مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۳، شماره ۱، سال ۱۳۸۱(۲۶۱-۲۵۵)

بررسی تغییرات کمی و کیفی پلی فنل اکسیدازها در ضمن رشد و نمو گیاه چای *Camellia sinensis* (L) O. Kuntze

حسن ابراهیم‌زاده[۱] و افسانه تیموری[۲]
۱، ۲، استاد و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دانشگاه تهران
تاریخ پذیرش مقاله ۸۰/۸/۲۳

خلاصه

فعالیت پلی فنل اکسیدازی (PPO) گیاه چای در ارقام دارجیلینگ[۱]، آسام[۲]، شوروی[۳]، و صد[۴] به صورت ماهانه و در طی یک سال به طور کمی و کیفی مورد بررسی قرار گرفت. در ۳ برگ اول سر شاخه روند فعالیت آنزیم از بهار تا زمستان در کلیه ارقام مورد بررسی یک سیر صعودی داشت و از برک اول تا سوم افزایش می‌یافت. ظهور نوارهای پلی فنل اکسیدازی برگ چای بر روی ژل‌های پلی آکریل آمید (PAGE) که با استفاده از DL-DOPA صورت گرفت نشان داد که نوارهای مذکور از اوزان مولکولی بالایی برخوردارند و همگام با روند افزایش فعالیت آنزیم از بهار تا زمستان تعداد ایزوزیمهای پلی فنل اکسیدازی افزایش می‌یابد. نتایج حاصل وجود رابطه بین کیفیت برگ چای و فعالیت پلی فنل اکسیدازی و ایزوزیمهای مربوطه را نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: چای، فعالیت پلی فنل اکسیدازی، ایزوزیمهای پلی فنل اکسیداز.

مکاتبه کننده: حسن ابراهیم‌زاده

1 . Darjeeling
2 . Assamica
3 . Shooravi
4 . 100

مقدمه

پلی فنل اکسیدازها (EC 1:10:3:1) که کاتکول اکسیدازها نیز نامیده می‌شوند به طور گسترده‌ای در سلسله گیاهی یافت می‌شوند (۷ ، ۱۵). علیرغم انتشار وسیع این آنزیم‌ها در موجودات زنده تشابه قابل توجهی بین کاتکول اکسیدازهای گیاهان و جانوران وجود دارد. آنزیم متشکل از ۴ زیر واحد (تترامری با ساختمان چهارم L_2H_2) است که هر یک واجد یک اتم مس می‌باشد (۱۱). گریگوری و بندال (۱۹۹۶) محتوای مس پلی فنل اکسیداز جوانه‌های چای را (W/W)٪۰/۳۲ گزارش کردند (۸). کاتکول اکسیداز گیاهی در بخش‌های مختلف سلولی یافت می‌شود. تحقیقات هیستوشیمیایی و مشاهدات میکروسکوپ الکترونی اتصال آنزیم را به درون نیعه‌ها و گرانوم‌های کلروپلاست و همچنین میتوکندریها نشان داد. کاتکول‌اکسیدازقارچی آنزیمی محلول و غیر متصل به غشا است.

این ویژگی در باکتریها نیز صدق می‌کند. مقدار این آنزیم در ضمن نمو گیاه به طور قابل توجهی تغییر یافته و تحت شرایط رشد نیز واقع می‌شود (۱۱). تایگسن و همکاران (۱۹۹۵) گزارش کردند که فعالیت پلی فنل اکسیداز در بافت‌های زایشی سیب‌زمینی نظیر تخمدان (خامه – کلاله) و بساک‌ها بالا بوده، لیکن در کاسبرگ‌ها و گلبرگ‌ها پائین می‌باشد (۱۸). قدرت اتصال کاتکول اکسیداز به غشا با توجه به نوع بافت و مرحله نموی گیاه تغییر می‌یابد. در توتون شستشوی با تامپون برای آزادسازی آنزیم از تیغه‌های کلروپلاست کفایت می‌کند.

