مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

بررسی اثر یون‌های مس و روی بر فعالیت آنزیم میروزیناز و تشکیل سولفارافان در گیاه *Lepidium draba*

مهدی محمدی[۱]، علی ریاحی مدوار*[۲]، شهرام پورسیدی[۳]، مریم امینی‌زاده[۱]

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

[۲] استادیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

[۳] استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۲۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۱۱

چکیده

میروزیناز یک آنزیم بتا-تیوگلوکوزید گلوکوهیدرولاز است که با جدا نمودن یک گلوکز از گلوکوزینولات‌ها یک حدواسط ناپایدار بنام آگلیکون تولید می‌نماید. اگلیکون تحت شرایط محیط بازآرایی نموده و به ترکیبات مختلفی از قبیل تیوسیانات، ایزوتیوسیانات و نیتریل تبدیل می‌شود که از بین آن‌ها، ایزوتیوسیانات‌ها اهمیت دارویی بسیاری دارند. سولفارافان یکی از مهم‌ترین ایزوتیوسیانات‌ها است که از هیدرولیز گلوکوزینولات گلوکورافانین توسط میروزیناز بدست می‌آید. در این تحقیق، جهت بررسی اثر یون‌های مس و روی بر فعالیت آنزیم میروزیناز و بازآرایی قطعه آگلیکون در گیاه ازمک (*Lepidium draba*)، بترتیب مقدار گلوکز و مقدار سولفارافان تولید شده مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم میروزیناز در غلظت ۸ میکرومولار یون روی در مقایسه با نمونه شاهد می‌باشد، البته با افزایش غلظت این یون در محیط، فعالیت آنزیم بطور معنی‌داری کاهش یافت. در حالیکه در حضور یون‌های مس، فعالیت این آنزیم در تمامی غلظت‌ها نسبت به نمونه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت و بیشترین میزان فعالیت در غلظت ٤ میکرومولار یون مس مشاهده گردید. از طرف دیگر، مقدار سولفارافان در حضور هر دو یون به ویژه یون روی نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت. از مجموع نتایج چنین استنباط می‌شود، یون‌های مذکور به ویژه عنصر مس در غلظت‌های کم اثر تحریکی بر فعالیت میروزیناز دارد. همچنین این یون‌ها به ویژه یون روی بر بازآرایی آگلیکون نیز تاثیر داشته و مسیر بازآرایی را به سمت ترکیباتی دیگر، غیر از ایزوتیوسیانات‌ها منحرف می‌کنند. لذا حضور یون‌های فلزی در طی واکنش سبب کاهش تولید سولفارافان می‌گردد.

کلمات کلیدی: *گلوکوزینولات‌ها، میروزیناز، ایزوتیوسیانات، سولفارافان، گلوکورافانین.*

