

## تأثیر برخی ترکیبات شیمیایی و طبیعی بر فعالیت پلی فنول اکسیداز میوه سیب

نادر چاپارزاده\*<sup>۱</sup>، مینا علی پاشائی دهکهرگانی<sup>۱</sup>، لیلا زرنندی میانداوب<sup>۱</sup><sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

\*مستول مکاتبات: نادر چاپارزاده، nchapar@azaruniv.ac.ir

**چکیده.** کیفیت بافت عامل مهمی در ارزیابی میوه‌ها می‌باشد. سطوح برش خورده میوه سیب، در اثر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز قهوه‌ای رنگ می‌شود که دلیل آن اکسیداسیون مواد فنولی می‌باشد. جلوگیری از اکسیداسیون مواد فنولی و تغییر رنگ بافت میوه‌ها در صنایع غذایی اهمیت فراوان دارد. به دلیل اثرات نامطلوب افزودنی‌های شیمیایی بر سلامت انسان و افزایش ترجیح مصرف‌کنندگان برای جایگزینی آنها با مواد طبیعی، بازار جالبی برای استفاده از افزودنی‌های طبیعی گیاهی در حال شکل‌گیری است. این تحقیق با هدف بررسی تأثیر برخی ترکیبات شیمیایی و طبیعی شامل متابی سولفیت سدیم، اسید سیتریک، عرق کاسنی، عرق شیرین‌بیان و عرق بادرنجبویه بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز صورت گرفت. فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز با استفاده از پیروگالل به‌عنوان سوبسترا به روش طیف سنجی نوری ارزیابی شد. مقادیر دما و pH بهینه فعالیت آنزیم به ترتیب ۳۲ درجه سانتی‌گراد و ۷ تعیین شدند. نتایج حاکی از تأثیر معنی‌دار ترکیبات طبیعی مورد استفاده، متابی سولفیت سدیم و اسید سیتریک در کاهش فعالیت این آنزیم بود. بر این اساس، می‌توان فعالیت پلی فنول اکسیداز را برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن میوه‌ها با استفاده از ترکیبات طبیعی مناسب به جای مواد شیمیایی کاهش داد.

واژه‌های کلیدی. اکسیداسیون، بادرنجبویه، شیرین‌بیان، کاسنی، مواد شیمیایی

## Effect of some chemical and natural compounds on polyphenol oxidase activity from apple fruits

Nader Chaparzadeh<sup>1\*</sup>, Mina Ali-Pashaei-Dehkargani<sup>1</sup> and Leila Zarandi-Miandoab<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

\*Correspondent author: nchapar@azaruniv.ac.ir

**Abstract.** Texture quality is an important factor in evaluating of fruits. The cut surfaces of the apple fruit turn brown because of the oxidation of phenolic compounds, triggered by polyphenol oxidase enzyme. Preventing the oxidation of phenolic substances and changing color of fruit are very important in the food industry. Due to the adverse effects of chemical additives on human health and increasing consumer preference for natural alternative compounds makes an interesting market for natural plant ingredients. This study was conducted to investigate the effect of some chemical and natural compounds including sodium metabisulfite, and citric acid, aromatic waters (sweats) of chicory, licorice and lemongrass on polyphenol oxidase enzyme activity of apple fruits. The activity of polyphenol oxidase was evaluated spectrophotometrically using pyrogallol as substrate. The optimum temperature and pH values were 32 °C and 7, respectively. It was found that the enzyme activity decreased due to use of natural compounds, sodium metabisulfite and citric acid. In conclusion, polyphenol oxidase activity can be reduced to prevent of fruits browning by using suitable natural compounds instead of chemicals.

**Key words:** Chemical materials, Chicory, Lemongrass, Licorice, Oxidation

Received 28.03.2023/ Accepted 16.06.2024/ Published 19.06.2024

دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۰۸، اصلاح: ۱۴۰۲/۰۳/۱۳، پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۲۲، انتشار: ۱۴۰۳/۰۳/۳۰

## مقدمه

آنزیم پلی فنول اکسیداز می‌باشد. واکنش قهوه‌ای شدن آنزیمی در دو مرحله و با دو نوع فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز انجام می‌شود. نخست، فعالیت مونوفنولازی (E.C.1.14.18.1) در حضور اکسیژن مولکولی موجب هیدروکسیلاسیون مونوفنول‌ها به ارتودی فنول‌ها می‌شود. در مرحله بعد، فعالیت دی فنولازی (E.C.1.10.3.2) موجب اکسایش دی فنول‌ها به ارتودی کینون‌های مربوطه می‌گردد. ارتودی کوئینون‌ها به شدت واکنشگر و ناپایدار می‌باشند و با پلیمریزاسیون و تراکم با اسیدهای آمینه و پروتئین‌ها سبب ایجاد ترکیبات قهوه‌ای رنگ می‌شوند (Zhang, ۲۰۲۳). در صنعت آبمیوه‌سازی، تغییر رنگ آنزیمی از مشکلات عمده محسوب می‌گردد. به دلیل اهمیت میزان فعالیت پلی فنول اکسیداز در قهوه‌ای شدن آنزیمی، عوامل موثر بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز از جمله نوع و مقدار ترکیبات فنولی، مقدار اکسیژن و میزان pH برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن آنزیمی از اهداف مهم در صنعت آبمیوه‌سازی هستند (Devece et al., ۱۹۹۹). مهار قهوه‌ای شدن آنزیمی به روش‌های فیزیکی، شیمیایی و طبیعی تقسیم‌بندی می‌شوند. روش‌های فیزیکی تنظیم‌کننده قهوه‌ای شدن آنزیمی شامل تیمار حرارتی با دماهای بالا و پایین، پرتودهی و استفاده از امواج فراصوت است (Tsikrika, ۲۰۲۲). در روش‌های شیمیایی مهار فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز با استفاده از مواد شیمیایی مانند اسیدها و متابی سولفیت سدیم و آنتی اکسیدان‌های مصنوعی صورت می‌گیرد. به دلیل اثرات نامطلوب بر سلامتی انسان، استفاده از مواد شیمیایی به منظور ممانعت از قهوه‌ای شدن فرآورده‌های میوه‌ای محدود شده است. مصرف‌کنندگان علاقه‌ای برای مصرف محصولات با افزودنی‌های مصنوعی را ندارند و ترجیح می‌دهند مواد شیمیایی با ترکیبات طبیعی جایگزین شوند. امروزه برای مهار فعالیت پلی فنول اکسیداز، استفاده از مواد طبیعی از منابع مختلف مانند ترکیبات ثانویه گیاهی مورد توجه صاحبان صنایع و محققین است (Coseteng & Lee, ۱۹۸۷). بنابراین، بررسی تاثیر ترکیبات طبیعی بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز سیب و استفاده از آنها به‌عنوان بازدارنده فعالیت آنزیمی دارای اهمیت زیادی است. تحقیقات زیادی برای مهار آنزیم پلی فنول اکسیداز توسط مواد طبیعی استخراج شده از منابع مختلف سبزیجات و میوه‌ها صورت گرفته است (Moon et al., ۲۰۲۰). برای مثال، میوه انگور به دلیل داشتن مقدار قابل توجهی ترکیبات پلی فنلی به‌ویژه در حالت نارس اثرات بازدارندگی پلی فنول اکسیدازی خوبی را نشان می‌دهد (۲۰۲۰). (Honisch et al., ۲۰۲۰). پوست و بافت داخلی میوه گوجه‌فرنگی به دلیل داشتن محتوای بسیار بالای لیکوپن (به‌عنوان عامل آنتی

