بررسی تاثیر اسانس آویشن در کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز در ترب سیاه و لوبیا سبز

نازنین مریم محسنی[1*]، امیر دارائی گرمه خانی[2]، علی محمدی ثانی[3]

۱- عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.
۲- عضو هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده فنی تویسرکان، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.
۳- عضو هیات علمی گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.
(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۶/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۵)

چکیده

آنزیم های موجود در بافتهای گیاهی میتوانند دارای اثرات مفید و مضری بر روی کیفیت میوه ها و سیزیجات باشند. بنابراین مدیریت تغییرات آنها درمیوه ها و سبزیجات به عنوان یکی از مسائل مورد توجه در صنایع غذایی مطرح است. امروزه تقاضای مصرف کنندگان به استفاده از مواد غذایی تازه و یا کمتر فرآوری شده افزایش یافته است. هدف از تحقیق حاضر ارزیابی توانایی اسانس آویشن در کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز (به عنوان یکی از عوامل مهم فساد بیوشیمیایی) در ترب سیاه و لوبیا سبز است. بدین منظور عصاره گیاهی حاوی آنزیم پراکسیداز با مخلوط سوبسترا شامل گایاکول، پراکسید هیدروژن، بافر فسفات سدیم و غلظت های مختلف اسانس آویشن (۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ µg/100 ml) مخلوط گردید. سپس جذب نمونه ها با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۴۰۰ ثانیه قرائت شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که فعالیت آنزیم پراکسیداز در ترب سیاه ٤٦٢٥ و در لوبیا سبز ۵۱ (گرم سبزی× ثانیه /واحد فعالیت) بوده که با افزودن اسانس آویشن در غلظت های فوق فعالیت آنزیم پراکسیداز ترب سیاه به ترتیب ۲٦۵۵، ۲۵۵۰، ۲۰۱۵ و ۲۱٦۲ (گرم سبزی× ثانیه /واحد فعالیت) و فعالیت آنزیم پراکسیداز لوبیا سبز به ترتیب ۷۰۸، ۵۵۱/٦، ۵۷۹ و ٦۹۰ (گرم سبزی× ثانیه /واحد فعالیت) شده است.

کلید واژگان: ترب سیاه، لوبیا سبز، اسانس آویشن، آنزیم پراکسیداز.

*مسئول مکاتبات: nazanin.mohsenii@gmail.com

۱- مقدمه

رشد روزافزون جمعیت در دهه‌های اخیر و استفاده بی‌رویه از منابع طبیعی باعث افزایش سیر تخریبی این منابع محدود شده است. تغذیه سالم این جمعیت بدون تخریب بیشتر محیط، نیازمند افزایش تولید مواد غذایی، جلوگیری از ضایعات قبل و پس از برداشت، کاهش کاربرد مواد شیمیایی جهت حفظ و نگهداری و سرانجام مصرف بجا و به موقع فرآورده‌های کشاورزی است. به طور کلی بیشتر میوه‌ها و سبزیجات به علت داشتن آب زیاد فسادپذیر هستند و پس از برداشت باید بلافاصله مصرف و یا به روش‌های خاصی نگهداری شوند [۱]. بروز ضایعات در محصولات باغی و زراعی یکی از مسائل مهم کشاورزی است که این امر ناشی از حمله قارچ‌ها و آفات یا فعالیت آنزیم های مختلف بوده و همه‌ساله خسارت زیادی را متوجه کشور می‌نماید. این موضوع علاوه بر از دست رفتن بخشی از محصولات کشاورزی، به علت تولید سموم قارچی، مصرف قارچ کش‌ها و آفت‌کش‌های شیمیایی جهت از بین بردن این‌گونه آفات سبب به خطر افتادن سلامت جامعه نیز می‌گردد. امروزه آثار سوءمصرف قارچ کش‌ها و سموم شیمیایی نیز بر همه ثابت شده و اکثر قریب به اتفاق کشورهای دنیا به تولید محصولات ارگانیک یا محصولات عاری از باقیمانده‌های آلاینده مضر مانند سموم، حشره‌کش‌ها، قارچ کش‌های مضر و شیمیایی و هر نوع آلودگی که برای مصرف‌کنندگان و محیط‌زیست زیان‌آور باشند روی آورده‌اند [۲]. ذکر این نکته نیز ضروری است که سالانه مقادیر زیادی ارز برای خرید سموم و قارچ کش‌های شیمیایی از کشور خارج می‌گردد. به علاوه به مرور زمان میکروارگانیسم‌ها و حشرات در مقابل این سموم مقاوم شده و هر روز نیازمند به فرمولاسیون جدید برای نابودی آن‌ها می‌باشد. هرچند عدم استفاده از این مواد نیز موجب بروز ضایعات بسیار زیاد محصولات کشاورزی و مواد غذایی بر اثر حمله آفات می‌گردد [۳]. پژوهش حاضر تلاشی است که با هدف استفاده از مواد طبیعی و غیر مضر (نظیر اسانس‌های طبیعی که مواد اولیه آن‌ها در داخل کشور به فراوانی تولید شده و به سادگی قابل استحصال می‌باشند)، جهت جایگزینی و حذف سموم و قارچ کش‌های شیمیایی وارداتی (مورد استفاده در کنترل رشد قارچ‌های تولیدکننده سموم خطرناک و کاهش ضایعات سردخانه‌ای محصولات کشاورزی) انجام می‌شود و در حقیقت قابلیت اسانس های گیاهی در غبر فعال سازی آنزیم های دخیل در فساد میوه ها و سبزیجات به منظور پیشگیری از بروز قهوه‌ای شدن آنزیمی را بررسی می کند. لذا با عنایت به محدودیت‌های روزافزون استفاده از مواد شیمیایی ضد میکروبی ناشی از گسترش مقاومت دارویی به نظر می‌رسد اسانس‌های فرار منابع ضد میکروبی بهتری در حفظ مواد خوراکی و کنترل بیماری‌های انسانی باشند [٤]. به علاوه تمایل به استفاده از ترکیبات طبیعی برای جلوگیری از رشد میکروبی در اثر فشار مصرف‌کننده جهت کاهش یا عدم استفاده از افزودنی‌های شیمیایی در میوه و سبزی‌ها در حال افزایش است [۵].

