FANPAYA
Knowledge Based Company
(PUBLISHER)

Journal of Environmental Sciences Studies (JESS)
Volume 11, Number 3, Autumn (2026)

Journal Homepage: www.jess.ir
Print ISSN: 2588-6851 Online ISSN: 2645-520X

Effects of Nitrate Salts on the Kinetic Properties of Ascorbate Peroxidase in Unripe and Ripe Pear Fruits

Shahriar Saeidian[1]*, Nabi Khalili-Aghdam[2], Masumeh Narmashiry[3]

*1. Associate professor of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Basic Science, University of Payame Noor, Tehran, Iran
2. Associate Professor of Agricultural Sciences, Faculty of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran
3. M.Sc. Graduate of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Basic Science, University of Payame Noor, Tehran, Iran
*Email Address: saeedyan@pnu.ac.ir

Article Info

Article Type:
Research Paper

Article History:

Received Date:
2026/07/18
Revised Date:
2026/09/16
Accepted Date:
2026/11/04
Published Date:
2026/11/04

Keywords:
Ascorbate peroxidase,
Pear (Pyrus communis L.),
Kinetic properties,
Chaotrope,
Kosmotrope,
Calcium nitrate

ABSTRACT

Fruit ripening is accompanied by increased production of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress. Ascorbate peroxidase (APX) plays a key role in the detoxification of hydrogen peroxide. The present study aimed to investigate the kinetic properties of APX extracted from a local Iranian pear cultivar at two developmental stages (unripe and ripe) and to evaluate the effects of nitrate salts on its catalytic behavior. Pear samples were collected at the unripe and ripe stages, and crude enzyme extracts were prepared from the pericarp tissue. The effects of pH, temperature, and different concentrations of nitrate salts, including $AgNO_3$, NH_4NO_3, KNO_3, $NaNO_3$, and $Ca(NO_3)_2$, on APX activity and kinetic parameters were determined spectrophotometrically. APX activity in ripe fruits was significantly higher (approximately 47.5%) than in unripe fruits. The optimum pH was 6.8 for unripe fruits and 7.0 for ripe fruits. The highest enzyme activity, maximum reaction velocity (Vmax), and catalytic efficiency were observed at 35°C, whereas elevated temperatures (60°C) markedly reduced the enzyme's catalytic capacity. Among the nitrate salts tested, the chaotropic salt silver nitrate exhibited the strongest inhibitory effect, showing the lowest IC_{50} value (0.2 mM) and causing a substantial decrease in Vmax and catalytic efficiency. In contrast, calcium nitrate enhanced enzyme activity by up to 135% at concentrations of 5–10 mM and exhibited the weakest inhibitory effect. The type of nitrate salt had no significant influence on the Km value of APX. Ripe fruits displayed greater sensitivity to ionic inhibition than unripe fruits. These findings indicate that pear fruit ripening enhances the stability and catalytic capacity of APX, thereby improving its ability to counteract oxidative stress.

Cite this article: Shahriar Saeidian , Nabi Khalili-Aghdam, Masumeh Narmashiry (2026) Effects of Nitrate Salts on the Kinetic Properties of Ascorbate Peroxidase in Unripe and Ripe Pear Fruits, Journal of Environmental Sciences Studies, 11(3), Pages 11443-11459.

EXTENDED ABSTRACT

Introduction

Pear (Pyrus communis L.) is an important climacteric fruit whose ripening is associated with increased respiration, ethylene production, and reactive oxygen species (ROS) accumulation. Excessive ROS accelerate oxidative damage and reduce postharvest fruit quality. Ascorbate peroxidase (APX), a key enzyme of the ascorbate–glutathione cycle, scavenges hydrogen peroxide and plays a vital role in maintaining cellular redox balance. APX activity is influenced by factors such as pH, temperature, and ionic environment. According to the Hofmeister theory, kosmotropic and chaotropic ions differentially affect protein stability and enzyme function. However, limited information is available on the kinetic properties of APX during pear ripening and its response to nitrate salts. Therefore, this study investigated the kinetic characteristics of APX extracted from unripe and ripe fruits of a local Iranian pear cultivar and evaluated the effects of different nitrate salts on its catalytic activity.

Materials and Methods

Fresh pear fruits were collected from orchards in Baneh County, Kurdistan Province, Iran, at two developmental stages (unripe and ripe). Crude APX extracts were prepared from pericarp tissues using cold phosphate buffer containing PVPP, EDTA, and PMSF. Soluble protein concentration was determined by the Bradford method. APX activity was measured spectrophotometrically following the method of Nakano and Asada by monitoring the decrease in absorbance of ascorbate at 290 nm. The effects of pH were evaluated over the range of 4–9 using appropriate buffer systems, whereas temperature dependence was investigated at 4, 25, 35, 50, and 60°C. Kinetic parameters (Km and Vmax) were estimated by nonlinear regression using Michaelis–Menten kinetics with ascorbate concentrations ranging from 1 to 40 mM. The influence of $AgNO_3$, NH_4NO_3, KNO_3, $NaNO_3$, and $Ca(NO_3)_2$ was examined at concentrations between 0 and 50 mM, and IC_{50} values were calculated using four-parameter logistic regression. Statistical analyses were performed using one-way and two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test at $P < 0.05$.

Results and Discussion

APX activity increased significantly during fruit ripening. Ripe fruits exhibited approximately 47.5% higher enzyme activity than unripe fruits, indicating enhancement of the antioxidant defense system in response to increased ROS production during ripening. The enzyme exhibited a bell-shaped pH profile, with optimum activity at pH 6.8 in unripe fruits and pH 7.0 in ripe fruits. Two-way ANOVA showed that pH was the major factor affecting APX activity, while ripening stage also had a significant effect. The broader pH stability observed in ripe fruits suggests improved enzyme stability during maturation. Temperature markedly influenced APX catalytic properties. Enzyme activity increased progressively from 4°C to 35°C, where the highest values of Vmax and catalytic efficiency (Vmax/Km) were recorded. At temperatures above 35°C, particularly at 60°C, enzyme activity declined sharply, indicating thermal destabilization of the protein. The higher catalytic efficiency observed in ripe fruits at all temperatures further demonstrates the enhanced antioxidant capacity developed during fruit maturation. The nitrate salts produced distinct effects on APX activity. Silver nitrate ($AgNO_3$) showed the strongest inhibitory effect, exhibiting the lowest IC_{50} value (0.2 mM) and causing substantial reductions in Vmax and catalytic efficiency without significantly affecting Km. This kinetic pattern suggests that Ag^+ mainly decreases catalytic turnover rather than substrate affinity, probably through interaction with sulfhydryl groups or disruption of the heme environment. In contrast, calcium nitrate [$Ca(NO_3)_2$] enhanced APX activity by approximately 135% at concentrations of 5–10 mM and exhibited the weakest inhibitory effect. Sodium, potassium, and ammonium nitrates produced intermediate concentration-dependent inhibition. The inhibitory potency followed the order $AgNO_3$ > NH_4NO_3 > KNO_3 > $NaNO_3$ > $Ca(NO_3)_2$. Kinetic analyses further demonstrated that the nitrate salts significantly reduced Vmax and catalytic efficiency, whereas Km remained nearly constant among treatments, indicating that the salts primarily affected catalytic capacity rather than substrate binding. Moreover, APX extracted from ripe fruits was more sensitive to ionic inhibition than that from unripe fruits, as reflected by lower IC_{50} values. Heatmap analysis confirmed that maximum enzyme activity occurred at near-neutral pH and ascorbate concentrations of approximately 20–24 mM, whereas lower or higher substrate concentrations resulted in reduced activity. In conclusion, fruit ripening significantly enhanced APX catalytic capacity and antioxidant potential in pear fruits. Among the nitrate salts investigated, calcium nitrate effectively preserved enzyme activity and catalytic efficiency, whereas silver nitrate acted as a potent inhibitor. The absence of significant changes in Km together with pronounced reductions in Vmax indicates that nitrate salts mainly influence enzyme turnover rather than substrate affinity. These findings provide new insights into the biochemical regulation of APX during pear ripening and suggest that calcium nitrate could be considered as a promising postharvest treatment to maintain antioxidant capacity and improve storage quality of pear fruits.

مجله مطالعات علوم محیط زیست
جلد ۱۱، شماره ۳
Journal Homepage: www.jess.ir
شاپای چاپی: 2588-6851 شاپای الکترونیکی: 2645-520X

FANPAYA
Knowledge Based Company
(PUBLISHER)

بررسی اثر نمک‌های نیتراتی بر ویژگی‌های سینتیکی آسکوربات پراکسیداز در میوه‌های نارس و رسیده گلابی

شهریار سعیدیان *[۱]، نبی خلیلی اقدم[۲]، معصومه نرماشیری[۳]

*۱- دانشیار بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲- دانشیار علوم کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۳- کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
*ایمیل نویسنده مسئول: E-mail: saeedyan@pnu.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله علمی پژوهشی

تاریخ دریافت:
۱۴۰۵/۰۴/۲۷
تاریخ بازنگری:
۱۴۰۵/۰۶/۲۵
تاریخ پذیرش:
۱۴۰۵/۰۸/۱۳
تاریخ انتشار:
۱۴۰۵/۰۸/۱۳

کلید واژه ها:
آسکوربات پراکسیداز،
گلابی،
ویژگی‌های سینتیکی،
کائوتروپ،
کاسموتروپ،
نیترات کلسیم.

چکیده

فرآیند رسیدگی در میوه‌ها با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و تنش اکسیداتیو همراه است. آنزیم آسکوربات پراکسیداز نقش کلیدی در حذف پراکسید هیدروژن دارد. هدف این پژوهش، بررسی سینتیکی آنزیم APX استخراج‌شده از میوه گلابی محلی ایران در دو مرحله نارس و رسیده و ارزیابی اثر نمک‌های نیتراتی بر رفتار کاتالیتیکی آن بود. نمونه‌های گلابی در دو مرحله نارس و رسیده جمع‌آوری و عصاره خام آنزیمی از بافت پریکارپ استخراج گردید. اثرهای pH، دما و غلظت‌های مختلف نمک‌های نیتراتی شامل $AgNO_3$، NH_4NO_3، KNO_3، $NaNO_3$ و $Ca(NO_3)_2$ بر فعالیت و پارامترهای سینتیکی به روش اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. فعالیت APX در میوه رسیده به طور معنی‌داری (حدود ۴۷/۵ درصد) بالاتر از میوه نارس بود. pH بهینه در مرحله نارس ۶/۸ و در مرحله رسیده ۷ تعیین شد. بیش‌ترین فعالیت آنزیمی، مقدار بیشینه سرعت و کارایی کاتالیتیکی در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید، در حالی که دماهای بالا (۶۰ درجه سانتی‌گراد) موجب افت شدید ظرفیت کاتالیتیکی شدند. در بررسی تیمارهای نمکی، نمک کائوتروپ نیترات نقره قوی‌ترین اثر مهاری را اعمال کرد و با کم‌ترین مقدار IC_{50} (۰/۲ میلی‌مولار)، میزان V_{max} و کارایی کاتالیتیکی را به شدت کاهش داد. نیترات کلسیم در غلظت‌های ۱۰-۵ میلی‌مولار موجب افزایش فعالیت آنزیم (٪۱۳۵) شد و کم‌ترین اثر مهاری را نشان داد. نوع نمک‌های نیتراتی اثر معنی‌داری بر مقدار K_m آنزیم نداشت. حساسیت به مهار یونی در میوه‌های رسیده بیشتر از میوه‌های نارس بود. نتایج نشان داد که فرآیند رسیدگی گلابی موجب افزایش پایداری و ظرفیت کاتالیتیکی آنزیم APX برای مقابله با تنش‌های اکسیداتیو می‌شود.