سیب یک میوه محبوب در سراسر جهان محسوب می‌شود. میوه سیب بسته به ژنتیک، شرایط محیطی و روش‌های کشت و داشت دارای انواع مواد معدنی، قندها، الکل‌های قندی، اسیدهای آلی، ویتامین‌ها و ترکیبات فنولی است. به دلیل محتوای بالای ترکیبات فنولی میوه سیب دارای ارزش تغذیه‌ای و آنتی‌اکسیدانی زیاد برای جلوگیری از ابتلا به سرطان و انواع بیماری‌هاست. ترکیبات فنولی و آنزیم‌های مرتبط در تعیین کیفیت میوه‌ها و سبزیجات نقش اساسی دارند. در بخش گوشتی و پوست سیب، مواد فنولی از قبیل اسیدکلروژنیک و اسیدکافئیک توسط عمل آنزیم‌ها با قهوه‌ای شدن منجر به بی‌کیفیت شدن میوه‌ها و ضررهای فراوان اقتصادی به کشاورزان و صنایع تبدیلی می‌گردند (Can et al., ۲۰۱۴). عامل اصلی قهوه‌ای شدن سیب آنزیم پلی فنول اکسیداز است که موجب افت کیفیت میوه و آب‌میوه سیب می‌شود (Walker & Ferrar, ۱۹۹۸). پلی فنول اکسیدازها توسط خانواده‌های چندژنی در گیاهان رمز می‌شوند و تعداد ژن‌ها در گیاهان مختلف متفاوت است. با این حال، در چند گونه گیاهی، از جمله خیار، تنها یک ژن پلی فنول اکسیداز دارند و آراییدوپسیس به طور کلی فاقد آن است (Sullivan, ۲۰۱۵). بسیاری از ژن‌های پلی فنول اکسیداز توسط زخم، پاتوژن‌ها و یا هورمون‌های مرتبط با تنش مانند متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک تنظیم می‌شوند. آنزیم حاوی دو اتم مس در جایگاه فعال خود است محل اتصال برای سوبستراهای فنولی و اکسیژن می‌باشند. معمولاً سوبستراها در پلاست‌ها و آنزیم در سیتوپلاسم قرار دارند که به هنگام زخم در کنار هم قرار می‌گیرند (۲۰۲۲) (Hamdan et al., ۲۰۲۲). آنزیم‌های پلی فنول اکسیداز دارای وظایف متعدد متابولیسمی در گیاهان هستند ولی شهرت اصلی این آنزیم‌ها در قهوه‌ای شدن محصولات کشاورزی پس از برداشت می‌باشد. با این همه، در برخی موارد مانند فرایند تخمیر در صنعت چای‌سازی و یا کمک به حفظ محتوای پروتئین علوفه‌ها به‌هنگام انبارداری آنزیم‌های فوق مفید هستند (Sullivan, ۲۰۱۵).

فرآیند قهوه‌ای شدن در میوه‌ها و سبزیجات به دو نوع آنزیمی و غیر آنزیمی تقسیم‌بندی می‌شود. در فرآیند قهوه‌ای شدن غیر آنزیمی، طی واکنش میلارد گروه آمین ترکیبات از جمله اسیدهای آمینه با ترکیبات کربونیلی از جمله قندهای احیاکننده ضمن تولید رنگدانه‌های قهوه‌ای رنگ (ملاتونی) طعم و بو هم ایجاد می‌کنند (Hemmler et al., ۲۰۱۸). برخلاف فرآیند قهوه‌ای شدن غیر آنزیمی، مسئول واکنش قهوه‌ای شدن آنزیمی

### سنجش فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز

فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد و در طول موج ۴۲۰ نانومتر در مخلوط واکنش شامل ۶۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰ میلی مولار (pH ۷)، ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم و ۲۰۰ میکرولیتر پیروگالل ۰/۲ مولار سنجیده شد. اندازه گیری فعالیت آنزیم براساس نرخ اولیه تشکیل کینون از روی افزایش جذب در طول موج یاد شده انجام گرفت. شروع واکنش با افزودن پیروگالل انجام می شد و برای ۱۵۰ ثانیه افزایش جذب رابطه خطی با زمان داشت. ۰/۰۰۱ افزایش جذب در یک دقیقه به عنوان یک واحد آنزیمی تعریف و نتایج به صورت فعالیت ویژه، واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین، محاسبه و به صورت درصد از نمونه شاهد بیان شد (Cho & Ahn, ۱۹۹۹). دما و pH بهینه فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز به روش های معمول آزمایشگاهی تعیین گردید.

### تعیین تاثیر غلظت های مختلف متابی سولفیت سدیم بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز

عصاره آنزیم پلی فنول اکسیداز با غلظت های مختلف (۰، ۰/۳، ۰/۵ و ۱ میلی مولار) متابی سولفیت سدیم مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس، میزان فعالیت آنزیم به روش ذکر شده در قبل اندازه گیری شد.

### تعیین تاثیر غلظت های مختلف اسید سیتریک بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز

عصاره آنزیم پلی فنول اکسیداز با غلظت های مختلف (۰، ۰/۳، ۰/۵ و ۱ میلی مولار) اسید سیتریک مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس، میزان فعالیت آنزیم به روش ذکر شده در قبل اندازه گیری شد.

### تعیین تاثیر غلظت های مختلف عرق های گیاهی بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز

عصاره آنزیم پلی فنول اکسیداز با غلظت های مختلف عرق کاسنی، عرق شیرین بیان و عرق بادرنجبویه (۰ تا ۰/۵٪)، استخراج شده به روش تقطیر با آب، مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس، میزان فعالیت آنزیم به روش ذکر شده در قبل اندازه گیری شد.

### آنالیز و بررسی آماری استفاده شده

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. برای محاسبه میانگین و انحراف استاندارد از

اکسیدان)، پتانسیل قابل توجهی در جلوگیری از قهوه ای شدن میوه ها دارند. هنگامی که سیب های تازه بریده شده با لیکوپن تیمار شوند، از قهوه ای شدن آنزیمی بدون تغییر کیفیت فیزیکوشیمیایی جلوگیری می شود (Martinez- ۲۰۱۹). Hernandez et al., مطالعات انجام شده با چای سبز نیز نشان داده است که فلاونوئیدهای چای سبز با پتانسیل آنتی اکسیدانی دارای اثر مهار روی پلی فنول اکسیداز سیب می باشند (۲۰۱۹). Soysal, از عسل نیز برای ممانعت از قهوه ای شدن آب میوه ها استفاده شده است. ترکیبات عسل به عنوان عامل کلاته کننده مس موجود در جایگاه فعال آنزیم پلی فنول اکسیداز برای مهار فعالیت عمل می کنند. علاوه بر این مقدار زیادی از اجزا سازنده مانند اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها و ویتامین های موجود در عسل دلالت بر خاصیت آنتی اکسیدانی آن دارد (De la ۲۰۱۱). Rosa et al.,

با توجه به اهمیت سیب به عنوان یک میوه ارزشمند در صنعت آبمیوه سازی و حساسیت آن نسبت به قهوه ای شدن آنزیمی و همچنین به دلیل اثرات زیان بار مواد شیمیایی مهارکننده قهوه ای شدن بر سلامتی انسان، این تحقیق جهت بررسی تاثیر برخی ترکیبات طبیعی در مقایسه با مواد شیمیایی رایج و تاثیر امواج فراصوت بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز سیب طراحی و اجرا شده است.

## مواد و روش ها

### استخراج عصاره آنزیم پلی فنول اکسیداز از میوه سیب

سیب زرد از بازار محلی خریداری و برای تخلیص آنزیم پلی فنول اکسیداز استفاده شد. ۱۰۰ گرم بخش خوراکی سیب پس از حذف پوست و دانه ها با ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار (pH ۶/۸) به مدت ۳ دقیقه در مخلوط کن همگن شد. همگن حاصل با استفاده از پارچه تنظیف و سپس سانتریفیوژ (۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه) صاف شد (Strelec et al., ۲۰۱۷). مایع رویی دارای عصاره آنزیمی با سولفات آمونیوم ۲۰٪ رسوب دهی و دوباره سانتریفیوژ شد (Duong-Ly & Gabelli, ۱۹۹۸). رسوب حاصل با بافر فسفات ۱۰ میلی مولار (pH ۶/۸) همگن شده و محلول بدست آمده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد در بافر فسفات ۱۰ میلی مولار (pH ۶/۸) دیالیز و میزان پروتئین نمونه ها اندازه گیری شد (Bradford, ۱۹۷۶).