اسانس‌ها ترکیبات طبیعی، بی‌رنگ و پیچیده‌ای از الکل، آلدئید، استر و ... هستند که دارای بوی مخصوص به خود بوده و در ترکیبات مصنوعی قابل‌دسترس نبوده و در سلامت انسان نقش حائز اهمیت دارند. این ترکیبات وزن مولکولی کمتر از آب داشته و در سطح آب می مانند، فرار بوده و از آن به عنوان بخور (اسانس اکالیپتوس)، طعم‌دهنده غذا، آنتی‌اکسیدان و ضد میکروبی استفاده‌های زیادی می‌گردد [٦].

آویشن با نام علمی *Thymus L* یکی از جنس های مهم خانواده نعناعیان است که از مهم ترین گیاهان دارویی در ایران می‌باشد و به دلیل داشتن دو ترکیب تیمول و کارواکرول دارای خواص دارویی متعددی نظیر اثر ضد اسپاسم، ضد نفخ، ضد روماتیسم، ضد عفونی کننده و ضد میکروبی قوی است. در زمینه اثرات ضد میکروبی گیاه آویشن تحقیقات وسیعی صورت گرفته است به عنوام مثال سینق و همکاران در سال (۲۰۰۳) بیان نمودند که آویشن و میخک موجب کاهش باکتری ها می‌گردد [۷]. تاسو و همکاران (۲۰۰۰) بیان نمودند که خاصیت ضد میکروبی آویشن به دلیل از دست رفتن انتقال الکترون و نفوذ پذیری در سطح غشاء سیتوپلاسمی میکروارگانیسم‌ها می باشد [۸]. اسانس آویشن همچنین با تغییر در نفوذ پذیری غشاء میکروارگانیسم ها سبب کمبود پرتون، فسفات و پتاسیم داخلی سلول می گردد [۹]. کارواکرل یک ترکیب ترپنی بوده و ماده موثره غالب موجود در اسانس گیاهان آویشن، میخک و زنیان است که به دلیل کاهش سنتز یا هیدرولیز بدون تغییر در نفوذ پذیری غشاء سبب حذف ATP داخل سلول باکتری می گردد [۱۰].

آنزیم های مختلفی نظیر پراکسیدازها، پکتین استرازها، پلی گالاکترونازها، پلی فنول اکسیدازها، لیپواکسیژنازها و فنلازها مسئول فساد آنزیمی میوه ها و سبزیجات بوده و میتوانند

واکنشهای اولیه تجزیه نامطلوب رنگ، عطر، طعم و تغییرات تغذیه‌ای و حسی را سبب شوند. آنزیم پراکسیداز یک آنزیم آهن دار بوده و شمار زیادی از واکنش‌ها را کاتالیز می کند که در آن پراکسید هیدروژن با دادن الکترون نقش احیاء کننده را ایفا کرده و ارتباط تجربی آن با کاهش طعم و رنگ در مواد خام اثبات شده است [۱۱]. بنابراین غیرفعال کردن این آنزیم عمر انباری میوه ها و سبزیجات را در حین نگهداری افزایش میدهد .آنزیم پراکسیداز به خاطر مقاومت حرارتی بالا و غلظت زیاد، از آن به عنوان شاخص کفایت آنزیم بری حرارتی در اغلب سبزی ها و میوه ها استفاده می شود. پراکسیداز به صورت ایزوآنزیمهای (شامل گلوتاتیون پراکسیداز، سیتوکرم سی پراکسیداز، لاکتوپراکسیداز، هورس ردیش پراکسیداز، هالوپراکسیداز و هیدروژن پراکسیداز با حساسیت متفاوت به دناتوراسیون حرارتی (فرمهای مقاوم و ناپایدار در برابر حرارت) در سبزیها و میوه‌ها یافت شده است. سه فرآیند عمده قابل ملاحظه در غیرفعال سازی پراکسیداز شامل ۱ - تفکیک گروه پروستاتیک Heme از هالوآنزیم (سیستم فعال آنزیم)، ۲- تغییر ترکیب آپوآنزیم (قسمت پروتئینی آنزیم) و ۳- تغییرات تجزیه‌ای گروه پروستاتیک است [۱۲].

