



## Kinetic evaluation of ascorbate peroxidase in black mulberry leaf and fruit with the help of linear and non-linear regression analysis

Zhila Zarei<sup>1</sup>, Nabi Khaliliaqdam<sup>2</sup>, Shahriar Saeidian<sup>3\*</sup>, Bahaaldin Rashidzadeh<sup>4</sup> and Mohammad Ghadermarzi<sup>1</sup>

1- Department of Biology, Payame Noor University

2- Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran

3\*- Corresponding author, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran, E-mail: saeedyan@pnu.ac.ir

4- Department of Chemistry, Payame Noor University, Tehran, Iran

Received: 27/01/2025

Revised: 08/02/2026

Accepted: 08/02/2026

### Abstract

**Background and objectives:** Plants possess efficient antioxidant defense systems that neutralize and eliminate toxic levels of reactive oxygen species (ROS). These systems include both enzymatic and non-enzymatic components. Ascorbate peroxidase (APX) is a key enzyme in this defense system, playing a crucial role in regulating the levels of toxic ROS in various intracellular compartments. The expression of APX is modulated during certain developmental stages as well as under biotic and abiotic stress conditions, highlighting the importance of APX activity in controlling hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) levels within cells.

**Methodology:** In this study, an enzyme extract was prepared from black mulberry (*Morus nigra* L.), and its kinetic properties were evaluated in the presence of different salts. The activity of ascorbate peroxidase (APX) was determined by measuring the oxidation of the ascorbate substrate at a wavelength of 290 nm, using an extinction coefficient of 18.2 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. The optimum temperature for enzyme activity was determined by measuring APX activity at temperatures ranging from 25 to 80 °C in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6) at 5 °C intervals. To evaluate thermal stability, the enzyme solution was incubated in a water bath at temperatures between 25 and 80 °C for 30 minutes. The reaction mixture was then maintained at room temperature for 10 minutes, after which APX activity was measured. To determine the most appropriate response of ascorbate peroxidase to the different levels of the studied treatments, linear and non-linear regression analyses were performed due to the limited number of treatments.

**Results:** The electrophoretic profile of ascorbate peroxidase in blackberry leaf extract revealed two isoenzymes at pH 6.5 and 8 (APX-LI and APX-LII), while one isoenzyme (APX-F) was detected in the fruit extract at pH 6.5. The substrates ascorbate, pyrogallol, and guaiacol increased peroxidase activity at low concentrations; however, at higher concentrations, they exhibited inhibitory effects on enzyme activity, likely due to substrate inhibition mechanisms that help regulate oxidative stress. Nonlinear regression analysis showed that the activities of APX-F and APX-LII followed the Gompertz exponential model, whereas the activity of APX-LI followed a monophasic incremental exponential function. The nonlinear regression analysis



of the effect of sodium chloride, based on a planar exponential function with a decreasing phase, indicated that APX-LI is more sensitive to sodium chloride in the environment than APX-LII. In the presence of ferrous sulfate, the slope of APX-LII activity was greater than that of APX-LI, suggesting that APX-LII is more sensitive to ferrous sulfate. The maximum activity of APX-LII was observed at a concentration of 0.138 mM iron chloride. In the presence of zinc sulfate, APX-LII reached 50% of its maximum activity later than the other two enzymes, indicating that this isoenzyme is less sensitive to zinc sulfate in the environment. The optimum temperatures for maximum enzyme activity were 35 °C for APX-F, 30 °C for APX-LI, and 45 °C for APX-LII.

**Conclusion:** High concentrations of metal ions reduce the plant's ability to cope with oxidative stress. Based on the results of the present study, the effects of zinc ions (zinc sulfate), iron chloride, iron sulfate, and sodium chloride on peroxidase activity were evaluated. The results indicated that sodium chloride at low concentrations had little effect on peroxidase activity; however, as sodium chloride concentration increased, structural changes occurred, leading to peroxidation. These structural alterations were associated with a significant reduction in enzyme activity, approaching nearly zero in all three isozymes. Zinc ions inhibit peroxidase activity by binding to the enzyme's active site, inducing unfavorable structural changes that interfere with substrate binding and catalytic activity. Nonlinear regression analysis of the activities of the three enzymes (APX-LI, APX-LII, and APX-F) at different temperature levels, based on a two-piece function, showed that the slope of the increasing phase of enzyme activity in the first part of the APX-LI model was greater than that of APX-LII and APX-F. This finding indicates that APX-LI is more sensitive to changes in ambient temperature in blackberries.

**Keywords:** Ascorbate peroxidase, isoenzyme, ferrus sulfate, zinc sulfate, iron chloride.

## ارزیابی سیتیکی آسکوبات پراکسیداز در برگ و میوه توت سیاه به روش تحلیل رگرسیونی غیرخطی

ژیلا زارعی<sup>۱</sup>، نبی خلیلی اقدم<sup>۲</sup>، شهریار سعیدیان<sup>۳\*</sup>، بهالدین رشیدزاده<sup>۴</sup> و محمد قادرمرزی<sup>۵</sup>

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲- دانشیار، علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۳- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، پست‌الکترونیک: saeedyan@pnu.ac.ir

۴- استادیار، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۵- کارشناس ارشد شیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۰۸

تاریخ اصلاح نهایی: ۱۴۰۴/۱۱/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۹

### چکیده

سابقه و هدف: گیاهان دارای سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی کارآمد برای خنثی کردن سطوح سمی گونه‌های فعال اکسیژن هستند که شامل اجزای مختلف آنزیمی و غیرآنزیمی می‌باشند. آسکوبات پراکسیداز (APX)، یک آنزیم کلیدی در این زمینه است که در کنترل سطوح گونه‌های فعال اکسیژن سمی در بخش‌های مختلف درون سلولی عمل می‌کند. بیان APX در برخی از مراحل رشد و تحت تنش‌های زیستی و غیرزیستی تعدیل می‌شود که نشان‌دهنده اهمیت فعالیت APX در کنترل محتوای H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در محفظه‌های درون سلولی است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، از توت سیاه با نام علمی *Morus nigra* از گیاهان بومی ایران و متعلق به خانواده Moraceae از هر دو بخش برگ و میوه به صورت جداگانه عصاره آنزیمی تهیه شده و به لحاظ سیتیکی در حضور نمک‌های مختلف NaCl، FeCl<sub>3</sub>، FeSO<sub>4</sub>، ZnSO<sub>4</sub> و Na<sub>3</sub>N مورد سنجش قرار گرفت. فعالیت آنزیم APX با توجه به میزان اکسایش سوبسترای آسکوبات و در طول موج ۲۹۰ nm و با بهره‌گیری از ضریب خاموشی ۲/۸ cm<sup>-1</sup>mm<sup>-1</sup> اندازه‌گیری شد. برای تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیم، سنجش APX در دمای ۲۵-۸۰ °C در بافر Tris-HCL ۵۰ mM (pH 6-7) با فواصل ۵ °C انجام شد. برای ارزیابی پایداری حرارتی، محلول آنزیم به مدت ۳۰ min در حمام آب از ۲۵ تا ۸۰ °C انکوبه شد و بعد واکنش مخلوط به مدت ۱۰ min در دمای اتاق نگهداری گردید. در نهایت فعالیت APX اندازه‌گیری شد. در این تحقیق با هدف تعیین بهترین سطح پاسخ APX به سطوح مختلف تیمارهای مورد مطالعه با توجه به کمی بودن تیمارها از تجزیه رگرسیون غیرخطی استفاده شد.

یافته‌ها: نمودار APX در عصاره برگ توت سیاه دو ایزوآنزیم را در pH حدود ۶/۵ و ۸ (APX-LI، APX-LII) و در عصاره میوه توت سیاه یک ایزوآنزیم (APX-F) در pH ۶/۵ را نشان می‌دهد. سوبستراهای آسکوبات، پیروگال و گایاکل افزایش‌دهنده فعالیت پراکسیدازی بوده، هرچند در غلظت‌های بالاتر با مهار سوبسترای، اثرهای معکوسی در فعالیت پراکسیداز در جهت کاهش تنش اکسیداتیو بر عهده دارند. آنالیز رگرسیونی غیرخطی APX-F و APX-LII از مدل رشد گومپرتز و فعالیت APX-LI نیز از تابع نمائی افزایشی تک‌فازی تبعیت کرد. نتایج آنالیز رگرسیونی غیرخطی اثر کلرید سدیم بر اساس تابع نمائی سطح، فاز کاهشی داشته و نشان داد که حساسیت APX-LI در محیط بیشتر از APX-LII است. در اثر سولفات آهن، شیب افزایش فعالیت APX-LII بیشتر از APX-LI است که حکایت از حساسیت بیشتر APX-LII به سولفات آهن دارد. APX-LII در غلظت ۰/۱۳۸ mM کلرید آهن، بیشینه فعالیت را داراست. در حضور سولفات روی، APX-LII بسیار دیرتر از دو آنزیم دیگر به ۵۰ درصد حداکثر فعالیت خود می‌رسد و این به معنی حساسیت کمتر این ایزوآنزیم به حضور سولفات روی در محیط است. شیب کاهش فعالیت APX-LI در حضور نیتريد سدیم حکایت از حساسیت بسیار بالای این ایزوآنزیم به سولفات روی در محیط دارد. بیشینه فعالیت APX-F در دمای ۳۵ °C، APX-LI در دمای ۳۰ °C و در مورد APX-LII دمای ۴۵ °C بود.

نتیجه‌گیری: غلظت‌های بالای یون‌های فلزی منجر به کاهش حساسیت گیاه در مقابله با تنش‌های اکسیداتیو می‌شود. براساس نتایج این مطالعه بین یونهای روی (سولفات روی)، کلرید آهن، سولفات آهن و کلرید سدیم این نتیجه حاصل شد که کلرید سدیم در غلظت‌های پایین (۲۳-۰ میلی‌مولار) تأثیر چندانی در فعالیت پراکسیدازی ندارد اما با افزایش غلظت کلرید سدیم (۲۳-۱۰۰ میلی‌مولار) ساختار پراکسیدازی دستخوش تغییرات ساختاری شده و با کاهش فعالیت آنزیم به نزدیک صفر در هر سه ایزوآنزیم همراه بوده است. یون روی با اتصال به جایگاه فعال آنزیم نقش مهارکننده پراکسیدازی و تغییرات ساختاری منفی در جهت عدم پذیرش و کاتالیز سوسترای پراکسیدازی را ایفا می‌کند. آنالیز رگرسیون غیرخطی فعالیت هر سه آنزیم APX-LI، APX-LII و APX-F در سطوح غلظتی مختلف دما با تبعیت از یک تابع دو تکه‌ای نشان داد که شیب افزایش فعالیت آنزیم در بخش اول مدل APX-LI بیشتر از APX-F و APX-LII بود و این حکایت از حساسیت بیشتر این ایزوآنزیم به دمای محیط در توت سیاه دارد.

واژه‌های کلیدی: آسکوربات پراکسیداز، ایزوآنزیم، سولفات آهن، سولفات روی، کلرید آهن.

## مقدمه

درخت توت مهمترین گیاه متعلق به تیره موروس از خانواده موراسه است و برای رشد، تقریباً در همه انواع خاک، به جز خاک‌های باتلاقی، شور یا اسیدی سازگار است (Dhanyalakshmi & Nataraja, 2018). میوه توت سیاه سرشار از ترکیب‌های زیست‌فعال مانند فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، رسوراترول و سایر پلی‌فنول‌ها است که به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی قوی، در پیشگیری و درمان بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو (مانند بیماری‌های قلبی-عروقی، سرطان و پیری زودرس) نقش دارد.

مطالعات نشان داده‌اند که آنتوسیانین‌های موجود در میوه توت سیاه اثرهای ضدالتهابی، ضددیابتی و محافظت‌کننده عصبی دارند. این ترکیب‌ها می‌توانند به کاهش التهاب، بهبود حساسیت به انسولین و محافظت در برابر بیماری‌های تخریب‌کننده عصبی کمک کنند. آسکوربات یک آنتی‌اکسیدان و پاک‌کننده رادیکال شناخته شده است که می‌تواند به‌طور خود به خود با سوپراکسید و سایر رادیکال‌ها واکنش نشان دهد. آسکوربات به‌عنوان یک دهنده الکترون در تجزیه  $H_2O_2$  از طریق برهم‌کنش‌های دینامیکی کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز (APX) عمل می‌کند (Corpas *et al.*, 2024). در گیاهان، APX‌ها به‌طور گسترده در سیتوزول، پراکسی‌زوم، میتوکندری و کلروپلاست وجود دارند، جایی که نقش مهمی در حفظ هموستاز

ردوکس سلولی با حذف  $H_2O_2$  تولید شده توسط فرایندهای متابولیکی مانند آنهایی که در کلروپلاست‌ها اتفاق می‌افتند، ایفا می‌کنند (Zandi & Schnug, 2022). APX یکی از اجزای اصلی چرخه آسکوربات-گلوتاتیون است. وقتی آنزیم کاتالاز در پراکسی‌زوم،  $H_2O_2$  را حذف می‌کند، این آنزیم مشابه همین کار را در سیتوزول و کلروپلاست انجام می‌دهد. APX،  $H_2O_2$  را به آب و «دی‌هیدروآسکوربات» تبدیل می‌کند و برای انجام این واکنش از آسکوربیک‌اسید به‌عنوان عامل کاهنده استفاده می‌کند (Foyer & Kunert, 2024). این آنزیم تمایل بیشتری نسبت به آنزیم کاتالاز برای  $H_2O_2$  دارد. در طی فعالیت‌های نرمال سلولی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و نیتروژن (RNS) تولید می‌گردد که علاوه بر عملکردهای سودمند، در مرگ سلولی و جلوگیری از آپوپتوز نقش حیاتی دارند. هر سلول برای جلوگیری از تولید بیش از حد این رادیکال‌های فعال، به سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مجهز می‌شود (Birben *et al.*, 2012). تنش اکسیداتیو طی تولید بیش از حد این گونه‌های فعال، ناشی از منشأ خارجی (برای نمونه، اشعه ماورای بنفش) و منشأ درونی (در سطح سلولی که میتوکندری درگیر است)، با تخریب دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی اتفاق می‌افتد. تحت تنش‌های غیرزیستی، گیاهان گونه‌های اکسیژن فعال متعددی از جمله رادیکال سوپراکسید،  $H_2O_2$  و پراکسیدهای لیپیدی تولید می‌کنند. تجمع بیش از

برابر تنش‌های محیطی مانند خشکی و شوری محافظت می‌کند.