*نویسنده مسئول: علی ریاحی مدوار تلفن: ۰۳۴۳۳۷۷۶۶۱۰ Email: riahi.ali@gmail.com

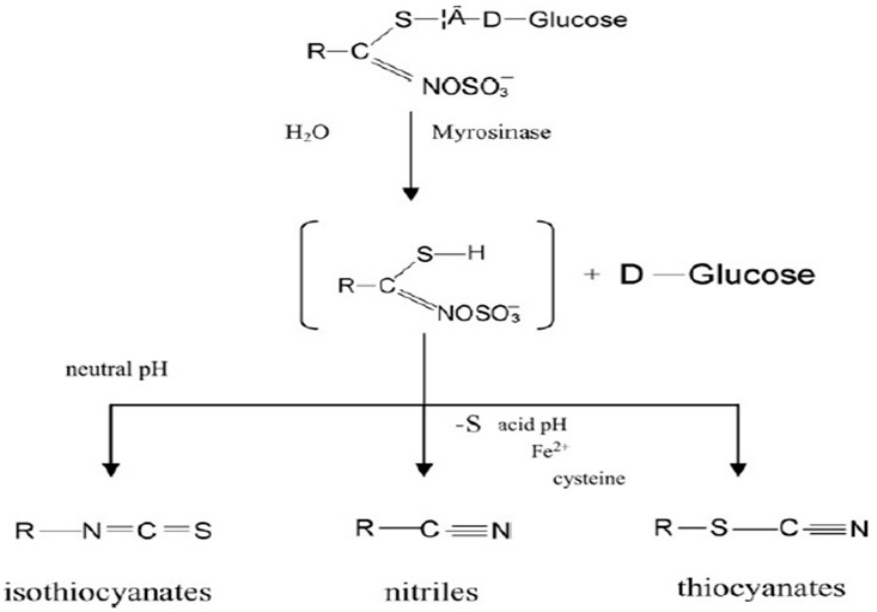
مقدمه

گلوکوزینولات‌ها گروهی از ترکیبات ثانویه حاوی سولفور و نیتروژن هستند که از اسیدهای آمینه مشتق شده‌اند و در گیاهان خانواده Brassica به فراوانی یافت می‌شوند. تا به امروز حدود ۱۲۰ نوع گلوکوزینولات مختلف گزارش شده است (Fahey et al., 2001) این ترکیبات که در واکوئل سلول‌های گیاهان ذخیره می‌شوند، پس از خورده شدن توسط علف‌خواران، شکستن یا حمله پاتوژن‌ها به سلول در تماس با آنزیم میروزیناز (β- تیو گلوکوزید گلوکوهیدرولاز) (EC 3.2.3.1) قرار می‌گیرند. میروزیناز پیوند β-تیوگلوکوزیدی موجود در مولکول‌های گلوکوزینولات را می‌شکند و گلوکز، سولفات و یک ترکیب حدواسط ناپایدار به نام آگلیکون تولید می‌کند (Liang et al., 2006). آگلیکون به صورت خود بخودی و بسته به شرایط محیط ترکیبات مختلفی از قبیل ایزوتیوسیانات، نیتریل و تیوسیانات تولید می‌کند (شکل ۱) (Rask et al., 2000). گلوکورافانین (٤-متیل سولفینیل بوتیل گلوکوزینولات) نوعی گلوکوزینولات است که تحت هیدرولیز آنزیمی میروزیناز تولید ایزوتیوسیانات سولفارافان (۱-ایزوتیوسیانات-٤-متیل سولفونیل بوتان) می‌نماید که یک ماده شگفت‌انگیز از نظر دارویی است (Traka & Richard, 2009). از مهم‌ترین خواص درمانی و کلینیکی سولفارافان می‌توان به القای آپوپتوز (Choi et al., 2008)، خواص ضد باکتریایی (Fahey et al., 2002)، ضد هیستون داستیلاز (Myzak et al., 2004)، خاصیت آنتی اکسیدانی (Yeh & Yen, 2009; Gao et al., 2001) و ضد متاستازی (Singh et al., 2009) و غیره اشاره نمود. از طرفی نیتریل‌ها خواص درمانی مفیدی را نشان نداده‌اند و حتی ممکن است برای سلول‌های نرمال هم سمیت ایجاد کنند (Matusheski et al., 2001). حضور میروزیناز در تمامی گیاهان حاوی گلوکوزینولات اثبات گردید (Rask et al., 2000). میروزیناز بدست آمده از دانه‌های خردل یک گلایکوپروتئین است که میزان کربوهیدرات-های آن به ۱۸ درصد می‌رسد و اغلب قندهای آن از نوع هگزوز می‌باشد. آنزیم میروزیناز اغلب با گلوکوزینولات‌ها یافت می‌شود. این متابولیت‌ها در تمام گونه‌های خانواده شب‌بو و همچنین در گونه‌هایی چون Bataceae ، Caricaceae، Euphorbiaceae، Moringaceae نیز گزارش شده‌اند (Ohtsuru et al., 1972). در قارچ‌هایی چون Aspergillus sydowi و Aspergillus. niger و باکتری‌های اولیه Enterobacter cloacae و Paracolobactrum aerogenoides آنزیم‌هایی با خصوصیات میروزیناز مشاهده شده است. همچنین در بافت‌های پستانداران و شته کلم *Brevicoryne brassicae* و *Lipaphis erisimi* آنزیم‌های مشابهی گزارش شده است.

میزان فعالیت آنزیم میروزیناز در گونه‌های مختلف گیاهی مورد آزمایش قرار گرفته و مشخص شده که آنزیم میروزیناز در *Sinapis alba* بیشترین فعالیت و در *Brassica rapa* کمترین فعالیت را دارد (Henderson et al., 1972). مطالعات گذشته نشان داده است که آنزیم میروزیناز دارای دو زیر واحد کاملاً مساوی با وزن مولکولی ۷۵ KDa می‌باشد (Bones et al., 1989). مطالعات ایمونولوژی نشان داده است که میروزیناز با اتصال به پروتئین‌های متصل شونده می‌تواند مولکول‌هایی با وزن بالا ایجاد کند (Eriksson et al., 2002). در خانواده Brassica میروزیناز، کمپلکس‌هایی با وزن مولکولی متفاوت ایجاد می‌کند (۶۰۰-۵۰۰ KDa، ۳۵۰-۲۷۰ KDa و ۲۰۰-۱۴۰ KDa) (Bellostas et al., 2008).

مشخص شده است که آنزیم میروزیناز استخراج شده از *Sinapis alba* حاوی یون روی است (Burmeister et al., 1997) بنابراین ممکن است که روی یا دیگر یون‌های فلزی در ساختار میروزیناز سایر اعضای خانواده Brassica وجود داشته و نقش مهمی را در تجزیه گلوکوزینولات-ها داشته باشند. همچنین نشان داده شده است که یون روی در گیاه بروکلی باعث افزایش تولید سولفارافان و آزاد سازی گلوکز می‌شود (Liang et al., 2006). بنابراین، این فرضیه وجود دارد که یون روی ممکن است بر فعالیت آنزیم میروزیناز و یا بازآرایی قطعه آگلیکون تاثیر بگذارد و موجب افزایش سولفارافان شود (Liang et al., 2006). به طور کلی مشخص شده است که pH پایین، وجود یون فرو و پروتئین‌های Epithiospecifier برای تشکیل نیتریل‌ها در هنگام شکستن گلوکوزینولات‌ها به وسیله آنزیم میروزیناز مفید هستند (Zabala et al., 2005). البته یون فرو تاثیری بر آزادسازی گلوکز در تجزیه سینیگرین توسط میروزیناز در شرایط اسیدی ندارد (Butcher et al., 1984). همچنین گزارش شده است که یون‌های مس و منیزیم باعث جلوگیری از تولید سولفارافان و آزاد سازی گلوکز در بروکلی می‌شوند (Liang et al., 2006) اما مشخص نیست که بر فعالیت میروزیناز اثر دارد یا بر بازآرایی اگلیکون. گیاه ازمک با نام علمی *Lipidium draba* L از خانواده براسیکا بوده و یک گیاه تجمع کننده فلزات سنگین از قبیل مس و روی می‌باشد (Chehregani et al., 2007). این گیاه همچنین یک منبع بی‌نظیر از گلوکورافانین برای تولید سولفارافان است (Powell et al., 2005). تاکنون گزارشی مبنی بر بهینه سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی در این گیاه منتشر نشده است، این در حالی است که گیاه ازمک بطور عمده دارای دو نوع گلوکوزینولات گلوکورافانین و گلوکوسینالبین است (Powell et al., 2005) و این ویژگی عمل استخراج گلوکورافانین از این گیاه را نسبت به سایر گیاهان خانواده براسیکا به مراتب آسان‌تر می‌کند (Powell et al., 2005). همانطور که در بالا اشاره گردید، حضور فلزات مختلف می‌تواند با اثر بر