فعالیت آنزیم پراکسیداز در عصاره تعداد زیادی از سبزیجات مورد مطالعه قرار گرفته است [۱۷-۱۳]. جهت غیرفعال‌سازی آنزیم پراکسیداز از روش‌های مختلفی نظیر حرارت‌دهی، کاهش pH یا فعالیت آبی (a_w) و یا افزودنی‌های شیمیایی (دی‌اکسید گوگرد) استفاده می‌شود که این روش‌ها دارای محدودیت‌های مخصوص به خود می‌باشند. با توجه به تمایل مصرف‌کنندگان به استفاده از محصولات غذایی با حداقل فرآوری، تولیدکننده‌ها به دنبال روش‌های جایگزین برای افزایش عمر نگهداری محصولات هستند. با توجه به اینکه خاصیت ضد میکروبی اسانس های گیاهی اثبات رسیده است در این مقاله تاثیر اسانس های گیاهی بر غیر فعال سازی آنزیم های دخیل در فساد میوه ها و سبزیجات بررسی شد. همانطور که پیش‌تر ذکر شدآنزیم پراکسیداز یکی از آنزیم‌های مهم در بافت‌های گیاهی است که با پراکسید هیدروژن (آب اکسیژنه) ترکیب و تولید کمپلکس فعالی می‌نماید که قادر به انجام واکنش با بسیاری از مولکول-های دهنده الکترون می‌باشد. همچنین مقداری آکسیژن در اثر فعالیت این آنزیم تولید می شود که می تواند با ترکیبات فنولی داخل گیاه واکنش و قهوه ای شدن آنزیمی را کاتالیز نمایند. بنابراین استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدان می تواند با حذف اکسیژن تولیدی از بروز واکنش قهو های شدن آنزیمی ممانعت کنند. گیاهان داروئی که مقدار پلی فنل های آنها بالاتر است دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتری هستند. خواص آنتی اکسیدانی اسانس های گیاهی مختلف با توجه به مواد موثر آن متفاوت بوده که این اختلاف در مواد موثر یک اسانس گیاهی خاص نیز به وضوح قابل مشاهده است. همدا و کلین (۱۹۹۰) عنوان نمودند اختلاف در رفتار آنزیم پراکسیداز بر ضد مواد آنتی اکسیدانی می تواند به حضور ایزو آنزیم ها نسبت داده شود [۱۸]. هدف از انجام این پژوهش بررسی توانایی اسانس آویشن در غیرفعال سازی آنزیم پراکسیداز ترب و لوبیا سبز بوده است. با توجه به خاصیت آنتی اکسیدانی اسانس های گیاهی این پژوهش می تواند تلاشی در آزمایش تاثیر این مواد در کاهش فعالیت آنزیم های موثر در قهوه ای شدن آنزیمی (پراکسیداز) و در نتیجه امکان حفظ رنگ و طعم میوه‌ها و سبزیجات خوراکی از طریق غیر فعال سازی این آنزیم به عنوان پیش نیاز فعالیت آنزیم های پلی فنل اکسیداز باشد.

۲- مواد و روش ها

جهت انجام این پژوهش ترب سیاه و لوبیا سبز از بازار میوه و سبزی شهرستان گرگان (ایران) تهیه شد. اسانس آویشن به عنوان منبع حاوی آنتی اکسیدان طبیعی از شرکت باریج اسانس تهیه و با استفاده از توئین ۸۰ غلظت‌های ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۲۰۰ ($\mu g/100\ ml$) از آن تهیه گردید.

۲-۱- تهیه عصاره آنزیمی ترب و لوبیا سبز

برای این منظور ۱۰ گرم از سبزی مورد نظر توزین و ضمن افزودن ۳۰ میلی لیتر آب مقطر (٤ درجه سانتی گراد) خرد گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی گراد سانتریفوژ (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه) شد و مایع رویی که حاوی آنزیم پراکسیداز می‌باشد به عنوان عصاره آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت [۱۳].

۲-۲- مخلوط واکنش

مخلوط سوبسترا شامل مخلوط ۱۰ میلی لیتر گایاکول ۱٪، ۱۰ میلی لیتر پراکسید هیدروژن ۳٪ و ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات سدیم بود که pH مخلوط واکنش روی ٦/٥ تنظیم شد [۱۸].