در حالیکه در اکثر موارد شرایط بسیار شدیدتری برای

انحلال کاتکول اکسیداز متصل به غشا نظیر بکارگیری زداینده‌هایی همچون تریتون digitonin، SDS, Manoxol Butanol، X-100 یا هضم محدود با آنزیم‌های پروتئولیزی ضروری به نظر می‌رسد (۱۱). حداقل ۹۸٪ از آنزیم در برگ‌های زنده چای در اتصال به بخش نامحلول است (۸). آنزیم دارای اشکال نهفته است، نهفتگی به معنای وجود یک شکل غیر فعال است که تنها در برخی شرایط فعال می‌شود. در بسیاری موارد مکرراً نهفتگی القا شده پس از تهیه پودر استنی مشاهده شده است.

به نظر می‌رسد چنین نهفتگی ویژگی طبیعی آنزیم نبوده بلکه در نتیجه تیمار با استن حاصل می‌شود (۱۱). سینگ (۱۹۹۴) به منظور استخراج (PPO) از اندام‌های گل چای از روش پودر استنی استفاده کرده و در نتیجه ظهور نوارهای آنزیمی مذکور بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید در عصاره پروتئینی میله پرچم ۲ نوار قوی، در بساک ۱ و در گلبرگ‌ها نیز ۲ نوار مشاهده نمود (۱۶). ترکیباتی همچون دی اتیل دی تیوکربامات[1]، سالیسیل آلدوگزیم [2]، پتاسیم اتیل گزانتات[3]، مشتقات تیواوه[4] نظیر فنیل تیواوره، کلاتورهای یونهای فلزی همچون آزید سدیم، EDTA و یا ۳، ۴ دی کلروفنیل سرین[5] با مس واقع در مرکز فعال آنزیم بر هم کنش کرده و بدینسان از فعالیت آنزیم ممانعت می‌کنند (۱۱). در مقاله حاضر ارتباط بین کیفیت برگ چای و فعالیت پلی فنل اکسیدازی مورد توجه قرار گرفت. نتایج حاصل از فعالیت‌های کمی و کیفی پلی فنل اکسیدازها در دوره‌های مختلف رشد یکساله گیاه ارائه شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی C. sinensis رقم آسام از لاهیجان، ایستگاه تحقیقات کشاورزی شهید اسلامی و ارقام دارجیلینگ، شوروی‌وصدازایستگاه تحقیقات کشاورزی فجر جمع‌آوری گردید.

نمونه‌برداری از فروردین تا اسفند ماه به صورت ماهانه صورت گرفت. جهت مطالعه آنزیم‌ها، ابتدا از هر رقم ۴ پایه به طور تصادفی انتخاب شد. کلیه پایه‌ها (۱۶ پایه) پلاک خورده شدند و هر ماه فقط از پایه‌های مذکور نمونه‌برداری صورت گرفت. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، ۳ برگ اول سرشاخه‌های جوان ارقام مختلف جدا شدند و به تفکیک تا زمان استخراج در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهدای گردیدند.

استخراج پلی فنل اکسیداز

پس از انجماد و خرد کردن بافت برگ (۲ گرم) در هوای مایع میلی‌لیتر ۱۶ بافر Tris-HCl (0.02M pH=6.8) حاوی گلیسرول (۱۰٪)، تریتون x-100 (۰/۱٪) و پلی وینیل پلی پیرولیدون (PVPP) (۰/۸ گرم) بدان افزوده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد همگن گردید. همگنای[6] حاصل به مدت ۲۴ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و سپس در ۱۲۰۰۰×g به مدت ۳۰ دقیقه (۴ درجه سانتی‌گراد) سانتریفوژ گردید. از روشناور به منظور انجام سنجش‌های مورد نظر استفاده شد (۱۲).

سنجش غلظت پروتئین

تعیین غلظت پروتئین‌های عصاره به کمک روش برادفورد[7] انجام شد و برای ترسیم منحنی استاندارد از گاماگلوبولین استفاده گردید (۶).

سنجش فعالیت پلی فنل اکسیدازی

به این منظور از مخلوط واکنشی شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۲M، pH=۷/۶) ۰/۲ میلی‌لیتر، پیروگالول (0.02M) و ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی استفاده گردید. سنجش اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۳۰ نانومتر و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد (دما تاثیر قابل توجهی بر فعالیت آنزیم آشکار ساخت). سرانجام این فعالیت بر حسب واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلیگرم پروتئین (میلی‌لیتر، پروتئین/ دقیقه/ مادرال) محاسبه شد (۱۴).