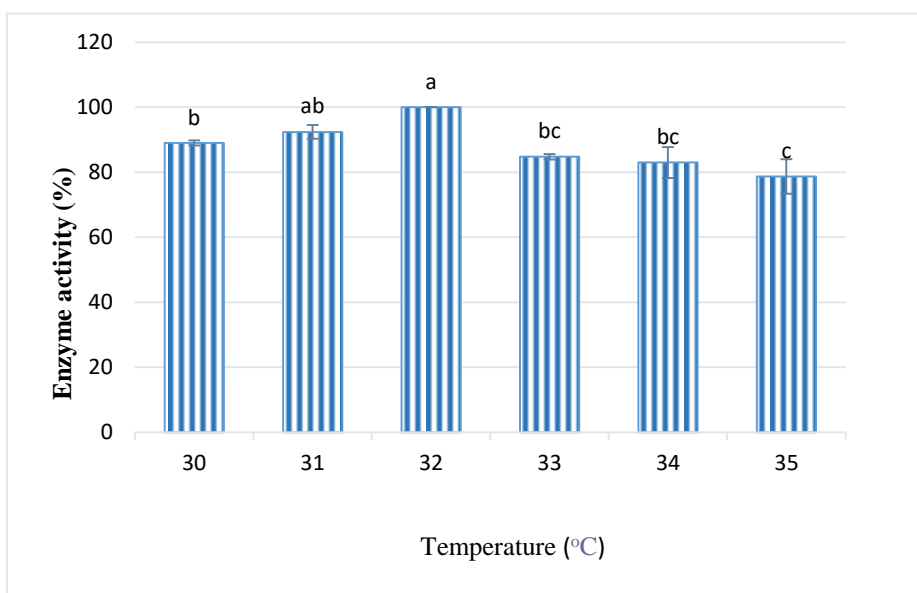
بهینه آنزیم دمایی است که در آن آنزیم بیش‌ترین فعالیت را از خود نشان می‌دهد. در آزمایش دیگر برای نیل به دقت بیشتر فعالیت آنزیم در بازه دمایی ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد بررسی شد (شکل ۱). آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز میوه سیب بیش‌ترین فعالیت را در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد (۱۰۰ درصد) و کمترین فعالیت را به میزان ۷۸/۷ درصد در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد نشان داد. نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که تاثیر دما بر فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز میوه سیب در بازه دمایی ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار است.

نرم‌افزار SPSS 17.1 و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2016 استفاده شد.

## نتایج

### تاثیر دما بر فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز میوه سیب

فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز میوه سیب در دماهای ۱۵، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. آنزیم در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به شکل معنی‌داری بیش‌ترین فعالیت را نشان داد (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). طبق داده‌های این پژوهش، دما یکی از عوامل تاثیرگذار بر روی فعالیت آنزیم‌ها می‌باشد و دمای



شکل ۱- تاثیر دما بر فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز میوه سیب حروف مختلف بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح  $P \leq 0.05$  است. مقادیر میانگین ۴ تکرار  $\pm SE$  هستند.

**Figure 1.** Effect of temperature on apple fruit polyphenol oxidase activity  
Means followed by different letters are significantly different at  $P \leq 0.05$ .  
Values indicate means with four replications  $\pm SE$ .

جدول ۱- تجزیه واریانس داده‌های تأثیر عوامل مختلف بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز میوه سیب

Table 1. Analysis of variance for the data of different effectors on apple fruit polyphenol oxidase activity

| F           | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منابع تغییر           |
|-------------|----------------|--------------|------------|-----------------------|
| ۶۱۰۲۹ **    | ۰/۰۲۳          | ۰/۱۱۴        | ۵          | دما                   |
| ۲۲۰/۱۹۴***  | ۰/۲۰۵          | ۰/۸۲۲        | ۴          | pH                    |
| ۱۷۳۳/۳۷۲*** | ۰/۵۴۳          | ۱/۶۲۸        | ۳          | متابولیسم سولفیت سدیم |
| ۵۶/۶۴۵***   | ۰/۰۴           | ۰/۱۱۹        | ۳          | اسید سیتریک           |
| ۲۵/۲۸۷***   | ۰/۰۴۶          | ۰/۳۲         | ۵          | کاسنی                 |
| ۱۱۳/۴۰۸***  | ۰/۰۶           | ۰/۳۰۱        | ۵          | شیرین بیان            |
| ۶/۲۳۲**     | ۰/۰۱۹          | ۰/۰۹۴        | ۵          | بادرنجبویه            |

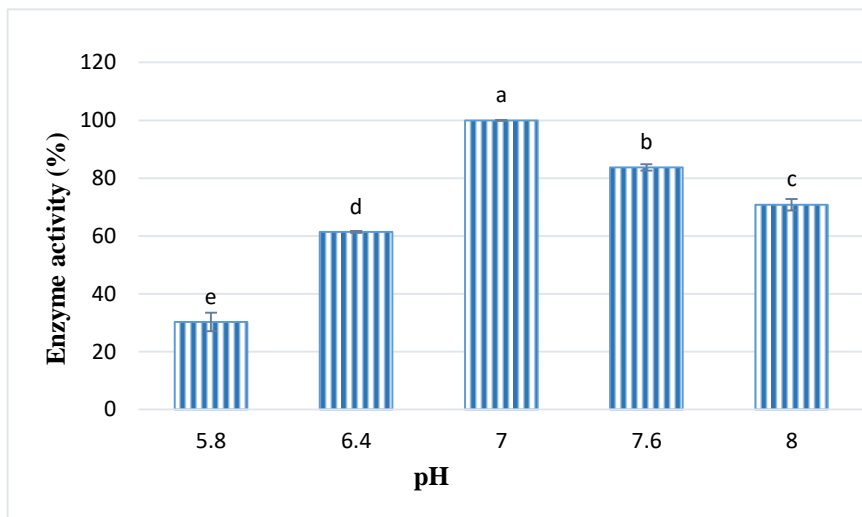
\*\*\* و \*\* به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌داری در سطوح ۰/۰۰۱ و ۰/۰۱ هستند.

\*\*\* and \*\* are significant at the 0.001 and 0.01 levels, respectively.

می‌باشد. بنابراین می‌توان pH ۷ را به عنوان pH بهینه عملکرد این آنزیم در محدوده مورد مطالعه در نظر گرفت. بالاتر و پایین‌تر از این pH فعالیت آنزیم کاهش یافت. نتایج آنالیز واریانس در جدول ۱ نشانگر تأثیر معنی‌دار pH بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز در سطح ۰/۰۰۱ است.

#### تأثیر pH بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز میوه سیب

فعالیت آنزیم در pHهای متفاوت در دمای ۳۲ درجه سانتی-گراد بررسی شد. نتایج حاصل (شکل ۲) نشان داد که آنزیم پلی فنول اکسیداز دارای بیشترین فعالیت در pH ۷ (۱۰۰ درصد) و کمترین فعالیت در pH ۵/۸ (۳۰/۲ درصد نسبت به pH ۷)



شکل ۲- تأثیر pH بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز میوه سیب

حروف مختلف بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح  $P \leq 0.05$  است. مقادیر میانگین ۴ تکرار  $\pm SE$  هستند.

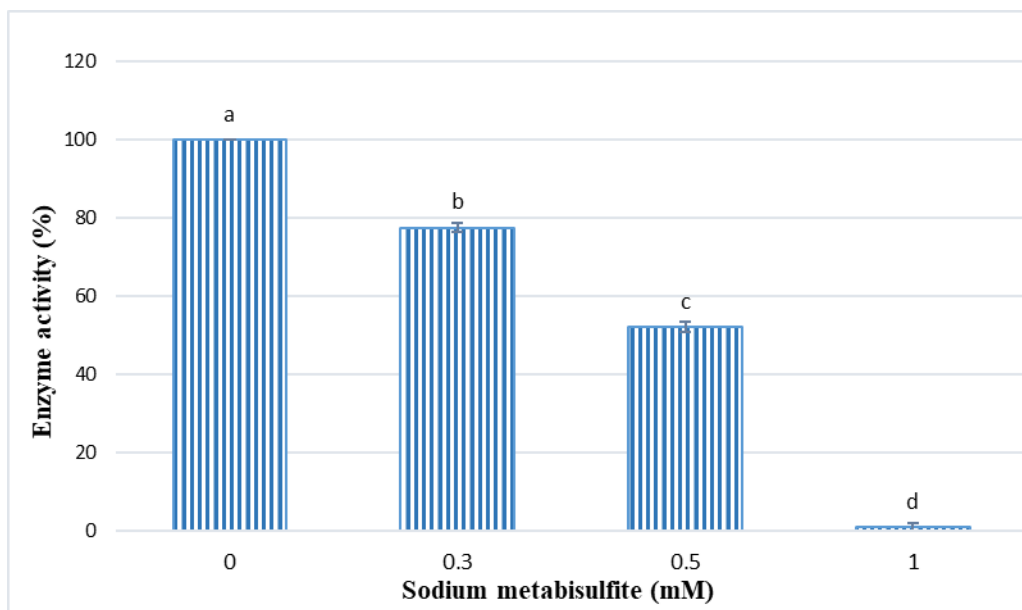
Figure 2. Effect of pH on apple fruit polyphenol oxidase activity  
Means followed by different letters are significantly different at  $P \leq 0.05$   
Values indicate means with four replications  $\pm SE$

و pH ۷) فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد. بیشترین اثر مهاري (۹۸/۹ درصد) روی فعالیت آنزیم در غلظت ۱ میلی مولار و کمترین تاثیر مهاري به میزان (۷۷/۵ درصد) در غلظت ۰/۳ میلی مولار نسبت به شاهد دیده می‌شود. نتایج جدول ۱ بیانگر تاثیر معنی دار متابی سولفیت سدیم بر روی فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز در سطح ۰/۰۰۱ است.

