نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۰، ص. ۲۸۷-۲۸۰
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 25, No. 3, Fall 2011, P. 280-287
ISSN: 2008 - 4730

بررسی روند متابولیزه شدن سیانید در ارقام سیب فوجی و عباسی مشهد

مسعود زاده باقری[1*]- یونس مستوفی[2]- مصطفی مصطفوی[3]

تاریخ دریافت:۸۸/۱۱/۶
تاریخ پذیرش:۹۰/۸/۳

چکیده

سیانید یک ماده بی‌رنگ، مضر و خطر ناک است و بویی شبیه به بوی بادام تلخ دارد. سیانید ترکیبات پایداری با آهن و منیزیم تشکیل می‌دهد و با اختلال در تنفس، تثبیت کربن و احیای نیترات، فعالیت سلول را مختل می سازد. به منظور بررسی روند متابولیزه شدن سیانید در ارقام سیب فوجی و عباسی مشهد، آزمایشی به صورت فاکتوریل در کرت‌های خرد شده در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار به اجرا درآمد. میوه‌ها به صورت تصادفی به چهار قسمت مجزا تقسیم و در چهار دما شامل ۲-، صفر، ۲ و ۴ درجه سانتی‌گراد در سردخانه معمولی (Refrigerator air) با رطوبت نسبی ۲±۸۵ درصد به مدت ۴ ماه نگهداری شدند. میزان تجمع سیانید و ارزیابی فعالیت آنزیم Beta-CAS بعد از خروج نمونه‌ها از انبار به مدت سیزده روز مورد بررسی قرار گرفت. میزان فعالیت آنزیم Beta–CAS با روش رنگ سنجی (Colorimetric) و براساس میزان H_2S تولید شده، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، در هر دو رقم مورد مطالعه بالاترین میزان تجمع سیانید بافت، در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد و کمترین تجمع سیانید در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد وجود داشت و به نظر می‌رسد که دماهای بالاتر جهت تجزیه و متابولیزه کردن سیانید مفیدتر باشند. فعالیت آنزیم Beta-CAS در رقم عباسی مشهد نسبت به فوجی بیشتر بوده و دماهای مختلف انبار پس از دوره انباری اثرات متفاوتی را بر فعالیت این آنزیم داشتند. با گذشت روزهای پس از انبار، میزان فعالیت این آنزیم افزایش و در روز سیزدهم فعالیت آن کاهش یافت.

واژه های کلیدی: اتیلن، آنزیم Beta–CAS، سیانید، سیب، دما

مقدمه

سیانید یک ترکیب شیمیایی مضر و خطرناک است که کربن آن با پیوند سه گانه به نیتروژن متصل می‌باشد. ترکیبات سیانید به صورت گاز، مایع و جامد وجود دارد. برخی به صورت مولکول، برخی به صورت یون و برخی به صورت پلیمر یافت می‌شوند. یون سیانید می‌تواند با جذب هیدروژن به سیانیدهیدروژن $(H-C\equiv N)$ تبدیل شود. سیانید یک ماده بی‌رنگ، بسیار سمی و فرار است. دمای جوش آن کمی بالاتر از دمای اتاق و در حدود ۲۶ درجه سانتی‌گراد است و بویی شبیه به بوی بادام تلخ دارد. برخی از مردم این بو را به خوبی حس می‌کنند و برخی به خوبی قادر به تشخیص این بو نمی‌باشند.

۱- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز
(*- نویسنده مسئول: Email: zadehbagheri@iaushiraz.ac.ir)
۲- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم باغبانی و گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۳- استاد پژوهشی گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

سیانیدهیدروژن یک اسید ضعیف محسوب می‌شود و به راحتی یونیزه شده و تولید یون (CN^-) می‌کند. سیانید پتاسیم و سیانید سدیم دو ترکیب خطرناک سیانید محسوب می‌شوند. این ترکیبات بر اثر هیدرولیز به راحتی به سیانیدهیدروژن تبدیل می‌شوند. در معده انسان این ترکیبات تحت تاثیر اسیدکلریدریک می‌توانند اسیدسیانیدریک تولید کنند و باعث مرگ یا سمیت شوند (۷ و ۲۵). سیانید به وسیله برخی باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها نیز تولید می‌شود. در گیاهان سیانید به صورت ترکیبات گلیکوزیدهای سیانوژنیک وجود دارد. به عنوان مثال، در کاساوا، سورگوم، ذرت، سیب‌زمینی شیرین، سیب و غیره می‌توان این ماده را یافت (۳ و ۹). بیوسنتز اتیلن در گیاهان عالی از مسیر ۱- آمینو سیکلو پروپان ۱- کربوکسیلیک[4] صورت می‌گیرد و سیانید نیز به عنوان یک محصول مشترک[5] با بیوسنتز اتیلن درپایان مسیر بیوسنتز اتیلن تولید می‌شود (۲۵).

در حالات ویژه فیزیولوژیکی از قبیل رسیدگی میوه، پیری گل و میوه، تنش‌های زنده و غیر زنده از قبیل غرقاب، کمبود اکسیژن،

4 - Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)
5 - Co-product

Archive of SID
www.SID.ir

خشکی، حمله عوامل بیماری‌زا، حمله حشرات، شرایط نامناسب انبار از نظر سرمازدگی و یخزدگی میوه، بیوسنتز اتیلن به میزان بیشتری تحریک می‌شود و هم‌زمان نیز موجبات تولید ماده سمی و خطرناک سیانید فراهم می‌گردد (۴ و ۲۵). چون ماده اولیه تولید سیانید و اتیلن یکسان است بنابراین به همان میزانی که اتیلن تولید می‌شود، ماده سمی و خطرناک سیانید نیز تولید می‌گردد و اگر قرار باشد سیانید در بافت تجزیه نشده و از بین نرود، آسیب‌ها و تبعات جبران‌ناپذیری به همراه خواهد داشت. در این راستا، گیاهان از قابلیت بالایی جهت سمیت‌زدایی و تجزیه سیانید در بافت برخوردارند. جهت سمیت‌زدایی سیانید در گیاهان، آنزیم کلیدی و مهم بتا- سیانوآلانین‌سینتاز[1] ایفای نقش می‌کند. سیانید تولید شده با ماده اِل- سیستئین[2] موجود در بافت ترکیب شده و تحت تاثیر آنزیم مذکور به ترکیبات غیر فعال متابولیزه می‌شود (۱، ۳، ۵، ۶، ۷ و ۸).