فعالیت APX با شدت تنش مرتبط است و نشان‌دهنده میزان تحمل گیاه است. سازوکار عملکرد آن به خوبی شناخته شده و امکان مقایسه بین گونه‌ها یا ژنوتیپ‌ها را فراهم می‌کند. اندازه‌گیری فعالیت APX با روش‌هایی مانند اسپکتروفتومتری ساده، سریع و دقیق است. این آنزیم با مسیرهای متابولیکی مانند متابولیسم آسکوربات و گلوکاتینون ارتباط دارد و اطلاعات جامعی از وضعیت گیاه ارائه می‌دهد. ژنوتیپ‌های مقاوم معمولاً فعالیت APX بالاتری دارند که آن را برای غربالگری مناسب می‌کند. در مقایسه با سایر شاخص‌ها مانند سوپراکسید دیسموتاز یا کاتالاز، APX به دلیل حساسیت بالا و سهولت اندازه‌گیری برجسته است. این ویژگی‌ها APX را به یک شاخص عملی و قابل‌اعتماد تبدیل کرده‌اند. مطالعه سینتیک آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)، یکی از آنزیم‌های کلیدی در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی گیاهان، در برگ و میوه توت سیاه می‌تواند به درک عمیق‌تر سازوکارهای دفاعی این گیاه و بهینه‌سازی بهره‌برداری از ترکیب‌های زیست‌فعال آن کمک کند.

### مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه پیام نور کردستان اجرا گردید. در این تحقیق، از توت سیاه با نام علمی *Morus nigra* به عمل آمده در کردستان (در فصل تابستان خریداری شده) استفاده شد. میوه‌ها، پس از شستشو و خشک شدن، به‌طور جداگانه و بلافاصله عصاره‌گیری شدند تا از فعالیت قارچی جلوگیری به‌عمل آید. به‌منظور تهیه عصاره از میوه‌های تهیه شده، در حضور بافر سیترات-فسفات ۰/۱ M با ۷ pH و محلول ۰/۰۲ mM فنیل متان سولفونیل فلوراید به‌عنوان مهارکننده پروتئازی، هموژنیزه کردن میوه‌ها به‌طور جداگانه انجام گردید. مخلوط هموژنیزه به مدت ۱۰ min با دور ۳۰۰۰g سانتریفوژ شد. رسوب بالایی به مدت نیم ساعت در ۱۵۰۰۰g سانتریفوژ شد و

حد ROS به سلول‌های گیاهی از طریق پراکسیداسیون لیپیدی و اکسیداسیون پروتئین آسیب می‌رساند (Hasanuzzaman et al., 2020). در نتیجه تنش اکسیداتیو لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA آسیب می‌بینند و مشکلاتی برای سلول ایجاد می‌شود.

آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی در نقاط مختلفی از سلول قرار می‌گیرند و اکسیژن‌های فعال را خنثی می‌کنند. از این دسته آنزیم‌ها می‌توان به سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، APX و گلوکاتینون ردوکتاز (GDH) اشاره کرد. عوامل محیطی می‌توانند باعث تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های گیاهی شوند (Xu et al., 2013). این مولکول‌ها در سطح پایه با عملکردهای سلولی ضروری مانند سیگنال‌دهی برای پاسخ‌های رشدی و دفاعی در گیاهان مرتبط هستند. از سوی دیگر، ROS در غلظت‌های بالا به‌طور قابل توجهی مضر است و منجر به آسیب اکسیداتیو در بیومولکول‌های مختلف سلولی می‌شود. گیاهان دارای سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی کارآمد برای خنثی کردن سطوح سمی گونه‌های فعال اکسیژن هستند که شامل اجزای مختلف آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشند. APX، آنزیمی کلیدی در این زمینه است که در کنترل سطوح گونه‌های فعال اکسیژن سمی در بخش‌های مختلف درون سلولی عمل می‌کند. در چندین گونه، بیان APX در برخی از مراحل رشد و تحت تنش‌های زیستی و غیرزیستی تعدیل می‌شود که نشان‌دهنده اهمیت فعالیت APX در کنترل محتوای  $H_2O_2$  در محفظه‌های درون سلولی است. دستکاری ژنتیکی بیان ژن APX در مدل‌های مختلف گیاهی باعث ایجاد پاسخ‌های متفاوت به شرایط استرس می‌شود و بر رشد و نمو گیاه تأثیر می‌گذارد که نشان می‌دهد این آنزیم‌ها می‌توانند به‌عنوان جاذب‌کننده  $H_2O_2$  و به‌عنوان حسگر تغییر اکسیداسیون در داخل سلول‌های گیاهی نقش داشته باشند (Costa et al., 2010). به‌طورکلی APX به‌دلیل نقش محوری در دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاهان، شاخص کلیدی برای ارزیابی تحمل به تنش است. این آنزیم در چرخه آسکوربات-گلوکاتینون، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) را خنثی کرده و از سلول‌ها در

بررسی فعالیت باقیمانده گرفته شد. میزان فعالیت در شروع سنجش ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد. در نهایت، نتایج فعالیت باقیمانده در برابر زمان انکوباسیون به تصویر کشیده شد. آزمایش مهار APX در شرایط آزمایشگاهی: مهار فعالیت APX با روش اسپکتروفتومتری تعیین شد (Elavarthi & Martin, 2010). مخلوط واکنش، حاوی محلول ترکیب آزمایشی (محلول مهار)، محلول APX در بافر فسفات ۰/۱ M (pH 8.0) به مدت ۱۰ min در دمای ۲۵°C انکوبه شد. سپس واکنش با افزودن سوبسترا آغاز شد. پس از ۶ min، در نهایت فعالیت آنزیم APX با توجه به میزان اکسایش سوبسترای آسکوربات و در طول موج ۲۹۰ nm و با بهره‌گیری از ضریب خاموشی  $2/8 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  اندازه‌گیری گردید. درصد مهار فعالیت پراکسیدازی به شرح زیر محاسبه شد.

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

در جایی که A فعالیت آنزیم بدون بازدارنده است، B فعالیت در حضور بازدارنده است.  $IC_{50}$  به‌عنوان غلظت عصاره‌های گیاهی و داروهای شیمیایی مورد نیاز برای مهار فعالیت آنزیم تا ۵۰٪ تعیین شد.

اثر یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم: به‌منظور بررسی اثر یون‌های فلزی بر فعالیت APX، برخی از ترکیب‌های شیمیایی مانند NaCl، FeCl<sub>3</sub>، FeSO<sub>4</sub>، ZnSO<sub>4</sub> و Na<sub>3</sub>N انتخاب شدند. غلظت‌های اعمال شده این یون‌ها در بافر ۵۰ میلی‌مولار Tris-HCL در pH 7.5 تهیه شدند. غلظت یون‌های فلزی تهیه شده ۰/۱، ۰/۵ و ۱ mM بود. هر واکنش مخلوط به مدت ۱۰ min دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و در نهایت فعالیت APX-F، APX-LI و APX-LII به‌طور جداگانه اندازه‌گیری گردید. سنجش مخلوط بدون یون‌های فلزی به‌عنوان ۱۰۰٪ فعالیت در نظر گرفته شد.

روش تجزیه‌وتحلیل: در این تحقیق برای تعیین بهترین سطح پاسخ آنزیم APX به سطوح مختلف تیمارهای مورد مطالعه، با توجه به کمی بودن تیمارها از تجزیه رگرسیون

محلول شفاف بالایی به‌عنوان عصاره خام و انجام سنجش‌های بعدی یعنی اندازه‌گیری فعالیت آنزیم APX در توت سیاه مورد استفاده قرار گرفت. برای اندازه‌گیری کمی پروتئین نمونه‌ها، از روش Bradford استفاده شد (Bradford, 1976). اساس روش برادفورد بر اتصال کوماسی برلیانت بلو G250 به پروتئین در محیط اسیدی و قرائت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ nm بود. غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد آلومین گاوی محاسبه و برحسب میلی‌گرم بر گرم محاسبه گردید. میزان جذب نوری در ۵۹۵ nm با غلظت پروتئین نسبت مستقیم دارد.

تعیین فعالیت APX: سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (EC 1.11.1.1) با استفاده از روش Nakano و Kozi (۱۹۸۷) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (Nakano & Kozi, 1987). برای این سنجش، به میزان یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش که دربرگیرنده آسکوربات ۱۰ mM، بافر فسفات پتاسیم یک مولار با pH ۷/۸، H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> با غلظت mM ۱۰ و ۱۰ μL از عصاره خام در داخل کووت به‌منظور سنجش در دستگاه اسپکتروفتومتر مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت فعالیت آنزیم APX با توجه به میزان اکسایش سوبسترای آسکوربات و در طول موج ۲۹۰ nm و با بهره‌گیری از ضریب خاموشی  $2/8 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  اندازه‌گیری شد (Kumar, 2022).

فعالیت دما و تعیین پایداری حرارتی: برای تعیین دمای بهینه برای فعالیت آنزیم، سنجش APX در دمای ۲۵-۸۰°C در بافر ۵۰ mM Tris-HCL (pH 6-7)، با فواصل ۵°C انجام شد. برای ارزیابی پایداری حرارتی، محلول آنزیم به مدت ۳۰ min در حمام آب در دمای ۲۵°C تا ۸۰°C انکوبه شد و بعد واکنش مخلوط به مدت ۱۰ min در دمای اتاق نگهداری گردید. در نهایت فعالیت APX باقی‌مانده اندازه‌گیری شد. آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. برای تعیین نیمه عمر، محلول آنزیمی حاوی ۲۲۰ U/mg تا ۶۰ min دقیقه در شرایط بهینه در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۴۵°C انکوبه شد. برای هر بازه ۳۰ min، ۲۰ μL از نمونه برای

می‌یابد. تغییر در مقدار  $Y$  معمولاً در ابتدا سریع رخ می‌دهد ولی زمانی که  $Y$  به یک مقدار حداقلی نزدیک می‌شود، شیب افزایش در مقدار  $Y$  نیز به تدریج کاهش می‌یابد. شکل این مدل عبارت است از:

$$Y = Y_m \times \left( \frac{Y_0}{Y_m} \right)^{\exp(-k \times X)}$$

که در آن  $Y_{\max}$  حداکثر مقدار  $Y$ ،  $Y_0$  مقدار  $Y$  در شروع منحنی و  $k$ ، شیب افزایش مدل (لگ زمانی) و  $1/k$  مقدار  $X$  در نقطه چرخش مدل است.

۵- مدل نمائی افزایشی تک فازی: این تابع در زمانی استفاده می‌شود که مقدار متغیر تابع (فعالیت آنزیم) با گذشت زمان یا در اثر افزایش مقدار یک نهاده یا ماده تحریک‌کننده افزایش می‌یابد. تغییر در مقدار  $Y$  معمولاً در ابتدا سریع رخ می‌دهد ولی زمانی که  $Y$  به یک مقدار حداقلی نزدیک می‌شود، شیب افزایش در مقدار  $Y$  نیز به تدریج کاهش می‌یابد. شکل این مدل عبارت است از:

$$Y = Y_{\max} \times (1 - e^{-kx})$$

که در آن،  $Y_{\max}$  حداکثر مقدار  $Y$  است که با افزایش در مقدار  $X$ ،  $Y$  به آن نزدیک می‌شود و  $Y$  و  $k$  شیب افزایش مدل است.

۶- مدل نمائی کاهشی تک فازی: این تابع در زمانی استفاده می‌شود که مقدار متغیر تابع (فعالیت آنزیم) با گذشت زمان یا در اثر افزایش مقدار یک نهاده یا ماده تحریک‌کننده کاهش می‌یابد. تغییر در مقدار  $Y$  معمولاً در ابتدا سریع رخ می‌دهد ولی زمانی که  $Y$  به یک مقدار حداقلی نزدیک می‌شود، شیب کاهش در مقدار  $Y$  نیز به تدریج کاهش می‌یابد. شکل این مدل عبارت است از:

$$Y = Pleatue + (Y_{\max} - Pleatue) \times \exp(-k \times X)$$

که در آن،  $Pleatue$  حداقل مقدار  $Y$  است که با افزایش در مقدار  $X$ ،  $Y$  به آن نزدیک می‌شود،  $Y_{\max}$  حداکثر مقدار  $Y$  و  $k$ ، شیب کاهش مدل است.