الکتروفورز با ژل پلی‌آکریل آمید (PAGE)

در پژوهش حاضر از سیستم بافری غیر تفکیک کننده[1] و غیر پیوسته[2] استفاده گردید (۹). به منظور ظهور نوارهای

1 . diethyldithiocarbamate
2 . salicyladoxime
3 . K. ethylxanathate
4 . thiourea
5 . 3,4- dichlorophenylserine
6 . homogenate
7 . Bradford

آنزیمی بر روی ژل (۱۲/۵٪) پلی آکریل آمید از روش (۱۹۷۱) Van-Loon با تغییراتی به شرح زیر استفاده شد. ژلها پس از خاتمه الکتروفورز در محلولی شامل بافر فسفات M ۰/۲، pH=۶/۸ (۵۰ میلی‌لیتر)، ۰/۵٪ DL-DOPA (۲۰ml) و کلسیم کلرید ۷۳/۵٪ [$CaCl_2 \cdot H_2O$] (۰/۷ میلی‌لیتر) قرار داده شد. ژلها تا ظهور نوارهای قهوه‌ای رنگ (قهوه‌ای بسیار تیره) پلی فنل اکسیداز به مدت ۲ تا ۳ ساعت در محلول فوق در تاریکی نگهداری گردید. تجربه نشان داد چنانچه پس از ظهور کامل نوارها ژل را چندین بار با آب مقطر شسته سپس آن را باز هم در تاریکی ودر آب مقطر قرار دهیم هیچ نیازی به رنگبری زمینه ژل به کمک اسکوربیک اسید (۱۰ mM) نخواهد بود (۱۹).

نتایج و بحث

بررسی فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در برگ‌های اول، دوم و سوم سرشاخه‌های چای روشن ساخت که از آغاز بهار تا پایان زمستان روند فعالیت آنزیم مذکور از یک سیر صعودی برخوردار است. روند فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در ۱۲ ماه سال تشابه قابل توجهی را در هر ۴ رقم آشکار ساخته و موارد اختلاف اندک بود. در فصول بهار و زمستان کمترین فعالیت آنزیم در ماه‌های خرداد و دی مشهود بود، لیکن در خصوص فصول تابستان و پاییز، ماه مورد نظر در بین ارقام مختلف کمی متغیر بود. در فصل تابستان کمترین آنزیم ارقام آسام و صد در شهریور ماه (سپتامبر)، در رقم شوروی در مرداد (آگوست)، و در رقم دارجیلینگ در تیرماه (جولای) مشاهده گردید. در فصل پاییز نیز کمترین فعالیت آنزیم مذکور در ارقام آسام، شوروی و صد در مهر ماه و در رقم دارجیلینگ در آذرماه دیده شد. اوج فعالیت آنزیم در ارقام دارجیلینگ، شوروی و صد در اسفند ماه و در رقم آسام در بهمن ماه دیده شد.

در مجموع و در هر ۴ رقم مورد بررسی، بیشینه فعالیت آنزیم در ماه‌های آبان، بهمن و اسفند و کمینه آن در خرداد ماه مشاهده شد. میزان فعالیت از برگ اول تا سوم افزایش یافته، به نحوی که بیشینه فعالیت در برگ سوم و کمینه آن در برگ اول مشهود بود (نمودارهای ۱ تا ۴ با احتساب انحراف از معیار).

تشابه قابل توجهی در روند تغییرات میزان فعالیت آنزیم در ماههای مختلف در هر ۳ برگ مشاهده شد. ایزوزیم‌های پلی فنل اکسیداز نیز در برگ چای به صورت ماهانه بررسی گردید (زیموگرام‌های ۱ تا ۴). در کلیه زیموگرامها کنار هر یک از نوارهای آنزیمی R_f مربوطه منظور شده است. در هر ماه ۸ بارگیری عصاره‌های پروتئینی بر روی ژل‌های پلی آکریل آمید صورت گرفت که ۴ بارگیری اول (۱، ۲، ۳، ۴) به ترتیب به برگ‌های اول ارقام دارجیلینگ، آسام، شوروی و صد تعلق داشت و ۴ بارگیری دوم (۵، ۶، ۷، ۸) به همان ترتیب قبل به برگ‌های دوم ارقام مذکور متعلق بود. این ترتیب بارگیری از یک سو مقایسه ایزوزیم‌های ۴ رقم مورد بررسی و از سوی دیگر مقایسه ایزوزیم‌های برگ‌های اول و دوم هر رقم را با یکدیگر به طور همزمان امکان‌پذیر می‌سازد

نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت آنزیم تا حد قابل توجهی با آنچه بر روی ژل‌های پلی آکریل آمید ظاهر شد، انطباق داشت.