ناشر: انتشارات فن پایا

DOI: 10.22034/jess.2026.592456.2472

۱- مقدمه

گلابی (Pyrus communis L.) یکی از مهم‌ترین میوه‌های درختی مناطق معتدل جهان است که به دلیل ارزش تغذیه‌ای بالا، ترکیبات فنولی، فیبر غذایی و ویژگی‌های حسی مطلوب، جایگاه ویژه‌ای در سبد غذایی انسان دارد (Ribeiro et al., 2025). با این حال، این میوه پس از برداشت به شدت تحت اثر فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مرتبط با رسیدگی قرار می‌گیرد که می‌تواند کیفیت، قابلیت نگهداری و عمر انبارمانی آن را محدود سازد. رسیدگی میوه‌های کلیماکتریک مانند گلابی با افزایش تنفس، تولید اتیلن و تغییرات گسترده متابولیکی همراه است که در نهایت منجر به نرم شدن بافت، تغییر رنگ، توسعه عطر و طعم و افزایش حساسیت به تنش‌های اکسیداتیو می‌شود (Iglesias-Sanchez et al., 2026). در طی فرآیند رسیدگی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) شامل سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل و به ویژه پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. اگرچه این مولکول‌ها در غلظت‌های پایین به عنوان پیام‌رسان‌های سلولی عمل می‌کنند، تجمع بیش از حد آن‌ها موجب اکسیداسیون لیپیدهای غشایی، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و در نهایت تسریع پیری و کاهش کیفیت میوه می‌شود (Wei et al., 2025). بنابراین گیاهان برای حفظ هموستازی اکسیداتیو، شبکه پیچیده‌ای از سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی را توسعه داده‌اند. در میان اجزای سیستم آنتی‌اکسیدانی، آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) به‌صورت هماهنگ عمل می‌کنند. این آنزیم‌ها با حذف گونه‌های فعال اکسیژن از آسیب اکسیداتیو به غشاها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک جلوگیری کرده و نقش کلیدی در تحمل تنش و حفظ کیفیت میوه طی فرآیند رسیدگی دارند (Hasanuzzaman et al., 2020). آسکوربات پراکسیداز (APX)یکی از مهم‌ترین اجزای سیستم آسکوربات–گلوتاتیون و اصلی‌ترین آنزیم حذف‌کننده پراکسید هیدروژن در سلول‌های گیاهی محسوب می‌شود. این آنزیم با استفاده از آسکوربات به عنوان دهنده الکترون، پراکسید هیدروژن را به آب احیا می‌کند و نقش اساسی در حفاظت سلول در برابر تنش اکسیداتیو ایفا می‌نماید (Sofo et al., 2015). مطالعه‌های متعدد نشان داده‌اند که فعالیت APX در پاسخ به تنش‌های محیطی نظیر سرما، گرما، خشکی، شوری و همچنین در مراحل مختلف رشد و رسیدگی میوه تغییر می‌کند (Kesawat et al., 2023). از سوی دیگر، ویژگی‌های سینتیکی این آنزیم از جمله K_m، V_{max}، pH بهینه و پایداری حرارتی می‌تواند تحت اثر تغییرات فیزیولوژیک مرتبط با رسیدگی قرار گیرد. فعالیت و کارایی APX علاوه بر شرایط فیزیولوژیک میوه، به شدت تحت اثر عوامل محیطی و شیمیایی قرار دارد. pH محیط واکنش، دما و حضور یون‌ها یا مهارکننده‌های مختلف می‌توانند ساختار فضایی، پایداری و رفتار کاتالیتیکی این آنزیم را تغییر دهند (Corpas et al., 2024). در میان این عوامل، یون‌های فلزی و نمک‌های معدنی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند، زیرا برخی از آن‌ها از طریق برهم‌کنش با گروه هم (heme)، گروه‌های تیولی پروتئین یا نواحی تنظیمی آنزیم قادر به مهار یا فعال‌سازی فعالیت APX هستند (Xiao et al., 2024). به ویژه یون نقره (Ag^{+}) به عنوان یک مهارکننده قوی گروه‌های سولفیدریل شناخته می‌شود، در حالی که یون کلسیم (Ca^{2+}) در بسیاری از سامانه‌های گیاهی به عنوان یک پیام‌رسان ثانویه و تنظیم‌کننده فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی عمل می‌کند (Gordon et al., 2010). با وجود اهمیت این موضوع، اطلاعات موجود درباره اثر نمک‌های نیتراتی مختلف بر رفتار سینتیکی APX در میوه‌های گلابی بسیار محدود است. اگرچه مطالعه‌های متعددی بر روی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گونه‌های مختلف گلابی انجام شده است، اطلاعات اندکی درباره تغییرات ویژگی‌های سینتیکی آسکوربات پراکسیداز در ارقام بومی و محلی ایران طی فرآیند رسیدگی وجود دارد. همچنین اثر نمک‌های نیتراتی مختلف بر فعالیت، کارایی کاتالیتیکی و الگوی مهار یا فعال‌سازی این آنزیم تاکنون به طور جامع بررسی نشده است. درک این ویژگی‌ها می‌تواند در شناخت بهتر ساز وکارهای دفاع آنتی‌اکسیدانی میوه و طراحی راهکارهای مناسب برای افزایش عمر پس از برداشت و حفظ کیفیت محصول نقش مهمی ایفا کند. بر اساس نظریه هوفمایستر، یون‌ها از نظر توانایی در پایدارسازی یا برهم زدن ساختار آب و پروتئین‌ها به دو گروه اصلی کاسموتروپ و کائوتروپ تقسیم می‌شوند. یون‌های کاسموتروپ معمولاً موجب افزایش نظم شبکه هیدروژنی آب و پایداری ساختار پروتئین می‌شوند، در حالی که یون‌های کائوتروپ تمایل دارند این نظم را کاهش داده و انعطاف‌پذیری یا ناپایداری ساختار پروتئین را افزایش دهند (Wei, 2023). بنابراین انتظار می‌رود این دو گروه از نمک‌ها اثرهای متفاوتی بر فعالیت و ویژگی‌های سینتیکی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی داشته باشند. در مطالعه حاضر، نیترات کلسیم به‌عنوان نمکی با ویژگی‌های نسبتاً کاسموتروپ و نیترات نقره به‌عنوان نمکی با اثرهای شدید بر برهم‌کنش‌های پروتئینی و مهار آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین نیترات‌های سدیم، پتاسیم و آمونیوم به‌عنوان یون‌های با رفتار بینابینی برای مقایسه انتخاب شدند. با وجود مطالعه‌های متعدد درباره نقش APXدر پاسخ به تنش‌های محیطی، اطلاعات اندکی درباره اثر مستقیم نمک‌های دارای ویژگی‌های کاسموتروپ و کائوتروپ بر رفتار سینتیکی این آنزیم در مراحل مختلف رسیدگی میوه گلابی وجود دارد. همچنین تاکنون مطالعه جامعی درباره تغییرات پارامترهای سینتیکی APXدر حضور این گروه از نمک‌ها در ارقام بومی ایران گزارش نشده است.بنابراین، هدف از پژوهش حاضر بررسی جامع ویژگی‌های سینتیکی آسکوربات پراکسیداز استخراج‌شده از میوه گلابی محلی ایرانی در دو مرحله نارس و رسیده بود. فرض بر این بود که نمک‌های دارای ویژگی‌های کاسموتروپ و کائوتروپ با ساز وکارهای متفاوت موجب تغییر در ظرفیت کاتالیتیکی و پارامترهای سینتیکی آسکوربات پراکسیداز شده و این پاسخ در مراحل مختلف رسیدگی میوه متفاوت خواهد بود. در این مطالعه اثر pH و دما بر فعالیت آنزیم تعیین شد و پارامترهای سینتیکی شامل K_m، V_{max} و کارایی کاتالیتیکی در شرایط مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین اثر نمک‌های نیتراتی

مختلف شامل نیترات نقره، نیترات آمونیوم، نیترات پتاسیم، نیترات سدیم و نیترات کلسیم بر فعالیت و ویژگی‌های سینتیکی APX بررسی شد تا نقش احتمالی این یون‌ها در تنظیم فعالیت آنزیم و پاسخ آنتی‌اکسیدانی میوه طی فرآیند رسیدگی روشن شود.

۲- روش انجام تحقیق

مواد گیاهی و جمع‌آوری نمونه‌ها: این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقاتی بیوشیمی دانشگاه پیام نور انجام شد. میوه‌های تازه گلابی (Pyrus communis L.) در دو مرحله رسیدگی (نارس و رسیده) از باغ‌های شهرستان بانه در استان کردستان ، ایران، در پایان فصل تابستان جمع‌آوری شدند. مرحله رسیدگی بر اساس رنگ پوست، سفتی بافت و یکنواختی ظاهری میوه تعیین شد. میوه‌های نارس دارای پوست سبز و سفتی بیشتر بودند، در حالی که میوه‌های رسیده دارای رنگ زمینه زرد متمایل به سبز، کاهش سفتی و افزایش مواد جامد محلول بودند. نمونه‌برداری از سه باغ مستقل انجام شد و هر باغ به عنوان یک تکرار زیستی در نظر گرفته شد. در هر باغ، پنج درخت سالم و همسن به‌صورت تصادفی انتخاب و از هر درخت ۱۰ میوه عاری از آسیب مکانیکی، علائم بیماری و ناهنجاری ظاهری برداشت گردید. تمامی میوه‌ها از یک رقم مشخص و با شرایط رشدی مشابه انتخاب شدند تا اثر عوامل محیطی و تغییرات زیستی بین نمونه‌ها به حداقل برسد. برای هر مرحله رسیدگی، سه تکرار زیستی مستقل مورد استفاده قرار گرفت.

• آماده‌سازی نمونه‌ها

میوه‌های جمع‌آوری‌شده تحت شرایط سرد به آزمایشگاه منتقل و بلافاصله پردازش شدند. پس از شستشو با آب مقطر، نمونه‌ها به‌منظور حذف آلودگی‌های قارچی با محلول ۲ درصد (وزنی/حجمی) بنومیل ضدعفونی و سپس دو بار با آب مقطر استریل شسته شدند. بافت پریکارپ (پوست و گوشت میوه) با استفاده از تیغ جراحی استیل ضدزنگ به‌دقت جدا شد و از ورود بافت‌های بذر و بخش مرکزی میوه جلوگیری گردید. برای حفظ یکنواختی، مقادیر مشابهی از بافت در تمامی تکرارهای آزمایشی مورد استفاده قرار گرفت. تمامی مراحل آماده‌سازی در کمتر از دو ساعت پس از برداشت و در شرایط سرد (۴°C) یا بر روی یخ نجام شد تا از کاهش فعالیت آنزیمی و تخریب پروتئین‌ها جلوگیری شود. تمامی آزمون‌های آنزیمی حداکثر ظرف چهار ساعت پس از استخراج انجام شدند و از انجماد و ذوب مجدد نمونه‌ها اجتناب شد .

• استخراج آنزیم

بافت‌های پریکارپ با نسبت ۱:۳ (وزن به حجم) در بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر ۷ که از قبل سرد شده بود، همگن شدند. به منظور جلوگیری از تجزیه پروتئین‌ها، ۰/۰۲ درصد (وزنی/حجمی) فنیل‌متیل‌سولفونیل فلوراید (PMSF) به‌عنوان مهارکننده پروتئاز به بافر افزوده شد. به منظور حذف ترکیبات فنولی و جلوگیری از اکسیداسیون آن‌ها، ۲ درصد پلی‌وینیل‌پلی‌پیرولیدون (PVPP) و ۱ میلی‌مولار EDTA نیز به بافر استخراج افزوده شد. عملیات همگن‌سازی روی یخ انجام گرفت تا از تخریب آنزیم جلوگیری شود. همگنات حاصل ابتدا در g × ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای 4 °C سانتریفیوژ شد تا بقایای سلولی حذف شوند. سپس محلول رویی مجدداً در g × ۱۵۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای 4 °C سانتریفیوژ گردید تا عصاره آنزیمی شفاف به دست آید. محلول رویی به‌عنوان عصاره خام آنزیم جمع‌آوری شده و تا زمان انجام آزمون‌های سینتیکی در دمای °C ۸۰- نگهداری شد.