۷- مدل نمائی مسطح-یک فاز کاهشی: این مدل در

خطی و غیرخطی استفاده شد. توابع رگرسیون مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از:

۱- مدل درجه دوم: از این مدل در شرایطی استفاده می‌شود که مقدار متغیر تابع درجه دوم (فعالیت آنزیم) با گذشت زمان یا در اثر افزایش مقدار یک نهاده یا ماده تحریک‌کننده تا نقطه عطف مدل افزایش می‌یابد و بعد روند نزولی بخود می‌گیرد. شکل این مدل عبارت است از:

$$Y = B_0 + B_1 X + B_2 X^2$$

که در آن  $B_0$ ،  $B_1$  و  $B_3$  ضرایب مدل هستند.

۲- مدل دوتکه‌ای: معادله این مدل عبارت است از:

$$Y_1 = \text{intercept}_1 + \text{slope}_1 * X$$

$$Y_{atX_0} = \text{slope}_1 * X_0 + \text{intercept}_1$$

$$Y_2 = Y_{atX_0} + \text{slope}_2 * (X - X_0)$$

$$Y = \text{IF}(X < X_0, Y_1, Y_2)$$

که در آن  $a$ ، عرض از مبدأ،  $b_1$  و  $b_2$  شیب مدل در دو طرف نقطه چرخش (Break point) و  $x_0$ ، نقطه چرخش مدل یا حداکثر مقدار عددی  $y$  است. مقادیر  $a$  و  $b_1$  همیشه مثبت و مقدار  $b_2$  نیز همیشه منفی است.

۳- مدل سه تکه‌ای (دندان مانند نامنظم):

$$\text{if } x < x_0$$

$$Y_1 = \text{intercept}_1 + \text{slope}_1 * X$$

$$Y_{atX_0} = \text{intercept}_1 + \text{slope}_1 * X_0$$

$$\text{if } x_0 < x_1$$

$$Y_2 = Y_{atX_0} + \text{slope}_2 * (X - X_0)$$

$$Y_{atX_1} = Y_{atX_0} + \text{slope}_2 * (X_1 - X_0)$$

$$Y_3 = Y_{atX_1} + \text{slope}_3 * (X - X_1)$$

$$Y = \text{IF}(X < X_0, Y_1, \text{IF}(X < X_1, Y_2, Y_3))$$

که در آن  $a$ ، عرض از مبدأ،  $\text{slope}_1$  و  $\text{slope}_2$  شیب مدل در دو طرف دو نقطه چرخش (Break point) و  $x_0$ ، نقطه چرخش مدل  $y$  است. مقادیر  $\text{intercept}$  و  $\text{slope}_1$  همیشه مثبت و مقدار  $\text{slope}_2$  نیز همیشه منفی است.

۴- مدل رشد گومپرتز: از این مدل در شرایطی استفاده می‌شود که مقدار متغیر تابع (فعالیت آنزیم) با گذشت زمان یا در اثر افزایش مقدار یک نهاده یا ماده تحریک‌کننده افزایش

مانند توابع نمایی، لجستیک یا چندجمله‌ای را مدل‌سازی کنند. در تحقیق مورد نظر، از Proc NLIN در نرم‌افزار SAS (نسخه ۲۰۰۹) برای برازش مدل‌های رگرسیون غیرخطی به منظور تحلیل رفتار سینتیکی آسکوربات پراکسیداز در برگ و میوه توت سیاه تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند pH، غلظت سوبستراها (آسکوربات) و نمک‌ها (کلرید سدیم، سولفات آهن و غیره) استفاده شده است.

### نتایج

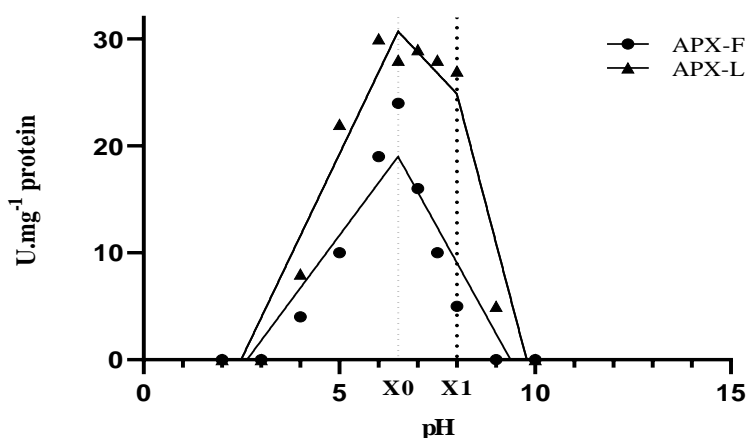
به منظور تعیین pH بهینه فعالیت APX، فعالیت آنزیم با استفاده از سوبسترای آسکوربات و  $H_2O_2$  در pHهای ۳ تا ۱۰ اندازه‌گیری شد. غلظت‌های بالای  $[H^+]$  و  $[OH^-]$  از لحاظ کاتالیکی منجر به غیرفعال شدن آنزیم می‌گردند، نتایج حکایت از وجود دو قله فعالیت برای آنزیم است. نمودار APX در عصاره برگ توت سیاه (APX-L) دو قله جداگانه در pH حدود ۶/۵ و ۸، احتمالاً نشان‌دهنده وجود دو ایزوآنزیم از آسکوربات پراکسیداز (APX-LI، APX-LII) است. نمودار APX در عصاره میوه توت سیاه (APX-F) یک قله در pH حدود ۶/۵ را نشان می‌دهد که نشان‌دهنده وجود یک ایزوآنزیم از APX است. بررسی کمی فعالیت آنزیم‌های APX-L و APX-F در سطوح مختلف pH نشان داد که روند تغییرات فعالیت آنزیم در معرض سطوح مختلف اسیدیته و بازی از یک تابع سه تکه‌ای تبعیت می‌کند (شکل ۱)، بدین ترتیب که با افزایش pH محیط، فعالیت آنزیم تا ۶/۷ pH با شیب ۰/۰۲۴ برای APX-L و ۰/۰۲۹ در APX-F افزایش پیدا می‌کند و پس از رسیدن به نقطه شکست (۶/۷ در هر دو گیاه) با شیب ۰/۰۶- در APX-L و ۰/۰۷- در توت سیاه فعالیت آنزیم کاهش پیدا می‌کند، به طوری که در pH حدود ۱۰ فعالیت هر دو آنزیم به صفر میل کرد (جدول ۱). شیب افزایشی فعالیت آنزیم در بخش اول مدل و شیب کاهشی در بخش دوم مدل در ارتباط با APX-F بیشتر از APX-L بود و این نشان‌دهنده حساسیت بیشتر

شرایطی استفاده می‌شود که مقدار متغیر تابع (فعالیت آنزیم) با گذشت زمان یا در اثر افزایش مقدار یک نهاده یا ماده تحریک‌کننده تا یک مقدار مشخص از نهاده یا ماده تحریک‌کننده ثابت بوده و پس از آن با تغییر در مقدار X، تغییر در مقدار Y ابتدا با شیب بالایی نزولی شده و زمانی که Y به یک مقدار حداقلی نزدیک می‌شود، شیب کاهش در مقدار Y نیز به تدریج کاهش می‌یابد. شکل این مدل عبارت است از:

$$Y = IF(X < X_0, Y_0) \\ Y = P_{leatue} + (Y_{max} - P_{leatue}) \times \exp(-k \times (X - X_0))$$

که در آن،  $P_{leatue}$  حداقل مقدار Y است که با افزایش در مقدار X، Y به آن نزدیک می‌شود،  $X_0$  نقطه شکست منحنی،  $Y_{max}$  حداکثر مقدار Y و k، شیب کاهش مدل است. برای برازش مدل‌های رگرسیون غیرخطی از رویه (procedure Non-Linear) Proc nlin افزار (SAS, 2009) از روش مطلوب‌سازی تکراری و نرم افزار GraphPadPrism استفاده شد (Khaliliaqdam *et al.*, 2024). در این روش با هر بار وارد کردن مقادیر اولیه پارامترها، مقادیر نهایی آنها با روش کمترین توان‌های دوم تخمین زده می‌شود و تغییر مقادیر اولیه تا زمانی انجام می‌شود که بهترین برآورد از پارامتر بدست بیاید. Proc NLIN یک رویه در نرم‌افزار SAS (Statistical Analysis System) اشاره دارد که برای برازش مدل‌های رگرسیون غیرخطی استفاده می‌شود. Proc NLIN مخفف Procedure Non-Linear است و یکی از ابزارهای قدرتمند SAS برای تحلیل و برازش مدل‌های رگرسیون غیرخطی به داده‌ها محسوب می‌شود. این رویه امکان تخمین پارامترهای مدل‌های غیرخطی را با استفاده از روش‌های بهینه‌سازی تکراری مانند گاوس-نیوتن، مارکوارت یا گرادیان فراهم می‌کند. برخلاف رگرسیون خطی که رابطه بین متغیرها را به صورت خطی فرض می‌کند، مدل‌های غیرخطی می‌توانند روابط پیچیده‌تری

آنزیم APX به pH محیط در میوه توت سیاه نسبت به برگ است.



شکل ۱- تأثیر pH بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ و میوه توت سیاه

Figure 1. Effects of pH on ascorbate peroxidase enzyme (APX) activity of *Morus nigra* fruits (F) or leaves (L)

جدول ۱- ضرایب برازش مدل‌های دو تکه‌ای و سه تکه‌ای به تغییر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ و میوه توت سیاه در سطوح مختلف pH

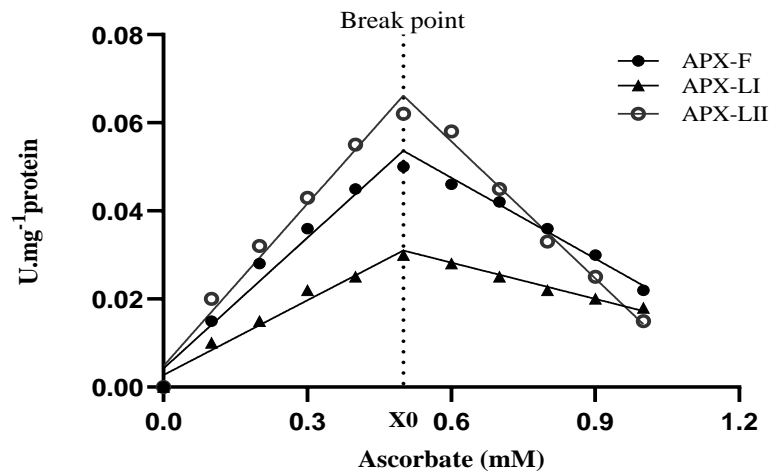
Table 1. Fitting coefficients of two- and three-segment piecewise models describing changes in ascorbate peroxidase (APX) activity of *Morus nigra* fruits (F) or leaves (L) at different pH levels

Factor	X <sub>02</sub>	X <sub>01</sub>	b <sub>3</sub> ±SE	b <sub>2</sub> ±SE	b <sub>1</sub> ±SE	intercept±SE	R <sup>2</sup>
APX-F	-	6.5	-	-6.61±0.5	4.92±0.3	-0.13±0.01	0.86
APX-L	8	6.5	-13.93±1.1	-3.86±0.2	7.65±0.6	-19.7±1.2	0.94

X<sub>01</sub> and X<sub>02</sub>: first and second break points, b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, and b<sub>3</sub>: coefficients of model, intercept: Y while X is zero, R<sup>2</sup>:determination coefficients, and SE: standard error.

از شیب APX-F بود و این حکایت از حساسیت بیشتر آنزیم APX به آسکوربات محیط در توت سیاه در بخش برگ نسبت به بخش میوه دارد. نقطه چرخش مدل برای هر سه آنزیم، ۰/۵ mM آسکوربات بدست آمد. به عبارت دیگر، بالاترین فعالیت هر سه آنزیم در این سطح غلظتی از آسکوربات ثبت شد. شیب کاهش فعالیت APX-LII در برگ به مراتب بیشتر از APX-LI و APX-F بود (جدول ۲). ضریب تبیین بالای مدل نیز مقبولیت برازش این مدل به فعالیت این سه آنزیم را در سطوح مختلف آسکوربات نشان داد.

