Archive of SID

مجله علمی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
تابستان ۱۳۸۸، دوره یکم، شماره اول، صفحه ۲۷- ۲۳

جداسازی، غربالگری و شناسایی پسودوموناس فلورسنس تولیدکننده فلاوآنزیم دو عملکردی PutA از خاک

حمید شهبازمحمدی، اسکندر امیدی‌نیا

گروه بیوشیمی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران.

نویسنده مسؤول: اسکندر امیدی‌نیا، انستیتوپاستور ایران، بخش بیوشیمی، تهران. skandar@pasteur.ac.ir

دریافت: ۸۸/۲/۲۶ پذیرش: ۸۸/۵/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: فلاو آنزیم دو عملکردی PutA (Proline utilization A) از دو دومن پرولین دهیدروژناز و Δ-پیرولین-۵-کربوکسیلات دهیدروژناز تشکیل یافته و نقش مهمی در مسیر متابولیسم پرولین به گلوتامات ایفاء می‌کند. هدف از این تحقیق، جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده فلاوآنزیم PutA با خصوصیات کینتیکی مناسب بود.

روش بررسی: برای این منظور نمونه‌های خاک مورد نیاز از مناطق مختلف دربند، درکه، دماوند و فرحزاد در شهر تهران جمع‌آوری شدند. جداسازی و غربالگری میکروارگانیسم‌های تولیدکننده فلاوآنزیم دو عملکردی با استفاده از دو روش تکنیک کشت غنی در محیط کشت اختصاصی پرولین و رنگ‌سنجی آنزیمی با واکنش رنگی فورمازان انجام شد و با سنجش آنزیمی تأیید گردید. شناسایی سویه جداسازی شده با کمک خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی انجام گرفت و فعالیت ویژه فلاوآنزیم محاسبه شد.

یافته‌ها: از مجموع ٤۰۰ باکتری جداسازی شده، تنها یک سویه تولیدکننده PutA بود که به عنوان *Pseudomonas fluorescens* تشخیص داده شد. فعالیت ویژه فلاوآنزیم نسبت به پرولین و Δ-پیرولین-۵-کربوکسیلات به ترتیب ۲۲/٤ U/mg و ۱۰/۷ U/mg محاسبه گردید.

نتیجه‌گیری: فعالیت ویژه این آنزیم نسبت به پرولین و Δ-پیرولین-۵-کربوکسیلات در مقایسه با مقادیر فلاوآنزیم‌های جدا شده از منابع دیگر، قابل قبول می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم، پرولین، *پسودوموناس فلورسنس*، فلاوآنزیم PutA، غربالگری.

مقدمه

آنزیم‌ها کاتالیزورهای زیستی مستعدی هستند که تمامی واکنش‌های شیمیایی ارگانیسم‌های زنده توسط آنها انجام شده و در فرآیندهای نظیر رشد و ابقاء سلول و ترانسفورماسیون ماکرومولکول‌ها نقش دارند. تمامی اجزای زنده شامل حیوانات، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها به عنوان منابع تولیدکننده آنزیم محسوب می‌شوند (۱ و ۲). ولیکن در زمینه آنزیم‌های صنعتی، میکروارگانیسم‌ها مهم‌ترین و ایده‌آل‌ترین منبع تولیدکننده آنزیم‌های مختلف با دامنه کاربردهای گسترده به شمار می‌آیند آن چنان که بر اساس آمارهای موجود بیش از ۹۰٪ آنزیم‌ها توسط آنها تولید می‌شوند. آنزیم‌ها به عنوان یکی از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه میکروبی محسوب می‌شوند که با استفاده از سیستم‌های تخمیر به طور موفقیت‌آمیز در مقیاس صنعتی تولید شده‌اند. از مزایای آنزیم‌های میکروارگانیسم‌ها می‌توان به امکان کنترل فیزیولوژیکی و فیزیکو شیمیایی، تنوع آنزیمی و