فعالیت آنزیم میروزیناز و بازآرایی قطعه آگلیکون، تولید سولفارافان را تحت تاثیر قرار دهد. لذا در این مطالعه، بمنظور بررسی اثرات غلظت‌های مختلف یون‌های روی و مس بر فعالیت آنزیم میروزیناز و بازآرایی قطعه آگلیکون در گیاهچه-های ازمک، بترتیب محتوی گلوکز و سولفارافان تولید شده مورد آنالیز قرار گرفتند.



شکل ۱- واکنش هیدرولیز گلوکوزینولات توسط آنزیم میروزیناز (Liang et al., 2006).

Figure 1- Reaction of glucosinolates hydrolysis by myrosinase (Liang et al., 2006).

مواد و روش‌ها

کشت بذرها و تولید گیاهچه

بذرهای بالغ گیاه ازمک از اطراف استان کرمان در اواخر بهار و اوایل تابستان برداشت شد و توسط یک گیاه‌شناس صحت گیاه مورد نظر تایید گردید. جهت ضد عفونی سطحی، ابتدا بذرها با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه آغشته شدند و پس از شستشو با آب مقطر استریل به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۳ درصد غوطه‌ور گردیدند و در نهایت با مقدار زیادی آب مقطر استریل شسته شدند. تعداد ۳۰ عدد بذر روی محیط MS (Murashige & Skook, 1962) حاوی آگار ۰/۸ درصد با فاصله تقریبی ۰/۵ سانتی‌متر از یکدیگر در داخل پتری قرار گرفتند. سپس پتری‌ها به ژرمیناتور با دمای کنترل شده ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۶۰ درصد قرار داده شدند. گیاهچه های ۷ روزه از محیط کشت

خارج و پس از شست و شو با آب مقطر استریل جهت آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی اثر یون‌ها بر فعالیت آنزیم میروزیناز و بازآرایی قطعه آگلیکون

به منظور بررسی اثر یون‌ها بر فعالیت آنزیم میروزیناز و بازآرایی قطعه آگلیکون از روش تغییر یافته Liang و همکاران (۲۰۰٦)، استفاده شد. به طور خلاصه، مقدار ۲ گرم از گیاهچه‌های ۷ روزه از محیط کشت خارج و بعد از شستشو با آب مقطر استریل در داخل هاون به صورت کامل ساییده شدند. در مرحله بعد یک میلی‌لیتر از محلول حاوی یون‌های سولفات مس و سولفات روی با غلظت‌های مختلف (صفر به عنوان شاهد، ٤ ، ۸ و ١٦ میکرومولار) در pH خنثی به بافت-های ساییده شده اضافه گردید. سپس مخلوط حاصل به مدت دو ساعت در دمای ٤٢±٢ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در ادامه مخلوط حاصل به دو بخش کاملاً مساوی جهت تعیین غلظت سولفارافان و تعیین غلظت گلوکز تقسیم شدند.

تعیین غلظت سولفارافان

جهت تعیین مقدار سولفارافان تولید شده تحت شرایط آزمایش، از روش Liang و همکاران (۲۰۰٦) با اندکی تغییرات استفاده شد. به یک میلی‌لیتر از مخلوط بدست آمده (اشاره شده در قسمت قبل)، ۵ میلی‌لیتر استونیتریل اضافه و سپس به مدت ۳ دقیقه سونی‌کیت شد. در ادامه، مخلوط حاصله با دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. محلول رویی برداشته و پس از فیلتراسیون با استفاده از فیلتر سر سرنگی ۰/۲ میکرومتری، به ستون C18 (25 × 0.46 cm) دستگاه HPLC (Agilent 1100 series, USA) تزریق گردید. از طول موج nm ۲٥٤ جهت شناسایی سولفارافان استفاده شد. از محلول استاندارد سولفارافان (سیگما) برای تعیین زمان نگه‌داری نمونه در ستون و همچنین تعیین مقدار سولفارافان تولید شده استفاده گردید.

تعیین غلظت گلوکز

جهت تعیین غلظت گلوکز، به منظور بررسی فعالیت آنزیم میروزیناز از روش تغییر یافته Wilkinson و همکاران استفاده شد (Wilkinson et al., 1984). به این منظور، به یک میلی‌لیتر از مخلوط بدست آمده (اشاره شده در قسمت قبل)، مقدار ۳ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه و سپس به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۸۰۰۰ در دمای اتاق سانتریفوژ گردید. در نهایت محلول رویی برداشته و پس از فیلتراسیون با استفاده از فیلتر سر سرنگی µm ۰/۲، جهت سنجش میزان گلوکز از دستگاه بیواسکن (Bioscan Metrohm, Switzerland) استفاده شد. همچنین از غلظت‌های مختلف گلوکز جهت ترسیم منحنی استاندارد استفاده گردید.

آنالیز آماری

تمامی آزمایش‌ها با ۳ تکرار مستقل و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. میانگین داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS توسط آزمون دانکن (Duncan test) و با در نظر گرفتن سطح اطمینان $P\leq0.05$ مورد تجزیه واریانس یک عاملی (One way ANOVA) قرار گرفتند.