• اندازه‌گیری مقدار پروتئین

مقدار پروتئین محلول با استفاده از روش برادفورد و بر اساس اتصال رنگ کوماسی بریلیانت بلو G-250 تعیین شد. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر UV–Vis اندازه‌گیری گردید. منحنی استاندارد با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) در محدوده غلظتی ۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. غلظت پروتئین به صورت میلی‌گرم بر گرم وزن تر گزارش شد (Kielkopf et al., 2020). تمامی اندازه‌گیری‌ها در سه تکرار مستقل انجام شدند و منحنی استاندارد دارای ضریب تعیین (R^2) بیشتر از ۰/۹۹ بود. تمامی نمونه‌ها در محدوده خطی منحنی استاندارد قرار داشتند و قبل از اندازه‌گیری، تمامی نمونه‌ها به گونه‌ای رقیق شدند که جذب آن‌ها در محدوده خطی منحنی استاندارد قرار گیرد.

• سنجش فعالیت آسکوربات پراکسیداز

فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX) بر اساس روش ارائه‌شده توسط Nakano و Asada (1981) به‌صورت اسپکتروفتومتری و با اندازه‌گیری کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر تعیین شد (Nakano & Asada, 1981). در این روش، واکنش آنزیمی در بافر فسفات مناسب حاوی آسکوربات (۴۰-۰ میلی‌مولار) به عنوان سوبسترا و هیدروژن پراکسید (H_2O_2) (۱۰میلی‌مولار) به عنوان پذیرنده الکترون انجام می‌شود. APX موجب اکسید شدن آسکوربات شده و در نتیجه کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر ایجاد می‌گردد که این کاهش به عنوان شاخص فعالیت آنزیم در نظر گرفته شد. تغییرات جذب در دقایق اولیه واکنش و تحت شرایط کنترل‌شده دمایی و pH و هر ۵ ثانیه به مدت ۶۰ ثانیه ثبت شد و شیب اولیه منحنی ($\Delta A/min$) برای محاسبه فعالیت آنزیم استفاده گردید. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی آسکوربات($\varepsilon = ۲/۸\ mM^{-1}\ cm^{-1}$) و طول مسیر نوری کووت(۱ cm) محاسبه شد و در نهایت به صورت میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین گزارش گردید.

- **تعیین pH بهینه**

اثر pH بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز در محدوده pH برابر ۴ تا ۹ بررسی شد. برای این منظور از سیستم‌های بافری مختلف استفاده گردید: بافر استات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (۶-۴ pH)، بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (۶-۸ pH) و بافر Tris-HCl با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (۸-۹ pH). واکنش آنزیمی با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره خام به ۲ میلی‌لیتر محلول ۱۰ میلی‌مولار H_2O_2 تهیه‌شده در بافر مربوطه آغاز شد. کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه و در دمای 25 °C ثبت گردید. سرعت‌های اولیه از بخش خطی واکنش محاسبه شدند و pH متناظر با بیش‌ترین فعالیت آنزیمی به‌عنوان pH بهینه در نظر گرفته شد. تمامی اندازه‌گیری‌ها در سه تکرار انجام شدند. تمامی بافرها با غلظت نهایی ۵۰ میلی‌مولار تهیه شدند تا اثر قدرت یونی بر فعالیت آنزیم به حداقل برسد.

- **تجزیه و تحلیل سینتیکی K_m و V_{max}**

پارامترهای سینتیکی میکائیلیس – منتن با استفاده از غلظت‌های مختلف آسکوربات در محدوده ۱ تا ۴۰ میلی‌مولار و در pH بهینه تعیین شدند. سرعت واکنش‌ها مطابق روش ذکرشده محاسبه گردید. مقادیر K_m و V_{max} با برازش غیرخطی داده‌ها با معادله میکائیلیس منتن در GraphPad Prism 10 انجام شد. بازده کاتالیتیکی ظاهری به صورت نسبت V_{max}/K_m محاسبه شد. کیفیت برازش مدل از طریق ضریب تعیین (R^2) و بررسی الگوی باقیمانده‌ها ارزیابی گردید.

- **آزمون‌های وابسته به دما**

اثر دما بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز در دماهای ۴، ۲۵ (دمای آزمایشگاه)، ۳۵، ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد و در سایر شرایط ثابت آزمایش بررسی شد. عصاره‌های آنزیمی پیش از آغاز واکنش به مدت ۵ دقیقه در هر دمای مورد نظر به تعادل حرارتی رسیدند. در هر دما، پارامترهای سینتیکی شامل K_m، V_{max} و بازده کاتالیتیکی ظاهری محاسبه شدند. انتخاب دماها بر اساس شرایط معمول نگهداری سرد، دمای محیط، دمای بهینه فعالیت آنزیم و محدوده آغاز دناتوراسیون حرارتی آسکوربات پراکسیداز انجام شد. دمای واکنش توسط حمام آب ترموستاتیک با دقت ۰/۲ °C ± کنترل شد و پیش از آغاز واکنش، تمامی اجزای مخلوط به مدت پنج دقیقه در دمای مورد نظر پیش‌انکوبه شدند (Rajan & Murugan, 2010).

- **تیمارهای تنش نمکی**

برای بررسی اثرهای یونی بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز، آزمون‌ها در حضور نمک‌های نیتراتی شامل KNO_3، $NaNO_3$، $AgNO_3$ و NH_4NO_3 انجام شدند. غلظت نهایی نمک‌ها در محدوده ۰ تا ۵۰ میلی‌مولار تنظیم گردید. نمک‌ها به‌صورت تازه در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) تهیه شدند و فعالیت آنزیمی تحت شرایط استاندارد اندازه‌گیری شد. غلظت ۳۰ میلی‌مولار به دلیل قرار گرفتن در محدوده‌ای که تغییر معنی‌دار در فعالیت آنزیم ایجاد می‌کرد و هنوز موجب غیرفعال شدن کامل آنزیم نمی‌شد، برای مطالعه‌های سینتیکی انتخاب شد. تمامی تیمارها با شاهد فاقد نمک مقایسه شدند. pH تمامی محلول‌های نمکی پس از تهیه بررسی و در صورت نیاز با استفاده از HCl یا NaOH در مقدار ۷.۰ تنظیم شد تا تغییرات مشاهده‌شده ناشی از اثر یون‌ها بوده و نه تغییر pH محیط. مقادیر IC_{50} با برازش منحنی‌های پاسخ–دوز به مدل لجستیک چهارپارامتری (4PL) محاسبه شدند. برازش منحنی‌های پاسخ–دوز برای تمامی نمک‌های مورد بررسی دارای ضریب تعیین (R^2) بیشتر از ۰/۹۸ بود و مقادیر IC_{50} همراه با فاصله اطمینان ۹۵ درصد گزارش شدند.

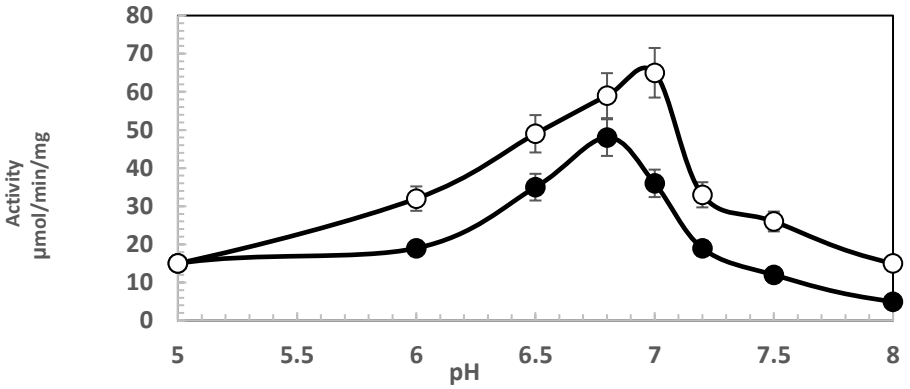
- **تجزیه و تحلیل آماری**

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس دوطرفه به منظور ارزیابی اثر مرحله رشدی، دما، غلظت نمک و برهم‌کنش آن‌ها بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز و پارامترهای سینتیکی انجام شد. نرمال بودن داده‌ها با آزمون شاپیرو–ویک و همگنی واریانس‌ها با آزمون Levene بررسی شد. تمامی داده‌ها شرایط لازم برای تحلیل‌های پارامتری را دارا بودند. در مواردی که اختلاف معنی‌دار مشاهده شد، آزمون مقایسه چندگانه توکی برای مقایسه میانگین‌ها به کار رفت. تمامی آزمون‌ها دوطرفه بودند. سطح معنی‌داری آماری برابر ($P <$ ۰/۰۵) در نظر گرفته شد. تمامی تحلیل‌های آماری با استفاده از GraphPad Prism 10 انجام شدند و سطح معنی‌داری برابر با ($P <$ ۰/۰۵) در نظر گرفته شد. همه آزمایش‌ها با سه تکرار زیستی مستقل انجام شدند و برای هر تکرار زیستی، سه تکرار فنی اندازه‌گیری گردید. میانگین تکرارهای فنی برای هر تکرار زیستی محاسبه و در تحلیل‌های آماری به عنوان واحد آزمایشی (n=۳) مورد استفاده قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار (SD) گزارش شدند تا قابلیت اطمینان و تکرارپذیری داده‌ها تضمین گردد. اندازه اثر (Effect size) برای تمامی آزمون‌های ANOVA با استفاده از شاخص Partial Eta Squared (η^2p) محاسبه شد .برای بررسی روابط بین پارامترهای سینتیکی آسکوربات پراکسیداز، حساسیت به مهار یونی، دما و مرحله رسیدگی، ضرایب همبستگی پیرسون محاسبه شد. ماتریس همبستگی به‌صورت نقشه حرارتی (Heatmap) با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism ترسیم شد تا الگوهای ارتباطی بین متغیرهای مورد بررسی به‌صورت بصری نمایش داده شوند.

۳- نتایج

• اثر pH بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

به‌منظور ارزیابی اثر نمک‌های مختلف بر ویژگی‌های سینتیکی آسکوربات پراکسیداز (APX)، فعالیت آنزیم در میوه‌های نارس و رسیده تحت تیمارهای مختلف بررسی شد. علاوه بر فعالیت نسبی آنزیم، پارامترهای سینتیکی، pH و دمای بهینه، پایداری حرارتی و اثر غلظت‌های مختلف نمک‌ها نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. در هر دو مرحله رسیدگی (نارس و رسیده)، فعالیت آسکوربات پراکسیداز تحت اثر pH الگوی زنگوله‌ای مشخصی را نشان داد. درpH های اسیدی (کمتر از ۵) فعالیت آنزیم تقریباً صفر بود و با افزایش pH به‌تدریج افزایش یافت تا به مقدار بیشینه برسد. در میوه نارس، بیش‌ترین فعالیت در pH = ۶/۸ حدود ۴۵/۳ میکرومول بر دقیقه بر میلیگرم پروتئین و در میوه رسیده در pH = ۷ حدود ۶۵ میکرومول بر دقیقه بر میلیگرم پروتئین مشاهده شد (شکل ۱). پس از این نقطه، با افزایش pH به سمت شرایط قلیایی (بالاتر از ۸)، فعالیت آنزیم در هر دو حالت کاهش یافت. همچنین فعالیت APX در میوه رسیده در تمام محدوده pH بالاتر از میوه نارس بود و دامنه پایداری وسیع‌تری نسبت به تغییرات pH نشان داد. نتایج ANOVA دوطرفه نشان داد که هم pH و هم مرحله رسیدگی اثر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم داشتند ($P < ۰/۰۰۰۱$). عامل pH بیش‌ترین سهم از تغییرات فعالیت را به خود اختصاص داد (η^2=۰/۸۳۷) در حالی که مرحله رسیدگی اثر کمتری اما معنی‌دار داشت (η^2 =۰/۰۶۰). همچنین برهمکنش pH و رسیدگی نیز معنی‌دار بود (F=۲/۷۰، P=۰/۰۰۸۶، η^2 ۰/۰۳۹) که نشان می‌دهد پاسخ آنزیم به تغییرات pH در میوه نارس و رسیده یکسان نیست (جدول ۱). در مجموع، pH مهم‌ترین عامل تعیین‌کننده فعالیت APX در گلابی است و فرآیند رسیدگی علاوه بر افزایش فعالیت کلی آنزیم، موجب تغییر در pH بهینه و بهبود پایداری آن در محدوده وسیع‌تری از pH می‌شود.