www.SID.ir

Archive of SID

مقادیر بالای تولید اشاره نمود (۳). در این راستا، جداسازی و غربالگری آنزیم‌های جدید با خصوصیات مؤثر و بهینه از میکروارگانیسم‌های ساکن طبیعت به عنوان اولین مرحله در مسیر تحقیق و توسعه محصولات آنزیمی محسوب می‌شود (۴). گروه مهمی از آنزیم‌ها که مطالعات غربالگری گسترده‌ای بر روی آنها انجام شده است، فلاوآنزیم‌ها می‌باشند (۵ و ۶). فلاو آنزیم دو عملکردی Proline utilization A (PutA) توسط ژن *putA* کد شده و از دو دومین پرولین دهیدروژناز و Δ-پیرولین-۵-کربوکسیلات دهیدروژناز تشکیل یافته است (۷). این آنزیم که نقش مهمی در مسیر متابولیسم پرولین به گلوتامات ایفاء می‌کند از منابع مختلف باکتریایی (۷)، گیاهی (۸) و حیوانی (۹) گزارش شده است.

در اولین مرحله از این مسیرمتابولیکی، پرولین دهیدروژناز در حضور کوآنزیم Flavin adenine dinucleotide (FAD) پرولین را به ترکیب حدواسط Δ-پیرولین-۵-کربوکسیلات تبدیل می‌نماید. $FADH_2$ تولید شده نیز الکترون‌های خود را به پذیرنده‌های زنجیره انتقال الکترون منتقل می‌کند. در دومین مرحله، Δ-پیرولین-۵-کربوکسیلات در یک واکنش غیرآنزیمی به گلوتامات-γ-سمی آلدئید هیدرولیز شده و سپس توسط آنزیم Δ-پیرولین-۵-کربوکسیلات دهیدروژناز و با حضور کوآنزیم NAD^+ به گلوتامات تبدیل می‌شود. در تمام یوکاریوت‌ها و برخی از باکتری‌ها نظیر *thermus thermophilus*، دو دومن این فلاوآنزیم توسط دو ژن جداگانه کد می‌شوند (۱۰). نقص ژنتیکی در مسیر متابولیکی پرولین به گلوتامات باعث بروز بیماری هایپرپرولینمیا در انسان می‌شود (۹). هر چند که شواهدی در خصوص ارتباط بین نقص مسیر متابولیسم پرولین و بروز بیماری اسکیزوفرنی و همچنین نقش آنزیم پرولین دهیدروژناز در مهار سرطان کشف شده است (۱۱).

هدف از این تحقیق، جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده فلاوآنزیم دو عملکردی PutA با خصوصیات کینتیکی مناسب بود. برای این منظور نمونه‌های مختلفی از شهر تهران جمع‌آوری شده و مطالعات غربالگری گسترده‌ای بر روی آنها صورت گرفت. بدیهی است که این آنزیم‌های باکتریایی می‌توانند مدل‌های مناسبی برای انجام مطالعات ساختاری و درک آنزیم‌های همتای آنها در انسان باشند. این مطالعه، اولین گزارش از جداسازی *Pseudomonas fluorescens* تولیدکننده فلاوآنزیم دو عملکردی PutA می‌باشد.

روش بررسی

گردآوری نمونه ها: نمونه‌های خاک مورد نیاز از مناطق مختلف دربند، درکه، دماوند و فرحزاد در شهر تهران جمع‌آوری شدند.

جداسازی و غربالگری باکتریهای تولید کننده فلاوآنزیم PutA: به منظور جداسازی میکروارگانیسم‌های تولیدکننده فلاوآنزیم دو عملکردی از دو روش تکنیک کشت غنی و رنگ‌سنجی آنزیمی استفاده شد.

الف) تکنیک کشت غنی: غربالگری اولیه باکتری‌های تولیدکننده PutA با روش تکنیک کشت غنی انجام شد. از هر نمونه خاک به مقدار یک گرم به ۵ میلی‌لیتر از محیط انتخابی شامل ۰/۵٪ (w/v) L-پرولین، ۲ گرم در لیتر دی هیدروژن پتاسیم فسفات، ۱ گرم در لیتر کلرید سدیم، ۰/۵ گرم در لیتر سولفات منیزیم، ۰/۵ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۵ گرم در لیتر پلی پپتون، pH=۷/۵ اضافه شده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای 37^{oC} و دور ۱۴۰ rpm در داخل انکوباتور شیکردار رشد داده شد. از هر لوله محیط کشت، سریال رقتی به میزان 10^{-4} تهیه گردید و ۵۰ ماکرولیتر از آن به محیط همتای جامد آگار برده و کشت داده شد. سپس محیط‌ها به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور 37^{oC} قرار گرفتند. تک کلنی‌های رشد کرده بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی متمایز شدند و سپس هر کلنی را به یک محیط آگار جدید انتقال داده و به منظور اطمینان از خالص بودن آنها تا سه مرتبه کشت داده شدند (۱۲).