۲-۳- اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

سنجش فعالیت آنزیمی طبق روش همدا و کلین (۱۹۹۰) انجام گردید [۱۸]. جهت بررسی اثر اسانس مورد استفاده در غلظت های کاربردی، فعالیت آنزیم پراکسیداز در ۲۵ درجه سانتی گراد و با اسپکتروفتومتر در ٤٧٠ نانومتر با استفاده از گایاکول (مرک) به عنوان سوبسترا و پراکسید هیدروژن (مرک) به عنوان دهنده هیدروژن اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۲/۸۷ میلی لیتر مخلوط سوبسترا، ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره خام و ۰/۰۳ میلی لیتر آب مقطر که جمعا ۳ میلی‌لیتر بود به کاوت منتقل و جذب نمونه‌ها به صورت سینتیکی در طول موج ٤٧٠ نانومتر به مدت ٤۰۰ ثانیه قرائت شد. جهت بررسی اثر اسانس گیاهی بر فعالیت آنزیم پراکسیداز به مخلوط سوبسترا و عصاره آنزیمی ۰/۰۳ میلی‌لیتر از غلظت های مختلف اسانس مورد مطالعه اضافه و جذب نمونه ها به صورت سینتیکی در طول موج ٤٧٠ نانومتر قرائت شد [۱۸]. در مرحلهٔ بعدی برای اندازه گیری بررسی تاثیر اسانس آویشن بر غیر فعال‌سازی آنزیم پراکسیداز در بافت سبزی، مقداری از سبزی مورد نظر را در محلولی با غلظت‌های مختلف اسانس آویشن (۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ µg/100 ml) به مدت ۱ دقیقه غوطه ور نموده و پس از ۱ ساعت مطابق روش قبل عصاره گیری انجام شده و جذب نمونه ها به صورت سینتیکی در طول موج ٤٧٠ نانومتر به مدت ٤۰۰ ثانیه قرائت شد.

۲-٤- تجزیه های آماری

این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و با استفاده از نرم افزار آماری (۲۰۰۱) SAS انجام شد. جهت مقایسه میانگین ها از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۵٪ و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel (۲۰۰۳) استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در عصاره خام ترب سیاه و لوبیا سبز توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد که به ترتیب برابر با ٤٦۲۵ و ۹۰۰ (گرم سبزی× ثانیه /واحد فعالیت) بود که این نشان دهنده میزان قابل توجه فعالیت آنزیم پراکسیداز در ترب سیاه و لوبیا سبز می باشد. نتایج مربوط به تاثیر غلظت های مختلف اسانس آویشن بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در عصاره خام ترب سیاه و لوبیا سبز مورد مطالعه در جداول (۱) و (۳) ارائه شده است و همانطور هم که در جداول (۲) و (٤) مشاهده می شود آویشن در تمامی غلظت های مورد استفاده بر آنزیم پراکسیداز ترب سیاه تأثیر مثبت داشته و باعث کاهش فعالیت آن گردید. اما در لوبیا سبز برعکس عمل نموده و در تمامی غلضت های مورد استفاده موجب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز شده است که این افزایش می‌تواند به علت افزایش سوبسترای در دسترس آنزیم و کم شدن اثر بازدارندگی آنزیم در غلظت های متفاوت اسانس آویشن باشد [۱٤]. از آنجا که آنزیم پراکسیداز دارای ایزوآنزیم های مختلفی (بیش از ۱۰۰۰ ایزو آنزیم) است که با یکدیگر تفاوت های اساسی دارند؛ بر این اساس مقدار فعالیت و نیز حساسیت این آنزیم به عوامل مختلف متفاوت است. نتایج این تحقیق نیز موید رفتار متفاوت این آنزیم به یک تیمار (اسانس آویشن) بر اساس نوع منبع آنزیمی بود. به طوریکه اسانس آویشن موجب کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز در ترب سیاه شده بود اما باعث تشدید فعالیت این آنزیم در لوبیا سبز شده بود. در حقیقت می توان بیان نمود که علاوه بر تفاوت نوع آنزیم در دو سبزی مورد مطالعه ممکن است عوامل ممانعت کننده دیگری در لوبیا سبز وجود داشته باشد که با اسانس آویشن واکنش داده و اثر آن را بر آنزیم پراکسیداز کاهش داده باشد یا حتی موجب تجزیه اسانس به ترکیبات فنولی فعال دیگر شده باشد که در واکنش با آب اکسیژنه شبیه نقش گایاکول را ایفا نموده و میزان فعالیت آنزیم را بیشتر نشان دهند [۱۷-۱٤].

Table 1 Effect of different concentrations of thyme essential oil on peroxidase activity (gram of vegetable × second / unit of activity) of crude extracts of selected vegetables

Peroxidase enzyme sources	thyme essential oil concentration (µg/100 ml)				
	0	50	75	100	200
Black Spanish radish	4625^{a}	2655^{b}	2550^{b}	2015^{c}	2162^{c}
Green bean	51^{c}	708^{a}	551.6^{b}	579^{b}	690^{a}

*Superscript letters indicate that means with the same letters designation in a raw are not significantly different at $P<0.05$.

Table 2 Effect of different concentrations of thyme essential oil on percent relative peroxidase activity (gram of vegetable × second / unit of activity) of crude extracts of selected vegetables.

Peroxidase enzyme sources	thyme essential oil concentration (µg/100 ml)				
	0	50	75	100	200
Black Spanish radish	4625[a]	42.59[c]	44.86[c]	56.43[b]	53.24[b]
Green bean	51[c]	-1288.23[a]	-981.56[b]	-1035.2[b]	-1252.94[a]

*Superscript letters indicate that means with the same letters designation in a raw are not significantly different at P<0.05.

*Negative sign mean that proxidase activity increased more than blank sample (crude extracts).