### تاثیر متابی سولفیت سدیم بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز

#### میوه سیب

نتایج حاصل از داده‌های شکل ۳ نشان می‌دهد که متابی سولفیت سدیم به عنوان یک ماده شیمیایی بر روی فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز سیب زرد اثر مهاري دارد. با افزایش غلظت مهارکننده در دما و pH ثابت (دمای ۳۲ درجه سانتی گراد



شکل ۳- تاثیر متابی سولفیت سدیم بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز میوه سیب

حروف مختلف بیانگر اختلاف معنی دار در سطح  $P \leq 0.05$  است. مقادیر میانگین ۴ تکرار  $\pm$  SE هستند.

**Figure 3.** Effect of sodium metabisulfite on apple fruit polyphenol oxidase activity

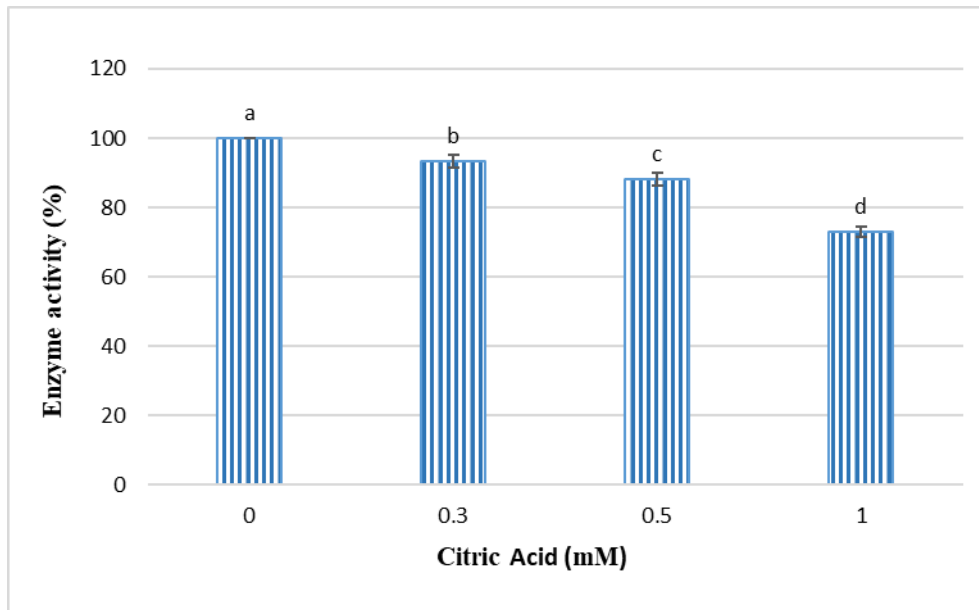
Means followed by different letters are significantly different at  $P \leq 0.05$

Values indicate means with four replications  $\pm$  SE

اسید سیتریک به میزان ۲۷/۱۱ درصد (کمترین فعالیت آنزیم به میزان ۷۲/۸۹ درصد) در غلظت ۱ میلی مولار در مقایسه با شرایط شاهد دیده می‌شود. غلظت ۰/۳ میلی مولار اسید سیتریک کمترین اثر مهاري را به میزان ۶/۸۴ درصد بر روی فعالیت این آنزیم دارد. نتایج جدول ۱ نشانگر تاثیر اسیدسیتریک بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز در سطح ۰/۰۰۱ معنی دار است.

### تاثیر اسید سیتریک بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز میوه سیب

با توجه به داده‌های شکل ۴، اسید سیتریک بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز سیب زرد اثر مهاري دارد. با افزایش غلظت اسید سیتریک در دما و pH ثابت (دمای ۳۲ درجه سانتی گراد و pH ۷) فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد. بیشترین اثر مهاري توسط



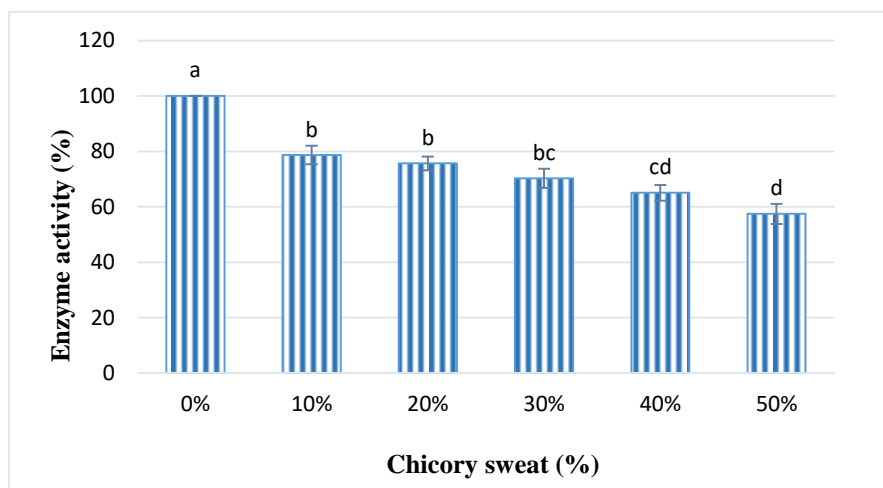
شکل ۴- تأثیر اسید سیتریک بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز میوه سیب

حروف مختلف بیانگر اختلاف معنی دار در سطح  $P \leq 0.05$  است. مقادیر میانگین ۴ تکرار  $\pm SE$  هستند.

**Figure 4.** Effect of citric acid on apple fruit polyphenol oxidase activity Means followed by different letters are significantly different at  $P \leq 0.05$  Values indicate means with four replications  $\pm SE$

و pH ثابت (دمای ۳۲ درجه سانتی گراد و pH ۷) مشاهده می شود. همچنین غلظت ۱۰ درصدی کم ترین کاهش فعالیت نسبت به شاهد را به میزان ۲۱/۲۹ درصد را نشان می دهد. نتایج حاصل از جدول ۱ حاکی از تأثیر معنی دار غلظت های مختلف کاسنی بر روی فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز در سطح ۰/۰۰۱ است.

تأثیر عرق کاسنی بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز میوه سیب نتایج حاصل از داده های شکل ۵ نشان می دهد که غلظت های مختلف عرق کاسنی به عنوان یک ترکیب طبیعی بر روی فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز اثر مهاری داشته و با افزایش غلظت عرق کاسنی فعالیت آنزیم کاهش بیشتر پیدا می کند. بیشترین کاهش فعالیت به میزان ۴۲/۵۳ در غلظت ۵۰ درصد عرق در دما



شکل ۵- تأثیر عرق کاسنی بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز میوه سیب

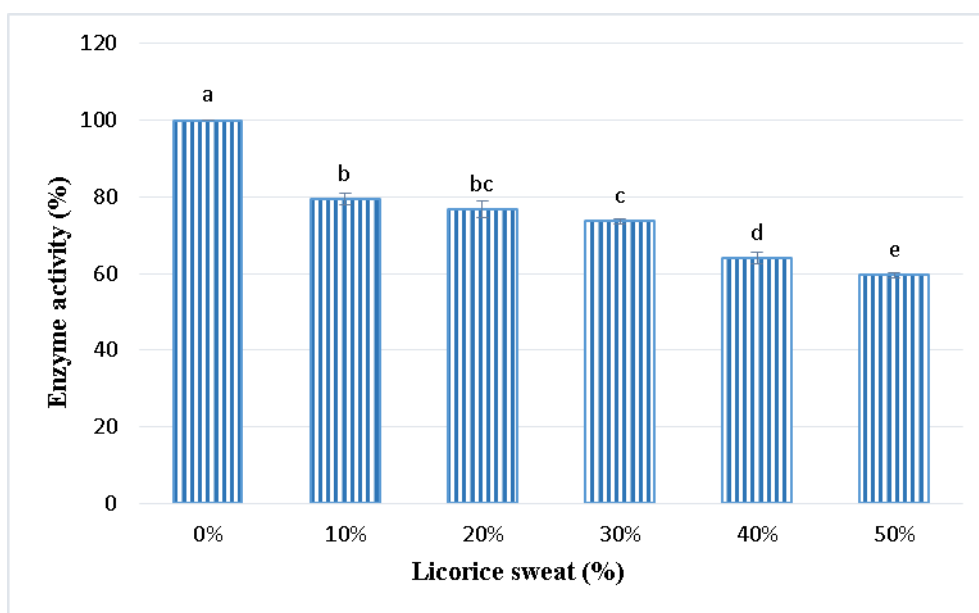
هستند.  $\pm SE$  است. مقادیر میانگین ۴ تکرار  $P \leq 0.05$  حروف مختلف بیانگر اختلاف معنی دار در سطح  $P \leq 0.05$

