ میکرولیتر عصاره بوته ۲ گیاه تر. D)۳۰ میکرولیتر عصاره بوته ۳ گیاه تر.

شکل ۱۰ ایزوآنزیم‌های پراکسیداز را در عصاره برگ رزماری نشان می‌دهد. در این روش از رنگ آمیزی اختصاصی ژل ۱۰ درصد (بدون دناتورانت) استفاده شد و حداقل سه ایزو آنزیم با اوزان مولکولی متفاوت مشاهده گردید. مقادیر ایزو آنزیم سوم ناچیز است و بسیار کم رنگ مشاهده می‌شود. علت تفاوت در وزن مولکولی ایزوآنزیم‌ها را می‌توان تفاوت در گلیکوزیلاسیون ایزو آنزیم‌های پراکسیدازی در گیاهان دانست.



شکل ۱۱. تفکیک ایزو آنزیم‌های کاتالاز در ژل پلی آکریل آمید (۱۰٪) و رنگ آمیزی اختصاصی توسط پراکسید هیدروژن. D) آنزیم کاتالاز (مارکر). C)۳۰ میکرولیتر عصاره بوته ۱ گیاه تر. B) ۳۰ میکرولیتر عصاره بوته ۲ گیاه تر. A)۳۰ میکرولیتر عصاره بوته ۳ گیاه تر.

در شکل ۱۱ ایزو آنزیم‌های کاتالاز در عصاره برگ رزماری است که بررسی سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز به روش اسپکتروفتومتری در برگ‌های تر (زنده)، ۱۰ روز بعد از خشک شدن و کاملاً خشک (ماکروویو) برگ گیاه رزماری، بررسی اثر pH های مختلف (تهیه pH پروفایل) و به دست آوردن pH بهینه آنزیم کاتالاز و مقایسه آن‌ها با یکدیگر، بررسی پایداری دمایی آنزیم کاتالاز در pH بهینه قبلاً توسط همین گروه مورد بررسی قرار گرفته بود و احتمال اینکه آنزیم کاتالاز دارای یک ایزو آنزیم در برگ گیاه رزماری است، ثبت شده بود (Shams, 2015).

در این پژوهش به کمک ژل الکتروفورز غیر دناتورانت حضور یک ایزو آنزیم برای کاتالاز مورد تأیید قرار گرفت. رنگ آمیزی اختصاصی ژل ۱۰ درصد (بدون دناتورانت) به‌منظور مشاهده ایزو آنزیم کاتالاز نشان می‌دهد که عصاره برگ رزماری دارای یک ایزو آنزیم می‌باشد.

۴. نتیجه‌گیری

بررسی سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز به روش اسپکتروفتومتری در برگ‌های تر (زنده)، ۱۰ روز بعد از خشک شدن و کاملاً خشک (ماکروویو) برگ گیاه رزماری، بررسی اثر pH های مختلف (تهیه pH پروفایل) و به دست آوردن pH بهینه آنزیم پراکسیداز و مقایسه آن‌ها با یکدیگر، بررسی پایداری دمایی آنزیم پراکسیداز در pH بهینه اساس انجام این پژوهش

بوده است و طبق نتایج به دست آمده آنزیم پراکسیداز دارای دو ایزو آنزیم در برگ گیاه رزماری است و فعالیت این آنزیم به‌عنوان به یک آنتی‌اکسیدان قوی در تنش‌های محیطی مانند خشکی، در pH بهینه و دمای بهینه آن به حداکثر خود می‌رسد. همچنین طبق نتایج به دست آمده، مشاهده می‌شود که آنزیم پراکسیداز در طیف وسیعی از تغییرات pH قادر به فعالیت می‌باشد. با مقایسه بین فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان پراکسیداز در حالت‌های مختلف برگ گیاه رزماری مشاهده شد که برگ گیاه تر (زنده) رزماری دارای فعالیت قابل ملاحظه‌ای نسبت به برگ‌های خشک شده به مدت ۱۰ روز و کاملاً خشک (ماکروویو) است و همچنین این آنزیم در گیاه رزماری علاوه بر تحمل pH های بالا، دماهای بالا را نیز تحمل می‌کند. در این تحقیق آنزیم پراکسیداز موجود در گیاه رزماری، در pH های ۵ و ۷ بیشترین فعالیت را از خود نشان دادند. pH های بهینه ۵ و ۷ برای آنزیم پراکسیداز، در سه حالت مختلف گیاه، تفاوت چندانی از لحاظ فعالیت آنزیمی و دمای بهینه از خود نشان ندادند و در هر دو pH بیشترین فعالیت مربوط به گیاه زنده و کمترین فعالیت مربوط به گیاه کاملاً خشک است.