شکل ۱: منحنی پروفایل pH فعالیت آسکوربات پراکسیداز در میوه گلابی محلی در شرایط نارس (●) و رسیده (○)

جدول ۱. آنالیز واریانس دوطرفه برای ارزیابی اثرهای مرحله رسیدگی و pH بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز در گلابی

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقادیر F	ارزش P	اندازه اثر(η^2)
مراحل رسیدگی	۱	۱۶۶۲/۷۲	۱۶۶۲/۷۲	۴۴/۸۹	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۶۰
pH	۱۱	۲۳۳۹۴/۴۴	۲۱۲۶/۷۷	۵۷/۴۲	<۰/۰۰۰۱	۰/۸۳۷
اثر متقابل رسیدگی و pH	۱۱	۱۱۰۱/۹۴	۱۰۰/۱۸	۲/۷۰	<۰/۰۰۸۶	۰/۰۳۹
خطا (باقیمانده ها)	۴۸	۱۷۷۸/۰۰	۳۷/۰۴	–	–	۰/۰۶۴
کل	۷۱	۲۷۹۳۷/۱۱	–	–	–	۱/۰۰۰

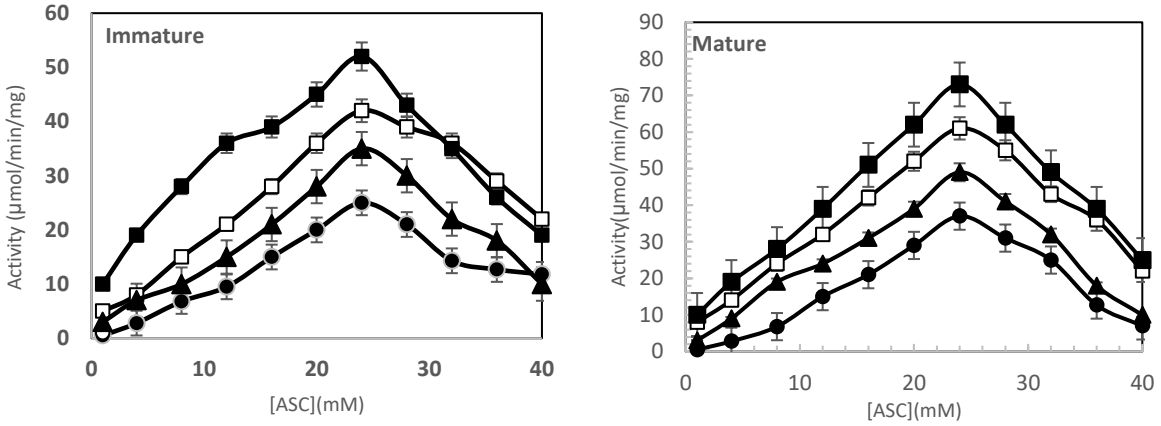
اثر مرحله رسیدگی (میوه‌های نارس و رسیده)، pH و برهم‌کنش آن‌ها بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز با استفاده از آزمون آنالیز واریانس دوطرفه بررسی شد. در این تحلیل، درجه آزادی (df)، مجموع مربعات (SS)، میانگین مربعات (MS)، مقادیر F و مقادیر P متناظر ارائه شده‌اند. اختلافات آماری در سطح P < 0/05 معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

• بررسی سینتیکی فعالیت آسکوربات پراکسیداز در شرایط نارس و رسیده

فعالیت آسکوربات پراکسیداز در هر دو مرحله نارس و رسیده با افزایش غلظت آسکوربات (۱ تا ۲۴ میلی‌مولار) به‌تدریج افزایش یافت و در غلظت ۲۴ میلی‌مولار به حداکثر مقدار خود رسید، سپس کاهش نشان داد. بیش‌ترین فعالیت در میوه‌های نارس و رسیده به‌ترتیب ۴۰/۳۳ و ۶۱/۶۷ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین در غلظت ۲۴ میلی‌مولار مشاهده شد. میانگین فعالیت آنزیم در میوه‌های رسیده حدود ۴۷.۵٪ بیشتر از میوه‌های نارس بود که نشان‌دهنده افزایش ظرفیت کاتالیتیکی APX طی فرآیند رسیدگی است. همچنین میوه‌های رسیده نسبت به نارس دارای فعالیت بالاتر در کل محدوده غلظت بوده و افزایش ۱/۴۸ برابری نشان داد.

• اثر دما بر فعالیت و ویژگی‌های سینتیکی APX در میوه‌های نارس و رسیده گلابی

فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX) در هر دو مرحله رسیدگی به‌طور معنی‌داری تحت اثر دما قرار گرفت (شکل‌های ۲ و ۳). در هر دو مرحله نارس و رسیده، فعالیت آنزیم با افزایش دما از ۴ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد به‌تدریج افزایش یافت و در ۳۵ درجه سانتی‌گراد به بیش‌ترین مقدار خود رسید. حداکثر فعالیت آنزیم در ۳۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد ($P < ۰/۰۰۰۱$)، به‌طوری که فعالیت به‌ترتیب به حدود ۵۲ و ۷۳ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین در میوه‌های نارس و رسیده رسید. با افزایش دما به بیش از ۳۵ درجه سانتی‌گراد، فعالیت آنزیم روند کاهشی نشان داد و در ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد افت شدیدی در ظرفیت کاتالیتیکی APX مشاهده شد. بررسی اثر دمای نگهداری و انکوباسیون نیز الگوی مشابهی را نشان داد، به‌طوری‌که نمونه‌های نگهداری‌شده در ۳۵ درجه سانتی‌گراد بیش‌ترین فعالیت آنزیمی را داشتند، در حالی که تیمارهای سرمایی (۴ درجه سانتی‌گراد) و گرمایی (۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد) موجب کاهش معنی‌دار فعالیت APX شدند.



شکل ۲: فعالیت سینتیکی آسکوربات پراکسیداز در هموژنات گلابی محلی نارس (چپ) و رسیده (راست) در۴ درجه سانتیگراد (●)، دمای آزمایشگاه (□) ، ۳۵ درجه سانتیگراد (■) و ۵۰ درجه سانتیگراد (▲).

نتایج نشان داد که دما اثر معنی‌داری بر پارامترهای سینتیکی آنزیم آسکوربات پراکسیداز در میوه نارس گلابی داشت ($P<۰/۰۰۰۱$). همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، مقدار K_m در دمای ۳۵ °C به کم‌ترین مقدار خود (۸±۰/۳ میلی‌مولار) رسید. بیش‌ترین مقادیر Kmدر دماهای ۴، ۵۰ و ۶۰ °C (۱۴ تا ۱۵ میلی‌مولار) مشاهده شد. بیش‌ترین مقدار V_{max} در دمای ۳۵ °C برابر با ۵۲±۲/۱ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین به دست آمد. کم‌ترین مقدار V_{max} نیز در دمای ۶۰ °C درجه سانتی‌گراد (۱۶±۰/۹ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) مشاهده شد.کارایی کاتالیتیکی (V_{max}/K_m) نیز بیش‌ترین مقدار را در دمای ۳۵ °C (۶/۵±۰/۲۲) و کم‌ترین مقدار را در دمای ۶۰ °C (۱/۰۶±۰/۰۶) نشان داد. نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که اثر دما بر K_m، V_{max} و کارایی کاتالیتیکی معنی‌دار بود ($P<۰/۰۰۰۱$) ؛ (جدول ۴). در میوه رسیده نیز دما اثر معنی‌داری بر پارامترهای سینتیکی APX داشت ($P<۰/۰۰۰۱$). مطابق جدول ۵، کم‌ترین مقدار K_m در دماهای ۲۵، ۳۵ و ۵۰ °C (۱۱ تا ۱۲ میلی‌مولار) مشاهده شد، در حالی که بیش‌ترین مقدار K_m در دمای ۶۰ °C (۱۵±۰/۶میلی‌مولار) به دست آمد. بیش‌ترین مقدار V_{max} در دمای ۳۵ °C (۷۳±۲/۸ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) و کم‌ترین مقدار آن در دمای ۶۰ °C (۲۲±۱/۱ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) ثبت شد. همچنین، کارایی کاتالیتیکی در دمای ۳۵ °C به بیش‌ترین مقدار خود (۶/۶۰±۰/۲۱) رسید و در دمای ۶۰°C به کم‌ترین مقدار (۱/۴۶±۰/۰۸) کاهش یافت. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثر دما بر K_m، V_{max} و کارایی کاتالیتیکی در میوه رسیده نیز بسیار معنی‌دار بود ($P<۰/۰۰۰۱$) (جدول ۶). در مجموع، فعالیت APX در میوه رسیده در بیشتر دماها بالاتر از میوه نارس بود. در هر دو مرحله، بیش‌ترین V_{max} و کارایی کاتالیتیکی در ۳۵°C و کم‌ترین مقادیر در ۶۰ °C مشاهده شد.

جدول ۲: پارامترهای سینتیکی فعالیت آسکوربات پراکسیداز در شرایط نارس و دمایی مختلف

دما (°C)	ثابت میکائیلیس (میلی‌مولار)	بیشینه سرعت (میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین)	بازدهی کاتالیتیکی (V_{max} / K_m)
۴	۱۴/۰ ± ۰/۵^{a}	۲۵/۰ ± ۱/۳^{c}	۱/۷۸ ± ۰/۹^{d}
۲۵	۱۲/۰ ± ۰/۴^{b}	۴۲/۰ ± ۱/۸^{b}	۳/۵۰ ± ۰/۱۵^{b}
۳۵	۸/۰ ± ۰/۳^{c}	۵۲/۰ ± ۲/۱^{a}	۶/۵۰ ± ۰/۲۲^{a}
۵۰	۱۴/۰ ± ۰/۵^{a}	۳۵/۰ ± ۱/۶^{b}	۲/۵۸ ± ۰/۱۱^{c}
۶۰	۱۵/۰ ± ۰/۶^{a}	۱۶/۰ ± ۰/۹^{d}	۱/۰۶ ± ۰/۰۶^{d}

داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (n = 3) ارائه شده‌اند. حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون HSDتوکی در سطح معنی‌داری (P < 0/05) هستند.