**Figure 5.** Effect of chicory sweat on apple fruit polyphenol oxidase activity Means followed by different letters are significantly different at  $P \leq 0.05$

تأثیر عرق شیرین بیان بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز میوه سیب

نتایج نشان می‌دهند که غلظت‌های مختلف شیرین بیان روی فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز اثر مهاری داشته است (شکل ۶). تأثیر عرق شیرین بیان روی فعالیت آنزیم به شکل وابسته به غلظت اتفاق افتاده است. در مقایسه با شرایط شاهد، بیش‌ترین تأثیر مهاری به میزان ۴۰/۳۷ (کم‌ترین درصد فعالیت به میزان

۵۹/۶۲) در غلظت ۵۰ درصد عرق شیرین بیان در دما و pH ثابت (دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و pH ۷) مشاهده می‌شود. کم‌ترین تأثیر مهاری به میزان ۲۰/۵۵ درصد نسبت به شاهد در غلظت ۱۰ درصد عرق مشاهده می‌شود. تأثیر مقادیر مختلف عرق شیرین بیان بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز میوه سیب در سطح ۰/۰۰۱ معنی‌دار است (جدول ۱).



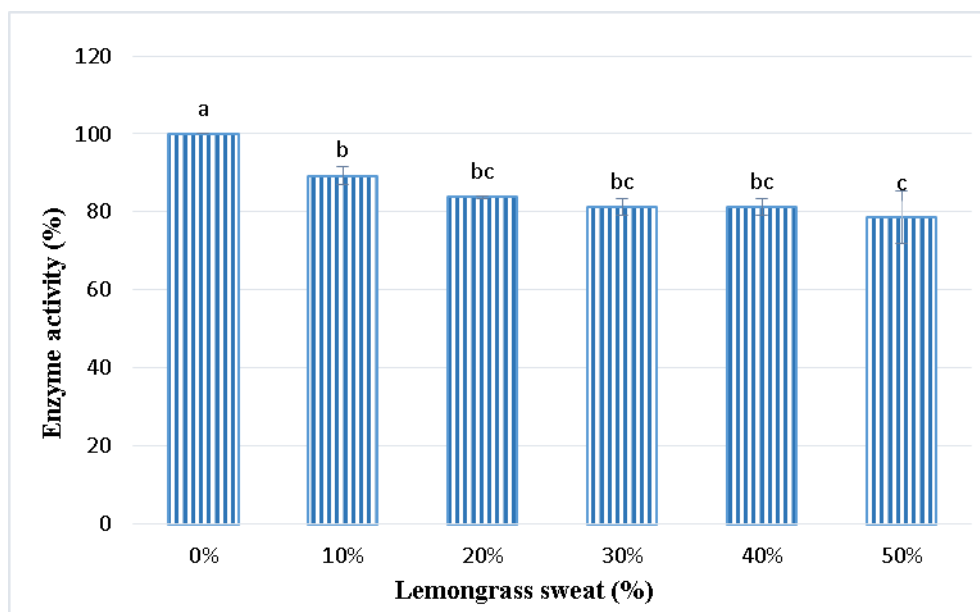
شکل ۶- تأثیر عرق شیرین بیان بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز میوه سیب  
حروف مختلف بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح  $P \leq 0.05$  است. مقادیر میانگین ۴ تکرار  $\pm SE$  هستند.  
**Figure 6.** Effect of licorice sweat on apple fruit polyphenol oxidase activity  
Means followed by different letters are significantly different at  $P \leq 0.05$

تأثیر غلظت‌های مختلف بادرنجبویه بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز میوه سیب

با توجه به شکل ۷، غلظت‌های مختلف عرق بادرنجبویه روی فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز میوه سیب اثر مهاری دارد. بیش‌ترین مقدار کاهش فعالیت آنزیم در غلظت ۵۰ درصد عرق به میزان ۲۱/۳۷ درصد (در مقایسه با شاهد) در دما و pH ثابت

اتفاق افتاده است. تأثیر عرق بادرنجبویه بر فعالیت آنزیم در یک حالت وابسته به غلظت عرق رخ داده است، به طوری که کم‌ترین تأثیر مهاری در غلظت ۱۰ درصد عرق به میزان ۱۰/۶۹ درصد مشاهده می‌شود. داده‌های حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار غلظت‌های مختلف بادرنجبویه روی فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز در سطح ۰/۰۱ است.





شکل ۷- تأثیر عرق بادرنجبویه بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز میوه سیب  
حروف مختلف بیانگر اختلاف معنی دار در سطح  $P \leq 0.05$  است. مقادیر میانگین  $\pm$  SE تکرار ۴ هستند.  
**Figure 7.** Effect of lemongrass sweat on apple fruit polyphenol oxidase activity  
Means followed by different letters are significantly different at  $P \leq 0.05$

## بحث

(Yoruk & Marshall, ۲۰۰۳). عوامل محیطی مختلف می توانند از طریق تغییرات برگشت پذیر یا برگشت ناپذیر در ساختار پروتئین بر سرعت واکنش های کاتالیز شونده توسط آنزیم پلی فنول اکسیداز تأثیر بگذارند. اثرات دما و pH بر فعالیت آنزیم ها به خوبی شناخته شده است.

دما به طور قابل توجهی بر فعالیت کاتالیتیکی پلی فنول اکسیداز تأثیر می گذارد. کاهش انرژی جنبشی مولکول های واکنش دهنده در دماهای پایین موجب کاهش سرعت عمل آنزیمی می شود. علاوه بر این، در دماهای بالا در اثر واسرشتگی یکپارچگی ساختار سه بعدی ظرف آنزیم آسیب می بیند. تغییرات دما همچنین ممکن است حلالیت اکسیژن را که یکی از سوبستراهای مورد نیاز پلی فنول اکسیداز برای انجام فعالیت کاتالیتیکی خود می باشد را تغییر دهد. دمای بهینه فعالیت پلی فنول اکسیداز برای منابع مختلف گیاهی متفاوت است. همچنین دمای بهینه فعالیت آنزیم به نوع سوبسترا وابسته است (Yoruk & Marshall, ۲۰۰۳). در این تحقیق، ابتدا فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز استخراج شده از سیب زرد در دماهای ۱۵، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۵ درجه سانتی گراد مطالعه شد که دمای بهینه برای فعالیت آنزیم ۳۰ درجه سانتی گراد در حضور سوبسترای پیروگالل تعیین گردید. سپس فعالیت آنزیم در بازه دمایی دقیق ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفت. در این بازه،

طیف کثیری از آنزیم ها به عنوان کاتالیست های زیستی مورد توجه جدی در صنایع پیشرو هستند. فعالیت آنزیم ها صدها سال است که توجه دانشمندان مختلف را به خود جلب نموده است. فعالیت کاتالیتیکی آنزیم ها به عوامل مختلف مانند دما و pH بستگی دارد. مطالعات در شیشه و در زیوه نقش بسیاری از مواد مختلف برای بازدارنگی فعالیت کاتالیتیکی را نشان داده است. آنزیم پلی فنول اکسیداز در اکثر بافت های گیاهی وجود دارد. به دلیل دخالت آن در قهوه ای شدن نامطلوب محصولات کشاورزی گیاهی، مورد توجه بسیاری از محققان در زمینه های زیست شناسی کاربردی، علوم غذایی و آنزیم شناسی صنعتی قرار گرفته است. قهوه ای شدن آنزیمی در نتیجه اکسیداسیون ترکیبات فنولی توسط پلی فنول اکسیداز به کینون ها و پلیمریزاسیون نهایی آن ها به رنگدانه های تیره رنگ اتفاق می افتد. واکنش های قهوه ای شدن اکسیداتیو در بسیاری از غذاهای با منشأ گیاهی با تغییر خواص تغذیه ای باعث کاهش کیفیت می شود. این واکنش ها به طور قابل توجهی علاقه مصرف کننده، عمر انبارداری و ارزش محصولات گیاهی را کاهش می دهد. بنابراین یافتن راهکارهایی برای کاهش فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز در میوه ها و سبزیجات مورد توجه تولیدکنندگان و صاحبان صنایع می باشد