نتایج

تعیین غلظت سولفارافان

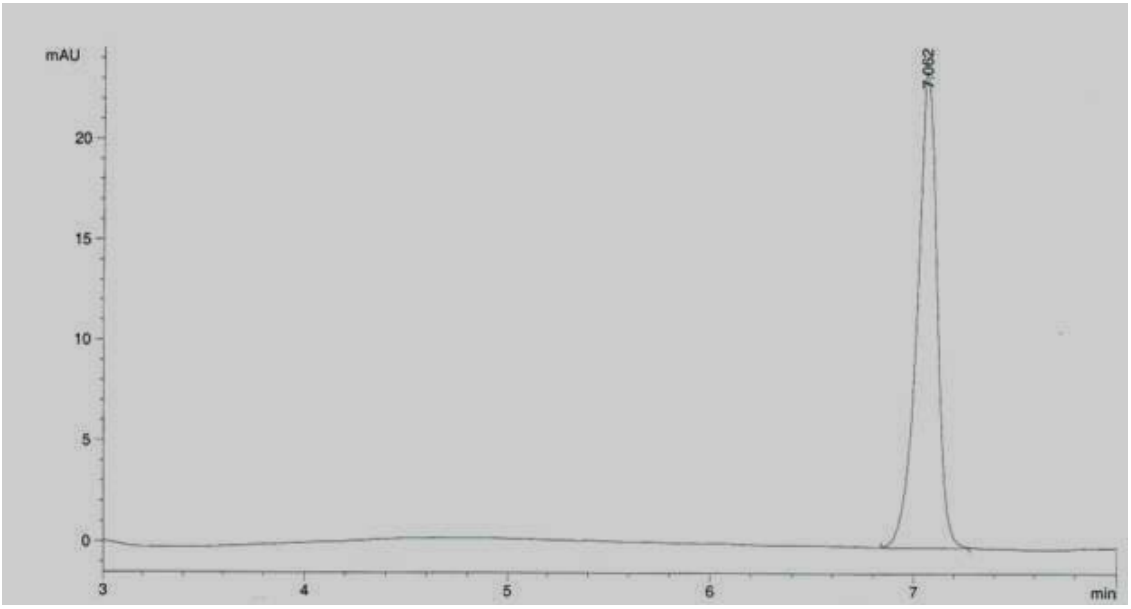
از استاندارد سولفارافان جهت تعیین زمان نگه‌داری نمونه در ستون استفاده شد. همانطور که در شکل ۲ قابل مشاهده است، ۷ دقیقه بعد از تزریق نمونه استاندارد به ستون، پیک نمونه خارج شد. همچنین پیکی مشابه در همین زمان برای نمونه‌های شاهد و تیمار شده نیز مشاهده گردید (شکل مربوطه نشان داده نشد).

اثر یون‌های روی و مس بر فعالیت آنزیم میروزیناز

در حالی‌که پایین‌ترین غلظت روی (٤ میکرومولار) بر فعالیت آنزیم میروزیناز تاثیر نداشت، فعالیت آنزیم در حضور غلظت ۸ میکرومولار روی به طور معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد افزایش نشان داد. ولی با افزایش غلظت این یون در محیط، کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم نسبت به نمونه شاهد مشاهده گردید (شکل ۳، A). همانطور که در شکل ۳، B قابل مشاهده است، فعالیت این آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف یون مس نسبت به نمونه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافته است. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در حضور غلظت ٤ میکرومولار یون مس مشاهده گردید و با افزایش غلظت این یون در محیط، میزان فعالیت آن نسبت به غلظت ٤ میکرومولار به طور معنی داری کاهش نشان داد. اطلاعات مربوط به تجزیه واریانس نتایج حاصله در جدول ۱ نشان داده شده است.

اثر یون‌های روی و مس بر بازآرایی قطعه آگلیکون بسمت تولید سولفارافان

تشکیل سولفارافان در تیمار با یون روی به طور معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت ولی تفاوت قابل توجهی بین تولید سولفارافان در تیمار با غلظت‌های مختلف این یون مشاهده نشد (شکل ٤، A). تشکیل سولفارافان در حضور یون مس نیز نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت. در حالیکه میزان کاهش در غلظت ٤ میکرومولار در مقایسه با نمونه شاهد معنی‌دار نبود، کاهش معنی‌دار مقدار سولفارافان در غلظت‌های بالاتر این یون مشاهده گردید و بیشترین مقدار کاهش در غلظت ۸ میکرومولار رخ داد (شکل ٤، B). اطلاعات مربوط به تجزیه واریانس نتایج حاصله در جدول ۲ نشان داده شده است.