بالاتر بودن میزان فعالیت آنزیم در برگ دوم نسبت به برگ اول به ۲ صورت ۱- قویتر شدن همان ایزوزیم‌های برگ اول ۲- ظهور ایزوزیم‌های جدید مشخص شد.

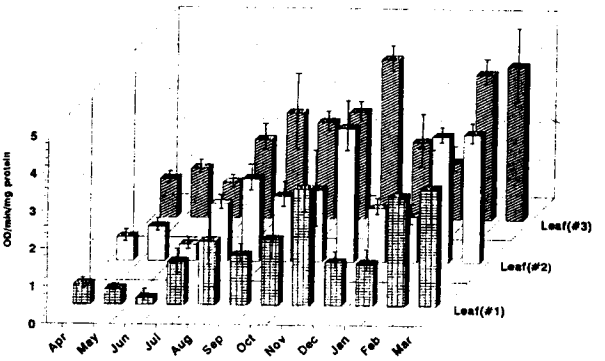
در فصل بهار پایین بودن فعالیت ویژه آنزیم به حدی بود که ظهور نوارهای آن در خصوص ۳ رقم امکان‌پذیر نشد و فقط نوارهای آنزیمی رقم آسام به صورتی بسیار ضعیف ظاهر شد.

ظهور قویتر نوارهای آنزیمی از تابستان آغاز شد.در اسفند ماه که اوج فعالیت PPO در رقم شوروی است تعداد ایزوزیم‌ها به ۶ رسید. افزایش تعداد ایزوزیم‌های PPO در هر ۴ رقم مورد بررسی از آبان ماه (نوامبر) آغاز شد.

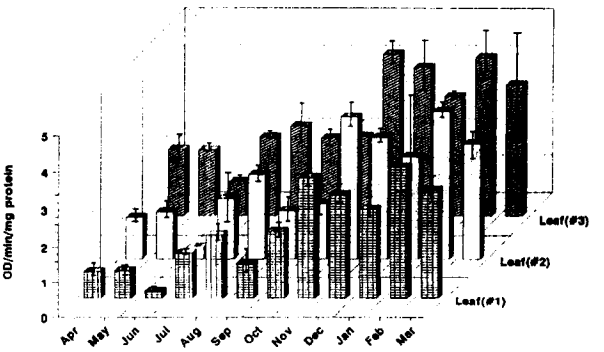
مقایسه کلیه R_f های به دست آمده با R_f سرم البومین گاوی (BSA) در ژل ۱۲/۵٪ به خوبی آشکار ساخت که ایزوزیم‌های مذکور از اوزان مولکولی بالاتر از ۱۳۲۰۰۰ دالتون (وزن مولکولی BSA) برخوردارند.

در انطباق با پژوهش حاضر گریگوری و بندال (۱۹۶۶) وزن مولکولی PPO جوانه‌های چای را ۱۶۰۰۰±۱۲۴۰۰۰ دالتون گزارش کردند. همچنین هیمدال و همکاران (۱۹۹۴) گزارش کردند که دما تاثیر قابل توجهی بر افزایش فعالیت پلی فنل اکسیداز کاهو (*L.sativa*) داشته، اوزان مولکولی پلی فنل اکسیدازهای بافت‌های فتوسنتزی بیش