جدول ۳. نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه پارامترهای سینتیکی پراکسیداز در دماهای مختلف در میوه نارس گلابی

پارامتر	ارزش F	ارزش P
ثابت میکائیلیس	۳۱/۸۴	<۰/۰۰۰۱
بیشینه سرعت	۱۴۲/۵۷	<۰/۰۰۰۱
بازدهی کاتالیتیکی	۲۴۸/۴۳	<۰/۰۰۰۱

جدول ۴: پارامترهای سینتیکی فعالیت آسکوربات پراکسیداز در شرایط رسیده و دمایی مختلف

دما (°C)	ثابت میکائیلیس (میلی‌مولار)	بیشینه سرعت (میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین)	بازدهی کاتالیتیکی (V_{max} / K_m)
۴	۱۴/۰ ± ۰/۵^{a}	۳۴/۰ ± ۱/۵^{d}	۲/۴۲ ± ۰/۱۰^{d}
۲۵	۱۱/۰ ± ۰/۴^{b}	۶۱/۰ ± ۲/۴^{b}	۵/۵۰ ± ۰/۱۸^{b}
۳۵	۱۱/۰ ± ۰/۳^{b}	۷۳/۰ ± ۲/۸^{a}	۶/۶۰ ± ۰/۲۱^{a}
۵۰	۱۲/۰ ± ۰/۴^{b}	۴۹/۰ ± ۲/۰^{c}	۴/۱۰ ± ۰/۱۵^{c}
۶۰	۱۵/۰ ± ۰/۶^{a}	۲۲/۰ ± ۱/۱^{e}	۱/۴۶ ± ۰/۰۸^{e}

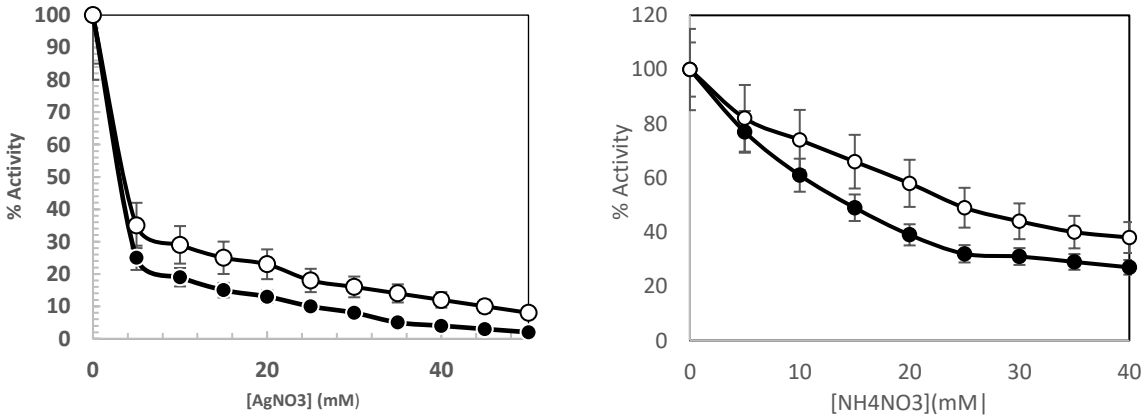
داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (n =۳) ارائه شده‌اند. حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون HSDتوکی در سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) هستند.

جدول ۵. نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه مقایسه پارامترهای سینتیکی پراکسیداز در دماهای مختلف در شرایط رسیده

پارامتر	ارزش F	ارزش P
ثابت میکائیلیس	۱۸/۷۶	<۰/۰۰۰۱
بیشینه سرعت	۱۹۶/۴۲	<۰/۰۰۰۱
بازدهی کاتالیتیکی	۲۸۷/۵۳	<۰/۰۰۰۱

• اثر نیترات نقره ($AgNO_3$) بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

نتایج شکل ۳ نشان داد که نیترات نقره ($AgNO_3$) قوی‌ترین اثر مهاری را بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX) در هر دو مرحله نارس و رسیده داشت. با افزایش غلظت $AgNO_3$، فعالیت آنزیم به‌صورت وابسته به غلظت کاهش یافت، به‌طوری‌که حتی در غلظت‌های پایین نیز افت محسوسی در فعالیت APX مشاهده شد و در غلظت‌های بالاتر، فعالیت آنزیم تقریباً به صفر رسید. همچنین، حساسیت APXدر میوه رسیده بیشتر از میوه نارس بود و مقادیر IC_{50} پایین‌تر این موضوع را تأیید کرد. نتایج آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که غلظت $AgNO_3$ ، مرحله رسیدگی و برهمکنش آن‌ها بر فعالیت APX همگی اثر بسیار معنی‌داری داشتند($P<۰/۰۰۰۱$)، جدول ۷). در میان عوامل بررسی‌شده، غلظت $AgNO_3$ با اندازه اثر $\eta^2=$ ۰/۸۳۸ بیش‌ترین سهم را در تغییرات فعالیت آنزیم داشت، در حالی که اندازه اثر برهم‌کنش مرحله رسیدگی و غلظت $AgNO_3$ نسبتاً کوچک بود ($\eta^2=$۰/۰۱۹).



شکل ۳ اثر نیترات نقره (چپ) و نیترات آمونیوم (راست) بر فعالیت سینتیکی آسکوربات پراکسیداز در هموژنات گلابی محلی نارس (●) و رسیده (○)

جدول ۶. جدول آنالیز واریانس دوطرفه برای اثر تیمار AgNO3 بر فعالیت پراکسیداز در گلابی

منبع تغییرات.	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقادیرF	ارزش P	اندازه اثر(η^2)
مراحل رسیدگی	۱۸۲۴/۳	۱	۱۸۲۴/۳	۱۲۶/۸	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۹۵
غلظت $AgNO_3$	۱۶۰۲۴۵/۷	۱۰	۱۶۰۲۴/۶	۱۱۱۳/۹	<۰/۰۰۰۱	۰/۸۳۸
اثر متقابل رسیدگی و غلظت	۳۶۸۸/۴	۱۰	۳۶۸/۸	۲۵/۶	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۱۹
خطا (باقیمانده ها)	۱۲۶۶/۲	۸۸	۱۴/۳۹	—	—	۰/۰۰۷
کل	۱۹۱۰۲۴/۶	۱۰۹	—	—	—	۱/۰۰۰

• اثر نیترات آمونیوم (NH_4NO_3) بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

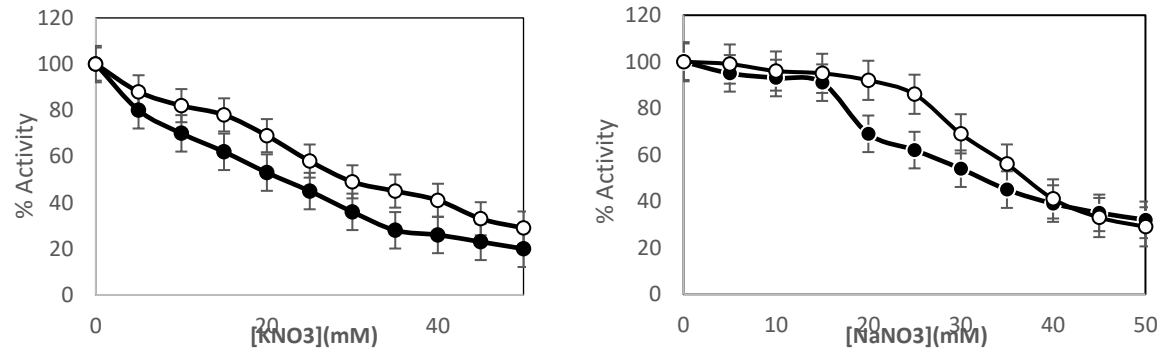
نتایج شکل ۴ نشان داد که با افزایش غلظت نیترات آمونیوم (NH_4NO_3)، فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX) در هر دو مرحله نارس و رسیده به‌صورت وابسته به غلظت کاهش یافت. با وجود این، حتی در بالاترین غلظت مورد بررسی (۵۰ میلی‌مولار)، فعالیت آنزیم به‌طور کامل مهار نشد. الگوی تغییرات در دو مرحله رسیدگی مشابه بود، اگرچه مقادیر IC_{50} نشان داد که برای کاهش ۵۰ درصدی فعالیت APX به غلظت‌های نسبتاً بالای NH_4NO_3 نیاز است. نتایج آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که مرحله رسیدگی، غلظت NH_4NO_3 و برهمکنش آن‌ها بر فعالیت APX اثر معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۰۰۱، جدول ۸). در میان عوامل بررسی‌شده، غلظت NH_4NO_3 با اندازه اثر η^2= ۰/۷۶۹ بیش‌ترین سهم را در تغییرات فعالیت آنزیم داشت، در حالی که اندازه اثر برهم‌کنش مرحله رسیدگی و غلظت NH_4NO_3 نسبتاً کوچک بود (η^2=۰/۰۳۰).

جدول ۷. جدول آنالیز واریانس دوطرفه برای اثر تیمار NH_4NO_3 بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز در گلابی

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقادیرF	ارزش P	اندازه اثر(η^2)
مراحل رسیدگی	۱۸۳۰/۴	۱	۱۸۳۰/۴	۴۸/۷	<۰/۰۰۰۱	۰/۱۱۸
غلظت NH_4NO_3	۳۱۷۴۲/۸	۱۰	۳۱۷۴/۳	۸۴/۵	<۰/۰۰۰۱	۰/۷۶۹
اثر متقابل رسیدگی و غلظت	۱۲۵۴/۶	۱۰	۱۲۵/۵	۳/۳۴	<۰/۰۰۱۷	۰/۰۳۰
خطا (باقیمانده ها)	۳۲۹۹/۵	۸۸	۳۷/۴۹	—	—	۰/۰۸۰
کل	۳۸۱۲۷/۳	۱۰۹	—	—	—	۱/۰۰۰

• اثر نیترات پتاسیم (KNO_3) بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

نتایج شکل ۵ نشان داد که با افزایش غلظت نیترات پتاسیم(KNO_3) ، فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX) در هر دو مرحله نارس و رسیده به‌صورت وابسته به غلظت کاهش یافت. با وجود این، حتی در بالاترین غلظت مورد بررسی (۵۰ میلی‌مولار)، فعالیت آنزیم به‌طور کامل مهار نشد. الگوی تغییرات در دو مرحله رسیدگی مشابه بود، اگرچه مقادیر IC_{50} نشان داد که حساسیت APX در میوه رسیده اندکی بیشتر از میوه نارس است؛ به‌طوری‌که مقادیر IC_{50} به‌ترتیب حدود ۱۵ و ۲۱ میلی‌مولار برای میوه‌های رسیده و نارس برآورد شد.



شکل ۴: اثر نیترات پتاسیم (چپ) و نیترات سدیم (راست) بر فعالیت سینتیکی آسکوربات پراکسیداز در هموژنات گلابی محلی نارس (●) و رسیده(○)

نتایج آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که مرحله رسیدگی و غلظت KNO_3 هر دو اثر بسیار معنی‌داری بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)داشتند(P<0.0001 ؛ جدول ۸). همچنین، برهم‌کنش مرحله رسیدگی و غلظت KNO_3 نیز معنی‌دار بود (F=۲/۶۳، P=۰/۰۰۹)، که نشان‌دهنده تفاوت پاسخ آنزیم به غلظت‌های مختلف KNO_3 در مراحل مختلف رسیدگی است. غلظت KNO_3 با بیش‌ترین اندازه اثر (η^2= ۰/۸۶۲) مهم‌ترین عامل مؤثر بر تغییرات فعالیت APX بود.