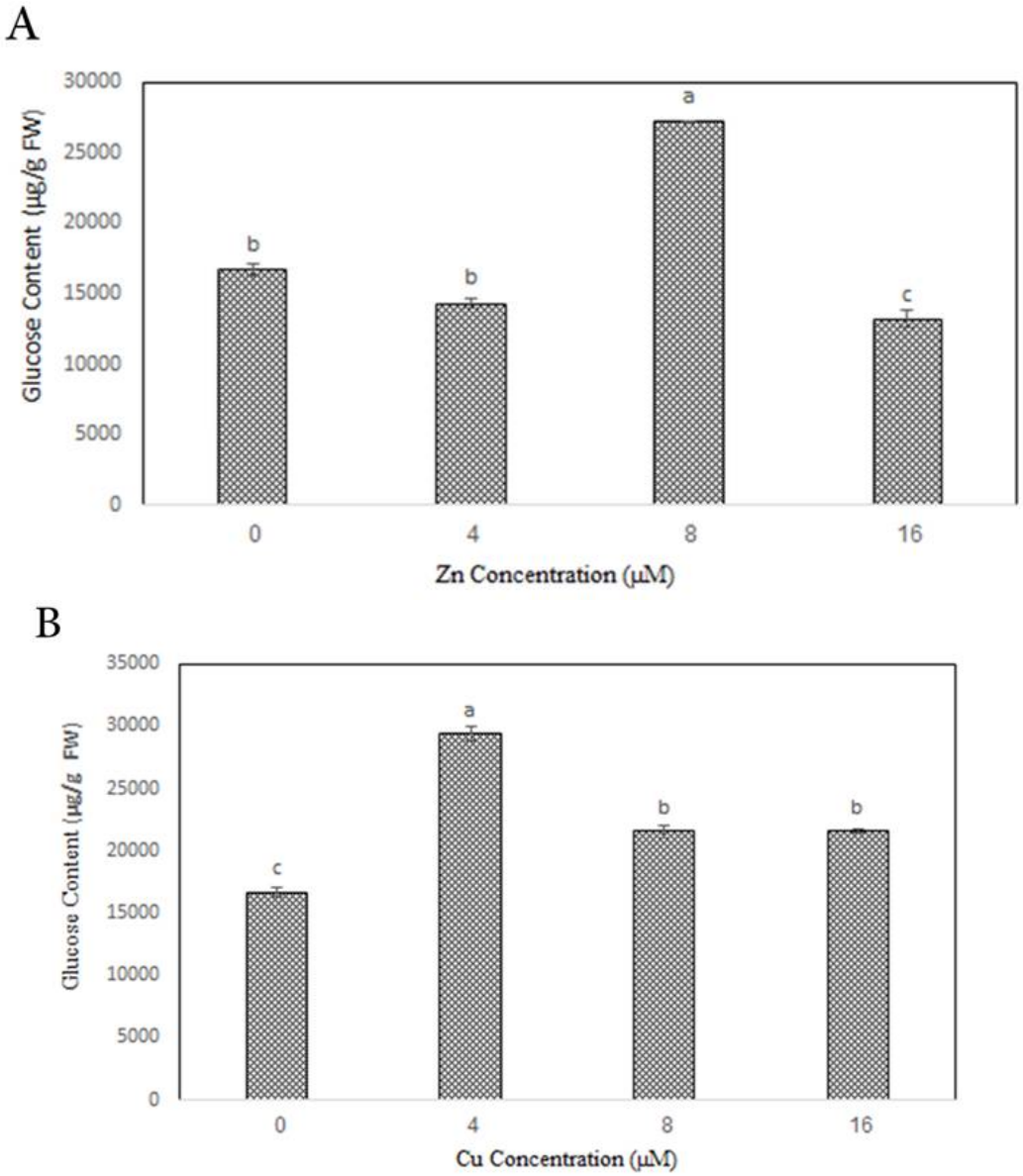
شکل ۲- کروماتوگرام مربوط به نمونه استاندارد سولفارافان. زمان نگه‌داری نمونه در ستون هفت دقیقه پس از تزریق می‌باشد.

Figure 2- HPLC chromatogram of the solforaphane standard. Retention time of sample is around 7 minutes after injection.

جدول ۱- تجزیه واریانس فعالیت آنزیم میروزیناز (آزادسازی گلوکز) تحت تاثیر یون‌های روی و مس.

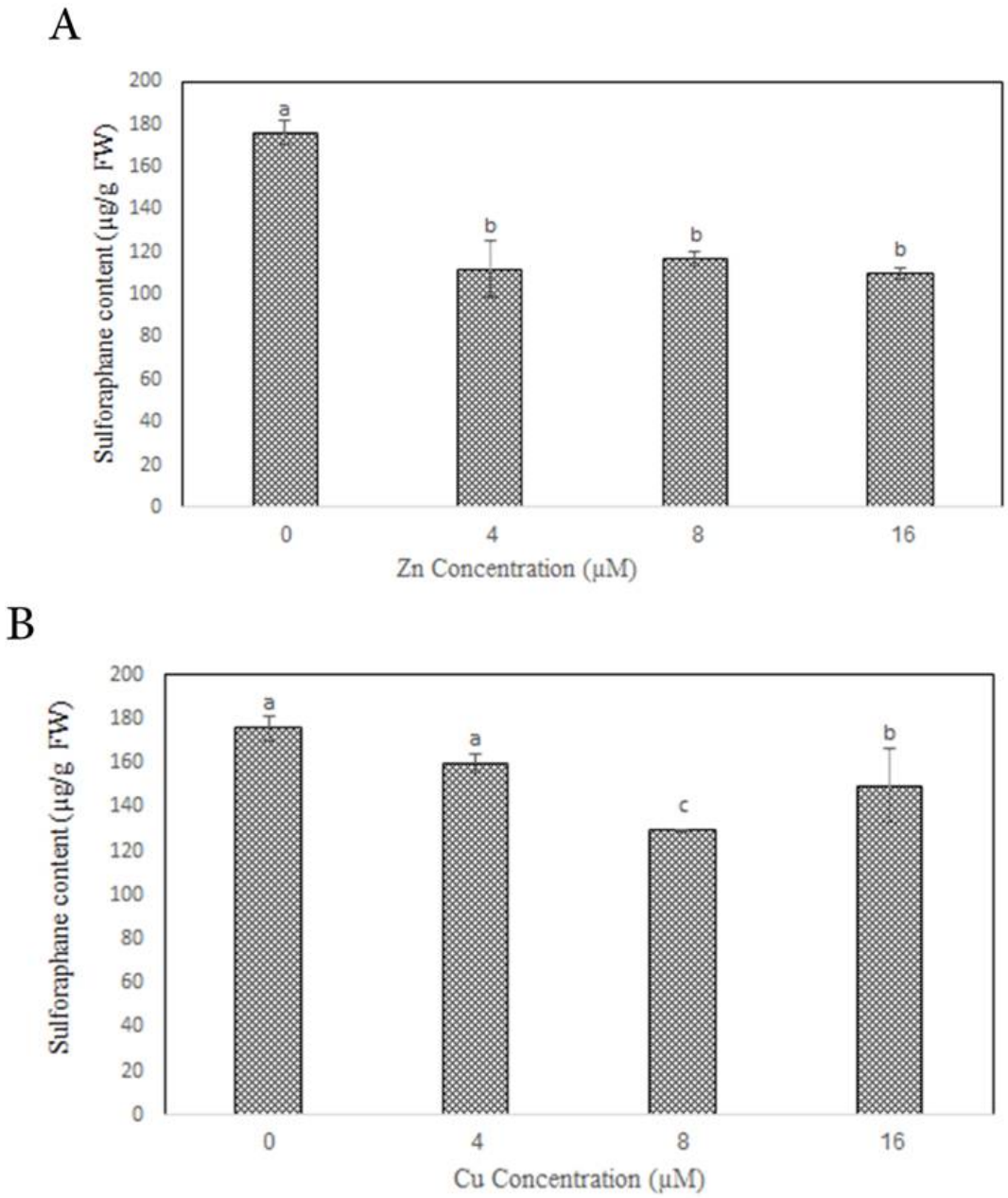
Table 1- Variance analysis of myrosinase enzyme activity (liberation of glucose) under the influence of zinc and copper ions.