با افزایش غلظت آسکوربات از ۰ تا ۱ میلی‌مولار، رفتار متفاوتی از هر سه آنزیم APX-LI، APX-LII و APX-F قابل مشاهده است (شکل ۲). نتایج آنالیز رگرسیون غیرخطی فعالیت هر سه آنزیم APX-LI، APX-LII و APX-F را در سطوح غلظتی مختلف آسکوربات نشان داد که روند تغییرات فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف آسکوربات از یک تابع دو تکه‌ای تبعیت می‌کند (جدول ۲). شیب افزایش فعالیت آنزیم در بخش اول مدل و شیب کاهش در بخش دوم مدل در APX-LII بیشتر از APX-LI و شیب APX-LI نیز بیشتر



شکل ۲- تغییر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز میوه و برگ توت سیاه در سطوح مختلف آسکوربات

**Figure 2. Changes in ascorbate peroxidase enzyme (APX) activity of *Morus nigra* fruits (F) or leaves (LI and LII) at different ascorbate levels**

جدول ۲- ضرایب برازش مدل دوتکه‌ای به تغییر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز میوه و برگ توت سیاه در غلظت ثابت  $H_2O_2$  و غلظت متفاوت آسکوربات

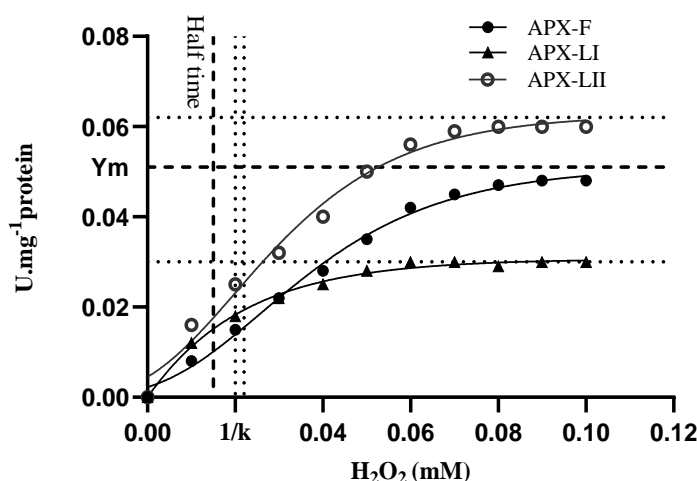
**Table 2. Fitting coefficients of two-segment piecewise models to changes in ascorbate peroxidase enzyme activity of *Morus nigra* fruits (F) or leaves (LI and LII) under constant  $H_2O_2$  and different concentrations of ascorbate**

Factor	$X_0$	$b_2 \pm SE$	$b_1 \pm SE$	intercept $\pm SE$	$R^2$
APX-F	0.5	$-0.061 \pm 0.003$	$0.098 \pm 0.01$	$0.0042 \pm 0.003$	0.97
APX-LI	0.5	$-0.027 \pm 0.002$	$0.056 \pm 0.003$	$0.0027 \pm 0.002$	0.97
APX-LII	0.5	$-0.103 \pm 0.005$	$0.122 \pm 0.01$	$0.0047 \pm 0.003$	0.98

$X_{01}$  and  $X_{02}$ : first and second break points,  $b_1$ ,  $b_2$ , and  $b_3$ : coefficients of model, intercept: Y while X is zero,  $R^2$ : determination coefficients, and SE: standard error.

APX-F بود (جدول ۳). مدل نمایی افزایشی نیز بخوبی پاسخ ایزوآنزیم APX-LI را نسبت به تغییرات  $H_2O_2$  محیط نشان داد (ضریب تبیین بالا). اگرچه شیب افزایش فعالیت این ایزوآنزیم از APX-F بیشتر و از APX-LII کمتر بود ولی بیشینه فعالیت ایزوآنزیم APX-LI همواره کمتر از ایزوآنزیم APX-LII و آنزیم APX-F بود. نیمه عمر فعالیت ایزوآنزیم APX-LI غلظت  $0.015$  میلی مولار  $H_2O_2$  درون یابی شد. به عبارت دیگر، در این سطح غلظتی شدت فعالیت ایزوآنزیم APX-LI به حدود ۵۰ درصد حداکثر فعالیت خود می‌رسد (جدول ۳).

نتایج آنالیز رگرسیون غیرخطی اثر  $H_2O_2$  در غلظت‌های متفاوت بر فعالیت APX در غلظت ثابت آسکوربات نشان داد که روند تغییرات فعالیت آنزیم APX-F و ایزوآنزیم APX-LII در حضور غلظت‌های مختلف  $H_2O_2$  از مدل رشد گومپرتز تبعیت می‌کند. پاسخ فعالیت ایزوآنزیم APX-LI نیز به غلظت‌های مختلف  $H_2O_2$  محیط نیز از یک تابع نمایی کاهش‌ی تک فازی تبعیت کرد (جدول ۳). شیب افزایش فعالیت ایزوآنزیم APX-LII در مدل رشد گومپرتز بیشتر از APX-F بود و این مؤید حساسیت بیشتر این ایزوآنزیم به غلظت‌های متفاوت  $H_2O_2$  محیط است. ضمن اینکه بیشترین سطح فعالیت ایزوآنزیم APX-LII بیشتر از



شکل ۳- تغییر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز میوه و برگ توت سیاه در سطوح مختلف  $H_2O_2$

Figure 3. Changes in ascorbate peroxidase enzyme (APX) activity of *Morus nigra* fruits (F) and leaves (LI and LII) under different  $H_2O_2$  levels

جدول ۳- ضرایب برازش مدل‌های رشد گومپرتز و نمائی تک فاز افزایشی به تغییر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز میوه و برگ

توت سیاه در غلظت‌های مختلف  $H_2O_2$

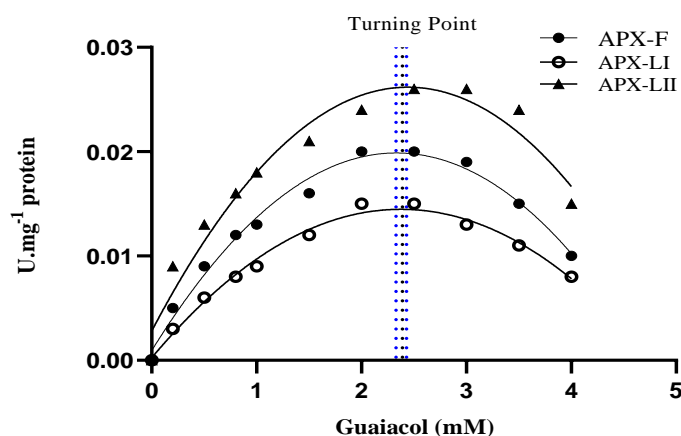
Table 3. Fitting coefficients of Gompertz growth and one phase exponential association on models to changes in ascorbate peroxidase enzyme (APX) activity of *Morus nigra* fruits (F) or leaves (LI and LII) under different  $H_2O_2$  concentrations

Factor (Gompertz exponential model)	$R^2$	k	$Y_0$	$Y_m$	1/k
APX-F	0.99	43.75	0.002	0.051	0.02
APX-LII	0.98	48.39	0.004	0.062	0.0022
Factor (one phase exponential association model)	$R^2$	Halftime	k	$Y_m$	1/k
APX-LI	0.99	0.015	45.32	0.03	0.02

$X_{01}$  and  $X_{02}$ : first and second break points,  $Y_0$ : initial amount of Y in start point of model, k: slope of model,  $Y_m$ : maximum value of Y, 1/k: x value in break point (lagtime), halftime: the time it takes for Y to drop by 50%, and  $R^2$ .

گایاکول بدست آمد. به بیان دیگر، در این سطح غلظتی از گایاکول، بیشینه فعالیت مدل مشاهده می‌شود و با افزایش غلظت گایاکول در محیط از فعالیت هر سه آنزیم با شیب‌های مختلف کاسته می‌شود (جدول ۴). البته ضریب تبیین مدل برای هر سه آنزیم نیز بالا بود.

نتایج آنالیز رگرسیون غیرخطی اثر سوبسترای گایاکول در غلظت‌های متفاوت بر فعالیت APX در غلظت ثابت  $H_2O_2$  نشان داد که روند تغییرات فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف آسکوربات از یک تابع درجه دوم تبعیت می‌کند (شکل ۴). نقطه عطف مدل یا همان بیشینه فعالیت هر سه آنزیم در غلظت ۲/۲۵ تا ۲/۴ mM



شکل ۴- تغییرات فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز میوه و برگ توت سیاه در سطوح مختلف گایاکول

**Figure 4. Changes in ascorbate peroxidase enzyme activity of *Morus nigra* fruits (F) and leaves (LI and LII) at different levels of guaiacol**

جدول ۴- ضرایب برازش رگرسیون درجه دوم به تغییرات فعالیت آنزیم APX در غلظت‌های مختلف گایاکول

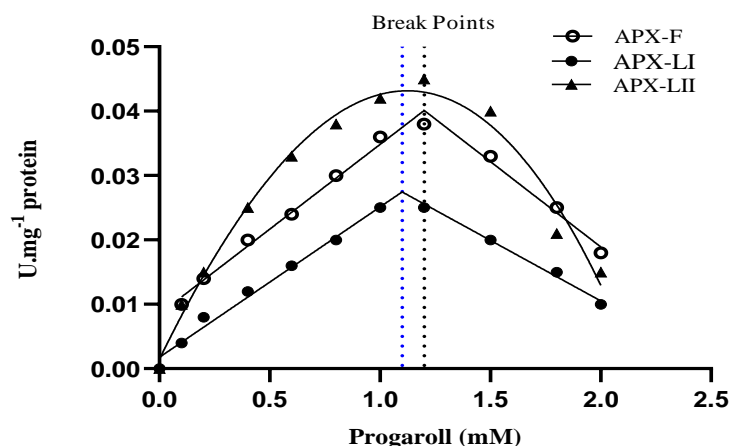
**Table 4. Fitting coefficients of second polynomial to changes in APX enzyme activity in different concentrations of guaiacol**

Factor	Turning point	R <sup>2</sup>	b <sub>2</sub> ±SE	b <sub>1</sub> ±SE	b <sub>0</sub> ±SE
APX-F	2.3	0.98	-0.0034±0.0004	0.016±0.003	0.0009±0.0001
APX-LI	2.25	0.99	-0.0025±0.0003	0.011±0.002	0.0024±0.0003
APX-LII	2.4	0.95	-0.0039±0.0005	0.019±0.004	0.0028±0.0003

Explanation. F: fruit, LI: first Isoenzyme of leaves, LII: second Isoenzyme of leaves, b<sub>0</sub>: intercept, b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub> and b<sub>3</sub>: coefficients of model R<sup>2</sup>: Determination coefficients and se: standard error

در غلظت ۱/۲ و بیشینه فعالیت ایزوآنزیم APX-LI نیز در غلظت ۱/۱ mM پیروگال درون‌یابی شد. برازش مدل رگرسیون غیرخطی درجه دوم به داده‌های فعالیت ایزوآنزیم APX-LII نشان داد که با افزایش غلظت پیروگال در محیط تا غلظت ۱/۱ mM شاهد افزایش فعالیت این ایزوآنزیم و با گذشت از این سطح غلظتی و افزایش غلظت از شدت فعالیت این ایزوآنزیم کاسته می‌شود. بیشینه فعالیت ایزوآنزیم APX-LI مشابه ایزوآنزیم APX-LII بود.

نتایج آنالیز رگرسیون غیرخطی نشان داد که اثر سوبسترای پیروگال در غلظت‌های متفاوت بر فعالیت APX-F و APX-LI در غلظت ثابت H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> از یک تابع دو تکه‌ای تبعیت می‌کند (شکل ۵). شیب افزایش فعالیت آنزیم APX-F در بخش اول مدل بیشتر از APX-LI بود که این حکایت از حساسیت بیشتر آنزیم APX-F به حضور پیروگال در محیط دارد و به همین ترتیب شیب کاهش فعالیت APX-F بعد از نقطه چرخش مدل منفی‌تر از APX-LI بود (جدل ۵). بیشینه فعالیت آنزیم APX-F



شکل ۵- تغییرات فعالیت آنزیم APX در سطوح مختلف پیروگال

Figure 5. Changes in APX enzyme activity of *Morus nigra* fruits (F) and leaves (LI and LII) at different levels of pyrogallel

جدول ۵- ضرایب برازش مدل درجه دوم و دو تکه‌ای به تغییرات فعالیت APX در غلظت‌های مختلف پیروگال

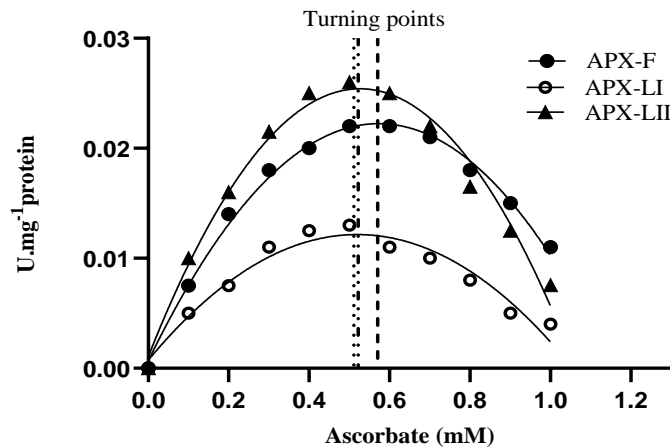
Table 5. Fitting coefficients of second polynomial and Two-segmented model to the changes of APX activity in different concentrations of pyrogallol

Factor (segmented model)		$b_2 \pm SE$	$x_0$	$b_1 \pm SE$	intercept $\pm SE$	$R^2$
APX-F		$-0.02 \pm 0.002$	1.2	$0.026 \pm 0.003$	$0.0084 \pm 0.0004$	0.99
APX-LI		$-0.018 \pm 0.002$	1.1	$0.023 \pm 0.002$	$0.0017 \pm 0.0002$	0.99
Factor (second polynomial model)	Turning point	$b_3$	$b_2$	$b_1$	$b_0$	$R^2$
APX-LII	1.1	$-0.003 \pm 0.0003$	$-0.025 \pm 0.002$	$0.072 \pm 0.006$	$0.0014 \pm 0.0002$	0.98

Explanation. F: fruit, LI: first Isoenzyme, LII: second Isoenzyme, In segmented model  $X_0$ : The break point,  $b_1$  and  $b_2$  slope of model before and after of break point, intercept: Y while X is zero, In second polynomial model  $b_0$ : intercept,  $b_1$ ,  $b_2$  and  $b_3$ : coefficients of model and  $R^2$ : Determination coefficients and se: standard error.