چند ایزوآنزیم برای آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز باشد. در یک مطالعه بر روی قسمت‌های مختلف میوه لوبیا سبز فعالیت تمام ایزوفرم‌ها در pH بین ۶/۸ تا ۷/۲ پایدار بودند اگرچه پایداری دمایی آنها بسیار متفاوت بود. تمام ایزوفرم‌های آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز بیشترین میل ترکیبی را به سوبسترای پیروگالل نشان دادند (Guo et al., ۲۰۰۹). pH بهینه برای آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز استخراج‌شده از جوانه‌های سویا بین ۸ الی ۹ تعیین شده است (Nagai & Suzuki, ۲۰۰۱). در جوانه‌های عدس پلی‌فنول‌اکسیدازها در بازه ۴ الی ۸ بهینه فعالیت را در pH حدود ۴/۵ تا ۵ نشان دادند (Sikora et al., ۲۰۱۹). از مطالعات مختلف چنین برمی‌آید که pH بهینه فعالیت آنزیمی به نوع سوبسترا و گونه گیاهی بستگی دارد (Zhang, ۲۰۲۳).

متابی سولفیت‌سدیم یک ترکیب شیمیایی با فرمول  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  است. متابی سولفیت‌سدیم یک ترکیب یونی حاوی کاتیون سدیم و آنیون متابی سولفیت است. متابی سولفیت‌سدیم به صورت پودر متمایل به سفید به سادگی در آب حل شده و به هنگام حل شدن بوی ناخوشایند گوگردی ایجاد می‌کند. نوع خوراکی این ماده در صنایع غذایی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان، نگهدارنده و ضدعفونی‌کننده جهت جلوگیری از رشد باکتری‌ها، افزایش ماندگاری، جلوگیری از قهوه‌ای شدن و از دست رفتن تازگی میوه‌ها و سبزیجات کاربردهای متعددی دارد. در مطالعات انجام شده در میان عوامل ضد قهوه‌ای، متابی سولفیت‌سدیم یکی از موثرترین آنهاست (Thipnate & Sukhonthara, ۲۰۱۵). در مطالعات قبلی انجام شده متابی سولفیت‌سدیم به طور غیر رقابتی آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز زنجبیل را با استفاده از هر دو متیل کاتکول و پیروکاتکل به‌عنوان سوبسترا مهار کردند (Lim & Wong, 2018). در تحقیق حاضر غلظت‌های ۱ و ۰/۵ و ۰/۳ میلی‌مولار متابی سولفیت‌سدیم در حضور سوبسترای پیروگالل و دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و pH اثر مهار بر روی فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز سیب زرد را داشتند و بیش‌ترین تاثیر مهار بر روی غلظت ۱ میلی‌مولار مشاهده می‌شود. طبق یافته‌های پژوهش حاضر متابی سولفیت‌سدیم به‌عنوان یک عامل شیمیایی موثر در جهت مهار قهوه‌ای شدن عمل می‌کند. در مطالعه روی پلی‌فنول‌اکسیدازهای جوانه‌های عدس با غلظت‌های مختلف متابی سولفیت‌سدیم نیز نتایج مشابه بدست آمده است (Sikora et al., ۲۰۱۹). عمل متابی سولفیت‌سدیم در ممانعت از قهوه‌ای شدن آنزیمی را می‌توان به جلوگیری از پلیمریزاسیون کینون‌ها به دلیل تشکیل کمپلکس‌های کینون- سولفیت و همچنین تاثیر مستقیم متابی سولفیت‌سدیم روی ساختار آنزیم

بهینه دما ۳۲ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز در انواع مختلف گونه‌های گیاهی دماهای بهینه متفاوتی را نشان می‌دهند. دمای بهینه فعالیت اکثر آنها در محدوده ۳۰ الی ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار دارند. توت سیاه در دامنه دمایی ۱۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز دارای فعالیت بود ولی دمای بهینه آن ۲۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شد (Azzouzi, ۲۰۲۲). در یک مطالعه بر روی ویژگی‌های بیوشیمیایی پلی‌فنول‌اکسیدازهای جوانه‌های عدس بهینه فعالیت را در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مشخص کردند (Sikora et al., ۲۰۱۹). این داده به طور مستقیم در بهبود کیفیت برای مصرف‌کنندگان جوانه‌ها مفید ارزیابی شده است. در مطالعات انجام شده روی گیاه جعفری با سوبسترای کاتکول، آنزیم‌های پلی‌فنول‌اکسیداز در ۴۰ درجه سانتی‌گراد عملکرد بهینه نشان دادند (Dogru & Erat, ۲۰۱۲). دمای بهینه برای حداکثر فعالیت پلی‌فنول‌اکسیداز در کاهو و انگور به ترتیب بین ۲۵ تا ۳۵ و ۲۵ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شده که در دماهای کمتر و بیشتر از این دما، فعالیت آنزیم به تدریج کاهش می‌یابد. پلی‌فنول‌اکسیدازهای برخی گیاهان دماهای بالا برای فعالیت بهینه نیاز دارند. طی چندین مطالعه دمای بهینه فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز توت‌فرنگی (Serradell et al., ۲۰۱۴) دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و خرمالو (Navarro et al., ۲۰۱۴) دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شده است. پلی‌فنول‌اکسیدازهای سیب، موز و انبه دارای دمای بهینه ۳۰ درجه سانتی‌گراد هستند (Yoruk & Marshall, ۲۰۰۳). دمای بهینه تعیین شده در این پژوهش در حضور سوبسترای پیروگالل با یافته‌های پژوهش‌های سابق انجام شده تا حدودی مطابق است. pH یکی از عوامل تاثیرگذار بر روی فعالیت آنزیم می‌باشد. در pH بهینه آنزیم بیش‌ترین فعالیت را دارد. تغییرات pH می‌تواند با ایجاد تغییر در ساختار آنزیم (با تغییر در پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی) نقش موثری در میزان فعالیت داشته باشد. همچنین سوبسترا و اسیدهای آمینه مهم واکنشگر در جایگاه فعال آنزیم‌ها از تغییرات pH متاثر می‌شوند. pH بهینه تحت تاثیر عواملی از قبیل ماهیت سوبسترای فنلی، روش‌های استخراج، دما، و سیستم بافر مورد استفاده در حین جداسازی قرار می‌گیرد. برای اغلب آنزیم‌های پلی‌فنول‌اکسیداز pH بهینه در بازه ۵ الی ۸ قرار دارد. در این تحقیق pH بهینه عملکرد آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز میوه سیب زرد در حضور سوبسترای پیروگالل، بافر فسفات سدیم و دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد ۷ تعیین شد. در توت سیاه pH بهینه بین ۶ تا ۷ تعیین شده است (Azzouzi, ۲۰۲۲). وجود چند pH بهینه، می‌تواند نشان دهنده وجود

در تحقیق حاضر از اسید سیتریک در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۳ و ۱ میلی مولار استفاده شد. بیش‌ترین اثر مهار در غلظت ۱ میلی مولار در حضور بافر فسفات ۱۰ میلی مولار ۷ pH و در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد در حضور پیروگالل ۰/۲ مولار مشاهده شد. تأثیر مهار اسید سیتریک بر روی فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز در این تحقیق و نقش آن در جلوگیری از قهوه‌ای شدن آنزیمی با مطالعات قبلی انجام شده همخوانی دارد. بنابراین این ترکیب می‌تواند جهت مهار پلی فنول اکسیداز سیب به کار رود.