ب) رنگ سنجی آنزیمی با واکنش رنگی فورمازان: در این روش به منظور تهیه پلیت‌های همانند (Replica plate)، میکروارگانیسم‌های جدا شده از خاک که در حدود ۴۰۰ کلنی بودند به پلیت‌های محیط کشت جامد آگار (در هر پلیت نزدیک ۱۰۰ کلونی) انتقال داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور 37^{oC} قرار گرفتند. بر روی کلنی‌های رشد کرده، کاغذ نیتروسلولزی قرار داده شد، به طوری که مقداری از هر یک از کلنی‌ها به کاغذ چسبیدند. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در محلولی از ۱۰ میلی‌گرم لیزوزیم و ۱۰ میلی‌مولار EDTA، (pH=۶/۰) در انکوباتور 37^{oC} قرار گرفتند و بعد از بیرون آوردن از انکوباتور، به مدت ۱۵ دقیقه در فریزر -20^{oC} و ۵ دقیقه در دمای اتاق قرارداده شدند. در ادامه برای جلوگیری از تشکیل ترکیب فورمازان ناشی از عملکرد آنزیم‌های زنجیره تنفسی، در بافر ۰/۱ مولار Tris-HCl (pH=۸/۰) حاوی ۵۰٪ گلیسرول و ۰/۰۵٪ Tween-80 مرطوب شده و به مدت ۱۰ دقیقه در 50^{oC}

www.SID.ir

Archive of SID

قرار داده شدند. در انتها بر روی کاغذ نیترو سلولز بافر ۰/۱ مولار Tris-HCl (pH=۸/۵) حاوی ۵۰٪ گلیسرول و ۰/۰۵٪ Tween-80، ۱۰ میلی‌مولار L– پرولین، ۰/۴ میلی‌مولار FAD (Flavin Adenine dinucleotide)، ۰/۵۴ میلی‌مولار INT (p-iodonitrophenyl tetrazolium) و ۰/۳۳ میلی‌مولار PMS (Phenazine methosulfate) اضافه شد و کلنی‌های که لکه‌های قرمز لاکی‌رنگ را تشکیل دادند جدا گردیدند (۱۳).

تولید فلاوآنزیم PutA: تولید آنزیم با استفاده از محیط کشت انتخابی شرح داده شده در قسمت روش‌های غربالگری انجام شد. هر یک از باکتری‌های جدا شده از غربالگری در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع و در شرایط دمای 37^{oC}، دور rpm ۱۴۰ و مدت زمان ۷۲ ساعت در داخل انکوباتور شیکردار رشد داده شدند. رسوب باکتری‌های رشد کرده با سانتریفوژ در دمای 4^{oC} و دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه جمع‌آوری شده و هر رسوب سلولی در ۱۰ میلی‌لیتر از بافر پتاسیم فسفات ۰/۱ مولار (pH=۷/۰) دارای ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۵ میلی‌مولار ۲- مرکاپتو اتانول، ۵٪ گلیسرول و ۰/۰۵٪ Tween80 حل گردید. سپس سوسپانسیون باکتریایی برروی یخ و به مدت زمان ۲۰ دقیقه با امواج kHz ۹ در دستگاه Ultrasonic Oscillator، سونیکه شد. به منظور شفاف شدن، سوسپانسیون حاصل از سونیکاسیون به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 4^{oC} و دور rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید و از محلول رویی جهت سنجش فعالیت آنزیمی و تعیین مقدار پروتئین استفاده شد (۱۴).