بیشینه فعالیت دو ایزوآنزیم APX-LI و APX-LII در غلظت ۰/۵۱ و ۰/۵۲ گیاکول بدست آمد (جدول ۶). حداکثر فعالیت ایزوآنزیم APX-LII تقریباً دو برابر APX-LI بود و نزدیک به بیشینه فعالیت آنزیم APX موجود در میوه بود. شیب افزایش فعالیت ایزوآنزیم APX-LI نیز کمتر از APX-F و APX-LII بود.

نتایج آنالیز رگرسیون غیرخطی اثر سوبسترای آسکوربات بر فعالیت APX نشان داد که روند تغییرات فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف آسکوربات از یک تابع درجه دوم تبعیت می‌کند (شکل ۶). نقطه عطف مدل یا همان بیشینه فعالیت آنزیم APX-F بیشتر دو ایزوآنزیم دیگر بود (۰/۵۷ mM). این در حالی بود که



شکل ۶- تغییرات فعالیت آنزیم APX در سطوح مختلف آسکوربات

Figure 6. Changes in APX enzyme activity of *Morus nigra* fruits (F) and leaves (LI and LII) at different levels of ascorbate

جدول ۶- ضرایب برازش رگرسیون درجه دوم به تغییرات فعالیت آنزیم APX در غلظت‌های مختلف آسکوربات در معرض ۵۰ mM کلرید سدیم و غلظت ثابت H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

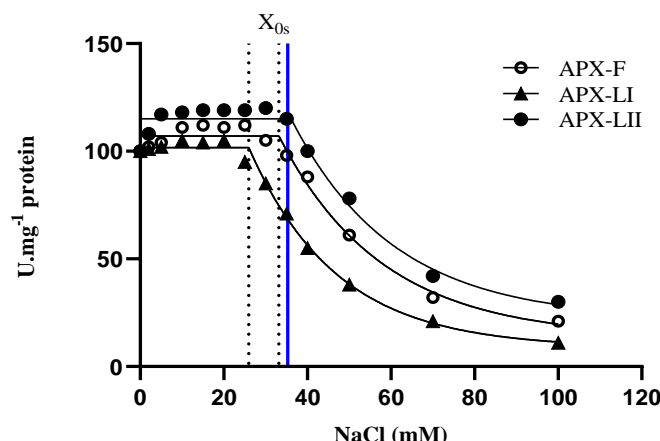
Table 6. Fit coefficients of second polynomial to changes in APX enzyme activity in different concentrations of ascorbate exposed to 50 mM sodium chloride and constant concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Factor	R <sup>2</sup>	b <sub>2</sub> ±SE	b <sub>1</sub> ±SE	b <sub>0</sub> ±SE	Turning point
APX-F	0.99	-0.065±0.003	0.075±0.004	0.0006±0.00004	0.57
APX-LI	0.95	-0.042±0.002	0.043±0.003	0.0007±0.00005	0.51
APX-LII	0.98	-0.088±0.004	0.092±0.006	0.0001±0.00002	0.52

Explanation. F: fruit, LI: first Isoenzyme, LII: seconf Isoenzyme, b<sub>0</sub>: intercept, b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub> and b<sub>3</sub>: coefficients of model and R<sup>2</sup>: Determination coefficient and se: standard error

آنزیم APX-F نیز چرخش مدل در غلظت ۳۳/۱۶ میلی مولار کلرید سدیم به وقوع پیوست و پس از آن با شیب مشابه با دو ایزوآنزیم برگ، روند نزولی بخود گرفت. نیمه عمر فعالیت در دو آنزیم APX-F و APX-LII تقریباً مشابه ولی در ایزوآنزیم APX-LI کمتر از دو آنزیم دیگر بود. این بدان معنی است که ایزوآنزیم APX-LI زودتر از دو آنزیم دیگر به ۵۰ درصد مقدار حداکثر فعالیت خود می‌رسد و این به معنی حساسیت بیشتر این ایزوآنزیم کلرید سدیم نسبت به دو آنزیم دیگر است. دامنه فعالیت هر سه آنزیم نیز تقریباً مشابه بود (جدول ۷).

نتایج آنالیز رگرسیون غیرخطی اثر کلرید سدیم بر فعالیت APX نشان داد که روند تغییرات فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف کلرید سدیم از یک تابع نمائی مسطح-یک فاز کاهشی تبعیت می‌کند (شکل ۷). بر پایه نتایج برازش این مدل، دو ایزوآنزیم APX-LI و APX-LII به ترتیب تا غلظت‌های ۲۵/۹۸ و ۳۶/۱۱ میلی مولار کلرید سدیم دارای بیشینه فعالیت خود هستند (مقادیر Y<sub>0</sub> در جدول ۸). به عبارت دیگر، حساسیت ایزوآنزیم APX-LI به افزایش غلظت کلرید سدیم در محیط بیشتر از APX-LII است. شیب کاهش فعالیت هر دو ایزوآنزیم با افزایش غلظت کلرید سدیم از نقطه چرخش به بعد، تقریباً مشابه بود. در مورد



شکل ۷- تغییرات فعالیت آنزیم APX در سطوح مختلف کلرید سدیم

Figure 7. Changes in APX enzyme activity of *Morus nigra* fruits (F) and leaves (LI and LII) at different levels of sodium chloride

جدول ۷- ضرایب برازش مدل نمائی مسطح- یک فاز کاهشی به تغییرات فعالیت آنزیم APX در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم در غلظت ثابت  $H_2O_2$  و آسکوربات

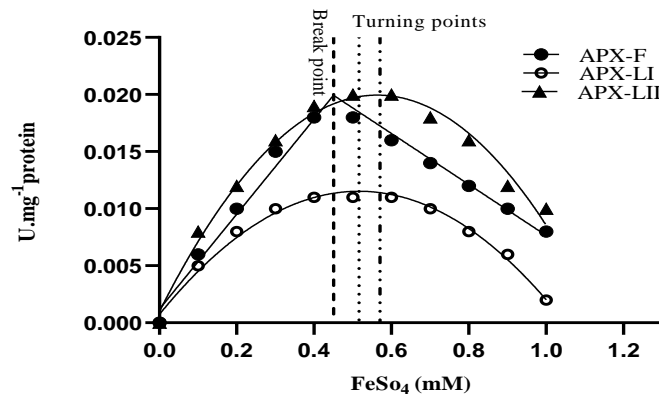
Table 7. The fitting coefficients of pleatue followed by one phase exponential decay model to the changes of APX enzyme activity in different concentrations of sodium chloride at a constant concentration of  $H_2O_2$  and ascorbate

Factor	1/k	span	halftime	k	Pleatue	Y <sub>0</sub>	x <sub>0</sub>	R <sup>2</sup>
APX-F	24.75	93.74	17.15	0.04	13.39	107.1	33.16	0.98
APX-LI	21.27	93.04	14.56	0.047	8.67	101.7	25.98	0.99
APX-LII	24.54	93.19	17.01	0.04	21.81	115	36.11	0.97

Explanation. F: fruit, LI: first Isoenzyme, LII: second Isoenzyme, X<sub>0</sub>: Break point, Y<sub>0</sub>: initial amount of Y in start point of model, k: slope of model, 1/k: x value in break point (lagtime), halftime: the time it takes for Y to drop by 50%, pleatue: minimum value of Y at equilibrium, span: Y<sub>max</sub>-pleatue and R<sup>2</sup>: Determination coefficient.

فعالیت APX-LII بعد از نقطه چرخش مدل منفی‌تر از APX-LI بود (جدول ۸). بیشینه فعالیت آنزیم APX-LII نیز بیشتر از حداکثر فعالیت ایزوآنزیم APX-LI درون‌یابی شد. نتایج همچنین نشان داد که APX-LII در غلظت ۱/۵۱ mM به حداکثر فعالیت خود می‌رسد (جدول ۸). در کران مقابل، پاسخ فعالیت آنزیم APX در میوه به حضور سولفات آهن تابع مدل دو تکه‌ای بود. حداکثر فعالیت آنزیم APX-F در غلظت ۱/۴۵ mM سولفات آهن اتفاق افتاد که کمتر از مقادیر نقطه چرخش برای دو ایزوآنزیم مورد بررسی در تابع درجه دوم

نتایج اثر سولفات آهن در غلظت‌های مختلف بر فعالیت APX در غلظت ثابت  $H_2O_2$  و آسکوربات نشان داد که سولفات آهن اثر تحریک‌کنندگی متفاوتی بر روی APX برگ و میوه توت سیاه دارد. نتایج آنالیز رگرسیون غیرخطی نشان داد که اثر سولفات آهن در غلظت‌های متفاوت بر فعالیت APX-LI و APX-LII در غلظت ثابت  $H_2O_2$  از یک تابع درجه دوم تبعیت می‌کند (شکل ۸). شیب افزایش فعالیت آنزیم APX-LII بیشتر از APX-LI بود که این حکایت از حساسیت بیشتر آنزیم APX-LII به حضور سولفات آهن در محیط دارد و به همین ترتیب شیب کاهش



شکل ۸- تغییرات فعالیت آنزیم APX در سطوح مختلف سولفات آهن

Figure 8. Changes in APX enzyme activity of *Morus nigra* fruits (F) and leaves (LI and LII) at different iron sulfate levels

جدول ۸- ضرایب برازش مدل درجه دوم و دو تکه‌ای به تغییرات فعالیت APX در غلظت‌های مختلف سولفات آهن و غلظت ثابت ۰/۱۷ mM آسکوربات

Table 8. Fitting coefficients of second polynomial and segmented model to the changes of APX activity in different concentrations of iron sulfate and constant concentration of ascorbate 0.17 mM

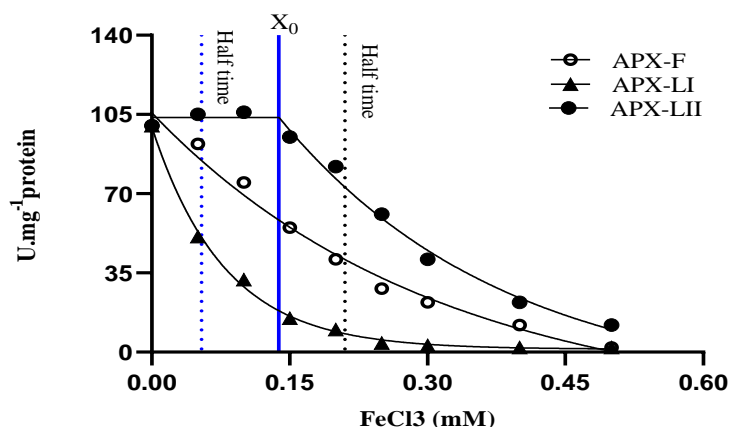
Factor (segmented model)	$b_2 \pm SE$	$x_0 \pm SE$	$b_1 \pm SE$	intercept $\pm SE$	$R^2$
APX-F	$-0.022 \pm 0.002$	0.45	$0.041 \pm 0.005$	$0.0012 \pm 0.0003$	0.98
Factor (second polynomial model)	Turning point $\pm SE$	$b_2 \pm SE$	$b_1 \pm SE$	$b_0 \pm SE$	$R^2$
APX-LI	$0.516 \pm 0.07$	-0.04	$0.041 \pm 0.005$	$0.0007 \pm 0.00005$	0.99
APX-LII	$0.57 \pm 0.05$	-0.059	$0.067 \pm 0.006$	$0.0009 \pm 0.0001$	0.98

Explanation. F: fruit, LI: first Isoenzyme, LII: second Isoenzyme, In segmented model  $X_0$ : The break point,  $b_1$  and  $b_2$  slope of model before and after of break point, intercept: Y while X is zero, In second polynomial model  $b_0$ : intercept,  $b_1$ ,  $b_2$  and  $b_3$ : coefficients of model and  $R^2$ : Determination coefficient and se: standard error.

فعالیت این ایزوآنزیم نیز با افزایش غلظت کلرید آهن از نقطه چرخش به بعد، ۴/۱ بود. نیمه عمر آنزیم نیز در غلظت ۰/۱۶ mM درون یابی شد. در مورد آنزیم APX-F و APX-LII نیز نتایج بیانگر پیروی آن از تابع نمایی کاهش‌ی تک فازی بود (جدول ۹). نیمه عمر فعالیت در دو آنزیم APX-F و APX-LI متفاوت بود و برای آنزیم APX-F بیشتر از ایزوآنزیم APX-LI بود. این بدان معنی است که ایزوآنزیم APX-LI بسیار زودتر از آنزیم APX-F به ۵۰ درصد مقدار حداکثر فعالیت خود می‌رسد و این به معنی

نتایج اثر کلرید آهن در غلظت‌های مختلف بر فعالیت APX در غلظت ثابت  $H_2O_2$  و آسکوربات نشان داد که کلرید آهن اثر مهارکنندگی متفاوتی بر روی APX برگ و میوه توت سیاه دارد. نتایج آنالیز رگرسیون غیرخطی نشان داد که اثر کلرید آهن در غلظت‌های متفاوت بر فعالیت ایزوآنزیم APX-LII از یک تابع نمایی مسطح-یک فاز کاهش‌ی تبعیت می‌کند (شکل ۹). بر پایه نتایج، ایزوآنزیم APX-LII در غلظت ۰/۱۳۸ mM کلرید آهن دارای بیشینه فعالیت خود است (مقدار  $Y_0$  در جدول ۹). شیب کاهش

حساسیت بیشتر APX-F نسبت به کلرید سدیم است. دامنه فعالیت آنزیم APX-F نیز بیشتر از APX-LI بدست آمد.