جدول ۸. جدول آنالیز واریانس دوطرفه برای اثر تیمار KNO3 بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز در گلابی

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقادیر F	ارزش P	اندازه اثر(η^2)
مراحل رسیدگی	۱۳۹۲/۸	۱	۱۳۹۲/۸	۳۹/۶	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۴۷
غلظت KNO_3	۲۵۵۸۴/۳	۱۰	۲۵۵۸/۴	۷۲/۷	<۰/۰۰۰۱	۰/۸۶۲
اثر متقابل رسیدگی و غلظت	۹۲۴/۷	۱۰	۹۲/۵	۲/۶۳	<۰/۰۰۱۰	۰/۰۳
خطا (باقیمانده ها)	۳۰۹۴/۶	۸۸	۳۵/۱۷	—	—	۰/۱۰۴
کل	۲۹۶۹۶/۴	۱۰۹	—	—	—	۱/۰۰۰

- **اثر نیترات سدیم ($NaNO_3$) بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز**

نتایج شکل ۶ نشان داد که با افزایش غلظت نیترات سدیم($NaNO_3$) ، فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX) در هر دو مرحله نارس و رسیده به‌صورت وابسته به غلظت کاهش یافت. با این حال، حتی در بالاترین غلظت مورد بررسی (۵۰ میلی‌مولار)، حدود ۲۵ تا ۳۰ درصد فعالیت اولیه آنزیم حفظ شد. الگوی تغییرات در دو مرحله رسیدگی مشابه بود و مقادیر IC_{50} نشان داد که حساسیت APX در میوه رسیده اندکی بیشتر از میوه نارس است؛ به‌طوری‌که مقادیر IC_{50} به‌ترتیب حدود ۲۲ و ۳۱ میلی‌مولار برای میوه‌های رسیده و نارس برآورد شد. نتایج آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که مرحله رسیدگی و غلظت $NaNO_3$ هر دو اثر بسیار معنی‌داری بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز داشتند (P<۰/۰۰۰۱، جدول ۹). همچنین، برهم‌کنش مرحله رسیدگی و غلظت $NaNO_3$ نیز معنی‌دار بود (F=۸/۴۵، P<۰/۰۰۰۱)، که نشان‌دهنده تفاوت پاسخ فعالیت APX به غلظت‌های مختلف $NaNO_3$ در مراحل مختلف رسیدگی است. در میان عوامل بررسی‌شده، غلظت $NaNO_3$ با اندازه اثر η^2= ۰/۷۰۰ بیش‌ترین سهم را در تغییرات فعالیت آنزیم داشت.

جدول ۹. جدول آنالیز واریانس دوطرفه برای اثر تیمار $NaNO_3$ بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز در گلابی

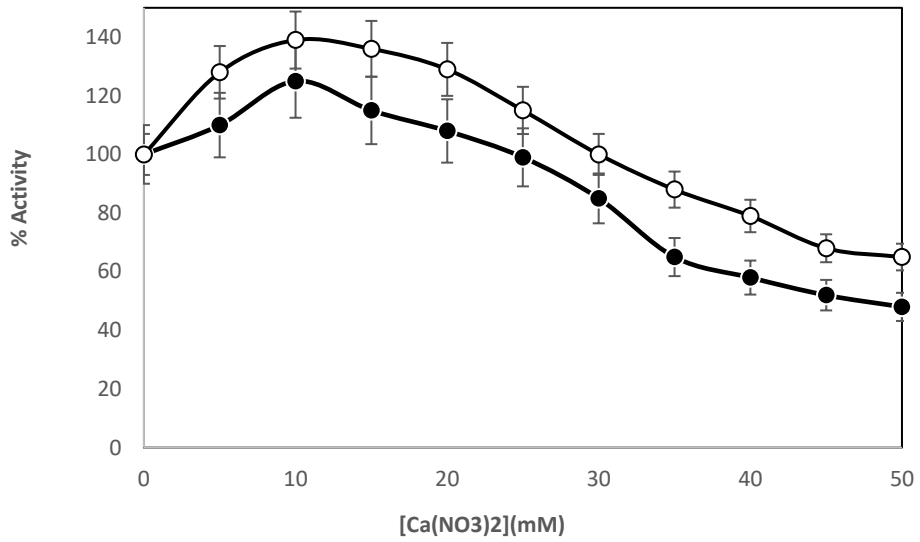
منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقادیر F	ارزش P	اندازه اثر(η^2)
مراحل رسیدگی	۶۲۴۸/۵	۱	۶۲۴۸/۵	۱۴۲/۳	<۰/۰۰۰۱	۰/۱۵۶
غلظت $NaNO_3$	۲۸۰۳۶/۴	۱۰	۲۸۰۳/۶	۶۳/۸	<۰/۰۰۰۱	۰/۷۰۰
اثر متقابل رسیدگی و غلظت	۳۷۱۲/۸	۱۰	۳۷۱/۳	۸/۴۵	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۹۳
خطا (باقیمانده ها)	۳۷۶۸/۲	۸۸	۴۳/۹۰	—	—	۰/۰۵۱
کل	۴۰۰۶۰/۹	۱۰۹	—	—	—	۱/۰۰۰

- **اثر نیترات کلسیم بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز**

نتایج شکل ۵ نشان داد که نیترات کلسیم [$Ca(NO_3)_2$] برخلاف سایر نمک‌های نیتراتی، در غلظت‌های پایین موجب افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX) شد. فعالیت آنزیم در هر دو مرحله نارس و رسیده تا غلظت ۵–۱۰ میلی‌مولار افزایش یافت و به حدود ۱۲۵–۱۳۵٪ مقدار شاهد رسید، به‌طوری‌که این افزایش در میوه رسیده بیشتر بود. با افزایش بیشتر غلظت، فعالیت APX به‌تدریج کاهش یافت، اما حتی در غلظت ۵۰ میلی‌مولار نیز بیش از ۵۰٪ فعالیت اولیه حفظ شد. همچنین، مقادیر IC_{50} برای میوه‌های نارس و رسیده به‌ترتیب حدود ۳۵ و ۳۰ میلی‌مولار برآورد شد که بیانگر اثر مهاری ضعیف‌تر نیترات کلسیم نسبت به سایر نمک‌های مورد بررسی است. نتایج آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که مرحله رسیدگی و غلظت $Ca(NO_3)_2$ هر دو اثر بسیار معنی‌داری بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX) داشتند (P<۰/۰۰۰۱؛ جدول ۱۰). غلظت $Ca(NO_3)_2$ با اندازه اثر η^2=۰/۸۲۱ مهم‌ترین عامل مؤثر بر تغییرات فعالیت APX بود، در حالی که اثر مرحله رسیدگی نیز معنی‌دار بود (η^2= ۰/۰۷۸). در مقابل، برهم‌کنش مرحله رسیدگی و غلظت $Ca(NO_3)_2$ معنی‌دار نبود (F=۰/۶۳، P=۰/۷۷۶) ، که نشان می‌دهد پاسخ فعالیت APX به غلظت‌های مختلف $Ca(NO_3)_2$ در هر دو مرحله رسیدگی مشابه بوده است.

جدول ۱۰. جدول آنالیز واریانس دوطرفه برای اثر تیمار [$Ca(NO_3)_2$] بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز در گلابی

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقادیر F	ارزش P	اندازه اثر(η^2)
مراحل رسیدگی	۴۲۷۲/۱۴	۱	۴۲۷۲/۱۴	۳۹/۳۵	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۷۸
غلظت $Ca(NO_3)_2$	۴۴۸۱۳/۴۲	۱۰	۴۴۸۱/۳۴	۴۱/۲۷	<۰/۰۰۰۱	۰/۸۲۱
اثر متقابل رسیدگی و غلظت	۶۸۸/۷۰	۱۰	۶۸/۸۷	۰/۶۳	۰/۷۷۶	۰/۰۱۳
خطا (باقیمانده ها)	۴۷۷۷/۳۳	۴۴	۱۰۸/۵۸	—	—	—
کل	۵۴۵۵۱/۵۹	۶۵	—	—	—	۱/۰۰۰



شکل ۵: اثر نیترات کلسیم بر فعالیت سینتیکی آسکوربات پراکسیداز در هموژنات گلابی محلی نارس (●) و رسیده(○)

جدول ۱۱: مقدار IC_{50} محاسبه شده برای APX در حضور نمکهای نیتراتی مختلف در دو شرایط نارس و رسیده

تیمار	IC_{50} (میلی‌مولار) نارس	IC_{50} (میلی‌مولار) رسیده
$Ca(NO_3)_2$	۳۵/۲ ± ۱/۴[a]	۳۰/۱ ± ۱/۲[a]
$NaNO_3$	۳۱/۱ ± ۱/۱[b]	۲۲/۳ ± ۰/۹[b]
KNO_3	۲۱/۴ ± ۰/۸[c]	۱۵/۲ ± ۰/۷[c]
NH_4NO_3	۱۵/۳ ± ۰/۸[d]	۱۰/۱ ± ۰/۵[d]
$AgNO_3$	۲/۱ ± ۰/۱[e]	۲/۱ ± ۰/۱[e]

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار (n = 3) گزارش شده‌اند. حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها بر اساس آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری P< ۰/۰۵ هستند.

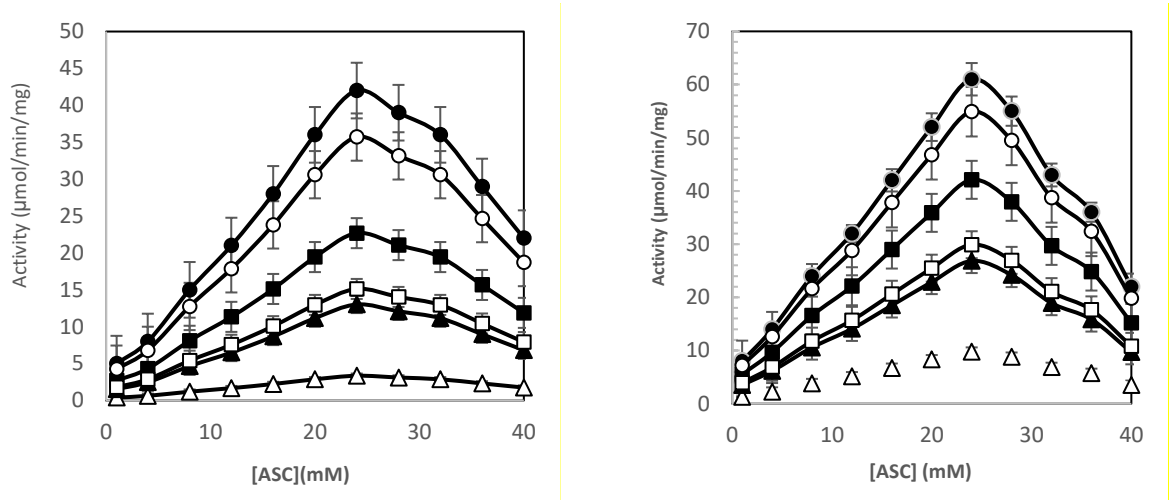
نتایج حاصل از تعیین IC_{50} نشان داد که قدرت مهاری نمک‌های مورد بررسی بر فعالیت APX تفاوت قابل‌توجهی داشت (جدول ۱۱). کم‌ترین مقدار IC_{50} مربوط به نیترات نقره (۰/۲ میلی‌مولار) بود که بیانگر توان مهاری بسیار بالای این نمک بر فعالیت آنزیم است، در حالی که نیترات کلسیم با بیش‌ترین مقدار IC_{50} یعنی ۳۵ و ۳۰ میلی‌مولار به‌ترتیب در میوه‌های نارس و رسیده) کم‌ترین اثر مهاری را نشان داد. مقادیر IC_{50} برای نیترات‌های سدیم، پتاسیم و آمونیوم نیز بین این دو حد قرار گرفت که بیانگر شدت مهاری متوسط این یون‌ها بر APX است.