سنجش فعالیت آنزیمی: به منظور سنجش فعالیت فلاوآنزیم PutA، عصاره سلولی به دست آمده از سونیکاسیون به مخلوطی از بافر ۰/۱ مولار Tris-HCl (pH=۸/۵) حاوی ۵۰٪ گلیسرول و ۰/۰۵٪ Tween 80، ۱۰ میلی‌مولار L– پرولین، ۰/۴ میلی‌مولار FAD، ۰/۵۴ میلی‌مولار INT و ۰/۳۳ میلی‌مولار PMS در حجم نهایی ۲۵۰ میکرو مولار اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت rpm ۱۰۰ بر روی شیکر نوسانی انکوبه می‌شود. در شاهد، سوبسترای پرولین بوسیله آب جایگزین خواهد شد. تشکیل رنگ فورمازان در طول موج ۴۹۰ نانومتر در دستگاه الایزا ریدر اندازه گیری شده و هر واحد فعالیت آنزیمی به عنوان مقدار آنزیمی که ۱ میکرومول INT را در مدت یک دقیقه احیاء می‌کند، تعریف گردید. Δ-پیرولین-۵-کربوکسیلات دهیدروژناز در طول موج ۳۴۰ نانومتر و توسط اسپکتروفتومتر UV-visible مورد سنجش قرار گرفت. مخلوط واکنش با حجم ۱ میلی‌لیتر شامل محلول ۱۰ میلی مولار Δ-پیرولین-۵-کربوکسیلات ، ۲ میلی مولار NAD^+، ۲۰۰ میلی مولار بافر Tris-HCl (pH=۷/۵) و محلول آنزیم بود. در شاهد، سوبسترا بوسیله آب جایگزین گردید. واحد فعالیت آنزیمی به عنوان مقدار آنزیمی که تشکیل ۱ میکرومول NADH را در هر دقیقه کاتالیز می‌نماید، تعریف شد. (۷).

سنجش مقدار پروتئین: اندازه‌گیری غلظت پروتئین کل سویه باکتری تولیدکننده آنزیم با کمک کیت سنجش پروتئین Bio-Rad انجام شد (۱۵).

شناسایی سویه باکتری تولیدکننده آنزیم: تشخیص سویه باکتری جدا شده از خاک با کمک خصوصیات فنوتیپی نظیر مورفولوژی میکروسکوپی، واکنش رنگ‌آمیزی گرم، تست هیدروکسید پتاسیم ۳٪، رشد در دمای ۳۷ و ۴۱ درجه سانتی گراد و تست‌های بیوشیمیایی استاندارد نظیر Voges-Proskauer (VP)، Triple Sugar Iron Agar (TSIA)، سیترات، قرمز متیل، تولید ایندول، هیدرولیز اوره، اکسیداز، کاتالاز، احیاء نیترات، لسیتیناز (واکنش زرده تخم‌مرغ)، هیدرولیز ژلاتین، آرژینین دهیدرولاز، تولید پلی‌ساکارید Levan، لیزین دکربوکسیلاز، اورنیتین دکربوکسیلاز، تریپتوفان دآمیناز و تولید گاز سولفید هیدروژن انجام گرفت (۱۶).

یافته‌ها

در مرحله اول غربالگری که به وسیله تکنیک کشت غنی در محیط انتخابی حاوی اسیدآمینه پرولین به عنوان تنها منبع کربن، نیتروژن و القاء کننده آنزیم انجام شد، ۴۰۰ میکروارگانیسم مختلف از ۲۵ نمونه خاک مختلف، جداسازی شدند. سپس به منظور غربالگری بیشتر سویه‌های تولیدکننده فلاوآنزیم مورد نظر از روش رنگ‌سنجی آنزیمی با واکنش رنگی فورمازان استفاده شد. تنها ۴ باکتری از مجموعه ۴۰۰ کلونی باکتری قادر به تشکیل رنگ قرمز لاکی بودند که به منظور تأیید نهایی با روش سنجش آنزیمی انتخاب شدند. بر اساس نتایج به دست آمده از سنجش آنزیمی، تنها سویه S5H به عنوان تولیدکننده فلاوآنزیم PutA شناخته شد. بر اساس اطلاعات ب ندست آمده، این سویه فعالیت ویژه قابل ملاحظه‌ای نسبت به L- پرولین و همچنین Δ- پیرولین- ۵- کربوکسیلات از خود نشان داد و فعالیت ویژه آن نسبت به پرولین و Δ-پیرولین-۵-کربوکسیلات به ترتیب ۲۲/۴ U/mg و ۱۰/۷ U/mg محاسبه گردید. بر اساس مطالعات تاکسونومیکی انجام شده بر روی سویه تولیدکننده آنزیم که نتایج آن در جدول ۱ خلاصه شده است. این باکتری‌ها به عنوان *P. fluorescens* شناسایی شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- میکروارگانیسم‌های جدا شده از نمونه‌های خاک با کمک تکنیک کشت غنی