شکل ۹- تغییرات فعالیت آنزیم APX در سطوح مختلف کلرید آهن

Figure 9. Changes in APX enzyme activity of *Morus nigra* fruits (F) and leaves (LI and LII) at different iron chloride levels

جدول ۹- ضرایب برازش مدل نمائی مسطح- یک فاز کاهشی و نمائی تک فاز کاهشی به تغییرات فعالیت آنزیم APX در غلظت‌های مختلف کلرید آهن در غلظت ثابت  $H_2O_2$  و آسکوربات

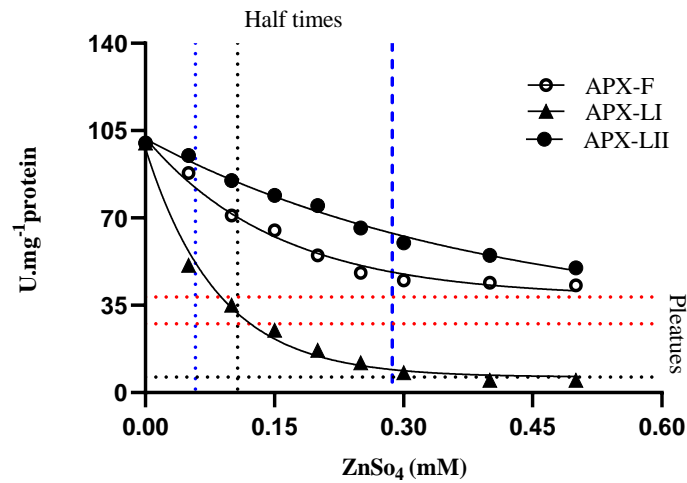
Table 9. The fitting coefficients of the one phase exponential decay model and pleatue followed by one phase exponential decay model to the changes of APX enzyme activity in different concentrations of iron chloride in constant concentration of  $H_2O_2$  and ascorbate

Factor (one phase exponential decay model)	R <sup>2</sup>	span	Pleatue	tau	halftime	k	Y <sub>0</sub>	
APX-F	0.99	131.7	-26	0.31	0.21	3.22	105.7	
APX-LI	0.99	98.19	1.27	0.078	0.054	12.67	99.47	
Factor (pleatue followed by one phase exponential decay model)	tau	span	Y <sub>0</sub>	halftime	k	Pleatue	x <sub>0</sub>	R <sup>2</sup>
APX-LII	0.24	121.1	103.7	0.16	4.1	-17.47	0.138	0.99

Explanation. F: fruit, LI: first Isoenzyme, LII: seconf Isoenzyme, Y<sub>0</sub>: initial mount of Y in start point of model, k: slope of model, tau: x value in break point(lagtime), halftime: the time it takes for Y to drop by 50%, pleatue: minimum value of Y at equilibrium, span: Ymax-pleatue and R<sup>2</sup>: Determination coefficient.

روی در محیط است. بیشینه فعالیت ایزوآنزیم APX-LII و APX-F در یک محدوده و برای ایزوآنزیم APX-LI برابر ۹۹/۹۴ میلی‌گرم پروتئین بود (جدول ۱۰). شیب کاهش فعالیت ایزوآنزیم APX-LI نیز بسیار بیشتر از دو آنزیم دیگر بود و این حکایت از حساسیت بسیار بالای این ایزوآنزیم به سولفات روی در محیط دارد، به طوری که زودتر به ۵۰ درصد حداکثر فعالیت خود می‌رسد.

در مورد اثر سولفات روی بر فعالیت سه آنزیم مورد مطالعه نشان داد که پاسخ هر سه آنزیم به سطوح مختلف سولفات روی از تابع نمائی کاهشی تک فازی پیروی می‌کند (شکل ۱۰). نیمه عمر فعالیت ایزوآنزیم APX-LII تقریباً پنج برابر ایزوآنزیم APX-LI و دو برابر آنزیم APX-F بود. به بیان دیگر، ایزوآنزیم APX-LII بسیار دیرتر از دو آنزیم دیگر به ۵۰ درصد مقدار حداکثر فعالیت خود می‌رسد و این به معنی حساسیت کمتر این ایزوآنزیم به حضور سولفات



شکل ۱۰- تغییرات فعالیت آنزیم APX در سطوح مختلف سولفات روی

Figure 10. Changes in APX enzyme activity of *Morus nigra* fruits (F) and leaves (LI and LII) at different levels of zinc sulfate

جدول ۱۰- ضرایب برازش مدل نمائی یک فاز کاهشی به تغییرات فعالیت آنزیم APX در غلظت‌های مختلف سولفات روی در غلظت ثابت  $H_2O_2$  و آسکورات

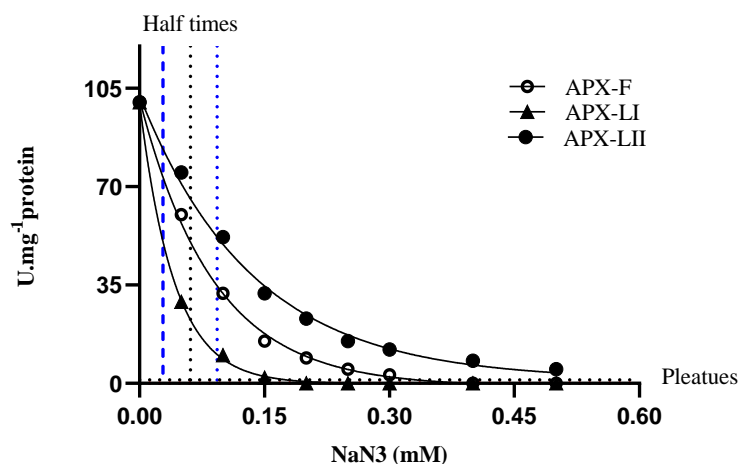
Table 10. Fitting coefficients of the one phase exponential decay model to the changes in APX enzyme activity in different concentrations of zinc sulfate at a constant concentration of  $H_2O_2$  and ascorbate

Factor	span	tau	halftime	k	Pleatue	$Y_0$	$R^2$
APX-F	78.16	0.155	0.107	6.45	38.27	102.1	0.99
APX-LI	91.72	0.083	0.058	11.93	6.1	99.94	0.99
APX-LII	76.6	0.4	0.287	2.47	25.57	101.6	0.24

Explanation. F: fruit, LI: first Isoenzyme, LII: seconf Isoenzyme,  $Y_0$ : initial mount of Y in start point of model, k: slope of model,  $Y_m$  and  $Y_{max}$ : maximum value of Y, tau: x value in break point (lagtime), halftime: the time it takes for Y to drop by 50%, pleatue: minimum value of Y at equilibrium, span:  $Y_{max}$ -pleatue and  $R^2$ : Determination coefficient.

محیط است. بیشینه فعالیت ایزوآنزیم APX-F و APX-LII در یک محدوده و برای ایزوآنزیم APX-LI برابر ۹۹/۹۲ میلی‌گرم پروتئین بود (جدول ۱۱). شیب کاهش فعالیت ایزوآنزیم APX-LI نیز بسیار بیشتر از دو آنزیم دیگر بود و این حکایت از حساسیت بسیار بالای این ایزوآنزیم به سولفات روی در محیط دارد و زودتر از دو آنزیم دیگر به ۵۰ درصد حداکثر فعالیت خود می‌رسد.

در مورد اثر نیتريد سدیم بر فعالیت سه آنزیم مورد مطالعه نیز نتایج نشان داد که پاسخ هر سه آنزیم به سطوح مختلف نیتريد سدیم از تابع نمائی کاهشی تک فازی پیروی می‌کند (شکل ۱۱). نیمه عمر فعالیت ایزوآنزیم APX-LII تقریباً چهار برابر ایزوآنزیم APX-LI بود. به بیان دیگر، ایزوآنزیم APX-LII بسیار دیرتر از دو آنزیم دیگر به ۵۰ درصد مقدار حداکثر فعالیت خود می‌رسد و این به معنی حساسیت کمتر این ایزوآنزیم به حضور نیتريد سدیم در



شکل ۱۱- تغییرات فعالیت آنزیم APX در سطوح مختلف نیتريد سدیم

**Figure 11. Changes in APX enzyme activity of *Morus nigra* fruits (F) and leaves (LI and LII) at different sodium nitrite levels**

جدول ۱۱- ضرایب برازش مدل نمائی یک فاز کاهشی به تغییرات فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در غلظت‌های مختلف نیتريد سدیم در غلظت ثابت  $H_2O_2$  و آسکوربات

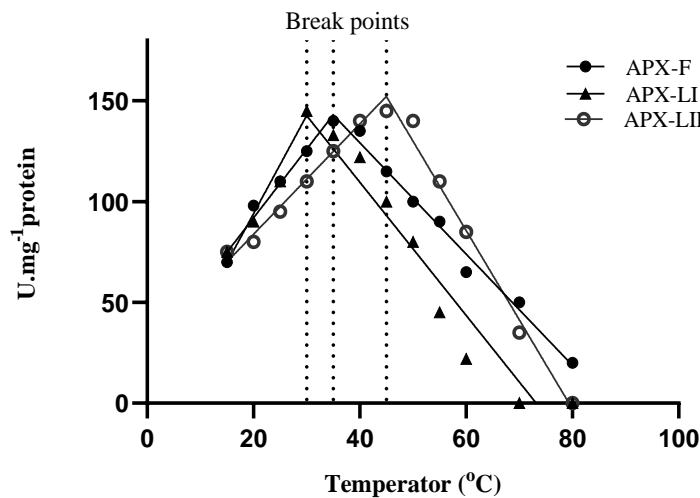
**Table 11. Fitting coefficients of the one phase exponential decay model to changes in the activity of ascorbate peroxidase enzyme in different concentrations of sodium nitrite at a constant concentration of  $H_2O_2$  and ascorbate**

Factor	span	tau	halftime	k	Pleatue	$Y_0$	$R^2$
APX-F	102.3	0.089	0.061	11.23	-1.27	101.1	0.99
APX-LI	100.1	0.041	0.028	24.27	-0.15	99.92	0.99
APX-LII	101.1	0.135	0.093	7.37	1.26	102.3	0.99

Explanation. F: fruit, LI: first substrate, LII: second substrate  $Y_0$ : initial amount of Y in start point of model, k: slope of model,  $Y_m$  and  $Y_{max}$ : maximum value of Y, tau: x value in break point (lagtime), halftime: the time it takes for Y to drop by 50%, pleatue: minimum value of Y at equilibrium, span:  $Y_{max} - pleatue$  and  $R^2$ : Determination coefficient.

متفاوت بود. بیشینه فعالیت APX-F در دمای  $35^\circ C$ ، APX-LI در دمای  $30^\circ C$  و APX-LII در دمای  $45^\circ C$  بود. این نتایج بیانگر اثر متفاوت دما بر فعالیت سه آنزیم مورد بررسی است. شیب کاهش فعالیت APX-LII در برگ به مراتب بیشتر از APX-LI و APX-F بود (جدول ۱۲). ضریب تبیین بالای مدل نیز مقبولیت برازش این مدل به فعالیت این سه آنزیم را در سطوح مختلف نیتريد سدیم نشان داد.