۵. منابع

Alnahdi, H.S. 2012. Effect of *Rosmarinus officinalis* extract on some cardiac enzymes of streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Health Sciences, 2(4): 33-37.

Barbut, S.J., David, B. and Arthur, J. 1985. Antioxidant properties of *Rosemary oleoresin* in turkey sausage. Journal of Food Science, 50(5): 1356-1359.

Begum, A., Sandhya, S., Shaffath Ali, S., Vinod, K.R., Reddy, S. and Banji, D. 2013. An in-depth review on the medicinal flora Rosmarinus officinalis (Lamiaceae)." Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 12(1): 61-74.

Boutekedjiret, C., Bentahar, F., Belabbes, R. and Bessiere, J.M. 2003. Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. Flavour and Fragrance Journal, 18(6): 481-484.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2): 248-254.

Chelikani, P.R. and Radhakrishnan, T.M. 2005. Catalase: a repertoire of unusual features. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 20(2): 131-135.

Cordeiro, A.M., Santos, N.A., Soledade, L.E.B., Pontes, L.F. Souza, A.L., Queiroz, N. and Souza, A.G. 2013. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. Journal of Thermal Analysis and calorimetry, 113(2): 889-895.

Doronicheva, N., Yasui, H. and Sakurai, H. 2007. Chemical structure-dependent differential effects of flavonoids on the catalase activity as evaluated by a chemiluminescent method. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 30(2): 213-217.

Ebrahimkhani ghazi, S.S. and Bastani, D. 2009. Comparison of different methods of rosemary extraction. Master's thesis in chemistry-food industry, Islamic Azad University.

Ghenaatian, L.S. and Amin, G. 2002. Analysis and identification of mountain clay essential oil by GC-MS method Faculty of Pharmacy. medical University Tehran.

Keyhani, J.K., Ezzatollah. Einollahi, Nahid. Minai-Tehrani, Dariush. Zarchipour, Sekineh 2003. "Heterogeneous inhibition of horseradish peroxidase activity by cadmium. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1621(2): 140-148.

Kim, S.W. and Smith, E.C. 1980. Isolation and characterization of two isoperoxidases from tobacco tissue cultures. Phytochemistry 19(2): 165-168.

Machado, D.G., Neis, V.B., Balen, G.O., Colla, A., Cunha, M.P., Dalmarco, J.B., Pizzolatti, M.G., Prediger, R.D. and Rodrigues, A.L. 2012. Antidepressant-like effect of ursolic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. in mice: evidence for the involvement of the dopaminergic system." Pharmacology Biochemistry and Behavior, 103(2): 204-211.

Morita, Y., Yamashita, H., Mikami, B., Iwamoto, H., Aibara, S., Terada, M. and Minami, J. 1988. Purification, crystallization, and characterization of peroxidase from *Coprinus cinereus*. The Journal of Biochemistry, 103(4): 693-699.

Nakatani, N. 2000. Phenolic antioxidants from herbs and spices. Biofactors, 13(1-4): 141-146.

Paknia, A. 2006. Investigation of the properties of peroxidase enzymes in Sardinia leaf. Master's thesis, Biochemistry and Biophysical Research Center, University of Tehran.

Seevers, P.D. and Catedral, F.F. 1971. The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease. Plant physiology, 48(3): 353-360.

Shams, S.K. and Eydi, A. 2015. Investigation and comparison of some biochemical properties of catalase enzymes in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in three living conditions, after separation from stems and dry plants. second Iranian scientific and research conference on biology and horticulture.

Tayefi Nasrabadi, H.D., Daihasani, B., Movafeghi, A. and Samadi, A. 2010. A Study on Some Biochemical Characteristics of Catalase Enzyme in Safflower. Journal of Agricultural Biotechnology, 2(1).