Anova		Mean Squares	
S.O.V منبع تغییرات	df درجه آزادی	Glucose گلوکز (Cu)	Glucose گلوکز (Zn)
Treatment تیمار	3	83586261.2	122352453.0
Error خطا	6	205712.4	۱۵۸۰۲۹/۳
CV% ضریب تغییرات	-	9.85	۱۰/۹۲



شکل ۳- فعالیت آنزیم میروزیناز در حضور غلظت‌های مختلف یون‌های روی (A) و مس (B). حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Figure 3- Myrosinase activity in presence of different concentrations of Zn (A) and Cu (B) ions. Different letters show a significant difference at p≤0.05.



شکل ٤- محتوی سولفارافان تولید شده در حضور غلظت‌های مختلف یون‌های روی (A) و مس (B). حروف مختلف بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Figure 4– Content of produced sulforaphane in presence of different concentrations of Zn (A) and Cu (B) ions. Different letters show a significant difference at p≤0.05.

جدول ۲- تجزیه واریانس تولید سولفارافان تحت تاثیر یون‌های روی و مس.

Table 2- Variance analysis of sulforaphane production under the influence of Zinc and copper ions.

Anova			Mean Squares
S.O.V منبع تغییرات	DF درجه آزادی	Sulforaphane سولفارافان (Cu)	Sulforaphane سولفارافان (Zn)
Treatment تیمار	3	1235.39	3009.24
CV% ضریب تغییرات	6	46.16	64.24
Error خطا	_	5.52	6.23

بحث

سولفارافان، ایزوتیوسیانات مشتق شده از گلوکوزینولات گلوکورافانین است که به دلیل خواص ضد سرطانی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Shapiro et al., 1998). سوبسترای این ماده به وفور در گیاهان بروکلی، ازمک و تربچه وجود دارد (West et al., 2004). برخلاف اغلب جنس‌های این خانواده گیاه ازمک (*L. draba*) به طور عمده حاوی دو نوع گلوکوزینولات گلوکورافانین و گلوکوسینالبین است بنابراین تخلیص گلوکورافانین از این گیاه راحت‌تر می‌باشد (Powell et al., 2005). با توجه به اینکه این گیاه، جاذب مناسبی برای فلزات روی و مس می‌باشد (Chehregani et al., 2007)، در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف یون‌های مس و روی بر فعالیت آنزیم میروزیناز مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه آنزیم میروزیناز پیوند تیوگلوکوزید موجود در گلوکوزینولات‌ها را می‌شکند و گلوکز آزاد می‌شود، مقدار گلوکز آزاد شده به عنوان معیاری جهت سنجش اثر فلزهای مذکور بر فعالیت آنزیم میروزیناز در مقایسه با نمونه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت (Liang et al., 2006). همانطور که در شکل ۳، A مشاهده می‌شود، فعالیت این آنزیم تحت تاثیر یون‌های مذکور قرار گرفت. یون مس تاثیر بیشتری بر فعالیت آنزیم میروزیناز در مقایسه با یون روی دارد. همانطور که در نتایج نشان داده شده است یون روی تا غلظت ۸ میکرومولار فعالیت آنزیم میروزیناز را افزایش داده و در بالاترین غلظت سبب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم شده است. بیشترین فعالیت آنزیم در تیمار با یون روی در تیمار با غلظت ۸ میکرومولار مشاهده گردید که تقریباً ۱/۵ برابر نمونه شاهد بود. Liang و همکاران (۲۰۰۶) مشاهده کردند

که یون روی تا غلظت ۱۰ mM بر فعالیت آنزیم میروزیناز (تولید گلوکز) دانه‌های بروکلی اثر تحریکی دارد. در مقابل، Prakash و همکاران اثر منفی یون روی را بر فعالیت آنزیم میروزیناز جداسازی شده از گیاه بروکلی مشاهده کردند. آنها دلیل احتمالی مهار فعالیت آنزیم در حضور یون روی را به بلوکه شدن جایگاه اتصال سوبسترا و یا ناپایداری کمپلکس آنزیم–سوبسترا نسبت دادند (Prakash et al., 2013).