Table 3 Effect of dipping in different concentrations of thyme essential oil on peroxidase activity (gram of vegetable × second / unit of activity) of selected vegetables

Peroxidase enzyme sources	thyme essential oil concentration (µg/100 ml)				
	0	50	75	100	200
Black Spanish radish	4625[d]	815[b]	960[a]	720[c]	975[a]
Green bean	51[d]	142.5[c]	257.5[b]	325[a]	151.25[c]

Superscript letters indicate that means with the same letters designation in a raw are not significantly different at P<0.05.

Table 4 Effect of dipping in different concentrations of thyme essential oil on percent relative peroxidase activity of selected vegetables

Peroxidase enzyme sources	thyme essential oil concentration (µg/100 ml)				
	0	50	75	100	200
Black Spanish radish	4625[a]	82.37[c]	79.24[d]	84.43[b]	78.91[d]
Green bean	51[c]	-179.41[c]	-404.90[b]	-537.25[a]	-196.56[c]

Superscript letters indicate that means with the same letters designation in a raw are not significantly different at P<0.05.

Negative sign mean that proxidase activity increased more than blank sample (crude extracts).

۳-۱- سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز با افزودن مستقیم اسانس به عصاره

شکل (۱) تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن بر فعالیت آنزیم پراکسیداز عصاره ترب سیاه را نشان می دهد. از آنجا که شیب منحنی جذب بیانگر فعالیت آنزیم می باشد و مقدار فعالیت از محاسبه شیب منحنی محاسبه می شود بنابراین همانطور که مشاهده می شود، اسانس آویشن در کلیه غلظت ها باعث کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز شده است به طوریکه در شکل ملاحظه می‌شود تمام منحنی های فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تأثیر اسانس آویشن با غلظت‌های مشخص شیب کمتری نسبت به منحنی های فعالیت آنزیم پراکسیداز اولیهٔ ترب داشته که بیانگر کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز می‌باشد. هرچند که از زمان‌های ۵۰ ثانیه به بعد به نظر می رسد تاثیر آنتی اکسیدانی اسانس آویشن و ممانعت کنندگی آن بر آنزیم پراکسیداز کاهش یافته باشد.

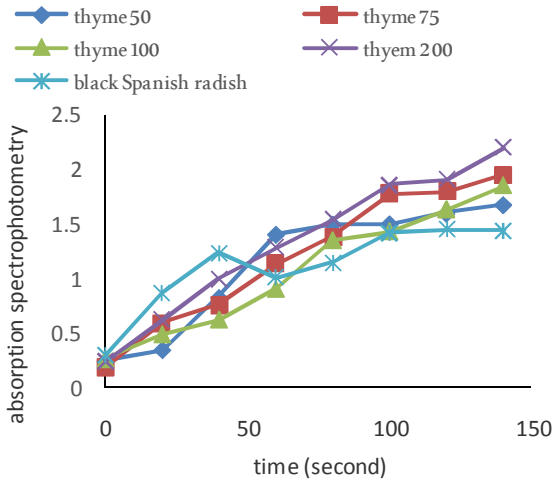

Fig 1 Effects of different concentrations of thyme essential oil on peroxidase enzymatic activity of black Spanish radish crude extract

شکل (۲) تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن بر فعالیت آنزیم پراکسیداز عصاره لوبیا سبز را نشان می دهد. همانطور که مشاهده می‌شود اسانس آویشن در کلیه غلظت ها باعث افزایش قابل توجهی در منحنی فعالیت آنزیم پراکسیداز شده است به

طوریکه در کلیه غلظت های اسانس آویشن، منحنی فعالیت آنزیم پراکسیداز بیشتر از عصاره های لوبیا فاقد اسانس آویشن می‌باشد. افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در لوبیا سبز تحت تاثیر اسانس آویشن می تواند به علت ترکیب شدن مواد فنولی اسانس آویشن با آب اکسیژنه و ایجاد رنگ قهوه ای باشد که باعث افزایش جذب شده است به عبارت دیگر اسانس آویشن نه تنها نتوانسته است فعالیت آنزیم پراکسیداز در لوبیا سبز را مهار کند بلکه خود به عنوان عامل تشدید کننده و ترکیب فنولی فعال با اکسیژن حاصل از تاثیر آنزیم بر آب اکسیژنه واکنش داده و شدت تشکیل رنگ را افزایش داده است. نتایج دارائی گرمه خانی و همکاران (۲۰۱۰) و نیز محسنی و همکاران (۲۰۱۵) نیز موید تفاوت تاثیر اسانس های مختلف روی منابع آنزیمی مختلف بود (۱۶-۱۵).