تحقیقات انجام شده نشان داده‌اند که خصوصیات آنتی‌اکسیدانی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی سبب کاهش آسیب‌های فیزیولوژیکی مانند قهوه‌ای شدن آنزیمی و افزایش زمان ماندگاری سبزی‌ها و میوه‌ها و حفظ کیفیت آنها می‌گردد. در پژوهش‌های سابق انجام شده تأثیر مثبت آویشن کوهی و باغی در کاهش فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز توت‌فرنگی اثبات شده است (Jannati et al., ۲۰۱۵). عصاره گل ختمی اثر ضدقهوه‌ای و کاهش فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز بر قطعات بریده میوه سیب را نشان داده است. خواص آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌های گل ختمی ممکن است مهار پلی فنول اکسیداز را توضیح دهد (Wessels et al., ۲۰۱۴). pH پایین عصاره حاصل از گل‌های ختمی ممکن است منعکس‌کننده محتوای بالای از اسیدهای آلی مانند اسید سیتریک، اسید مالیک، اسید تارتاریک و اسید اگزالیک باشد. همانطور که در قبل گفته شد، اسیدهای آلی علاوه بر کاهش pH قادر به تشکیل کمپلکس با مس، کوفاکتور پلی فنول اکسیداز و در نتیجه بر فعالیت آنزیم تأثیر می‌گذارند. تأثیر برخی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند در جلوگیری از قهوه‌ای شدن آنزیمی نشان داده شده است (Azzouzi, ۲۰۲۲) و (Li et al., ۲۰۱۹). برخی از پلی فنول‌ها آنزیم پلی فنول اکسیداز را به‌صورت رقابتی، غیررقابتی یا با عمل به‌عنوان یک عامل کلات‌کننده مهار می‌کنند. گیاهان دارویی حاوی مقادیر قابل توجهی اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها به ویژه تانن‌های هیدرولیز شونده و متراکم هستند (Wessels et al., ۲۰۱۴). در یک مطالعه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی تیمول در برابر قهوه‌ای شدن پریکارپ و پوسیدگی میوه گرمسیری لونگان (*Dimocarpus longan*) بررسی و نتایج نشان داد که بخور تیمول به شکل معنی‌دار از فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز جلوگیری کرده و پوسیدگی میوه را به عقب انداخت (۲۰۲۱) (Khan et al., ۲۰۱۴). در این تحقیق هر یک از عرقیات کاسنی، شیرین‌بیان و بادرنجبویه با غلظت‌های ۱۰ تا ۵۰ درصد دارای اثر

پلی فنول اکسیداز به عنوان بازدارنده برگشت‌ناپذیر (غیررقابتی) مرتبط دانست (Valero et al., ۱۹۹۹).

اسیدهایی که به طور طبیعی در برخی از محصولات غذایی خوراکی وجود دارند، مانند اسید اسکوربیک، اسید سیتریک، اسید مالیک یا اسید فسفریک، pH محیط را کاهش می‌دهند. آنزیم پلی فنول اکسیداز عموماً از نظر کاتالیزوری در محدوده pH بین ۴ تا ۸ فعال‌تر است و فعالیت آنزیم به شدت تحت تأثیر اسیدهای آلی قرار می‌گیرد. اسید آسکوربیک به صورت رقابتی و اسید سیتریک به شکل غیررقابتی از فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز برگ‌های کاساوا (*Manihot esculenta*) (Crantz) ممانعت به عمل می‌آورند (Wong & Lee ۲۰۱۴). تأثیر اسید سیتریک بر کاهش فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز در مطالعات دیگر و از منابع مختلف گیاهی نشان داده شده است. نقش اسیدهای آلی مانند اسید مالیک و اسید سیتریک در پوره موز برای ممانعت از قهوه‌ای شدن نشان داده شده است (۲۰۰۷) (Chaisakdanugull et al., ۲۰۰۷). در مطالعه حاضر در غلظت‌های مورد استفاده تأثیر اسید سیتریک کمتر از متابی سولفیت سدیم بوده است. در مطالعات دیگر نیز نقش اسید سیتریک در بازدارندگی فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز به شکل وابسته به غلظت نشان داده شده است (Sikora et al., ۲۰۱۹). اسید می‌تواند به پروتونه شدن گروه‌های عاملی ضروری برای کاتالیز، تغییرات ساختاری در جایگاه فعال آنزیم، دناتوره شدن غیرقابل برگشت پروتئین و یا کاهش پایداری سوبسترا کمک کند. علاوه بر این، اسید ممکن است اتصال مس به جایگاه فعال آنزیم را تضعیف و یا اینکه اسید سیتریک مس را کلاته نماید (۲۰۲۰) (Moon et al., ۲۰۲۰). تیمار سطوح بریده شده سیب با محلول اسید سیتریک و یا اسید اسکوربیک به تنهایی در مهار قهوه‌ای شدن موثر نبود ولی محلول ترکیبی اسید سیتریک و اسید آسکوربیک تأثیر چشمگیری در کاهش فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز نشان داد (Pizzocaro et al., ۱۹۹۳). در مطالعه روی میوه گرمسیری گواوا (*Psidium guajava* L.) تأثیر اسید سیتریک روی فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز خیلی کمتر از اسید آسکوربیک بود (Thipnate & Sukhonthara, ۲۰۱۵). pH پایین عصاره گل‌های ختمی ممکن است منعکس‌کننده محتوای بالای از اسیدهای آلی مانند اسید سیتریک، اسید مالیک، اسید تارتاریک و اسید اگزالیک باشد. اسیدهای آلی علاوه بر کاهش pH قادر به تشکیل کمپلکس با مس، کوفاکتور پلی فنول اکسیداز و در نتیجه بر فعالیت آنزیم تأثیر می‌گذارند (Wessels et al., ۲۰۱۴). شاید اسید اگزالیک با اتصال به مس و تشکیل یک کمپلکس غیرفعال-کننده به‌عنوان یک مهارکننده غیررقابتی عمل کند.

در مقایسه با روش‌های فیزیکی و شیمیایی مختلف برای مهار آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز و حفظ کیفیت و سلامت محصولات میوه‌ای، مواد طبیعی مانند اسانس‌ها و عرقیات با توجه به داشتن خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی دارای اهمیت مضاعف هستند. همچنین، علاقه فزاینده‌ای در بین صاحبان صنایع برای بالابردن میزان فعالیت ضد قهوه‌ای شدن در محصولات جانبی و ضایعات غذایی وجود دارد که از آنها استفاده مجدد به عمل آید.

### سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و قطب آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی دانشگاه اصفهان کمال تشکر را دارند.

مهاری بر فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز بودند. بیش‌ترین تاثیر مهاری در غلظت ۵۰ درصد برای هر یک از عرقیات مشاهده شد. تاکنون مطالعه‌ای در مورد تاثیر عرقیات کاسنی، شیرین بیان، بادرنجبویه بر روی فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز در سیب زرد گزارش نشده است.

### نتیجه‌گیری

طبق داده‌های این پژوهش، ترکیبات طبیعی و شیمیایی مورد استفاده دارای اثر مهاری بر روی فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز سیب زرد بودند. شناسایی و توسعه عوامل ضد قهوه‌ای شدن میوه‌ها و سبزیجات در صنایع غذایی دارای اهمیت فراوانی است. سلامت انسان، اثربخشی و ارزان بودن از عوامل مهمی هستند که جایگزینی ترکیبات طبیعی با مواد شیمیایی را توجیه می‌کنند.

## References

- Azzouzi, N., Bouchaib, A., Britel, M.R. & Maurady, A.** 2022. Characterization of polyphenol oxidase (ppo) from blackberry thorny wild *Rubus fruticosus* and its inhibition using natural extracts. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal* 10(3): 1205-1221. doi: 10.12944/CRNFSJ.10.3.33.
- 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. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- Can, Z., Dincer, B., Sahin, H., Baltas, N., Yildiz, O. and Kolayli, S.** 2014. Polyphenol oxidase activity and antioxidant properties of Yomra apple (*Malus communis* L.) from Turkey. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 29: 829-835. doi: 10.3109/14756366.2013.858144.
- Chaisakdanugull C, Theerakulkait C, Wrolstad RE.** 2007. Pineapple juice and its fractions in enzymatic browning inhibition of Banana [Musa (AAA Group) Gros Michel]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 55(10): 4252-4257. doi: 10.1021/jf0705724.
- Cho Y.K., Ahn H.K.** 1999. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: II. Inhibition and catalytic mechanism. *Journal of Food Biochemistry* 23: 593-605. doi: 10.3390/foods8050154.
- Coseteng, M.Y. & Lee, C.Y.** 1987. Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *Journal of Food Science* 52: 985-989. doi: 10.1111/j.1365-2621.1987.tb14257.x.
- De la Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E., Moyers-Montoya, E., Villegas-Ochoa, M., Ayala-Zavala, J.F., Hernandez, J. & Gonzalez-Aguilar, G.A.** 2011. Mechanism for the inhibition of apple juice enzymatic browning by *Palo fierro* (desert ironweed) honey extract and other natural compounds. *LWT-Food Science and Technology* 44: 269-276. doi: 10.1016/j.lwt.2010.05.030.
- Devece, C., Rodriguez-Lopez, J.N., Fenoll, L.G., Tudela, J., Catala, J.M., de los Reyes, E. & Garcia-Canovas, F.** 1999. Enzyme inactivation analysis for industrial blanching applications: comparison of microwave, conventional, and combination heat treatments on mushroom polyphenoloxidase activity. *Journal of Agricultural and Food chemistry* 47: 4506-4511. doi: 10.1021/jf981398.
- Dogru, Y.Z. & Erat, M.** 2012. Investigation of some kinetic properties of polyphenol oxidase from parsley (*Petroselinum crispum*, Apiaceae). *Food Research International*. 49: 411-415. doi: 10.1016/j.foodres.2012.07.028.
- Duong-Ly, K.C. & Gabelli, S.B.** 2014. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods Enzymol.* 541: 85-94. doi: 10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0.
- Guo, L., Ma, Y., Shi, J. & Xue, S.** 2009. The purification and characterisation of polyphenol oxidase from green bean (*Phaseolus vulgaris* L.).