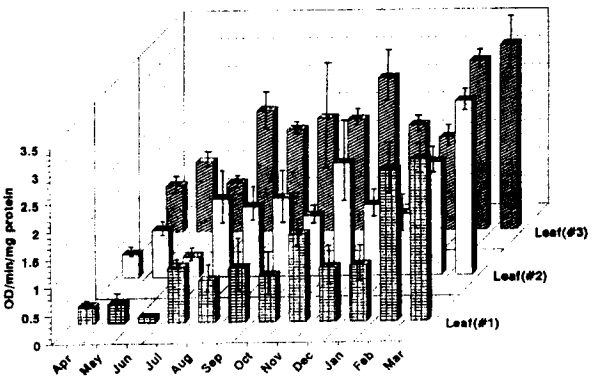
1 . nondissociating
2 . discontinuous



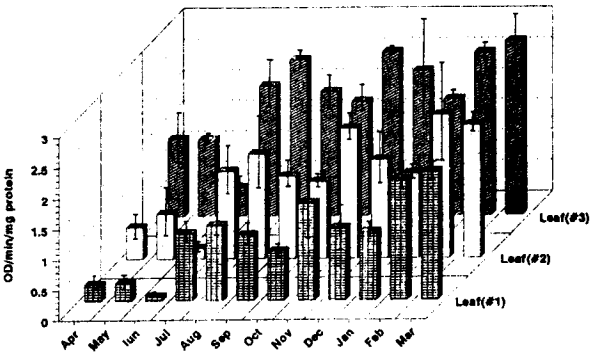
شکل ۱- تغییرات کمی فعالیت آنزیم PPO (بصورت ماهانه) در سه برگ اول سر شاخه (رقم دارجیلینگ)



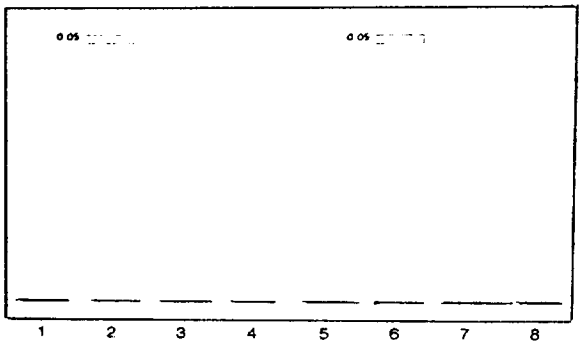
شکل ۲- تغییرات کمی فعالیت آنزیم PPO (بصورت ماهانه) در سه برگ اول سرشاخه (رقم آسام)



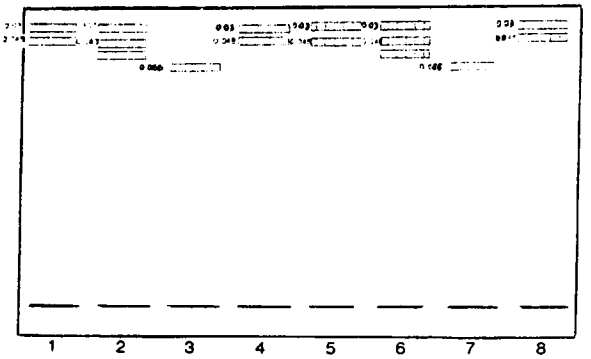
شکل ۳- تغییرات کمی فعالیت آنزیم PPO (بصورت ماهانه) در سه برگ اول سرشاخه (رقم شوروی)



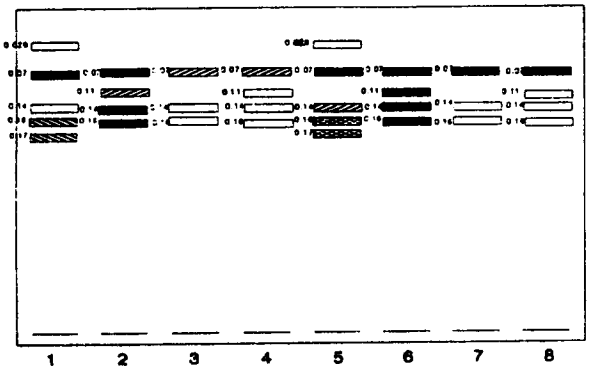
شکل ۴- تغییرات کمی فعالیت آنزیم PPO (بصورت ماهانه) در سه برگ اول سرشاخه (رقم صد)



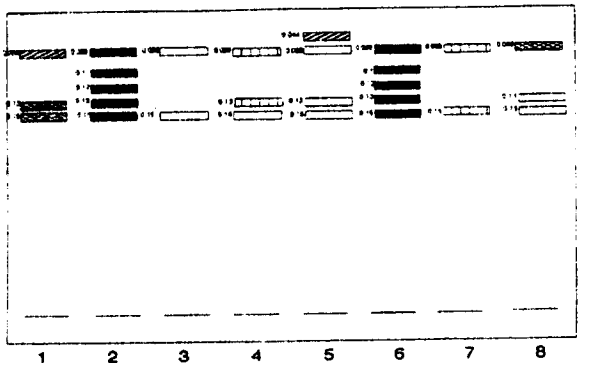
شکل ۵- الگوی الکتروفورزی ایزوزیم‌های PPO برگ چای (برگهای اول و دوم – چهار رقم مورد بررسی) در اردیبهشت ماه