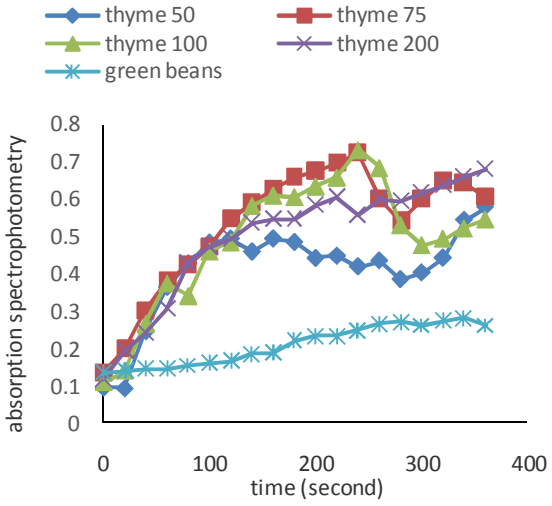

Fig 2 Effects of different concentrations of thyme essential oil on peroxidase enzymatic activity of green bean crude extract

۳-۲- سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز با غوطه ور کردن سبزیجات در اسانس آویشن

تاثیر غوطه وری ترب سیاه در غلظت‌های مختلف اسانس آویشن بر فعالیت آنزیم پراکسیداز ترب سیاه در شکل (۳) نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود غوطه وری نمونه های ترب سیاه در تمامی غلظت های اسانس آویشن مورد مطالعه، منجر به کاهش قابل توجهی در فعالیت آنزیم پراکسیداز ترب سیاه شده است به طوریکه که منحنی فعالیت آنزیم پراکسیداز در هر چهار غلظت ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ (µg/100 ml) آویشن نسبت به نمونه های ترب سیاه بدون غوطه وری در اسانس کمتر بوده و شیب نمودارها کاهش یافته است بنابراین می توان بیان نمود که اسانس آویشن دارای اثر بازدارندگی بسیار مناسبی روی کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز می باشد.

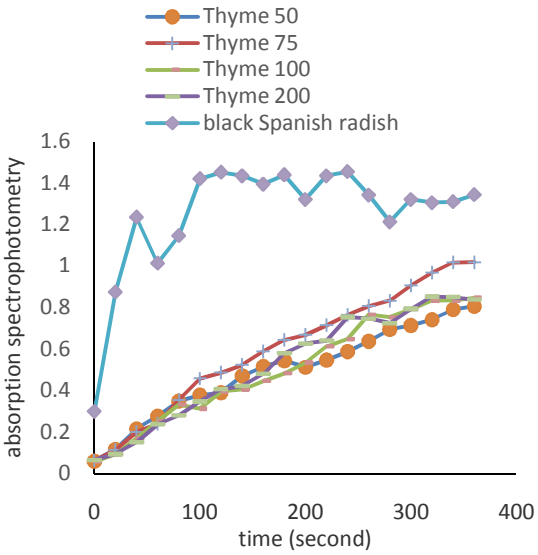

Fig 3 Effect of dipping in different concentrations of thyme essential oil on peroxidase enzymatic activity of black Spanish radish

همانطور که در شکل (٤) مشاهده می شود غوطه وری نمونه های لوبیا سبز در غلظت های ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۲۰۰ (µg/100 ml) اسانس آویش، منجر به افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به نمونه های لوبیا سبز بدون غوطه‌وری شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود با افزایش غلظت اسانس آویشن منحنی فعالیت آنزیم پراکسیداز روند صعودی داشته و شیب نمودار افزایش یافته است و می‌توان چنین بیان نمود که افزایش غلظت اسانس آویشن باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز شده است.

همان‌طور که در شکل های (۱)، (۲)، (۳) و (٤) مشخص است با افزایش زمان، فعالیت آنزیم پراکسیداز در یک غلظت ثابت از اسانس آویشن، افزایش می‌یابد که نتایج، مربوط به ارتباط فعالیت‌آنزیمی با زمان، بیانگر افزایش دسترسی آنزیم به سوبسترا بوده که در تحقیق دارائی گرمه خانی و همکاران (۲۰۱۰)، شهابی قهفرخی و همکاران (۲۰۱۳) و محسنی و همکاران (۲۰۱۵) نیز ثابت شده است (۱٦-۱٤).

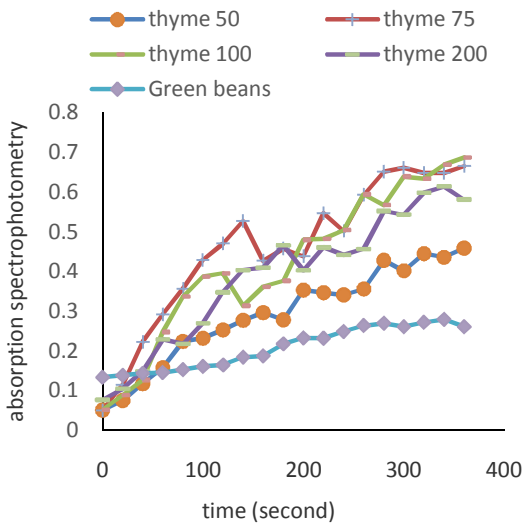

Fig 4 Effect of dipping in different concentrations of thyme essential oil on peroxidase enzymatic activity of green bean.