- **اثر نمک‌های نیترات بر رفتار سینتیکی APX در میوه‌های نارس و رسیده گلابی**

نتایج شکل ۸ نشان داد که فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX) در حضور غلظت ثابت ۳۰ میلی‌مولار نمک‌های مختلف نیتراتی از سینتیک مایکلیس–منتن پیروی کرد. در هر دو مرحله نارس و رسیده، افزایش غلظت آسکوربات موجب افزایش سرعت واکنش شد، اما نوع نمک نیتراتی بر ظرفیت کاتالیتیکی آنزیم اثر متفاوتی داشت. نیترات کلسیم کم‌ترین اثر مهاری را نشان داد، به‌طوری‌که مقدار V_{max} در میوه نارس از ۴۲ به ۳۶ و در میوه رسیده از ۶۱ به ۵۴/۹ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین کاهش یافت. در مقابل، نیترات نقره بیش‌ترین اثر مهاری را اعمال کرد و V_{max} را به ۳/۱۲ و ۹/۷۶ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین در میوه‌های نارس و رسیده کاهش داد. سایر نمک‌های $NaNO_3$ ، KNO_3 و NH_4NO_3 اثرهای مهاری متوسطی داشتند. مقدار K_m در تمامی تیمارها تقریباً ثابت (۱۱–۱۲ میلی‌مولار) باقی ماند و اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد، در حالی که V_{max} و کارایی کاتالیتیکی به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند. همچنین، فعالیت APX در میوه رسیده در تمامی تیمارها بیشتر از میوه نارس بود. ترتیب حفظ فعالیت آنزیم در هر دو مرحله :

$$Ca(NO_3)_2 > NaNO_3 > NH_4NO_3 \approx KNO_3 > AgNO_3$$

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که نوع نمک نیتراتی مهم‌ترین عامل مؤثر بر فعالیت APX در هر دو مرحله رسیدگی بود P<۰/۰۰۰۱، جداول ۱۲ و ۱۳). همچنین، برهم‌کنش نوع نمک و غلظت آسکوربات معنی‌دار بود، اگرچه اندازه اثر آن نسبت به عوامل اصلی کمتر بود.



شکل ۶: فعالیت سینتیکی آسکوربات پراکسیداز در هموژنات گلابی محلی رسیده (راست) و نارس (چپ) در حضور غلظتهای صفر (●) و ۴۰ mM از نیترات نقره (Δ)، نیترات سدیم (■)، نیترات کلسیم (o)، نیترات پتاسیم (□) و نیترات آمونیوم (▲).

جدول ۱۲: مقایسه اثر نمک‌های نیترات و غلظت آسکوربات بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز در میوه‌های نارس و رسیده گلابی

پارامتر	میوه نارس	میوه رسیده
اندازه اثر نمک‌ها (η^2)	۰/۵۴۱	۰/۵۲۳
اندازه اثر آسکوربات (η^2)	۰/۳۵۱	۰/۳۶۷
اندازه اثر متقابل آسکوربات و نمک‌ها (η^2)	۰/۰۷۳	۰/۰۶۰
قویترین مهارکننده	$AgNO_3$	$AgNO_3$
ضعیفترین مهارکننده	$Ca(NO_3)_2$	$Ca(NO_3)_2$
غلظت مطلوب و موثر آسکوربات	۲۴ mM	۲۴ mM
بیشترین فعالیت آسکوربات پراکسیداز	۴۳/۳ µmol min^{-1} mg^{-1}	۶۱/۴ µmol min^{-1} mg^{-1}

جدول ۱۳: اثر نمکهای نیتراتی در غلظت ثابت ۳۰ میلی مولار بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز در میوه گلابی نارس

تیمار	ثابت میکائیلیس (میلی‌مولار)	بیشینه سرعت (میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین)	بازدهی کاتالیتیکی (V_{max} / K_m)
Control	۱۲/۱ ± ۰/۳^{a}	۴۲/۱ ± ۲/۱^{a}	۳/۵۲ ± ۰/۱۲^{a}
$Ca(NO_3)_2$	۱۲/۳ ± ۰/۴^{a}	۳۶/۲ ± ۱/۸^{b}	۳/۰ ± ۰/۱۱^{b}
$NaNO_3$	۱۲/۲ ± ۰/۵^{a}	۲۲/۱ ± ۱/۳^{c}	۱/۸۳ ± ۰/۰۸^{c}
NH_4NO_3	۱۲/۳ ± ۰/۴^{a}	۱۵/۴ ± ۰/۹^{d}	۱/۲۵ ± ۰/۰۶^{d}
KNO_3	۱۲/۰ ± ۰/۳^{a}	۱۳/۳ ± ۰/۸^{d}	۱/۰۸ ± ۰/۰۵^{d}
$AgNO_3$	۱۲/۵ ± ۰/۴^{a}	۳/۹ ± ۰/۳^{e}	۰/۲۶ ± ۰/۰۲^{e}

جدول ۱۴. آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) پارامترهای سینتیکی آسکوربات پراکسیداز در میوه نارس گلابی

پارامتر	ارزش P	ارزش F
ثابت میکائیلیس	۰/۸۳۱ ns	۰/۴۲
بیشینه سرعت	<۰/۰۰۰۱	۱۸۶/۴
کارایی کاتالیتیکی	<۰/۰۰۰۱	۱۷۳/۸

جدول ۱۵: اثر نمکهای نیتراتی در غلظت ثابت ۳۰ میلی مولار بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز در میوه گلابی رسیده

تیمار	ثابت میکائیلیس (میلی‌مولار)	بیشینه سرعت (میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین)	بازدهی کاتالیتیکی (V_{max} / K_m)
Control	۱۱/۱ ± ۰/۳^{a}	۶۱/۱ ± ۲/۳^{a}	۵/۵۵ ± ۰/۱۸^{a}
$Ca(NO_3)_2$	۱۱/۱ ± ۰/۴^{a}	۵۴/۹ ± ۲/۱^{b}	۴/۹۹ ± ۰/۱۶^{b}
$NaNO_3$	۱۲/۴ ± ۰/۴^{a}	۴۲/۱ ± ۱/۸^{c}	۳/۵۰ ± ۰/۱۴^{c}
KNO_3	۱۱/۲ ± ۰/۳^{a}	۲۹/۹ ± ۱/۵^{d}	۲/۷۲ ± ۰/۱۱^{d}
NH_4NO_3	۱۱/۴ ± ۰/۵^{a}	۲۶/۸۴ ± ۱/۳^{d}	۲/۴۴ ± ۰/۱۰^{d}
$AgNO_3$	۱۲/۱ ± ۰/۳^{a}	۹/۷۶ ± ۰/۶^{e}	۰/۸۱ ± ۰/۰۴^{e}

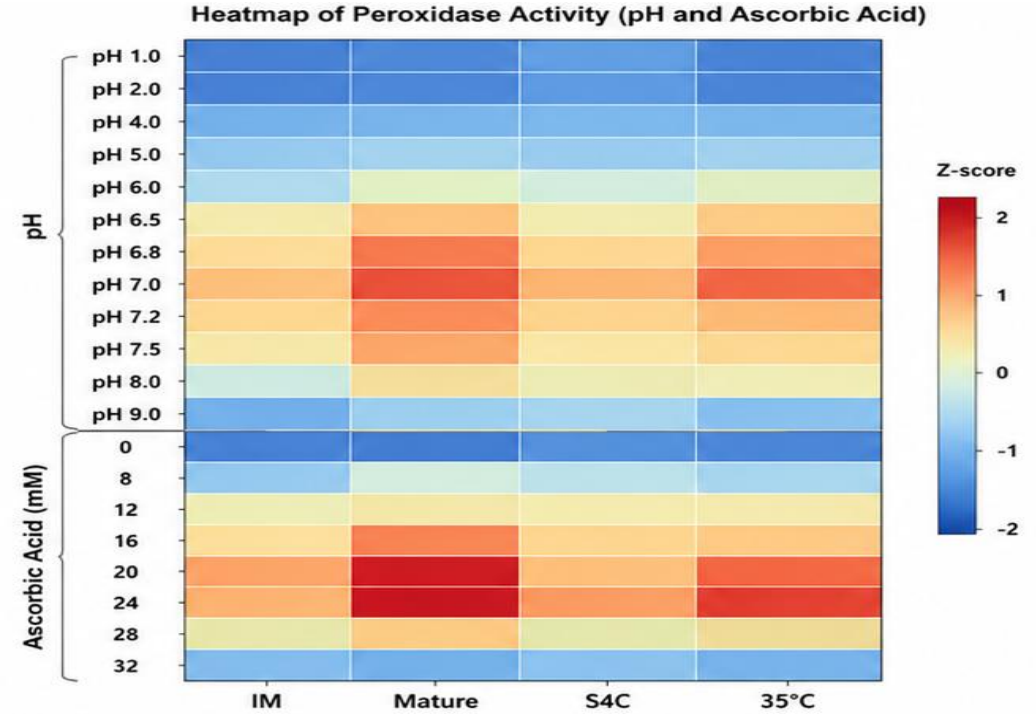
جدول ۱۶. آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) پارامترهای سینتیکی آسکوربات پراکسیداز در میوه رسیده گلابی

پارامتر	ارزش P	ارزش F
ثابت میکائیلیس	۰/۷۱۶ ns	۰/۵۸
بیشینه سرعت	<۰/۰۰۱	۲۴۱/۶
کارایی کاتالیتیکی	<۰/۰۰۱	۲۲۸/۳

نتایج نشان داد که حضور نمک‌های نیتراتی در غلظت ۳۰ میلی‌مولار موجب تغییر معنی‌دار در پارامترهای سینتیکی آسکوربات پراکسیداز (APX)در میوه رسیده شد. در شرایط شاهد، بیش‌ترین مقادیر V_{max} (۶۱ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) و کارایی کاتالیتیکی (۵/۵۵) مشاهده شد، در حالی که تیمار $AgNO_3$ کم‌ترین مقادیر V_{max} (۹/۷۶ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) و کارایی کاتالیتیکی (۰/۸۱) را نشان داد. در مقابل، $Ca(NO_3)_2$ کم‌ترین اثر مهاری را داشت و مقادیر V_{max} (۵۴/۹ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) و کارایی کاتالیتیکی (۴/۹۹) آن نزدیک به شاهد بود. مقدار K_m در تمامی تیمارها تقریباً ثابت (۱۱–۱۲ میلی‌مولار) باقی ماند، در حالی که V_{max} و کارایی کاتالیتیکی به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافتند (جدول ۱۵). بر این اساس، شدت اثر مهاری نمک‌ها به‌ترتیب:

$$AgNO_3 > NH_4NO_3 > KNO_3 > NaNO_3 > Ca(NO_3)_2$$

نتایج آنالیز واریانس نیز نشان داد که نوع نمک نیتراتی بر V_{max} و کارایی کاتالیتیکی اثر معنی‌داری داشت ($P<0/0001$) در حالی که K_m بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P>0.05$، جداول ۱۶ و ۱۷). همچنین، مقادیر V_{max} و کارایی کاتالیتیکی در میوه‌های رسیده به‌طور معنی‌داری بیشتر از میوه‌های نارس بود.



شکل ۷. نقشه حرارتی فعالیت نسبی آنزیم پراکسیداز در تیمارهای مختلف pH و غلظت‌های متفاوت اسکوربیک اسید. شدت رنگ آبی تا قرمز به ترتیب بیانگر فعالیت کم تا زیاد آنزیم است.

نتایج Heatmap نشان داد که فعالیت پراکسیداز وابستگی زیادی به pH و غلظت اسکوربیک اسید دارد. بیش‌ترین فعالیت در محدوده pH نزدیک به خنثی (۶/۸–۷) و غلظت‌های ۲۰ تا ۲۴ میلی‌مولار اسکوربیک اسید مشاهده شد، در حالی که درpH های اسیدی و قلیایی و همچنین غلظت‌های پایین و بسیار بالای اسکوربیک اسید فعالیت آنزیم کاهش یافت.