میزان و پتانسیل تولید سیانید و فعالیت این آنزیم به نوع گونه گیاهی بستگی دارد. این آنزیم علاوه بر تاثیر بر روی سیانید، در متابولیسم نیتروژن در برخی از گونه‌های گیاهی نقش دارد. به عنوان مثال، در بذور گیاه Pará rubber[3] در اثر عمل این آنزیم گلیکوزیدهای نیتروژن که منبع عظیمی از نیتروژن هستند، تحت تاثیر قرار گرفته و بعد از جوانه زدن بذر توسعه بهتری در گیاهچه رخ می‌دهد. در بذر گیاه Cocklebur[4] فعالیت این آنزیم در تنظیم جوانه زدن بذر با تاثیر بر روی آمینواسیدها موثر است (۱۰). این آنزیم علاوه بر متابولیزه کردن سیانید در گیاهان باعث تجزیه سیانید در باکتری‌ها، حشرات و حتی در حیواناتی مانند میمون نیز می‌شود (۸ و۱۷). در گیاهان به نظر می‌رسد دو نوع از این آنزیم بر اساس تفاوت در ترکیبات آمینواسید و ساختار پروتئین قابل تشخیص باشند. Hasegawa (۱۹۹۵) نشان داد که در لوپن‌آبی[5] (*Lupinus perennis* L.,) این آنزیم دارای وزن مولکولی ۵۲ کیلو دالتون می‌باشد (۱۱) و در اسفناج (*Spinacia oleraceae* L.) این آنزیم دارای دو زیر گروه ۲۸ و ۳۰ کیلو دالتونی می‌باشد (۱۰). در تنباکو این آنزیم دارای دو ایزوزایم $Beta\text{-}CAS_1$ و $Beta\text{-}CAS_2$ می‌باشد. ایزوزایم‌های یک و دو در سیتوسول و ایزوزایم ۲ در میتوکندری نیز دیده می‌شود و در کلروپلاست نیز هیچ کدام از این دو شکل آنزیمی وجود ندارد. آنزیم $Beta\text{-}CAS_1$ از نظر فعالیت آنتی‌اکسیداتیو از $Beta\text{-}CAS_2$ بسیار قوی‌تر است و در مقابل، اکسیداسیون از خود مقاومت نشان می‌دهد (۱۲). در اثر فعالیت این آنزیم سیانید به عنوان سوبسترا با کمک ال- ستیستین متابولیزه شده و به مواد غیر سمی مانند بتا سیانو آلانین[6] و H_2S تبدیل می‌شود. در واقع، سولفید آزاد شده از سیستئین باعث تولید H_2S می‌شود و از میزان H_2S تولید شده جهت ارزیابی و اندازه‌گیری این آنزیم استفاده می‌شود. واحد ارزیابی این آنزیم به صورت $mol\ H_2S\ min^{-1}\ mg^{-1}$ protein بیان می‌شود. H_2S تولید شده می‌تواند همچون سیانید مانع فعالیت آنزیم سیتوکروم‌اکسیداز[7] در میتوکندری شود و هم‌چنین، گیاهان این توانایی توانایی را دارند که H_2S را متابولیزه کرده و به یون‌های هیدروسولفاید تبدیل نموده که در ساخت سیستئین و هوموسیستئین[8] مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۴، ۱۷ و ۲۳). آنزیمی که باعث تبدیل ماده سیانوآلانین به آسپاراژین و غیره می‌شود، آنزیم بتا-سیانوهیدرولاز[9] نامیده می‌شود. می‌شود. این آنزیم دارای وزن مولکولی $۱۰^{۵}\times ۵ - ۱۰^{۵}\times ۴$، $Km= 2$ mM و دامنه فعالیت آن در $pH= ۸/۵$ می‌باشد. یکی از پیش‌نیازهای مهم انجام فعالیت آنزیم Beta-CAS، وجود ماده اِل- سیستئین در بافت می‌باشد. این ماده تحت اثر آنزیم سیتئین سنتاز ساخته می‌شود. محل فعالیت این آنزیم در سیتوسول، کلروپلاست و میتوکندری متمرکز می‌باشد (۱۴ و۲۲). سیانید با برخی از عناصر مانند نیکل، مس، نقره، منگنز، سرب و به خصوص آهن میل ترکیبی زیادی دارد و این موضوع به دلیل بار منفی سیانید می‌باشد (۴ و ۱۸). در میتوکندری اکثر گیاهان آنزیمی با عنوان اکسیداز مقاوم به سیانید در زنجیره انتقال الکترون وجود دارد که دارای یک مسیر جداگانه و با عنوان مسیر تنفسی جانشینی[10] و یا به بیان ساده‌تر، مسیر جانشینی یا مسیر چاره از آن یاد می‌شود. اعتقاد بر این است که مسیر چاره به عنوان یک سر ریز انرژی[11] عمل نموده و از سوبستراهای تنفسی مازاد بر نیاز رشد استفاده می‌کند (۲۰). هدف از این تحقیق بررسی روند متابولیزه شدن سیانید در دوره پس از انبار و ارزیابی فعالیت آنزیم Beta-CAS در دماهای تعیین شده و معرفی دمای مناسب و مورد نیاز جهت کمترین تجمع سیانید در ارقام فوجی و عباسی مشهد است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه علوم باغبانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران در سال ۸۶-۱۳۸۵ انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در کرت‌های خرد شده با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار به اجرا در آمد. فاکتورهای اصلی شامل رقم و دمای انبار و فاکتور فرعی زمان پس از انبار بود. رقم فوجی (*Malus domestica* Borkh., CV. Fuji) به عنوان یکی از ارقام تجاری و مهم سیب محسوب می‌شود و از تلاقی دو رقم (Red Delicious ×