کاشانی نژاد و دارائی (1391) نیز در تحقیقی بیان داشتند که اسانس ها با ترکیب شدن با اکسیژن محیط مانع از قهوه ای شدن آنزیمی شده و در نتیجه فعالیت آنزیم پراکسیداز را تحت کنترل قرار می دهند که با بخشی از نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت [۱۷]. نتایج تحقیقات سایر محققین نیز ارتباط فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس های گیاهی و ممانعت کنندگی فعالیت آنزیم پراکسیداز در سبزیجات مختلف تحت تأثیر اسانس های گیاهی را نشان می دهد که موید نتایج تحقیق حاضر می‌باشند. دارائی گرمه خانی و همکاران (2010)، شهابی قهفرخی و همکاران (۲۰۱۳) تاثیر اسانس‌های میخک، رازیانه و زیره در غیر فعال سازی آنزیم پراکسیداز سبزیجات مختلف (کاهو، کلم سفید، کلم قرمز، کدو خورشتی و سیب زمینی) را گزارش نمودند [۱٤و ۱٦]. با افزایش مدت زمان فعالیت آنزیمی، شدت و نرخ فعالیت آنزیمی (جذب) کاهش می‌یابد؛ که می‌تواند به علت کم شدن سوبسترای در دسترس آنزیم و کم شدن فعالیت اکسیداتیو آنزیم باشد؛ از سوی دیگر تشکیل ترکیبات ممانعت‌کننده از فعالیت آنزیمی نیز می‌تواند در این مورد موثر باشد [۱٤و ۱٦]. اسانس ها با ترکیب شدن با اکسیژن محیط مانع واکنش قهوه ای شدن آنزیمی شده و در نتیجه فعالیت آنزیم پراکسیداز را کنترل می کنند که با مطالب این پژوهش منطبق می باشد [۱۷]. دارائی گرمه خانی و همکاران (2010) بیان داشتند که در اسانس رازیانه، افزایش زمان فعالیت و افزایش غلظت اسانس منجر به افزایش شدید فعالیت آنزیم پراکسیداز در کلم سفید و کلم قرمز شد درحالی که در اسانس میخک عکس این حالت مشاهده گردید و افزایش غلظت اسانس میخک اثر بازدارندگی بالاتری داشت. آنها نتیجه گیری کردند که قدرت آنتی اکسیدانی و مهار کنندگی اکسیژن، اسانس میخک به مراتب بالاتر از اسانس رازیانه است [۱٦]. در این پژوهش نیز اسانس آویشن در ترب سیاه خوب عمل کرده و موجب کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز شد که بیانگر کاهش سوبسترای مصرفی و یا کاهش اکسیژن مورد نیاز آنزیم برای ایجاد رنگ قهوه ای می باشد که نشان دهنده توانایی اسانس آویشن در واکنش با اکسیژن محیط و ممانعت از واکنش آنزیم پراکسیداز و پلی فنول اکسیداز (قهوه ای شدن آنزیمی) می باشد. اسانس ها با ترکیب شدن با اکسیژن محیط مانع واکنش قهوه ای شدن آنزیمی شده و در نتیجه فعالیت آنزیم پراکسیداز را کنترل می کنند. نتایج دارائی گرمه خانی و همکاران (۲۰۱۰) بیانگر تأثیر مثبت اسانس میخک در ممانعت از فعالیت آنزیم پراکسیداز در سبزیجات مورد مطالعه (کلم سفید و کلم قرمز) بود و اثر ممانعت کنندگی اسانس با افزایش غلظت اسانس تشدید می‌شد [۱٦]. در لوبیا سبز با افزایش زمان فعالیت آنزیمی، شدت و نرخ فعالیت آنزیمی (جذب) افزایش می‌یابد که این افزایش می‌تواند به علت افزایش سوبسترای در دسترس آنزیم و کم شدن اثر بازدارندگی آنزیم در غلظت های متفاوت اسانس آویشن باشد [۱٤و ۱٦].

٤- نتیجه گیری

از روش های گوناگونی جهت حفظ انبارمانی محصولات غذایی استفاده می گردد و با توجه به اینکه اسانس های طبیعی علاوه بر خاصیت ضد میکروبی دارای خصوصیت آنتی اکسیدانی نیز می باشند پس می توان از آن جهت جایگزین نمودن روش های معمول استفاده نمود. غیر فعال نمودن آنزیم پراکسیداز توسط حرارت مشکلاتی از قبیل افت رنگ و کاهش مواد مغذی را به همراه دارد که در استفاده از اسانس این قبیل مسائل مطرح نبوده و در عین حال موجب کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز می گردد. نتایج این تحقیق نشان داد که می توان از اسانس های طبیعی در کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز استفاده نمود، با توجه به اینکه آنزیم پراکسیداز در سبزیجات مختلف متفاوت می باشد در این مطالعه مشخص شد که اسانس آویشن می تواند اثر خوبی در جهت کاهش عملکرد

پراکسیداز ترب سیاه داشته باشد اما در لوبیا سبز موجب افزایش عملکرد آن می‌گردد. در مجموع این مطالعه قابلیت استفاده از اسانس های گیاهی در غیرفعال سازی غیر حرارتی آنزیم پراکسیداز را نشان داد اما بایستی برحسب نوع منبع آنزیم از اسانس مناسب استفاده نمود.

۵- منابع

[1] Rahemi, M. 2004. Post harvest physiology, an introduction to fruits and vegetables physiology and handling. Shiraz University press (in Persian).