۴- بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX) در میوه‌های رسیده به‌طور معنی‌داری بیشتر از میوه‌های نارس بود. این افزایش احتمالاً بازتاب نیاز بیشتر بافت رسیده به سامانه‌های آنتی‌اکسیدانی برای مقابله با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)در طی فرآیند رسیدگی است. افزایش شدت تنفس و متابولیسم اکسیداتیو در مراحل پایانی رشد، تولید پراکسید هیدروژن را افزایش می‌دهد و در نتیجه، افزایش فعالیت APX می‌تواند به حفظ تعادل اکسایش–کاهش و محدود کردن آسیب اکسیداتیو کمک کند [۳،۷]. افزایش فعالیت APX در میوه‌های رسیده احتمالاً ناشی از افزایش تولید ROS در طی فرآیند رسیدگی است . این نتیجه با گزارش‌های منتشرشده در سیب و هلو که افزایش فعالیت APX را در مراحل پایانی رسیدگی گزارش کرده‌اند، همخوانی دارد [۱۹، ۲۰]. افزایش فعالیت APX در میوه‌های رسیده همچنین با نقش این آنزیم در چرخه آسکوربات–گلوتاتیون مطابقت دارد، چرخه‌ای که در آن APX با استفاده از آسکوربات، پراکسید هیدروژن را به آب تبدیل کرده و از آسیب اکسیداتیو به اجزای سلولی جلوگیری می‌کند (Foyer & Kunert, 2024). مطالعه‌های مختلف نیز نشان داده‌اند که افزایش فعالیت APX همراه با افزایش فعالیت سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون ردوکتاز، با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و حفظ یکپارچگی غشا همراه است (Jomova et al., 2024). فعالیت APX در محدوده pH نزدیک به خنثی به بیش‌ترین مقدار خود رسید و در شرایط اسیدی یا قلیایی کاهش یافت. این الگو احتمالاً به تغییر وضعیت یونیزاسیون باقی‌مانده‌های اسیدآمینه موجود در جایگاه فعال و نیز پایداری گروه هم (heme) وابسته است که هر دو در کارایی کاتالیتیکی آنزیم نقش اساسی دارند (Zhang et al., 2023). بنابراین، حفظ pH نزدیک به خنثی می‌تواند شرایط مناسب‌تری برای عملکرد APX فراهم کند. دما نیز اثر معنی‌داری بر فعالیت APX داشت و بیش‌ترین فعالیت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. افزایش فعالیت تا این دما احتمالاً ناشی از افزایش برخوردهای مؤثر بین آنزیم و سوبسترا است، در حالی که کاهش فعالیت در دماهای بالاتر را می‌توان به ناپایداری ساختار پروتئین و تغییر آرایش جایگاه فعال نسبت داد. همچنین، فعالیت کمتر در دماهای پایین احتمالاً ناشی از کاهش تحرک مولکولی و سرعت واکنش‌های آنزیمی است (McLeod et al., 2025; Hiner et al., 2000). حفظ فعالیت بالاتر APX در میوه‌های رسیده در تمام دماهای بررسی‌شده نیز بیانگر افزایش ظرفیت سامانه آنتی‌اکسیدانی در طی فرآیند رسیدگی است. نمک‌های نیتراتی اثرهای متفاوتی بر فعالیت و ویژگی‌های سینتیکی APX نشان دادند. در میان آن‌ها، نیترات کلسیم کم‌ترین اثر مهاری را داشت، در حالی که نیترات نقره بیش‌ترین کاهش را در فعالیت آنزیم، Vmax و کارایی کاتالیتیکی ایجاد کرد. هم‌راستایی نتایج فعالیت آنزیمی، مقادیر IC_{50} و پارامترهای سینتیکی نشان می‌دهد که تغییرات مشاهده‌شده در ظرفیت کاتالیتیکی APX با شدت اثر هر یک از نمک‌های نیتراتی مطابقت دارد. اثر مهاری شدید $AgNO_3$ احتمالاً به تمایل زیاد یون Ag^+ برای برهم‌کنش با گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌ها و ایجاد تغییر در ساختار آنزیم مربوط است، در حالی که یون Ca^{2+} با حفظ پایداری ساختار پروتئین و برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی، کم‌ترین اثر مهاری را بر APX نشان داد (Zhao, 2016; Baldwin, 1996). این تفاوت می‌تواند علت حفظ بیشتر فعالیت آنزیم در حضور نیترات کلسیم نسبت به سایر نمک‌های بررسی‌شده باشد. کاهش مقادیر IC_{50} در میوه‌های رسیده نسبت به میوه‌های نارس نشان داد که حساسیت APX به مهار یونی در طی رسیدگی افزایش می‌یابد. این تغییر ممکن است ناشی از تغییرات ساختاری یا تنظیمی آنزیم در طی فرآیند رسیدگی باشد که دسترسی یون‌های مهارکننده به نواحی عملکردی پروتئین را تسهیل می‌کند. نتایج تحلیل همبستگی پیرسون و نقشه حرارتی نیز وجود ارتباط مثبت بین فعالیت APX، V_{max} و کارایی کاتالیتیکی را تأیید کرد، در حالی که شاخص‌های مرتبط با مهار آنزیم همبستگی منفی با این پارامترها داشتند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که تغییر ظرفیت کاتالیتیکی مهم‌ترین عامل تعیین‌کننده تغییرات فعالیت APX در پاسخ به شرایط مختلف آزمایش است.در مجموع، نتایج این پژوهش نشان داد که فعالیت و ویژگی‌های سینتیکی آسکوربات پراکسیداز تحت اثر مرحله رسیدگی، pH، دما و نوع نمک نیتراتی قرار می‌گیرد. در میان تیمارهای بررسی‌شده، نیترات کلسیم بیش‌ترین توانایی را در حفظ فعالیت آنزیم داشت، در حالی که نیترات نقره قوی‌ترین اثر مهاری را نشان داد. این یافته‌ها نقش شرایط محیطی و ترکیب یونی را در تنظیم عملکرد سامانه آنتی‌اکسیدانی میوه گلابی برجسته می‌کند.با توجه به نتایج این پژوهش، پیشنهاد می‌شود در مطالعه‌های آینده اثر سایر یون‌ها و نمک‌های کاسموتروپ و کائوتروپ بر ویژگی‌های سینتیکی آسکوربات پراکسیداز و دیگر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بررسی شود. همچنین، مطالعه بیان ژن‌های مرتبط با APX در مراحل مختلف رسیدگی و ارزیابی اثر تیمارهای پس از برداشت، به‌ویژه نیترات کلسیم، بر کیفیت و ماندگاری میوه گلابی می‌تواند به درک بهتر سازوکارهای تنظیم فعالیت این آنزیم و توسعه راهکارهای مؤثر برای افزایش کیفیت و عمر پس از برداشت میوه‌ها کمک کند.

قدردانی

نویسندگان از مسئولان و کارکنان آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه پیام نور به دلیل فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و همکاری در اجرای این پژوهش صمیمانه قدردانی می‌کنند. این پژوهش بدون دریافت حمایت مالی از هیچ سازمان یا نهاد خاصی انجام شده است.

منابع

- Baldwin RL. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. Biophys J. 1996 Oct;71(4):2056–2063. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79404-3. PMID: 8889180; PMCID: PMC1233672.
- Corpas FJ, González-Gordo S, Palma JM. Ascorbate peroxidase in fruits and modulation of its activity by reactive species. J Exp Bot. 2024 May 3;75(9):2716–2732. doi: 10.1093/jxb/erae092. Erratum in: J Exp Bot. 2024 May 20;75(10):3201. doi: 10.1093/jxb/erae142. PMID: 38442039; PMCID: PMC11066807.
- Foyer CH, Kunert K. The ascorbate-glutathione cycle coming of age. J Exp Bot. 2024 May 3;75(9):2682–2699. doi: 10.1093/jxb/erae023. PMID: 38243395; PMCID: PMC11066808.
- Gordon O, Vig Slenters T, Brunetto PS, Villaruz AE, Sturdevant DE, Otto M, Landmann R, Fromm KM. Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Oct;54(10):4208–4218. doi: 10.1128/AAC.01830-09. Epub 2010 Jul 26. PMID: 20660682; PMCID: PMC2944614.
- Hasanuzzaman M, Bhuyan MHMB, Zulfiqar F, Raza A, Mohsin SM, Mahmud JA, Fujita M, Fotopoulos V. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator. Antioxidants (Basel). 2020 Jul 29;9(8):681. doi: 10.3390/antiox9080681. PMID: 32751256; PMCID: PMC7465626.
- Hiner AN, Rodríguez-López JN, Arnao MB, Lloyd Raven E, García-Cánovas F, Acosta M. Kinetic study of the inactivation of ascorbate peroxidase by hydrogen peroxide. Biochem J. 2000 Jun 1;348(Pt 2):321–328. PMID: 10816425; PMCID: PMC1221069.
- Iglesias-Sanchez A, García-Carbonell S, Fernie AR, Pujol M, Florez-Sarasa I. Fruit respiration: putting alternative pathways into perspective. New Phytol. 2026 Apr;250(1):54–73. doi: 10.1111/nph.70882. Epub 2026 Feb 10. PMID: 41664942; PMCID: PMC12961250.
- Jomova K, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, Valko M. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. Arch Toxicol. 2024 May;98(5):1323–1367. doi: 10.1007/s00204-024-03696-4. Epub 2024 Mar 14. PMID: 38483584; PMCID: PMC11303474.
- Kesawat MS, Satheesh N, Kherawat BS, Kumar A, Kim HU, Chung SM, Kumar M. Regulation of reactive oxygen species during salt stress in plants and their crosstalk with other signaling molecules—current perspectives and future directions. Plants (Basel). 2023 Feb 14;12(4):864. doi: 10.3390/plants12040864. PMID: 36840211; PMCID: PMC9964777.
- Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Bradford assay for determining protein concentration. Cold Spring Harb Protoc. 2020 Apr 1;2020(4):102269. doi: 10.1101/pdb.prot102269. PMID: 32238597.
- McLeod MJ, Barwell SAE, Holyoak T, Thorne RE. A structural perspective on the temperature-dependent activity of enzymes. Structure. 2025;33(5):924–934.e2. doi: 10.1016/j.str.2025.02.013.
- Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 1981;22(5):867–880.
- Rajan S, Murugan K. Purification and kinetic characterization of the liverwort Pallavicinia lyellii cytosolic ascorbate peroxidase. Plant Physiol Biochem. 2010;48(9):758–763.
- Ribeiro J, Silva V, Igrejas G, Barros L, Heleno SA, Reis FS, Poeta P. Phenolic compounds from Pyrus communis residues: mechanisms of antibacterial action and therapeutic applications. Antibiotics (Basel). 2025 Mar 8;14(3):280. doi: 10.3390/antibiotics14030280. PMID: 40149091; PMCID: PMC11939275.

- Sofo A, Scopa A, Nuzzaci M, Vitti A. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. Int J Mol Sci. 2015 Jun 12;16(6):13561–13578. doi: 10.3390/ijms160613561. PMID: 26075872; PMCID: PMC4490509.
- Wei W, Liu Z, Pan X, Yang T, An C, Wang Y, Li L, Liao W, Wang C. Effects of reactive oxygen species on fruit ripening and postharvest fruit quality. Plant Sci. 2025 Mar;352:112391. doi: 10.1016/j.plantsci.2025.112391. Epub 2025 Jan 12. PMID: 39805341.
- Wei W. Hofmeister effects shine in nanoscience. Adv Sci (Weinh). 2023 Aug;10(22):e2302057. doi: 10.1002/advs.202302057. Epub 2023 May 21. PMID: 37211703; PMCID: PMC10401134.
- Xiao L, Jiang G, Lai H, Duan X, Yan H, Chen S, Chen Z, Duan X. Study on a mechanism of improving MaAPX1 protein activity by mutating methionine to lysine. Antioxidants (Basel). 2024 Jul 14;13(7):843. doi: 10.3390/antiox13070843. PMID: 39061911; PMCID: PMC11273533.
- Zhang B, Lewis JA, Kovacs F, Sattler SE, Sarath G, Kang C. Activity of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) from Panicum virgatum against ascorbate and phenylpropanoids. Int J Mol Sci. 2023 Jan 16;24(2):1778. doi: 10.3390/ijms24021778. PMID: 36675291; PMCID: PMC9864165.
- Zhao H. Protein stabilization and enzyme activation in ionic liquids: specific ion effects. J Chem Technol Biotechnol. 2016 Jan;91(1):25–50. doi: 10.1002/jctb.4837. Epub 2015 Nov 19. PMID: 26949281; PMCID: PMC4777319.