نمونه خاک	مکان و زمان جمع‌آوری	مشخصات ظاهری	تعداد باکتری‌های جدا شده بر روی محیط انتخابی
S1	تهران، منطقه فرحزاد، ۸۶/۸/۱۲	مرطوب، ماسه‌ای	۱۰
S2	تهران، منطقه فرحزاد، ۸۶/۸/۱۲	قهوه‌ای، مرطوب، چسبنده	۱۵
S3	تهران، منطقه فرحزاد، ۸۶/۸/۱۲	قهوه‌ای، نرم، ماسه‌ای	۲۰
S4	تهران، منطقه فرحزاد، ۸۶/۸/۱۲	مرطوب، شنی، نرم	۲۴
S5	تهران، منطقه فرحزاد، ۸۶/۸/۱۲	سیاه گل‌آلود	۲۰
S6	تهران، منطقه دربند، ۸۶/۸/۱۵	سیاه، مرطوب، سفت	۱۲
S7	تهران، منطقه دربند، ۸۶/۸/۱۵	مرطوب، ماسه‌ای	۱۴
S8	تهران، منطقه دربند، ۸۶/۸/۱۵	خشک، قهوه‌ای روشن	۱۷
S9	تهران، منطقه دربند، ۸۶/۸/۱۵	مرطوب، سیاه	۱۸
S10	تهران، منطقه دربند، ۸۶/۸/۱۵	مرطوب، سیاه، خوشه‌ای	۲۲
S11	تهران، منطقه درکه، ۸۶/۸/۱۷	خشک، قهوه‌ای روشن، نرم	۶
S12	تهران، منطقه درکه، ۸۶/۸/۱۷	خشک، نرم، قهوه‌ای	۹
S13	تهران، منطقه درکه، ۸۶/۸/۱۷	مرطوب، سیاه، نرم	۱۱
S14	تهران، منطقه درکه، ۸۶/۸/۱۷	مرطوب، سیاه	۱۹
S15	تهران، منطقه درکه، ۸۶/۸/۱۷	قهوه‌ای مرطوب، سفت	۲۰
S16	تهران، منطقه درکه، ۸۶/۸/۱۷	خشک، ماسه‌ای، نرم	۱۶
S17	تهران، منطقه دماوند، ۸۶/۸/۲۰	ماسه‌ای، قهوه‌ای روشن	۲۴
S18	تهران، منطقه دماوند، ۸۶/۸/۲۰	قهوه‌ای روشن، سفت	۵
S19	تهران، منطقه دماوند، ۸۶/۸/۲۰	خشک، سفت، قهوه‌ای تاریک	۱۷
S20	تهران، منطقه دماوند، ۸۶/۸/۲۰	مرطوب، مجزا	۲۰
S21	تهران، منطقه دماوند، ۸۶/۸/۲۰	مرطوب، ماسه‌ای	۲۳
S22	تهران، منطقه دماوند، ۸۶/۸/۲۱	گل‌آلود	۱۹
S23	تهران، منطقه دماوند، ۸۶/۸/۲۱	گل‌آلود	۱۰
S25	تهران، منطقه دماوند، ۸۶/۸/۲۱	گل‌آلود	۱۱
S26	تهران، منطقه دماوند، ۸۶/۸/۲۱	خشک، قهوه‌ای روشن، نرم	۱۸