[2] Holley, R. A., Patel, D. 2005. Improvement in shelf- life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22, 273-292.

[3] Maskoki, A M. 1998. The technology of essential oils and medicinal products production from medical herbs. Reported research at Iranian Research Organization for Science and Technology, Mashhad Unit (in Persian).

[4] Boyraz, N, Ozcan, M. 2005. Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (Satureja hortensis L.) growing wild in Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, 1, 1-5.

[5] Lanciotti, R, Gianotti, A, Patrignani, F, Belletti, N, Gverzoni, M E, Gardini, F. 2004. Use of natural aroma compound to improve shelf life and safety of minimally processed fruit. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 201-208.

[6] Omidbigi, R, 2009. Medicinal plant production and processing. Astan Ghodse Razavi publisher, 5th ed, pp: 653 (Persian).

[7] Singh, A, Singh, RH, Bhunia, AK, singh, N. 2003. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against Listeria monocytogenes in hotdogs. *LWT- Food Science and Technology*, 36, 787-94.

[8] Tassou, CC, Koutsou Manis, K, Nychas, G. JE. 2000. Inhibition of salmonella entertidis & staphylococcus aureus in nutrient broth by mint essential oil, *Food Research International*, 33, 273-280.

[9] Lambert, RJW, Skandamis, PN, Coote, PJ, Nychas, GJE. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*., 91, 453-462.

[10] Ultee, A, Kets, PE, Smid, EJ. 1999. Mechanism of action of carvacol on the foodborne pathogen bacillus cereus. *Applied & Environmental Microbiology*, 65, 4606-4610.

[11] Nikos Gand Tzortzakis, A. 2007. Maintaining postharvest quality of fresh produce with volatile compounds. *Innovative food science & emerging technologies*, 8, 11-116

[12] Ercan, S. S, Soysal, C. 2011. Effect of ultrasound and temperature on tomato peroxidase. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 689-695.

[13] Ponec, AG, Del Valle, CE, Roura, SI. 2004. Natural essential oil as reducing agents of perroxidase activity in leafy vegetable, *LWT - Food Science and Technology*, 37, 199-204.

[14] Shahabi Ghahfarrokhi, I., Daraei Garmakhany, A, Kashaninejad, M, Dehghani, AA. 2013. Estimation of Peroxidase Activity in red cabbage by Artificial Neural Network (ANN), *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 5(2), 163-167.

[15] Mohseni, M, Mohamadi Sani, A, Daraei Garmakhani, A. 2015. An investigation on the effects of clove essence on deactivation of horseradish peroxidase. *International journal of biology, pharmacy and allied science (IJBPAS)*, 4(7), 4891-4897

[16] Daraei Garmakhany, A, Mirzai, HO, Aghajani, N, kashiri, M. 2010. Investigation of natural essential oil antioxidant activity on peroxidase enzyme in selected vegetable. *Journal of Agricultural Science and Technology*; ISSN1939-125, USA, volume, 4 (3), 78-84.

[17] Kashaninejad M, Daraei Garmakhany A. 2013. Application of essential oils as natural antioxidant in reduction of peroxidase enzyme activity. Reported research at Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, (in Persian).

[18] Hemeda, HM, Klein, BP. 1990. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. *Journal of Food Science*, 55, 184-186.

Study of the effect of thyme essential oil on the reduction of peroxidase enzyme activity in the black Spanish radish and green bean

Mohseni, N. M. [1*], Daraei Garmakhany, A. [2], Mohamadi Sani, A. [3]

1. Young Researchers and Elite Club, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran
2. Department of Food Science and Technology, Toyserkan Faculty of agricultural science and natural resources, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran
3. Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.

(Received: 2017/09/21 Accepted:2018/02/04)

Enzymes in plant tissues can have undesirable or desirable effects on the quality of fruits and vegetables; therefore management of their change in fruits and vegetables is one of the concerns in food industry. Nowadays consumer's trend has been oriented to use fresh products or foods prepared by little process, therefore producers are interested the ways to increase shelf life by use of alternative methods. The aim of this work was to study the ability of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil in reduction of peroxidase enzyme activity (as an important biochemical degradation factors) in the black Spanish radish and green bean. For this purpose, plant extract containing peroxidase enzyme was mixed with a substrate mixture composed from guaiacol, hydrogen peroxide, sodium phosphate buffer and different concentrations of thyme essential oil (50, 75, 100 and 200 µg/100 ml). The absorbance of the samples was measured at 470 nm for 400 seconds spectrophotometrically. Results of this study showed that the peroxidase enzyme activity in the black Spanish radish and green beans were 4625 and 51 (gram of vegetable × second / unit of activity) respectively and by addition of thyme essential oil in the above concentrations the peroxidase enzyme activity of black Spanish radish were 2655, 2550, 2015 and 2162 (gram of vegetable × second / unit of activity) respectively and the peroxidase enzyme activity of green bean were 708, 6/551, 579 and 690 (gram of vegetable × second / unit of activity) respectively.

Keywords: Black Spanish radish, Green beans, Thyme essential oil, Peroxidase enzyme.

* Corresponding Author E-Mail Address: Maryam.mohseni@iausari.ac.ir