شکل ۶- الگوی الکتروفورزی ایزوزیم‌های PPO برگ چای (برگ‌های اول و دوم – چهار رقم مورد بررسی) در مرداد ماه



شکل ۷- الگوی الکتروفورزی ایزوزیم‌های PPO برگ چای (برگ‌های اول و دوم – چهارم رقم مورد بررسی) در آبان‌ماه



شکل ۷- الگوی الکتروفورزی ایزوزیم‌های PPO برگ چای (برگ‌های اول و دوم – چهارم رقم مورد بررسی) در بهمن‌ماه

از ۱۵۰۰۰۰ و بافت‌های آوندی کمر از ۱۳۶۰۰۰ دالتون (۴۶۰۰۰ و ۴۰۰۰۰ دالتون) می‌باشد. به علاوه بررسی دقیق ایزوزیم‌های PPO در برگ‌های چای با توجه به ماه ظهور آنها به خوبی روشن ساخت که سبکترین ایزوزیم‌ها به ماه نوامبر (آبان)، ماه گل دهی چای، تعلق دارد و به این ترتیب بین نوع فعالیت رشدی گیاه و نوع ایزوزیم‌های آن نیز رابطه‌ای دیده می‌شود. مقایسه میزان فعالیت آنزیم PPO با مقدار پروتئین‌های محلول (۱) در فصول مختلف منجر به این استنتاج شد که در فصول بهار و تابستان آنزیم مذکور سهم کوچکی از پروتئین‌های محلول برگ را تشکیل داده در حالیکه در پائیز و زمستان، سهم آن به مراتب فزونی می‌یابد.

به نظر می‌رسد در فصول مناسب جهت رشد رویشی بخش عمده PPO به حالت نامحلول (متصل به غشاء و یا به حالت نهفته) در می‌آید و در فصولی که رشد رویشی تنزل می‌کند، بخش عمده آن به حالت محلول یافت می‌شود. به علاوه بریگس و همکاران (۱۹۵۶)، سوندهیمر و همکاران (۱۹۶۰) و توماس زوانسکی و همکاران (۱۹۶۶) نشان دادند که ترکیبات فنلی گیاهان مختلف بر اکسیداسیون IAA تاثیرکرده‌وتخریب‌اکسین توسط کاتکول اکسیداز کاتالیز می‌شود. به عبارت دیگر، افزایش فعالیت کاتکول اکسیداز سبب کاهش رشد خواهد شد (۱۱).

بنابراین در برگ‌های چای نیز کاهش رشد گیاه را می‌توان به افزایش فعالیت کاتکول اکسیداز و ظهور باند جدید نسبت داد. این نتایج با آنچه که توسط سنگری پس از مطالعه فعالیت PPO در برگ‌های چای گزارش شده مغایرت داشته (۲) با مطالعات صالحی شانجانی در سال ۱۳۷۵ بر روی فعالیت PPO در ارس مطابقت کامل ندارد (۳).

نامبرده گزارش نمود که کمینه فعالیت آنزیم در سرشاخه‌های سبز در بهار و بیشینه آن اواخر پاییز است. در حالی که در شاخه‌ها در بهار و پاییز میزان فعالیت آنزیم PPO کمینه بوده، در تابستان و زمستان در حد بیشینه است (۳). مجموعه نتایج حاصل نشان می‌دهند که کیفیت برگ چای با میزان و نوع فعالیت پلی فنل اکسیداز رابطه معکوس داشته، از طریق کنترل فعالیت این آنزیم می‌توان کیفیت چی را نیز تحت کنترل قرار داد.

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

۱. تیموری، ا. ۱۳۷۶. کشت بافت و بررسی تغییرات کمی و کیفی برخی از اکسیدازها در ضمن رشد و نمو گیاه چای *Camellia sinensis*. پایان نامه کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه تهران.

۲. سنگری، س. ۱۳۷۱. بررسی فعالیت پلی فنل اکسیدازی و پراکسیدازی در گیاه چای. پایان‌نامه کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه تهران.