1 - Beta-cyanoalanine synthase (Beta-CAS)
2 - L-cysteine
3 - *Hevea brasiliensis*
4 - *Xanthium spinosum*
5- Blue lupine

6 - Beta-cyanoalanine
7 - Cytochrome oxidase
8 - Homocysteine
9 - Beta-cyanohydrolase
10 - Alternative respiratory pathway
11 - Overflow

Archive of SID

www.SID.ir

(Ralls Janet) به دست آمده است (۲) و رقم عباسی مشهد یکی از ارقام دیررس سیب در کشور محسوب می‌گردد. سیب فوجی از منطقه دماوند و ۱۷۰ روز بعد از تمام گل (Full Bloom) و سیب عباسی مشهد از منطقه خور نیشابور برداشت و بلافاصله با هواپیما به آزمایشگاه منتقل شدند. میوه‌ها به صورت تصادفی به چهار قسمت مجزا تقسیم و در چهار دما شامل ۲- ، صفر، ۲ و ۴ درجه سانتی‌گراد در سردخانه معمولی با رطوبت نسبی ۲±۸۵ درصد به مدت ۴ ماه نگهداری شدند. در تمام مدت به صورت هفتگی و بعضا روزانه دمای انبار و دیگر شرایط محیطی مورد بررسی و کنترل قرار می‌گرفت. اندازه‌گیری مربوط به صفات سیانید و آنزیم Beta-CAS بلافاصله بعد از خروج نمونه‌ها از انبار و ۱۳ روز بعد از خروج از انبار به فاصله هر ۳روز یک بار انجام شد. جهت اندازه‌گیری سیانید، تکه‌های بافت سیب به وزن ۲ گرم به مدت ۲ ساعت در محلول کلرید کلسیم دو درصد خیسانده شد، سپس نمونه‌ها در یک ظرف ۱۰ میلی‌لیتر حاوی ۲۰۰ میکرولیتر سود ۰/۱ نرمال در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر اسیداستیک یک مولار، یک میلی لیتر سوکسینامید۰/۲۵ درصد در ان-کلروسوکسینامید ۰/۰۲۵ درصد و در نهایت، ۲۰۰ میکرولیتر باربیتوریک‌اسید[1] ۳ درصد در پیریدین[2] ۳۰ درصد اضافه گردید. محلول به دست آمده به خوبی تکان داده شد و بعد از ۱۰ دقیقه میزان جذب رنگ تولید شده توسط اسپکتروفتومتر مدل Cary50 در ۵۸۰ نانومتر قرائت شد. برای رسم منحنی استاندارد از سیانید پتاسیم استفاده شد (۲۵). جهت اندازه‌گیری آنزیم Beta-CAS ابتدا تکه‌های بافت گوشت سیب با وزن ۲۵ گرم در هاون ریزریز و له شد و سپس دو برابر وزن نمونه، یعنی ۵۰ میلی لیتر محلول Tris-HCl با pH=۸/۵ در غلظت ۵۰ میلی‌مولار اضافه گردید. بعد از سانتریفیوژ ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده در یک لوله آزمایش دارای سپتوم ریخته شد و ۴ میلی لیتر سوبسترای تازه آماده شده به آن افزوده شد. بعد از به هم زدن و قرار دادن در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، یک میلی لیتر از محلول به دست آمده را در یک تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتر ریخته و توسط سپتوم ۰/۱ میلی-لیتر از ماده N,N-Dimethyl-s-phenylene diamine sulfate ۰/۰۲ نرمال جهت توقف واکنش اضافه و در نهایت، ۰/۱ میلی لیتر از ماده کلرید آهن ۰/۰۳ مولار که در اسید کلریدریک ۱/۲ نرمال حل شده بود، اضافه گردید. بعد از تشکیل رنگ، شدت جذب در ۶۵۰ نانومتر قرائت شد. از ماده Na_2S جهت رسم منحنی استاندارد استفاده گردید (۲۵). در این پژوهش همچنین صفات دیگری همچون تولید اتیلن، سفتی بافت، میزان سرمازدگی و میزان قند اندازه گیری شد (نتایج منتشر نشده). داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد تا اثر تیمارها مشخص شود. با استناد به آزمون F و آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار[3] (LSD) مقایسه میانگین‌ها میانگین‌ها انجام شد.