- Food Chemistry 117: 143-151. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.03.088.
- Hamdan, N., Lee, C.H., Wong, S.L., Fauzi, C.E.N.C.A., Zamri, N.M.A. & Lee T.H.** 2022. Prevention of enzymatic browning by natural extracts and genome-editing: A review on recent progress. *Molecules*. 27(3): 1101. doi: 10.3390/molecules27031101.
- Hemmler, D., Roullier-Gall, C., Marshall, J.W., Rychlik, M., Taylor, A.J. & Schmitt-Kopplin, P.** 2018. Insights into the chemistry of non-enzymatic browning reactions in different ribose-amino acid model systems. *Scientific Reports* 8: 16879. doi: 10.1038/s41598-018-34335-5.
- Honisch, C., Osto, A., de Matos, A.D., Vincenzi, S. & Ruzza, P.** 2020. Isolation of a tyrosinase inhibitor from unripe grapes juice: A spectrophotometric study. *Food chemistry* 305 :125506. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125506.
- Jannati, M., Abdossi, V. & Mashhadi Akbar Boujar, M.** 2015. Effect of calcium chloride and thyme essential oils application on some postharvest characteristics of strawberry fruit cv. Selva. *Agroecology Journal* 10: 25-32 (In Persian).
- Khan, M.R., Huang, C., Zhao, H., Huang, H., Ren, L., Faiq, M., Hashmi, M.S., Li, B., Zheng, D., Xu, Y., Su, H. & An, J.** 2021. Antioxidant activity of thymol essential oil and inhibition of polyphenol oxidase enzyme: A case study on the enzymatic browning of harvested longan fruit. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 8 (61): 1-10. doi: 10.1186/s40538-021-00259-y.
- Li, J., Wang, H., Lu, Y., Mao, T.F., Xiong, J., He, S.L. & Liu, H.** 2019. Inhibitory effect of tartary buckwheat seedling extracts and associated flavonoid compounds on the polyphenol oxidase activity in potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Integrative Agriculture*, 18(9): 2173-2182. doi: 10.1016/S2095-3119(19)62692-4.
- Lim, W.Y. & Wong, C.W.** 2018. Inhibitory effect of chemical and natural anti-browning agents on polyphenol oxidase from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Journal of Food Science And Technology* 55: 3001-3007. doi: 10.1007/s13197-018-3218-7.
- Martinez-Hernandez, G.B., Castillejo, N. & Artes-Hernandez, F.** 2019. Effect of fresh cut apples fortification with lycopene microspheres, revalorized from tomato by products, during shelf life. *Postharvest Biology and Technology* 156:110925. doi: 10.1016/j.postharvbio.2019.05.026
- Moon, K.M., Kwon, E.B., Lee, B. & Kim, C.Y.** 2020. Recent trends in controlling the enzymatic browning of fruit and vegetable products. *Molecules* 25:2754. doi: 10.3390/molecules25122754
- Nagai, T. & Suzuki, N.** 2001. Partial purification of polyphenol oxidase from Chinese cabbage *Brassica rapa* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 3922-3926. doi: 10.1021/jf000694v. DOI: 10.1021/jf000694v.
- Pizzocaro, F., Torreggiani, D. & Gilardi, G.** 1993. Inhibition of apple polyphenoloxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride. *Journal of Food Processing and Preservation* 17: 21-30. doi: 10.1111/j.1745-4549.1993.tb00223.x.
- Serradell, M.D.L.A., Rozenfeld, P.A., Martinez, G.A., Civello, P.M., Chaves, A.R., Anon, M.C.** 2000. Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch., cv Selva): Characterisation and partial purification. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 1421-1427. doi: 10.1002/1097-0010(200007)80:9<1421::AID-SFA649>3.0.CO;2-K.
- Sikora, M., Swieca, M., Franczyk, M., Jakubczyk, A., Bochnak, J. & Zlotek, U.** 2019. Biochemical properties of polyphenol oxidases from ready-to-eat lentil (*Lens culinaris* medik.) sprouts and factors affecting their activities: A search for potent tools limiting enzymatic browning. *Foods*. 8 (5): 154. doi: 10.3390/foods8050154.
- Soysal, C.** 2009. Effects of green tea extract on golden delicious apple polyphenoloxidase and its browning. *Journal of Food Biochemistry* 33 (1): 134-148. doi: 10.1111/j.1745-4514.2008.00201.x.
- Strelec, I., Burić, P., Janković, I., Kovač, T. & Molnar, M.** 2017. Inhibitory effect of coumarin derivatives on apple (cv. Idared) polyphenol oxidase. *Croatian Journal of Food Science and Technology*9:57-65. doi: 10.17508/CJFST.2017.9.1.08.
- Sullivan, M.L.** 2015. Beyond brown: Polyphenol oxidases as enzymes of plant specialized metabolism. *Frontiers in Plant Science* 14; 5:783. doi: 10.3389/fpls.2014.00783.
- Thipnate, P. & Sukhonthara, S.** 2015. Control of enzymatic browning in apple and potato purees by using guava extract. *Science, Engineering and Health Studies* 9(2): 59-68.
- Tsikrika, K., Lemos, M.A., Chu, B.S., Bremner, D.H. & Hungerford, G.** 2022. Effect of ultrasound on the activity of mushroom (*Agaricus bisporus*) polyphenol oxidase and observation of structural changes using time-resolved fluorescence. *Food and Bioprocess Technology* 15: 656-668. doi: 10.1007/s11947-022-02777-5.
- Valero, E., Varon R. & Garcia-Carmona F.** 1992. Kinetic study of the effect of metabisulfite on polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and*

- Food Chemistry 40 (5): 904-908. doi: 10.1021/jf00017a042
- Walker, J.R. & Ferrar, P.H.** 1998. Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 15: 457-498. doi: 10.1080/02648725.1998.10647966.
- Wessels, B., Schulze-Kaysers, N., Damm, S., & Kunz, B.** 2014. Effect of selected plant extracts on the inhibition of enzymatic browning in fresh-cut apple. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 87: 16-23. doi: 10.5073/JABFQ.2014.087.003.
- Wong, C.W. & Lee A.P.L.** 2014. Inhibitory effect of onion extract on cassava leaf (*Manihot esculenta* Crantz) polyphenol oxidase. *International Food Research Journal* 21(2): 755-758.
- Yoruk, R. & Marshall, M.R.** 2003. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review 1. *Journal of Food Biochemistry* 27: 361-422. doi: 10.1111/j.1745-4514.2003.tb00289.x.
- Zhang, S.** 2023. Recent Advances of polyphenol oxidases in plants. *Molecules* 28(5): 2158. doi: 10.3390/molecules28052158.

\*\*\*\*\*

**How to cite this article:**

- Chaparzadeh N, Ali-Pashaei-Dehkhargani M & Zarandi-Miandoab L** 2024. The effect of some chemical and natural compounds on polyphenol oxidase activity from apple fruits. *Nova Biologica Reperta* 11: 1-14. (In Persian).  
چاپارزاده. ن، علی پاشائی دهخوارقانی. م، زرنندی میانداوب. ل. ۱۴۰۳. تاثیر برخی ترکیبات شیمیایی و طبیعی بر فعالیت پلی فنول اکسیداز میوه سیب. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۱۱: ۱-۱۴