فعالیت آنزیم میروزیناز در حضور تمامی غلظت‌های یون مس به طور معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد افزایش نشان داد. بیشترین اثر یون مس در پایین‌ترین غلظت (٤ میکرومولار) آن مشاهده شد بطوریکه فعالیت آنزیم تقریباً دو برابر نمونه شاهد افزایش یافته بود. این مشاهدات با نتایج گزارش شده توسط Liang و همکاران (۲۰۰٦) و Prakash و همکاران (۲۰۱۳) که اثر یون مس را به ترتیب بر روی میروزیناز دانه‌های بروکلی و تخلیص شده از گیاه بروکلی ارزیابی می‌کردند مغایرت دارد. تفاوت نتایج حاصله می‌تواند به ساختار و همچنین شرایط آزمایش مرتبط باشد. علاوه بر این، غلظت یون و همچنین زمان درمعرض قرار گرفتن آنزیم با یون می‌تواند بر تفاوت نتایج حاصله موثر باشد (Prakash et al., 2013). از طرف دیگر، یکی از محصولات بدست آمده ناشی از تجزیه گلوکوزینولات‌ها تحت هیدرولیز آنزیمی میروزیناز، قطعه آگلیکون می‌باشد که ناپایدار بوده و تحت شرایط محیط می‌تواند به ترکیبات مختلفی تبدیل شود. با توجه به حضور قابل توجه گلوکورافانین در گیاه ازمک (*L. draba*) (Powell et al., 2005) و توانایی تبدیل آن به ایزوتیوسیانات سولفارافان، مقدار این ترکیب به عنوان معیاری برای بررسی اثر یون‌های مس و روی بر بازآرایی قطعه آگلیکون در جهت تولید ایزوتیوسیانات در مقایسه با نمونه شاهد ارزیابی گردید. همانطور که در شکل ٤ قابل مشاهده می‌باشد اثر این یون‌ها بر بازآرایی قطعه آگلیکون به سمت ایزوتیوسیانات سولفارافان مهاری بوده است.

کاهش محتوی سولفارافان در دانه‌های بروکلی در حضور یون مس توسط Liang و همکاران (۲۰۰٦) نیز گزارش شد که با نتایج بدست آمده کاملاً مطابقت دارد. در مقابل کاهش محتوی سولفارافان در گیاه ازمک در حضور یون روی (شکل ٤)، افزایش تولید آن در دانه‌های بروکلی در حضور این یون مشاهده گردید (Liang et al., 2006). تاثیر متفاوت این یون بر تولید سولفارافان در دو گیاه می‌تواند ناشی از تفاوت غلظت و زمان درمعرض قرار گرفتن یون با قطعه آگلیکون مرتبط باشد. اگر چه مطالعات بیشتری لازم است تا اطلاعات دقیقتری در ارتباط با فعالیت و ساختار آنزیم میروزیناز در گیاه ازمک بدست آید، از نتایج بدست آمده چنین استنباط می‌شود که یون‌های مس و روی به ویژه در غلظت‌های پایین اثر تحریکی بر فعالیت آنزیم میروزیناز دارند در حالیکه اثر آن‌ها بر بازآرایی

قطعه آگلیکون به سمت ایزوتیوسیانات‌ها مهاری می‌باشد. با توجه به مطالعات گذشته که نشان داده است تشکیل نیتریل درحضور یون دو ظرفیتی آهن (Fe^{2+}) تسهیل می‌شود (Butcher et al., 1984)، چنین به نظر می‌رسد که در حضور یون-های دوظرفیتی مس و روی نیز بازآرایی قطعه آگلیکون به سمت نیتریل می‌باشد تا ایزوتیوسیانات. در مجموع مس اثر مثبت‌تری بر فعالیت آنزیم میروزیناز در مقایسه با یون‌های روی دارد. اهمیت این مطالعه در بهینه‌سازی شرایط برای افزایش تولید سولفارافان از این گیاه دارویی بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

منابع

Bellostas N, Petersen IL, Sørensen JC, Sørensen H (2008). A fast and gentle method for the isolation of myrosinase complexes from Brassicaceous seeds. Journal of biochemical and biophysical methods 70: 918-925.

Bones, AtleSlupphaug, Geir (1989). Purification, Characterization and Partial Amino Acid Sequencing of β-thioglucosidase from Brassica napus L. Journal of Plant Physiology 134: 722-729.

Burmeister WP, Cottaz S, Driguez H, Iori R, Palmieri S, Henrissat B (1997). The crystal structures of Sinapis alba myrosinase and a covalent glycosyl–enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. Structure 5: 663-676.

Butcher D, Chamberlain K, Rausch R, Searle L (1984). Changes in indole metabolism during the development of clubroot symptoms in Brassicas. Monograph-British Plant Growth Regulation Group.

Chehregani AB, Malayeri, E B (2007). Removal of heavy metals by native accumulator plants. International Journal of Agriculture and Biology 9: 462-465.

Choi WY, Choi BT, Lee WH, Choi YH (2008). Sulforaphane generates reactive oxygen species leading to mitochondrial perturbation for apoptosis in human leukemia U937 cells. Biomedicine & Pharmacotherapy 62: 637-644.

Eriksson S, Andréasson E, Ekbom B, Granér G, Pontoppidan B, Taipalensuu J, Zhang J, Rask L, Meijer J (2002). Complex formation of myrosinase isoenzymes in oilseed rape seeds are dependent on the presence of myrosinase-binding proteins. Plant Physiology 129: 1592-1599.

Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM, Kensler TW, Scholtus I, Stephenson KK, Talalay P , Lozniewski A (2002). Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of Helicobacter pylori and prevents benzo [a] pyrene-induced stomach tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences 99: 7610-7615.

Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. Phytochemistry 56: 5-51.