نتایج

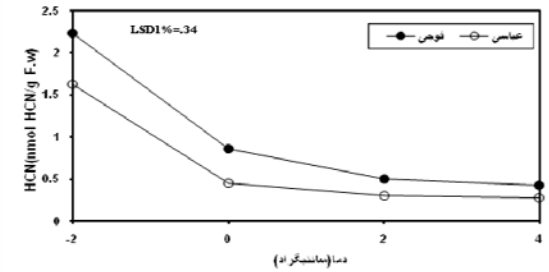
نتایج تجزیه واریانس تجمع سیانید در زمان پس از انبار نشان می‌دهد اثرات ساده و متقابل عامل‌های مطرح شده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شده است (جدول۱). درخصوص تجزیه واریانس تغییرات آنزیم Beta-CAS تمام اثرات ساده و متقابل در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشند (جدول۱). با مشاهده شکل ۱ و تجزیه واریانس عامل‌های مورد بررسی در خصوص اثرات ساده رقم، دمای انبار و زمان پس از انبار می‌توان گفت، رقم فوجی در زمان پس از انبار از نظر تجمع سیانید از قابلیت بالاتری نسبت به رقم عباسی مشهد برخوردار است و اختلاف بین این دو معنی‌دار می‌باشد. با افزایش دما، تجمع سیانید کمتر می‌شود. به طوری که بیشترین میزان سیانید در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد و کمترین آن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. در ضمن، با توجه به معیار LSD بین دمای ۲ و ۴ درجه سانتی‌گراد به جهت تجمع سیانید از نظر آماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. با گذشت تعداد روز از زمان خروج از انبار میزان تجمع سیانید کاهش چشمگیری از خود نشان داد. شکل ۲ اثر متقابل رقم در دمای انبار را پس از دوره انبار مورد بررسی قرار می‌دهد. در هر دو رقم با افزایش دما، میزان تجمع سیانید کاهش یافت. با بررسی معیار LSD می‌توان دریافت که به جز در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد در بقیه سطوح دما، تفاوت معنی‌داری به جهت تجمع سیانید در ارقام مورد مطالعه نداشت. در خصوص اثر متقابل دمای انبار و زمان پس از انبار می‌توان اظهار داشت که در دماهای مختلف مورد مطالعه با گذشت زمان (روز) پس از انبار میزان تجمع سیانید به صورت معنی‌دار کاهش یافت. خروج ارقام مورد مطالعه انبار شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بیشترین تاثیر را در خصوص کاهش تجمع سیانید از خود نشان دادند به طوری که در روزهای دهم تا سیزدهم پس از انبار اصولا هیچ گونه سیانیدی در بافت میوه مشاهده نشد (شکل۳). اثر متقابل رقم و زمان پس از انبار (شکل۴) نشان داد که بین ارقام فوجی و عباسی مشهد از نظر تجمع سیانید در زمان‌های پس از انبار تفاوت معنی‌دار بود و با گذشت زمان، تجمع سیانید در هر دو رقم به صورت معنی‌داری کاهش یافت به طوری که میزان تجمع سیانید سیب فوجی در یک روز پس از انبار از عدد ۱/۵۱ به عدد nmol H_2S/gFW ۰/۴۲ در روز سیزدهم تقلیل یافت. شکل ۵ اثر سه‌گانه رقم، دمای انبار و زمان پس از انبار را مورد بررسی قرار می‌دهد. رقم

1 - Barbituric acid
2 - Pyridine
3 - Least significant difference

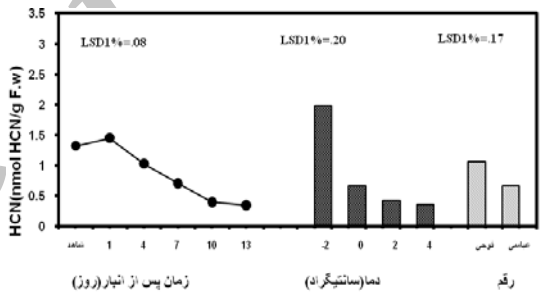
Archive of SID

www.SID.ir

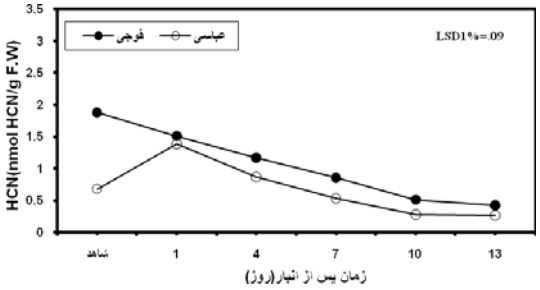
فوجی نسبت به رقم عباسی مشهد در تمام مواردی که اختلاف معنی‌دار داشت، از میزان تجمع سیانید بیشتری برخوردار بود. میوه‌های رقم فوجی و عباسی مشهد که در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، بعد از خروج از انبار و قرار گرفتن در دمای محیط، روند متابولیزه شدن سیانید در هر دو رقم روند مشابهی داشت به طوری‌که در روزهای دهم و سیزدهم بعد از انبار در هیچ کدام از ارقام تجمع سیانید مشاهده نشد.



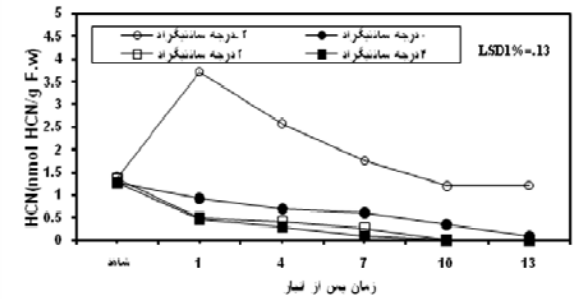
شکل ۱- اثر مستقل دما، رقم و زمان پس از انبار بر میزان سیانید



شکل ۲- اثر متقابل رقم و دما بر میزان سیانید



شکل ۳- اثر متقابل دما و زمان پس از انبار بر سیانید



شکل ٤- اثر متقابل رقم و زمان پس از انبار بر سیانید

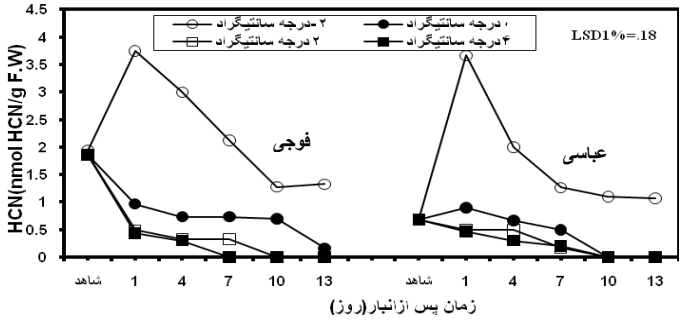
جدول ۱- تجزیه واریانس سیانید و آنزیم Beta-CAS در دوره پس از انبار