نتایج آنالیز رگرسیون غیرخطی فعالیت هر سه آنزیم APX-F، APX-LI، APX-LII در سطوح غلظتی مختلف دما نشان داد که روند تغییرات فعالیت آنزیم در سطوح مختلف دما از یک تابع دو تکه‌ای تبعیت می‌کند (شکل ۱۲). شیب افزایش فعالیت آنزیم در بخش اول مدل APX-LI بیشتر از APX-F و APX-LII بود (جدول ۱۲) و این حکایت از حساسیت بیشتر این ایزوآنزیم به دمای محیط در توت سیاه دارد. نقطه چرخش مدل برای هر سه آنزیم نیز



شکل ۱۲- تغییرات فعالیت آنزیم APX در سطوح مختلف دما

Figure 12. Changes in APX enzyme activity of *Morus nigra* fruits (F) and leaves (LI and LII) at different temperature levels

جدول ۱۲- ضرایب برازش مدل دو تکه‌ای (a: عرض از مبدأ مدل و b: شیب رگرسیون) به تغییرات فعالیت آنزیم APX در سطوح مختلف دما

Table 12. Fitting coefficients of the Two- segmented model (a: width from the origin of the model and b: regression slope) to changes in APX enzyme activity at different temperature levels

Factor	X <sub>0</sub>	b <sub>2</sub> ±SE	b <sub>1</sub> ±SE	intercept±SE	R <sup>2</sup>
APX-F	35	-2.76±0.3	3.4±0.4	23.72±3.5	0.98
APX-LI	30	-3.3±0.35	4.87±0.51	-3.48±0.02	0.94
APX-LII	45	-4.43±0.41	2.73±0.32	28.96±4.1	0.99

Explanation. F: fruit, LI: first Isoenzyme, LII: second Isoenzyme In segmented model X<sub>0</sub>: The break point, b<sub>1</sub> and b<sub>2</sub> slop of model before and after of break point, intercept: Y while X is zero and R<sup>2</sup>: Determination coefficient and se: standard error

نمودار APX در عصاره برگ‌های توت سیاه وجود دو ایزوآنزیم از APX را در pH حدود ۶/۵ و ۸ و نمودار APX در عصاره میوه توت سیاه وجود یک ایزوآنزیم از APX در pH حدود ۶/۵ را نشان می‌دهد. در همین راستا، نتایج تحقیقات سینتیکی Rahmani و همکاران (Rahmani *et al.*, 2013) بر روی زعفران، وجود دو ایزوآنزیم پراکسیدازی را در زعفران نشان داد. بررسی کمی فعالیت آنزیم‌های APX-F و APX-L در سطوح مختلف pH با تبعیت از یک تابع سه تکه‌ای نشان‌دهنده حساسیت بیشتر آنزیم APX به pH محیط در میوه توت سیاه نسبت به برگ است. سوبستراهای آسکوریات، پیروگال و گایاکل تا

## بحث

سیستم‌های دفاعی ضد اکسنده آنزیمی در گیاهان به منظور کاهش خسارت اکسیداتیو ایجاد شده به وسیله گونه‌های اکسیژن فعال به وجود آمده است. APX یک پراکسیداز حاوی هم از نوع کلاس I است که با استفاده از آسکوریات به عنوان دهنده الکترون خاص، تبدیل H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> به H<sub>2</sub>O و O<sub>2</sub> را کاتالیز می‌کند. APX نقش اصلی را در حذف گونه‌های اکسیژن فعال درون سلولی ایفا می‌کند و گیاهان را از آسیب‌های اکسیداتیو که می‌تواند در نتیجه تنش‌های زیستی و غیرزیستی رخ دهد، محافظت کند (Hong *et al.*, 2018).

نشان داد که حساسیت ایزوآنزیم APX-LI به افزایش غلظت کلرید سدیم در محیط بیشتر از APX-LII است و ایزوآنزیم APX-LI زودتر از دو آنزیم دیگر به ۵۰ درصد مقدار حداکثر فعالیت خود می‌رسد. سولفات آهن اثر تحریک‌کنندگی متفاوتی بر روی APX برگ و میوه توت سیاه دارد، به نحوی که شیب افزایش فعالیت آنزیم APX-LII بیشتر از APX-LI بود که این حکایت از حساسیت بیشتر آنزیم APX-LII به حضور سولفات آهن در محیط است و به همین ترتیب شیب کاهش فعالیت APX-LII بعد از نقطه چرخش مدل منفی‌تر از APX-LI می‌باشد.

کلرید آهن اثر تحریک‌کنندگی متفاوتی بر روی APX برگ و میوه توت سیاه دارد. ایزوآنزیم APX-LI بسیار زودتر از آنزیم APX-F به ۵۰ درصد مقدار حداکثر فعالیت خود می‌رسد و این به معنی حساسیت بیشتر APX-F نسبت به کلرید سدیم است. اثر سولفات روی با تبعیت از تابع نمایی کاهشی تک فازی نشان داد که ایزوآنزیم APX-LII بسیار دیرتر از دو آنزیم دیگر به ۵۰ درصد مقدار حداکثر فعالیت خود می‌رسد و این به معنی حساسیت کمتر این ایزوآنزیم به حضور سولفات روی در محیط است. اثر نیتريد سدیم بر فعالیت APX با تبعیت از تابع نمایی کاهشی تک فازی نشان داد که ایزوآنزیم APX-LII بسیار دیرتر از دو آنزیم دیگر به ۵۰ درصد مقدار حداکثر فعالیت خود می‌رسد و این به معنی حساسیت کمتر این ایزوآنزیم به حضور نیتريد سدیم در محیط است. نتایج تحقیق نشان داد که افزایش غلظت‌های نمک‌های مختلف از جمله کلرید سدیم و کلرید آهن، سولفات مس و نیتريد سدیم آثار کاهنده در برابر عملکرد اصلی آنزیم پراکسیداز دارند و فعالیت پراکسیداز را در جهت کاتالیز و حذف پراکسید هیدروژن بر عهده دارند. در نتیجه می‌توان گفت که غلظت‌های بالای این ترکیب‌ها منجر به کاهش دادن حساسیت گیاه در مقابله با تنش‌های اکسیداتیو می‌شود. به‌طور مشابه آثار تنش شوری در گیاه زعفران در تحقیق Torabi و همکاران (Torabi et al., 2018) نشان داد که غلظت‌های بالای شوری، حساسیت گیاه را در جهت حذف پراکسید هیدروژن کاهش می‌دهد.

غلظت‌های خاصی افزایش‌دهنده فعالیت پراکسیداز بوده و در غلظت‌های بالاتر با مهار سوبسترای آنزیم پراکسیدازی فعالیت این آنزیم را کاهش می‌دهند، از این رو غلظت‌های بالاتر سوبسترا اثرهای معکوسی در فعالیت پراکسیداز در جهت کاهندگی تنش اکسیداتیو بر عهده دارند (Afzal et al., 2023).

با افزایش غلظت  $H_2O_2$  فعالیت آنزیم در عصاره برگ و میوه همواره بیشتر می‌شود که این فعالیت در برگ نسبت به میوه بیشتر است. آنالیز رگرسیون غیرخطی فعالیت هر سه آنزیم APX-LI، APX-LII و APX-F در سطوح غلظتی مختلف آسکوربات با تبعیت از یک تابع دو تکه‌ای، حساسیت بیشتر آنزیم APX به آسکوربات محیط در توت سیاه در بخش برگ نسبت به بخش میوه را نشان داد. آنالیز رگرسیون غیرخطی اثر  $H_2O_2$  در غلظت‌های متفاوت بر فعالیت APX در غلظت ثابت آسکوربات با تبعیت از مدل نمایی گومیرتز نشان‌دهنده حساسیت بیشتر ایزوآنزیم APX-LI به غلظت‌های متفاوت  $H_2O_2$  محیط است، هر چند که بیشینه فعالیت ایزوآنزیم APX-LI همواره کمتر از ایزوآنزیم APX-LII و آنزیم APX-F بود. نتایج آنالیز رگرسیون غیرخطی اثر سوبسترای گایاکل نشان داد که با افزایش غلظت گایاکل در محیط فعالیت هر سه آنزیم با افزایش همراه است و با افزایش غلظت بیشتر، فعالیت هر سه آنزیم با شیب‌های مختلف کاسته می‌شود.

نتایج آنالیز رگرسیون غیرخطی اثر سوبسترای پیروگالل بر اساس تابع دو تکه‌ای نشان داد با افزایش غلظت پیروگالل در محیط، شاهد افزایش فعالیت APX-LII هستیم و با افزایش بیشتر غلظت، از شدت فعالیت این ایزوآنزیم کاسته می‌شود. بیشینه فعالیت ایزوآنزیم APX-LI مشابه ایزوآنزیم APX-LII بود. نتایج آنالیز رگرسیون غیرخطی اثر سوبسترای آسکوربات بر اساس تابع درجه دوم نشان داد که حداکثر فعالیت ایزوآنزیم APX-LII تقریباً دو برابر APX-LI بود و نزدیک به بیشینه فعالیت آنزیم APX موجود در میوه بود. نتایج آنالیز رگرسیون غیرخطی اثر کلرید سدیم بر فعالیت APX بر اساس تابع نمایی مسطح-یک فاز کاهشی

همکاران (۲۰۰۳) نشان داده شد که مطالعات pH پروفایل تأییدکننده این مسئله است که در آنزیم پراکسیدازی علاوه بر هیستیدین، اسیدهای آمینه آسپاراتات و گلوتامات نیز تحت تأثیر قرار گرفته، به نحوی که منجر به اتصال بیشتر یون‌های فلزی حاضر در محیط در محل جایگاه فعال می‌شود که با ایجاد اختلال در اتصال عامل دهنده هیدروژن در جایگاه فعال شده و در نهایت به مهار پراکسیداز منجر می‌گردد.

در مقایسه بین یون‌های نیکل، کبالت، منگنز و مس در مطالعه انجام شده، به این نتیجه رسیده‌اند که قدرت مهارکنندگی در حضور منگنز بیش از بقیه و در مورد مس کمتر از بقیه افزایش نشان داده است (Mahmoudi *et al.*, 2003). براساس نتایج این مطالعه نیز بین یون‌های روی (سولفات روی)، کلرید آهن، سولفات آهن و کلرید سدیم این نتیجه حاصل شد که کلرید سدیم در غلظت‌های پایین تأثیر چندانی در فعالیت پراکسیدازی ندارد اما با افزایش غلظت کلرید سدیم ساختار پراکسیدازی دستخوش تغییرات ساختاری شده و با کاهش فعالیت آنزیم به نزدیک صفر در هر سه ایزوآنزیم همراه بوده است و در کل ساختار پراکسیداز را دنا توره کرده است. در واقع نمک سدیم کلرید به‌عنوان یک نمک کاتوتروپیک حلالیت پروتئین‌ها را افزایش می‌دهد و در غلظت‌های بالا با توجه به کاهش دادن اثر هیدروفوبیک منجر به دنا تورسیون و کاهش فعالیت پراکسیداز شده است (Erichsen *et al.*, 2021). در مورد سولفات آهن، در غلظت‌های پایین آهن، با اتصال به جایگاه فعال آنزیم، تغییرات ساختاری مثبتی در جهت قرارگیری هر چه بیشتر سوبسترا در جایگاه فعال آنزیم پراکسیدازی را ایجاد نموده است و سرعت کاتالیز آنزیم را افزایش داده است. اما در غلظت‌های بالای آهن با ایجاد ممانعت فضایی مانع از دسترسی جایگاه فعال آنزیم را فراهم نموده، هر چند که تغییرات ساختاری پراکسیداز نیز محتمل می‌باشد (Poulos, 2014). بنابراین می‌توان بیان نمود که یونهای سولفات به‌عنوان عوامل کوزموتروپیک حلالیت پروتئین‌ها را کاهش و اثرهای هیدروفوبیک را افزایش می‌دهند، به طوری که در غلظت‌های پایین اثر فعال‌کنندگی و در غلظت‌های بالا

این در حالی است که نتایج این تحقیق حکایت از آن دارد که غلظت‌های پایین سولفات مس با افزایش فعالیت APX در جهت مقابله با تنش‌های محیطی همراه است، کما اینکه غلظت‌های بالای سولفات مس همانند سایر ترکیب‌های کلرید سدیم و کلرید آهن و سولفات مس حساسیت گیاه را در جهت تنش‌زدایی کاهش می‌دهند. در تأیید این نتایج، آثار افزایش تنش شوری در گیاه پونه معطر توسط Merati و همکاران (Merati *et al.*, 2014) نشان داد که افزایش غلظت شوری با افزایش فعالیت پراکسیدازی همراه است. با توجه به نوع گیاه و محیط رویش گیاه و شرایط اقلیمی، احتمالاً تحمل گیاه در برابر ترکیبات به تغییر تحمل گیاه در برابر شوری و سایر عوامل محیطی متفاوت است که منجر به پاسخ‌های متفاوتی در برابر ترکیب‌ها و عوامل مختلف از خود می‌شود (Mohseni *et al.*, 2020; Hasanuzzaman & Fujita, 2023).

در آزمایش Li و همکاران (۲۰۱۳)، اثر APX را بر روی میزان تحمل گیاه ذرت به خشکی در شرایط گلخانه‌ای مورد مطالعه قرار دادند که نتایج به‌دست آمده حکایت از آن داشت که تحت شرایط تنش شدید و ملایم، تیمار APX باعث افزایش عملکرد و تحمل گیاه در مقابل گیاه می‌شود. بررسی پارامترهای سینتیکی در تحقیقات Shareghi و Kazemi (۲۰۱۸) نشان داد که اکسید آهن و اکسید مس باعث کاهش سرعت پیشینه و فعالیت آنزیم پراکسیداز می‌شوند. احتمال دارد با توجه به اینکه یون آهن و مس بار مثبت دارد، این مکان‌ها روی جایگاه‌های گلیکوزیله آنزیم یا در کنار آنها قرار دارند و به دلیل بار منفی خود مکان‌های مناسبی برای اتصال آهن و مس باشند (Shareghi & Kazemi, 2018). به‌طور کلی یون‌های فلزی قابلیت اتصال به رزیدوهای فعال در محل جایگاه فعال آنزیم‌ها را دارند و منجر به فعال‌سازی عملکرد و فعالیت یک آنزیم می‌شوند (Gohra & Di Cera, 2016). از سوی دیگر، این نوع اتصالات می‌تواند دسترسی سوبسترا را به محل جایگاه فعال آنزیم مختل نماید و از این طریق شرایط مهار فعالیت آنزیمی را میسر کند. در مطالعه انجام شده توسط Mahmoudi و

می‌کند.