بحث

در این تحقیق با هدف دستیابی و شناسایی سویه‌های تولیدکننده فلاو آنزیم PutA، مطالعات جداسازی و غربالگری گسترده‌ای بر روی باکتری‌های خاکزی صورت گرفت. برای این منظور، ابتدا ۲۵ نمونه مختلف خاک از مناطق دربند، درکه، دماوند و فرحزاد در شهر تهران جمع‌آوری شدند. سپس بر اساس تجربیات Asano و همکارانش و همچنین مجری طرح، محیط کشت اختصاصی که از اسیدآمینه پرولین به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن استفاده می‌کند، طراحی و ساخته شد (۱۲ و ۱۳). نمونه‌های جمع‌آوری شده پس از کشت در داخل محیط‌های مایع و رقیق‌سازی به میزان ۴-۱۰ به داخل محیط‌های جامد آگار انتقال داده شده و از آنها کلونی‌های خالص تهیه گردید. در مرحله اول غربالگری که به وسیله تکنیک کشت غنی در محیط انتخابی حاوی اسیدآمینه پرولین به عنوان تنها منبع کربن، نیتروژن و القاءکننده آنزیم انجام شد، ۴۰۰ میکروارگانیسم مختلف از ۲۵ نمونه خاک مختلف، جداسازی شدند. سپس با توجه به این که، این مرحله تنها به عنوان غربالگری اولیه محسوب شده و احتمال رشد باکتری‌های ناخواسته واجد فلاوآنزیم‌های دیگر وجود داشت، از روش دقیق‌تر رنگ سنجی آنزیمی با واکنش رنگی فورمازان استفاده شد. با انجام رنگ‌سنجی آنزیمی، از مجموع ۴۰۰ کلونی جدا شده در مرحله اول، تنها ۴ کلونی قادر به تشکیل رنگ قرمز لاکی بودند که به منظور تأیید نهایی با روش سنجش آنزیمی انتخاب شدند. در ادامه به منظور تأیید نهایی و اطمینان حاصل نمودن از تولید آنزیم، این ۴ کلونی جدا شده در محیط‌های مایع به مقدار حجیم کشت داده شدند که پس از تهیه رسوب سلولی و انجام سنجش آنزیمی در حضور پرولین و Δ-پیرولین-۵-کربوکسیلات، تنها یک سویه به عنوان تولیدکننده قطعی فلاوآنزیم PutA شناخته شد. این سویه فعالیت ویژه قابل ملاحظه‌ای نسبت به L- پرولین و همچنین Δ- پیرولین- ۵- کربوکسیلات از خود نشان داد و فعالیت ویژه آن نسبت به پرولین و Δ-پیرولین-۵-کربوکسیلات به ترتیب ۲۲/۴ U/mg و ۱۰/۷ U/mg محاسبه گردید. این سویه که با عنوان S5H نامگذاری شده و از نمونه خاک جمع‌آوری شده از منطقه فرخزاد جداسازی شده بود، به منظور شناسایی جنس و گونه تحت مطالعات تاکسونومیکی قرار گرفت. بر اساس مطالعات تاکسونومیکی انجام شده بر

www.SID.ir

Archive of SID

روی سویه تولیدکننده آنزیم که نتایج آن در جدول ۱ خلاصه شده است. این باکتری‌ها به عنوان *P. fluorescens* شناسایی شد. همچنین با توجه این که خصوصیات بیوشیمیایی *P. fluorescens* و *P. putida* بسیار نزدیک هم بوده و در مواردی احتمال اشتباه وجود دارد. از تست افتراقی ژلاتین استفاده شد که در *P. fluorescens* ۱۰۰٪ مثبت بوده و در *P. putida* ۱۰۰٪ منفی می باشد (۱۶). انجام این تست در سه مرتبه، *P. fluorescens* بودن سویه مورد نظر را تأیید نمود. با وجود این که گزارشات متعددی در خصوص جداسازی فلاوآنزیم PutA از گیاهانی نظیر جلیک کلرلا (۱۸) و باکتری‌های نظیر Escherichia coli (۱۹) و Salmonella typhimurium (۲۰) وجود دارد، ولیکن در جداسازی این فلاوآنزیم از سویه *P. fluorescens* گزارشی ثبت نشده است.

نتیجه‌گیری

مطالعه انجام شده اولین گزارش از جداسازی *P. fluorescens* تولیدکننده فلاوآنزیم PutA می‌باشد. فعالیت ویژه این آنزیم نسبت به پرولین و Δ-پیرولین-۵-کربوکسیلات به ترتیب ۲۲/۴ U/mg و ۱۰/۴ U/mg بود که در مقایسه با مقادیر فلاوآنزیم‌های جدا شده از از منابع دیگر، قابل قبول می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از گروه بیوشیمی و میکروبیولوژی انستیتو پاستور ایران به منظور همکاری در انجام آزمایشات و استفاده از تجهیزات مورد نیاز در اجرای این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1- Palmer T. *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology and Clinical Chemistry*. Harwood Publishing Limited, International Publishers, Coll House, Weatergate, Chichester, Weat Sussex; 2003: 354-355.