منبع تغییرات	سیانید		Beta-CAS	
	df	MS	df	MS
بلوک	۳	۰/۰۴۸^{ns}	۳	۷۲/۹۶۹ ^{ns}
دمای انبار	۳	۱۶/۹۵۸**	۳	۳۰۱۲۶۰/۱۸**
رقم	۱	۳/۷۱۱**	۱	۱۱۸۷۵/۶۲۲**
رقم × دمای انبار	۳	۰/۳۲۱**	۳	۵۷۱۲/۱۲۴**
خطا	۱۵	۰/۰۸۲	۲۱	۳۵۲/۳۴۳
زمان پس از انبار	۵	۴/۹۶۳**	۵	۱۲۶۷۷۷/۴۲**
دمای انبار × زمان پس از انبار	۱۵	۱/۷۰۵**	۱۵	۱۵۸۴۳/۰۲۷**
رقم × زمان پس از انبار	۵	۱/۰۹۹**	۵	۱۲۶۳۸/۲۴۴**
رقم × دمای انبار × زمان پس از انبار	۱۵	۰/۱۱۱**	۱۵	۲۲۴۵/۴۷۷**
خطا	۸۳	/۰۱۰	۱۱۵	۳۷۷/۷۰۱
کل	۱۴۸		۱۸۶	
CV	۱۱/۱		۸/۸	

*: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد **: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

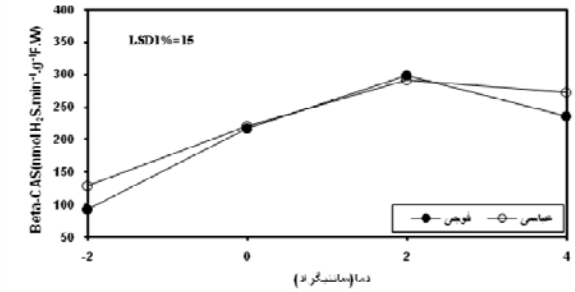
Archive of SID

www.SID.ir

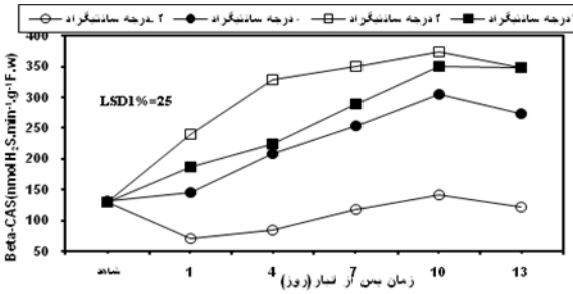


شکل ۵- اثر سه گانه دما، رقم و زمان پس از انبار بر سیانید

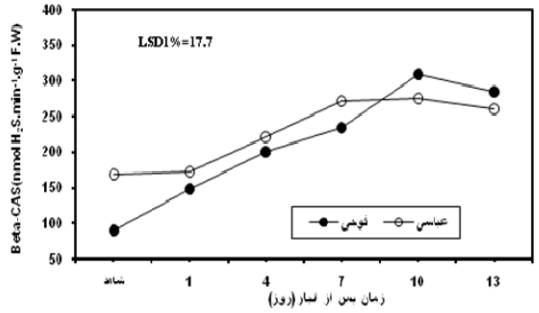
با توجه به جدول ۱ و شکل ۶ که اثرات ساده رقم، دمای انبار و زمان پس از انبار را بر فعالیت آنزیم Beta-CAS بررسی می‌نماید، می‌توان اظهار داشت که فعالیت این آنزیم در رقم عباسی مشهد نسبت به فوجی بیشتر بود. دماهای مختلف انبار پس از دوره انباری اثرات متفاوتی را بر فعالیت آنزیم Beta-CAS داشت و میزان فعالیت این آنزیم در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۲ درجه سانتی‌گراد کمتر بود. با گذشت روزهای پس از انبار، میزان فعالیت این آنزیم افزایش یافته، در صورتی که در روز سیزدهم فعالیت کاهش داشت. با توجه به جدول تجزیه واریانس اثرات متقابل رقم و دمای انبار در سطح ۱٪ معنی‌دار شده است. با توجه به شکل ۷ مشاهده می‌شود روند تغییرات فعالیت آنزیم Beta-CAS در سطوح مختلف دما برای هر دو رقم از ۲- تا ۲ درجه سانتی‌گراد روند صعودی دارد و در ۴ درجه سانتی‌گراد حالت نزولی به خود می‌گیرد (شکل۷). شکل ۸ اثرات متقابل دمای انبار و زمان پس از انبار را در خصوص تاثیر بر فعالیت آنزیم Beta-CAS مورد بررسی قرار می‌دهد. نتایج نشان داد دماهای مختلف انبار می‌توانند پس از خروج نمونه‌ها از انبار بر میزان فعالیت آنزیم Beta-CAS اثرگذار باشند. میزان فعالیت این آنزیم در ارقام عباسی مشهد و فوجی در زمان‌های مختلف پس از انبار تفاوت معنی‌داری نشان داد (شکل۹). مطالعه جدول ۱ نشان می‌دهد که اثر متقابل سه عامل دما، رقم و زمان پس از انبار در سطح یک درصد معنی‌دار شده است. این مطلب بیانگر عدم وجود تغییرات مشابه فعالیت این آنزیم در ارتباط با این سه عامل است (شکل ۱۰).