آنالیز رگرسیون غیرخطی فعالیت هر سه آنزیم APX-LI, APX-LII و APX-F در سطوح غلظتی مختلف دما با تبعیت از یک تابع دو تکه‌ای نشان داد که شیب افزایش فعالیت آنزیم در بخش اول مدل APX-LI بیشتر از APX-F و LII بود و این حکایت از حساسیت بیشتر این ایزوآنزیم به دمای محیط در توت سیاه دارد. بیشینه فعالیت APX-F در دمای ۳۵ °C، APX-LI در دمای ۳۰ °C و در مورد APX-LII دمای ۴۵ °C بود. تغییرات دما و اثر آن بر روی فعالیت پراکسیدازی به گونه‌ای است که در دمای پایین فعالیت پراکسیدازی را افزایش می‌دهد اما دماهای بالا با تغییرات ساختاری در آنزیم پراکسیدازی منجر به دناتوراسیون آنزیمی و کاهش فعالیت آنزیمی می‌گردد. هر چند که دمای بهینه هر سه ایزوآنزیم تفاوت‌هایی را نشان می‌دهد. به طوری که دمای بهینه پراکسیدازی برگ از دمای بهینه پراکسیدازی میوه بالاتر است.

### نتیجه‌گیری

این تحقیق نشان داد که آسکوربات پراکسیداز (APX) در برگ و میوه توت سیاه با دو ایزوآنزیم APX-LI و APX-LII در برگ و یک ایزوآنزیم APX-F در میوه نقش کلیدی در دفاع آنتی‌اکسیدانی در برابر تنش‌های اکسیداتیو ایفا می‌کند. تحلیل رگرسیونی غیرخطی نشان داد که فعالیت APX در برگ نسبت به میوه به تغییرات pH و غلظت آسکوربات حساس‌تر است، در حالی که APX-LI به تغییرات غلظت H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> حساسیت بیشتری دارد. سوبستراهای آسکوربات، پیروگال و گایاکل در غلظت‌های پایین فعالیت APX را افزایش می‌دهند، اما در غلظت‌های بالا باعث مهار آن می‌شوند. نمک‌هایی مانند کلرید سدیم، کلرید آهن، سولفات مس و نیتريد سدیم در غلظت‌های بالا فعالیت APX را کاهش داده و حساسیت گیاه به تنش اکسیداتیو را کم می‌کنند، در حالی که سولفات مس در غلظت‌های پایین فعالیت آنزیم را افزایش می‌دهد. سولفات آهن و روی

با توجه به افزایش بیشتر اثرهای هیدروفوبیک منجر به مهار فعالیت آنزیم شده است (Erichsen *et al.*, 2021).

نیتريد سدیم که یک مهارکننده قوی برای پراکسیداز بود نتایج حکایت از دناتوره شدن و به هم ریختن ساختار پراکسیدازی آن داشت، به طوری که در غلظت‌های کم نیتريد سدیم فعالیت پراکسیدازی را به صفر رسانده است. کلرید آهن رفتاری مشابه با کلرید سدیم را از خود بروز می‌دهد که نشان می‌دهد در بین نمک‌هایی مانند کلرید آهن و کلرید سدیم نقش یون کلرید در مهار آنزیمی پررنگ‌تر از نقش آهن و سدیم است. سولفات روی نتایج متفاوتی از سولفات آهن نشان داد که این گونه نشان می‌دهد که در نمک‌های سولفات مانند سولفات روی و سولفات آهن نقش عنصرهای آهن و روی پررنگ بوده، با این تفاوت که آهن در غلظت‌های پایین با ایجاد تغییرات ساختاری مثبت در جهت پذیرش و کاتالیز هرچه بیشتر سوبسترای پراکسیدازی بر عهده داشته و آنزیم پراکسیداز را فعال می‌کند.

تحقیق انجام شده توسط Hadizadeh و همکاران نیز اثر مهارکنندگی روی را بر فعالیت پراکسیدازی نشان دادند، به نحوی که گزارش کردند که یون روی دارای آثار مهارکنندگی وابسته به غلظت بر پراکسیداز بوده و با تأثیر بر گروه پروستتیک آنزیم فعالیت آن را با سازوکار غیررقابتی به شدت کاهش می‌دهد (Hadizadeh *et al.*, 2017). Shareghi و Kazemi (۲۰۱۸) گزارش کردند با توجه به اینکه یون آهن بار مثبت دارد، این مکان‌ها روی جایگاه‌های گلیکوزیله آنزیم یا در کنار آنها قرار دارند و به دلیل بار منفی خود مکان مناسبی برای اتصال آهن هستند (Hadizadeh *et al.*, 2017). احتمالاً اتصال آهن باعث تغییر بیشتر ساختار دوم شده و باعث می‌شود کسر پیچ‌های تصادفی بیشتر از ماریچ‌های آلفا باشد، به گونه‌ای که فعالیت پراکسیدازی را افزایش می‌دهد که در تأیید نتایج این تحقیق است (Shareghi & Kazemi, 2018). بر این اساس، در این تحقیق یون روی با اتصال به جایگاه فعال آنزیم، نقش مهارکننده پراکسیدازی و تغییرات ساختاری منفی در جهت عدم پذیرش و کاتالیز سوبسترای پراکسیدازی را بازی

اثرهای متفاوتی دارند؛ سولفات آهن در غلظت‌های پایین فعالیت APX را تحریک می‌کند، اما سولفات روی به دلیل مهار غیررقابتی، فعالیت آنزیم را کاهش می‌دهد. دما نیز تأثیر متفاوتی بر ایزوآنزیم‌ها دارد (دمای بهینه  $30^{\circ}\text{C}$  برای APX-LI،  $45^{\circ}\text{C}$  درجه برای APX-LII و  $35^{\circ}\text{C}$  درجه برای APX-F). این نتایج نشان‌دهنده تفاوت‌های متابولیکی بین برگ و میوه توت سیاه و حساسیت متفاوت ایزوآنزیم‌های APX به شرایط محیطی است که می‌تواند در اصلاح نژاد، مدیریت کشاورزی و بهبود کیفیت محصول توت سیاه کاربرد داشته باشد.

اثرهای متفاوتی دارند؛ سولفات آهن در غلظت‌های پایین فعالیت APX را تحریک می‌کند، اما سولفات روی به دلیل مهار غیررقابتی، فعالیت آنزیم را کاهش می‌دهد. دما نیز تأثیر متفاوتی بر ایزوآنزیم‌ها دارد (دمای بهینه  $30^{\circ}\text{C}$  برای APX-LI،  $45^{\circ}\text{C}$  درجه برای APX-LII و  $35^{\circ}\text{C}$  درجه برای APX-F). این نتایج نشان‌دهنده تفاوت‌های متابولیکی بین برگ و میوه توت سیاه و حساسیت متفاوت ایزوآنزیم‌های APX به شرایط محیطی است که می‌تواند در اصلاح نژاد، مدیریت کشاورزی و بهبود کیفیت محصول توت سیاه کاربرد داشته باشد.

## References

- Afzal, S., Abdul Manap, A.S., Attiq, A., Albokhadaim, I., Kandeel, M. and Alhojaily, S.M., 2023. From imbalance to impairment: The central role of reactive oxygen species in oxidative stress-induced disorders and therapeutic exploration. *Frontiers in Pharmacology*, 14: 1269581. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1269581>
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S. and Kalayci, O., 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5(1): 9-19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- 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: 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Costa, A., Drago, I., Behera, S., Zottini, M., Pizzo, P., Schroeder, J.I., Pozzan, T. and Lo Schiavo, F., 2010.  $\text{H}_2\text{O}_2$  in plant peroxisomes: an in vivo analysis uncovers a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent scavenging system. *The Plant Journal: for cell and molecular biology*, 62(5): 760-772. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2010.04190.x>
- Corpas, F.J., González-Gordo, S. and Palma, J.M., 2024. Ascorbate peroxidase in fruits and modulation of its activity by reactive species. *Journal of Experimental Botany*, 75(9): 2716-2732. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae092>
- Dhanyalakshmi, K.H. and Nataraja, K.N., 2018. Mulberry (*Morus* spp.) has the features to treat as a potential perennial model system. *Plant Signaling & Behavior*, 13(8): 1491267. <https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1491267>
- Elavarthi, S. and Martin, B., 2010. Spectrophotometric assays for antioxidant enzymes in plants. *Methods in Molecular Biology*, 639: 273-281. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0_16)
- Erichsen, A., Larsen, D. and Beeren, S.R., 2021. Chaotropic and kosmotropic anions regulate the outcome of enzyme-mediated dynamic combinatorial libraries of cyclodextrins in two different ways. *Frontiers in Chemistry*, 9: 721942. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.721942>
- Foyer, C.H. and Kunert, K., 2024. The ascorbate-glutathione cycle coming of age. *Journal of Experimental Botany*, 75(9): 2682-2699. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae023>
- Gohara, D.W. and Di Cera, E., 2016. Molecular mechanisms of enzyme activation by monovalent cations. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(40): 20840-20848. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.737833>
- Hadizadeh Shirazi, N., Homayoun Keihan, A. and Sajjadi, S., 2017. Evaluation of oxidative activity of horseradish peroxidase in the presence of zinc ion; spectroscopic and molecular docking study. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 7(27): 47-54. <https://doi.org/20.1001.1.22285458.1396.7.27.4.6>
- Hasanuzzaman, M. and Fujita, M., 2023. Plant responses and tolerance to salt stress: Physiological and molecular interventions. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(21): 15740. <https://doi.org/10.3390/ijms242115740>
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M.B., Zulfikar, F., Raza, A., Mohsin, S.M., Mahmud, J.A., Fujita, M. and Fotopoulos, V., 2020. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(8): 681. <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>
- Hong, S.H., Tripathi, B.N. and Chung, M.S., 2018. Functional switching of ascorbate peroxidase 2 of rice (OsAPX2) between peroxidase and molecular chaperone. *Scientific Reports*, 8: 9171. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27459-1>
- Khaliliaqdam, N. and Talebzade, S.J., 2022. Prediction of rate of leaf appearance, leaf area index and growth stages in corn and sunflower plants. *Journal of Crop Production*, 15(1): 205-228. <https://doi.org/10.22069/ejcp.2022.19114.2426>
- Khaliliaqdam, N., Saeidian, S. and Bashirpor, S.,

2024. Evaluation of the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense system of artichoke root extract against cadmium. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 40(2): 207-224. [doi: 10.22092/ijmapr.2023.362560.3331](https://doi.org/10.22092/ijmapr.2023.362560.3331)
- Kumar, P., 2022. Measurement of ascorbate peroxidase activity in sorghum. *Bio-protocol journal*, 12(20): e4531. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4531>
- Li, Y., Zhang, J., Zhang, J., Hao, L., Hua, J., Duan, L., Zhang, M. and Li, Z., 2013. Expression of an arabidopsis molybdenum cofactor sulphurase gene in soybean enhances drought tolerance and increases yield under field conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 11: 747-758. <https://doi.org/10.1111/pbi.12066>
- Merati, M.J., Niknam, V., Hassanpour, H. and Mirmasoumi, M., 2014. Comparative effects of salt stress on growth and antioxidant responses in different organs of pennyroyal (*Mentha pulegium* L.). *Journal of Plant Research*, 28(5): 1097-1107. <https://doi.org/10.1007/s123832592.1394.28.5.17.0>
- Mohseni, Z., Moradian, F. and Rahdari, P., 2020. The study of activity of antioxidant enzymes, guaiacol peroxidase and ascorbate peroxidase and the amount of Na, K and pigment content in *Spinach oleracea* L. under NaCl salinity stress. *Journal of Plant Research*, 32(4): 698-712. <https://doi.org/10.1007/s123832592.1398.32.4.11.0>
- Mahmoudi, A., Nazari, K., Mohammadian, N. and Moosavi-Movahedi, A.A., 2003. Effect of Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, and Cu<sup>2+</sup> on horseradish peroxidase: activation, inhibition, and denaturation studies. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 104(1): 81-94. <https://doi.org/10.1385/abab:104:1:81>
- Nakano, Y. and Kozi, A., 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; Its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiology*, 28: 131-140. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077268>
- Poulos, T.L., 2014. Heme enzyme structure and function. *Chemical Reviews*, 114(7): 3919-3962. <https://doi.org/10.1021/cr400415k>
- Rahmani, A., Seighali, N. and Ebrahimzadeh, H., 2013. A study on peroxidase activity alterations in corms of saffron (*Crucus sativus* L.) exposed to different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations and pH measurement during dormancy and waking. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 3(10): 79-84. <http://dori.net/dor/20.1001.1.22285458.1392.3.10.10.0>
- Shareghi, B. and Kazemi Nafchi, M., 2018. Kinetics studies of peroxidase enzyme in the presence of ferric oxide and copper oxide at different temperatures. *Experimental Animal Biology*, 6(4): 23-33. <https://dor.isc.ac/dor/20.1001.1.23222387.1397.6.4.2.4>
- Torabi, S., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H. and Sharifi, G., 2018. Comparative study of biochemical responses of different saffron (*Crocus sativus*) accessions to salt stress and alleviative effects of salicylic acid. *Journal of Plant Research*, 29(4): 728-740. <https://dor.isc.ac/dor/20.1001.1.23832592.1395.29.4.4.2>
- Xu, J., Duan, X., Yang, J., Beeching, J.R. and Zhang, P., 2013. Enhanced reactive oxygen species scavenging by overproduction of superoxide dismutase and catalase delays postharvest physiological deterioration of cassava storage roots. *Plant Physiology*, 161(3): 1517-1528. <https://doi.org/10.1104/pp.112.212803>
- Zandi, P. and Schnug, E., 2022. Reactive oxygen species, antioxidant responses and implications from a microbial modulation perspective. *Biology*, 11(2): 155. <https://doi.org/10.3390/biology11020155>