۳. صالحی شانجانی، پ. ۱۳۷۵. کشت بافت و بررسی اثر عوامل محیطی بر متابولیسم فرآورده‌های ثانوی و تغییرات کمی و کیفی پروتئین ایزوآنزیمی پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در ارس *Juniperus* ssp پایان نامه کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه تهران

4. Asaka, M., Aoyama Y., Nakanishi R. and Hayashi R., 1994. Purification of a latent form of polyphenoloxidase from La France Pear Fruit and its Pressure activation. Biosic, Biotech, Biochem, 58(8) 1486-1489.
5. Ben- Shalom N., Kahh V., Harel E. and Mayer A. M., 1977. Catechol oxidase from green olives: Properties and partial purification. Phytochemistry, Vol. 16: 153-1158.
6. Bradford M. M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
7. Gauillard F., Richard – Forget F. and Nicolas. J., 1993. New spectrophotometric assay for polyphenoloxidase activity. Analytical Biochemistry, 215: 59-65.
8. Gregory R. P. F. and Bendall D. S., 1966. The purification and some properties of the polyphenoloxidase from tea (*Cammellia sinensis*). Biocheam. J., 101: 569-581.
9. Hames B. D., 1990. Gelelectrophoresis of proteins. A practical approach. Oxford University Press, New York. Tokyo.

10. Heimdal H., Larsen L. M. and Poll L., 1994. Characterization of polyphenoloxidase from photosynthetic and vascular lettuce tissues (*Lactuca sativa*). J. Agric. Food Chem., 42: 1428-1433.
11. Mayer a. M. and Harel E., 1979. Polyphenol oxidases in plants. Phytochemistry, Vol. 18: 193-215.
12. McDougall G. J., 1993. Solubilization of wall - bound peroxidases by limited proteolysis. Phytochemistry, Vol.33 (4): 765-767.
13. Moore B. M. and Flurkey W. H., 1990. Sodium dodecylsulfate activation of a plant Polyphenoloxidase. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 256 (9): 4982-4988.
14. Raymond J., Rakariyatham N. and Azanza J. L., 1993. Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds. Phytochemistry, Vol. 34(4) 927-931.
15. Robert C., Rouch C., Richard – Forget F., Pabion M. and Cadet F., 1996. Partial purification and physiochemical characterization of *Acanthophenix rubra* polyphenoloxidase. Plant Physiol. Biochem. 34 (3) 369-375.
16. Singh H. P. and Ravindranath S. D., 1994. Occurrence and distribution of PPO activity in floral organs of some standard and local cultivars of tea. J. Sci. Food Agric, 64: 117-120.
17. Tomaszewski M. and Thimann K. V., 1966. Interactions of phenolic acids, metallic ions and chelating agents on auxin – induced growth. *Plant Physiol.*, 41: 1443-1454.
18. Thygesen P. W., Dry I. B. and Robinsion S. P., 1995. Polyphenoloxidase in potato . Plant Physiol., 109: 525-531.
19. Van – Loon L. C., 1971. Tobacco Polyphenoloxidase. A specific staining method indicating non – identify with perxidase. Phytochemistry, 10: 503-507.

An Investigation of Qualitative and Quantitative Changes of Polyphenoloxidase During the Growth and Development of Tea Plant (*Camellia sinensis*)

H. EBRAHIMZADEH[1] AND A. TEIMOORI[2]

1, 2, Professor and Former Graduate Student, Department of Biology, Faculty of Science, Tehran University, Iran.

Accepted Nov. 14, 2001

SUMMARY

Polypheiioloxidase (PPO) activity in tea plant in Darjeeling, Assamica, Shooravi and 100 other varieties was examined quantitatively and qualitatively monthly and for a duration of one year. In the first three leaves on shoot the trend of the enzyme activity from spring to winter was ascending and increasing from the fist leaf to the third. Appearance of PPO bands of tea leaf on polyacrylamide gels (PAGE), with DL-DOPA, showed that the mentioned bands are of high molecular weight and concomitant with increase in enzyme activity from spring to winter, the number of PPO isoenzymes were increased. The results indicate a relationship between the quality of tea leaf and PPO activity as well as related isoenzymes.

Key words: Tea (*Camellia sinensis*), Polyphenoloxidases activity, Isoenzymes of polyphenoloxidase.