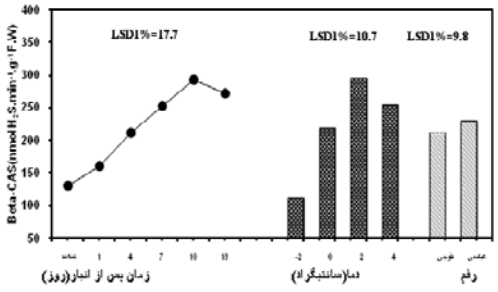
شکل ۷- اثر متقابل دما و رقم بر آنزیم Beta-CAS



شکل۸ - اثر متقابل دما و زمان بر آنزیمBeta-CAS



شکل ۹- اثر متقابل زمان و رقم بر آنزیم Beta-CAS



شکل ٦- نمایش اثر ساده دما، رقم و زمان بر آنزیم Beta-CAS

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

سیانید به عنوان یک ماده سمی بسیار خطرناک در گیاهان یافت می‌شود. تیمار گیاه آرابیدوپسیس با سیانید به صورت مشخص باعث کاهش ظرفیت کلروفیل و توقف رشد می‌شود. سیانید می‌تواند باعث ایجاد نقاط سیاه رنگ بر روی برگ‌های تنباکو شود. هم‌چنین در برگ‌های گیاه نخود می‌تواند هسته سلول‌های پوست و سلول‌های محافظ پوست را تخریب کند. این ماده خطرناک و سمی در هسته زردآلو، هلو، گیلاس، بادام تلخ، دانه‌های سیب، سورگوم، شاخه‌های بامبو، ریشه‌های کاساوا و لوبیای لیما[1] دیده می‌شود (۹، ۱۳ و ۲۵). در این پژوهش، در هر دو رقم سیب مورد مطالعه بالاترین میزان تجمع سیانید بافت در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد و کمترین تجمع سیانید در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد وجود داشت و به نظر می‌رسد که دماهای بالاتر به جهت تجزیه و متابولیزه کردن سیانید مفیدتر باشند. دمای ۲- درجه سانتی‌گراد احتمالا به جهت اختلال در عمل آنزیم و یا متلاشی شدن غشاء مانع متابولیزه کردن سیانید شده است. در همین راستا، آنزیم Beta-CAS که جهت متابولیزه کردن سیانید کاربرد دارد، در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد کمترین میزان فعالیت را داشت. این آنزیم یک همبستگی خوبی را جهت تجزیه سیانید با دما نشان داد. در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انتظار می‌رود کمترین میزان سیانید وجود داشته باشد، چون بالاترین میزان فعالیت این آنزیم در این دما متصور است. سرعت اغلب واکنش‌های شیمیایی در اثر بالا رفتن دما افزایش می یابد. انرژی حرارتی که در افزایش دما به مولکول‌ها منتقل می گردد باعث می شود که انرژی جنبشی مولکول‌ها بالا رفته و تصادمات مولکولی افزایش یابد بهمین سبب تعداد تصادماتی که منجر به ایجاد محصول واکنش می گردد در واحد زمان افزایش می یابد. مولکول‌های آنزیم که دارای ساختمان منظمی می باشند در واکنش-های خود با مولکول سوبسترا در جایگاه فعال به همین ترتیب عمل می‌کنند با این تفاوت که ساختمان مولکول آنزیم پیچیده تر از مولکول‌های ساده شیمیائی است و ممکن است در اثر دماهای بالا دناتوره شود و ساختمان سه بعدی خود را که لازمه فعالیت آنزیمی است از دست بدهد. افزایش دما تا زمانی قادرست موجب افزایش فعالیت آنزیمی گردد که در اثر عوامل مختلف، ساختمان سه بعدی آنزیم دستخوش تغییراتی نگردیده باشد. از آنجا که لازمه افزایش سرعت واکنش آنزیمی افزایش سرعت تصادمات بین مولکول آنزیم و سوبسترا است چنان‌چه بالا رفتن دما اختلالی در تشکیل کمپلکس آنزیم و سوبسترا ایجاد نماید سرعت واکنش آنزیمی در این دماها افزایش نیافته و با افزایش دما سرعت واکنش کاهش می یابد (۲۰).

در این تحقیق میزان سیانید در مدت چهار ماه نسبت به دو ماه کمتر می‌باشد و بالا بودن میزان فعالیت آنزیم Beta-CAS در مدت زمان چهار ماه دلیلی بر کاهش میزان سیانید می‌باشد. هم‌چنین، فعالیت این آنزیم در سیب عباسی مشهد نسبت به فوجی بیشتر بوده، بنابراین پایین بودن میزان سیانید رقم عباسی مشهد نسبت به فوجی دور از انتظار نبود. در یک پژوهش توسط Xiaozhany و همکاران (۲۴) سرعت تغییرات متابولیسم سیانید در دماهای مختلف (۲۳°c- ۱۱) در دو گیاه (*Salix babyLonica* L.) و *Sambucus chinensis* (Lindl.) مورد بررسی قرار گرفت. در هر دو جنس با افزایش دما روند متابولیزه شدن سیانید نیز افزایش یافت و گیاه Salix از توان بیشتری جهت تجزیه و غیر فعال نمودن سیانید برخوردار بود. نتیجه این پژوهش نشان داد که تغییرات دما اثرات شگرفی بر میزان متابولیزه شدن سیانید در هر دو جنس مورد مطالعه دارد. بررسی ارزش ضریب حرارتی نشان می‌دهد که سرعت متابولیزه شدن سیانید در گیاه Salix بیشتر تحت تأثیر تغییرات دمایی قرار می‌گیرد. دماهای بالا به صورت عمومی سرعت غیر فعال نمودن سیانید را شدت می‌بخشد و می‌توان از این گونه‌ها جهت متابولیزه کردن سیانیدهای موجود در هوای جو استفاده نمود و در پدیده گیاه‌پالایی (Phytoremediation) مورد استفاده قرار گیرند (۲۴). بر روی فعالیت آنزیم‌ها عواملی از جمله غلظت نمک‌ها، دما، pH و غلظت سوبسترا موثر است و قاعدتاً هر چه غلظت سوبسترا بالا رود، می‌توان پیش‌بینی کرد که فعالیت آنزیمی نیز افزایش خواهد یافت. سیانید به عنوان سوبسترا توسط آنزیم Beta-CAS کاتالیز می‌شود. بنابراین، افزایش غلظت سیانید می‌تواند باعث افزایش فعالیت این آنزیم گردد (۳ و ۴). در این تحقیق، دمای ۲ درجه سانتی‌گراد به برخی دلایل از جمله تولید بهینه هورمون اتیلن، حفظ سفتی بافت میوه، عدم وجود سرمازدگی بافت ارقام مورد مطالعه، از دست دادن رطوبت بافت میوه در حد قابل قبول، تولید سطح مناسبی از آنزیم Beta-CAS جهت تجزیه سیانید و غیره در هر دو رقم مورد مطالعه به عنوان دمای بهینه و مطلوب مورد توجه بود. دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به دلیل تولید بالای اتیلن و عدم داشتن سفتی بافت و رطوبت مناسب میوه مورد توجه نیست، هر چند که از نظر سطح تولید ماده سمی سیانید در شرایط مناسبی قرار دارد.