Gao X, Dinkova-Kostova AT, Talalay P (2001). Powerful and prolonged protection of human retinal pigment epithelial cells, keratinocytes, and mouse leukemia cells against oxidative damage: the indirect antioxidant effects of sulforaphane. Proceedings of the National Academy of Sciences 98: 15221-15226.

Henderson, McEwen, vig (1972). Effect of ascorbic acid on thioglucosidases from different crucifers. Phytochemistry 11: 3127-3133.

Liang H, Yuan Q, Xiao Q (2006). Effects of metal ions on myrosinase activity and the formation of sulforaphane in broccoli seed. Journal of molecular catalysis B: Enzymatic 43: 19-22.

Matusheski NV, Wallig MA, Juvik JA, Klein BP, Kushad MM, Jeffery EH (2001). Preparative HPLC method for the purification of sulforaphane and sulforaphane nitrile from Brassica oleracea. Journal of agricultural and food chemistry 49: 1867-1872.

Murashige, Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum 15: 473-497.

Myzak MC, Karplus PA, Chung F-L, Dashwood RH (2004). A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane inhibition of histone deacetylase. Cancer Research 64: 5767-5774.

Ohtsuru, Masaru, Hata, Tadao (1972). Molecular properties of multiple forms of plant myrosinase. Agricultural and biological chemistry.

Powell EE, Hill GA, Juurlink BH, Carrier DJ (2005). Glucoraphanin extraction from Cardaria draba: Part 1. Optimization of batch extraction. Journal of chemical technology and biotechnology 80: 985-991.

Prakash O, Rai AK, Singh J, Singh P (2013). Effect of Heavy Metal Ions and Carbohydrates on the Activity of Cauliflower (Brassica oleracea Var. botrytis) Myrosinase. Journal of Stress Physiology & Biochemistry 9: 108-117.

Rask L, Andréasson E, Ekbom B, Eriksson S, Pontoppidan B, Meijer J (2000). Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. In Plant Molecular Evolution): Springer, pp. 93-113.

Shapiro TA, Fahey JW, Wade KL, Stephenson KK, Talalay P (1998). Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. Cancer Epidemiology, Biomarkers Prevvention 7, 1091–1100.

Singh SV, Warin R, Xiao D, Powolny AA, Stan SD, Arlotti JA, Zeng Y, Hahm E-R, Marynowski SW, Bommareddy A (2009). Sulforaphane inhibits prostate carcinogenesis and pulmonary metastasis in TRAMP mice in association with increased cytotoxicity of natural killer cells. Cancer research 69: 2117-2125.

Traka M, Richard M (2009). Glucosinolates, isothiocyanates and human health. Phytochemistry Reviews 8: 269-282.

West LG, Meyer KA, Balch BA, Rossi FJ, Schultz MR, Haas GW (2004). Glucoraphanin and 4-hydroxyglucobrassicin contents in seeds of 59 cultivars of broccoli, raab, kohlrabi, radish, cauliflower, brussels sprouts, kale, and cabbage. Journal of agricultural and food chemistry 52: 916-926.

Wilkinson AP, Rhodes MJ, Fenwick RG (1984). Myrosinase activity of cruciferous vegetables. Journal of the Science of Food and Agriculture 35: 543-552.

Yeh CT, Yen GC (2009). Chemopreventive functions of sulforaphane: A potent inducer of antioxidant enzymes and apoptosis. Journal of Functional Foods 1: 23-32.

Zabala MdT, Grant M, Bones AM, Bennett R, Lim YS, Kissen R, Rossiter JT (2005). Characterisation of recombinant epithiospecifier protein and its over-expression in Arabidopsis thaliana. Phytochemistry 66: 859-867.

The study of Zn^{2+} and Cu^{2+} effects on myrosinase activity and sulforaphane production in *Lepidium draba*

Mohammadi M.[1], Riahi-Madvar A.[*2], Pourseyedic S.[3], Aminizadeh M.[1]

[1]Department of Biotechnology, Faculty of Science and Modern Technology, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.
[2] Department of Biotechnology, Institute of Science and High technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.
[3]Department of Biotechnology, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran.

Abstract

Myrosinase is a β-thioglucoside glucohydrolase enzyme which catalyzses the separation of glucose from glucosinolates and produces an unstable intermediate, aglycone. This intermediate will be rearranged and then converted to different compound such as thiocyanate, isothiocynate and nitrile, depending on the environmental conditions. Among them, isothiocyanates are more important compounds due to the pharmaceutical applications. Sulforaphane is the most isothioyanates which produces from glucosinolate glucoraphanin through myrosinase hydrolysis. In this study, in order to investigate the effects of Cu and Zn ions on myrosinase activity and rearrangement of aglycone fragment in *Lepidium draba*, glucose and sulforaphane content were measured respectively. The results showed that myrosinase activity significantly promoted at treatment with 8 µM Zn^{2+} in compared to the control and significantly reduced by the increase Zn^{2+} concentration in media. Elevated of the enzyme activity was seen at all Cu concentration which was more significant at 4 µM. On the other hand, sulforaphane content was reduced at presence of all concentrations of the both ions especially Zn ions. Overall, it deduced that the mentioned ions, especially Cu at low concentrations have stimulatory effects on myrosinase activity. These ions also affected rearrangement of the aglycone fragment particularly Zn which turned the rearranged pathway into other compound except isothiocyanates, therefore the sulforaphane content reduced at presence of these metals.

Keywords: *Glucoraphanin, Glucosinolates, Isothiocynates, Myrosinase, Sulforaphane.*

[*] Corresponding Author: Riahi-Madvar A. Tel: +983433776610 Email: riahi.ali@gmail.com