2- Acehle W. *Enzymes in industry, Production and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim; 2004: 244-246.

3- Buchholz K, Kasche V, Bornscheuer UT. *Biocatalysts and Enzyme Technolgy*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim; 2005: 186-192.

4- Desai M.A. *Downstream processing of proteins: methods and protocols*. Humana Press, Totowa; 2000: 23-40.

5- Sakuraba H, Takamatsu Y, Satomura T, Kawakami R, Ohshima T. *Purification, characterization, and application of a novel dye-linked L-proline Dehydrogenase from a hyperthermophilic archaeon, hermococcus profundus.* Applied and environmental microbiology. 2001, 67: 4: 1470-1475.

6- Kawakami R, Sakuraba H, Tsuge H, Goda S, Katunuma N. Ohshima T. *A second novel dye-linked L-proline dehydrogenase complex is present in the hyperthermophilic archaeon pyrococcus horikoshii OT-3.* FEBS 2005; 272: 4044- 4054.

7- Meile L, Leisinger T. *Purification and properties of the bifunctional proline dehydrogenase/1- pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from Pseudomonas aeruginosa.* Eur. J. Of Biochem. 1982; 129: 67- 75.

8- Kiyosue T. Yoshiba Y, Yamaguchi-Shinozaki K. Shonozaki K. *A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in Δ raline metabolism is upregulated by praline but downregluated by dehydration in Arbidopsis*. American society of plant physiologists. 1996; 8: 1323-1335.

9- Gogos JA, Santha M, Takacs Z, Beck KD, LuineV, Lucas1 L R, Nadler JV, Karayiorgou M. *The gene encoding proline dehydrogenase modulates sensorimotor gating in mice. Nature genetics.* 1999; 21: 434-439.

10- White TA, Krishnan N, Becker D F, Tanner J J. *Structure and kinetics of monofunctional proline dehydrogenase from Thermus thermophilus.* J. Biol. Chem. 2007; 282: 19: 14316-14327.

11- Jaequet H, Raux G, Thibaut F, Hecketsweler B, Houy E, Demilly C., et al. *PRODH mutations and hyperprolinemia in a subset of schizophrenic patients.* Hum. Mol. Genet. 2002; 11: 9: 2243-2249.

12- Hongpattarakere T, Seksun N Suriya A. *Isolation and screening of D-amino acid amidase producing bacteria from soil samples. Songklanakarin*. J. Sci. Technol. 2003; 25: 2: 255-265.

13- Shahbaz Mohammadi H, Omidinia E, Lotfi AS, Saghiri R. *Preliminary report of NAD^+- dependent amino acid dehydrogenase producing bacteria isolated from soil.* Iranian Biomed. J. 2007; 11: 2: 131- 135.

14- Shahbaz Mohammadi H, Omidinia E. *Purification of recombinant phenylalanine dehydrogenase by partitioning in aqueous two-phase systems*. J. Chromatogr. B 2007; 854: 273-278.

15- Bradford M.M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976; 72: 248-254.

16- Baron EJ, Finegold SM. Bailey and Scotts's. *Diagnostic microbiology.* 8th edition, the C.V. Mosby Company, ST. Louis. Baltimore. Philadelphia. Toronto. 1990: 363-407.

17- Asano Y, Tanetani M. *Thermostable phenylalanine dehydrogenase from a mesophilic Microbacterium sp. Strain DM86-1*. Arch. Microbiol. 1998; 169: 220-224.

18- Mcnamer AD, Stewart CR, *Nicotinamide adenine dinucleotide-dependent Δ raline dehydrogenase in chlorella.* Plant Physiol. 1973; 53: 440-444.

19- Baban BA, Vinod M P, Tanner JJ, Becker D F. *Probing a hydrogen bond pair and the FAD redox properties in the Δ raline dehydrogenase domain of Escherichia coli PutA.* BBA 2004; 1701: 49-59.

20- Menzel R, Roth J. *Enzymatic properties o f the purified PutA protein from Salmonella typhimurium.* J. Biol. Chem. 1981; 256: 18: 9762-9766.

www.SID.ir