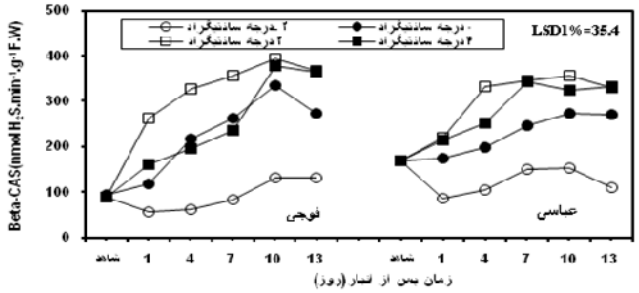
دمای صفر و ۲- درجه سانتی‌گراد نیز به دلیل آسیب‌های سرمازدگی و داشتن سطح نامعقول ماده سمی سیانید قابل توصیه نیست. سیانید افزون بر اثرات بازدارنده‌ای که قبلا در مورد آنها بحث شد، بر روی فعالیت آنزیم‌هایی مانند سیتوکروم‌اکسیداز و ریبو لوزدی فسفات‌کربوکسیلاز[2] در گیاه اثر بازدارنده دارد. همچنین، با اثر منفی بر گیرنده Cu-protein plastocyanine که در پروسه انتقال الکترون در واکنش‌های نوری مربوط به فتوسنتز دخالت دارد، مانع انجام فتوسنتز به شکل بهینه می‌شود (۱۲).

1- Lima bean

2 - Ribulose-bisphosphate carboxylase

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۱۰- اثر سه گانه دما، رقم و زمان پس از انبار بر آنزیم Beta-CAS

سیانید حتی در میزان کم، می‌تواند تنفس را در میتوکندری مهار کند و بدین ترتیب، باعث توقف رشد و یا حتی باعث مرگ سلول شود (۷).

سیانید می‌تواند یک حالت Positive-feedback داشته باشد. به طوری که خود سیانید باعث افزایش سیانید در گیاه شود. سیانید باعث افزایش بیان ژن‌های آنزیم ACC سنتاز می‌شود و این رخداد باعث افزایش تولید اتیلن و سیانید می‌شود (۱۷). در اثر تنش سرما تولید اتیلن به میزان بیشتری تحریک می‌شود و میزان تولید سیانید نیز تلویحا افزایش می‌یابد (۱۴). هم‌چنین، تنش‌هایی مانند یخزدگی و خشکی با تاثیر بر روی غشاء سلول و با در نظر گرفتن نقش آنزیم‌ها، می‌تواند باعث افزایش میزان سیانید و ایجاد سمیت شوند (۳). سیانید به عنوان سوبسترای آنزیم Beta-CAS مورد استفاده قرار می‌گیرد و این ماده سمی و خطرناک به مواد غیر سمی متابولیزه می‌شود (۱۵). آنزیم Beta-CAS در بسیاری از گیاهان دیده شده است. برگ‌های گیاهچه جو به صورت ویژه یک میزان زیادی از فعالیت این آنزیم و حدود ۱/۱ $\mu mol\ min^{-1}\ mg^{-1}$ chloroplast را نشان می‌دهند و میزان زیاد این آنزیم حاکی از انجام یک عمل مهم است و همچنین، مؤید این مطلب است که سوبسترای این آنزیم، یعنی سیانید در بافت موجود است. در برگ‌های گیاه جو مقدار کمی سیانید وجود دارد، ولی در عین حال، میزان فعالیت این آنزیم زیاد می‌باشد و این اهمیت متابولیزه شدن سریع سیانید را منعکس می‌کند (۱). فعالیت این آنزیم در بافت‌ها و نواحی انتهایی رشد، جایی که میزان تولید اتیلن قابل توجه است، و یا در جاهایی که اتیلن در اثر پیری یا زخم القا می‌گردد، بیشتر می‌باشد (۱۳). برای مقابله با تنش‌ها و اکسیداتیوهای ایجاد شده یک سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی با کارائی بالا در گیاهان وجود دارد که می‌تواند رادیکال‌های آزاد را از بین برده، خنثی و یا جارو کند. این سیستم دفاعی شامل سازوکارهای آنزیمی و غیر آنزیمی است. آنزیم-های این سیستم دفاعی شامل سوپراکسید دیسموتاز[1]، کاتالاز[2]، آسکوربیک پراکسیداز، دهیدروآسکوربات ردوکتاز و گلوتاتیون ردوکتاز است و سیستم غیر آنزیمی شامل آسکوربیک اسید، گلوتاتیون، آنتوسیانین‌ها، ویتامین E و کارتنوئیدها می‌باشد. آنزیم‌های آنتی-اکسیدانت مهم کاتالاز و پراکسیداز از بین برنده رادیکال‌های آزاد هستند. به طور کلی این مواد سبب محافظت از غشاءها و مولکول‌های بزرگ و هم‌چنین، مسئولیت سمیت‌زدایی را در برخی واکنش‌ها بر عهده دارند. ممکن است آنزیم Beta-CAS نیز یکی از آنزیم‌های مهمی باشد که در زمان تنش (سرما، خشکی و...) جهت سم‌زدایی ومتابولیزه شدن سیانید در سیستم دفاعی گیاه مورد استفاده قرار گیرد (۱۳، ۲۱ و ۲۵). با عنایت به این موضوع که: تنش سرمازدگی می‌تواند باعث تجمع سیانید در بافت گردد، پیشنهاد می‌شود در خصوص بررسی اثر تنش‌هایی مانند خشکی بر تجمع سیانید در بافت گیاهان و محصولات استراتژیک پژوهش‌هایی انجام گیرد. با علم به اینکه در کشورمان در خصوص ماده سمی و خطرناک سیانید و آن هم با نگرش به محصولات کشاورزی تحقیقات لازم صورت نگرفته است، ضروری است که در خصوص تعیین و مقدار میزان سیانید در گونه‌های سیانوژنیک مرتبط با محصولات باغی و زراعی اقدامات عاجلی صورت پذیرد. پیشنهاد می‌شود در خصوص بررسی مولکولی آنزیم Beta-CAS و تعیین ایزوزایم‌های مربوط به این آنزیم در ارقام محلی و بومی سیب ایران مانند عباسی مشهد اقداماتی صورت گیرد.

1 - Super Oxide Dismutase (SOD)

2 - Catalase

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1- Akopyan T.A., Braunstein A.E., and Goryachenkova E.V. 1975. Beta- cyanoalanine synthase: Purification and characterization. Proc. Nat. Acad. Scientia, USA 72: 1617-1621.
2- Blankenship S.M., Parker M., and Unrath C.R. 1997. Use of maturity indices for predicting post storage firmness of 'Fuji' apples. Journal of Horticultural Science, 32: 909-910.
3- Blumenthala's S.G. 1968. Cyanide metabolism in higher plant. III. The Biosynthesis of Cyanoalanine. Journal of Biochemistry, 243: 5302-5507.
4- Castric P.A., Farnden K.J.F., and Conn E.E. 1972. Cyanide metabolism in higher plants. . Journal of Biochemica et Biophisica, 152: 62-69.
5- Dunnill P. and Fowden L. 1965. Enzymatic formation of β-cyanoalanine from cyanide by Escherichia coli extracts. Natural Population Tree, 208: 1206-1207.
6- Evesyrkin W.B. 1985. Sub cellular and development distribution of β-etacyanoalanine synthase in barley leaves. Journal of Plant Physiology, 78: 285-290.
7- Ezzi M.I., and Lynch J.M. 2002. Cyanide catabolizing enzymes in *Trichoderma spp.* Enzyme and Microbiology Technology, 31: 1042-1047.
8- Fowden L., and Bell E.A. 1965. Cyanide metabolism by seedling. Natural Population Tree, 208: 110-112.
9- Goudey J.S., Tittle F.L., and Spencer M.S. 1989. A role of ethylene in the metabolism of cyanide by higher plants. Journal of Plant Physiology, 89: 1306-1310.
10- Hatzfeld Y. 2000. Beta- cyanoalanine synthase is a mitochondrial cysteine synthase - like protein in spinach and Arabidopsis. Journal of Plant Physiology, 123: 1163-1172.
11- Hasegawa R., Maruyama A., Nakaya M., Tsuda S., and Esashi Y. 1995. The presence of two types of beta-cyanoalanine synthase in germinating seeds and their responses to ethylene. Physiology Plantarum, 93, 713-718.
12- Liang W.S., and Li D.B. 2001. The two beta-cyanoalanine synthase isozymes of tobacco showed different anti oxidative abilities. Journal of Plant Science, 161: 1171-1177.
13- Liang W.S. 2003. Drought stress increase both cyanogenesis and beta-cyanoalanine synthase activity in tobacco. Journal of Plant Science, 165: 1109-1115.
14- Maruyama A., Saito K., and Ishizawa K. 2001. Beta-cyanoalanine synthase and cysteine synthase from potato: Molecular cloning biochemical charactization, and spatial and hormonal regulation. Plant Moleculat Biology, 46: 746-760.
15- Meyer S.D., and Ahmad S. 1991. Link between L-3-cyanoalanine synthase activity and differential cyanide sensitivity of insects Journal of Biochemica et Biophisica, 1075: 195-197.
16- Mizutani F., Yamanaka Y., and Amano S. 1992. Effect of ethylene and hydrogen cyanide on beta-cyanoalanine synthase activity in Satsuma mandarin '*Citris unsho*' fruit. Journal of Plant Science, 49: 223-231.
17- Ogunlabi O.O., and Agboola F.K. 2007. A soluble beta-cyano alanine synthase from the gut of the variegated grasshopper *Zonocerus variegates* L. Insect Biochemistry and Moleculat Biology, 37: 72-79.
18- Rychter A., Janes H.W., and Frenkel C. 1978. Cyanide-resistant respiration in freshly cut potato slices. Journal of Plant Physiology, 61: 607-668.
19- Solomos T., and Laties G.G. 1976. Effects of cyanide and ethylene on the respiration of cyanide-sensitive and cyanide-resistant plant tissues. Journal of Plant Physiology, 58: 47-50.
20- Taiz and Zeiger. 1998. Plant Physiology .Second edition .Sinauer Associates ,inc.publishers.
21- Tatsuma T., Komori K., Yeoh H.H., and Oyama N. 2000. Disposable test plates with tyrosinase and beta-glucosidase for cyanide and cyanogenic glysider. Amalytica Chimica, 408: 233-240.
22- Wen J.Q., Huang F., Liang W.S., and Laing H.G. 1997. Increase of HCN and beta - cyanoalanine synthase activity during agening of potato tuber slices. Journal of Plant Science, 126: 147-151.
23- Wurtele E.S., Nikolau B.J., and Conn E.E. 1984. Tissue distribution of beta-cyanoalanine synthase in leaves. Journal of Plant Physiology, 75: 979-982.
24- Xiaozhang Y.U., Stefan Trapp B., Puhua Zhoua and Hao H.U. 2005. The effect of temperature on the rate of cyanide metabolism of two woody plants, Chemosphere. 59, 1099–1104.
25- Yip W.K., and Yang S.F. 1998. Ethylene biosynthesis in relation to cyanide metabolism. Botanical Bulletin Academia Sinica, 39: 1-7.

Archive of SID

www.SID.ir