Archive of SID

روش سادهٔ اسپکتروفتومتری برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پکتین‌استراز پوست پرتقال

دردی قوجق[۱] و سید احسان موسوی[۲]

چکیده

هدف از این پژوهش استفاده از روشی ساده برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پکتین‌استراز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد است. پرتقال رسیده در فصل زمستان از فروشگاه‌های محلی تهیه شد. پنج گرم پوست پرتقال در محلول ۱۰ درصد سدیم کلراید و بافر فسفات ۰/۵ مولار هموژنیزه گردید. مخلوط هموژنیزه با ۳۵۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شده، محلول رویی جمع‌آوری، و توسط سود ۰/۱ مولار، pH آن به ۷/۲۵ رسانده شد. جذب هر یک از نمونه‌ها در طول موج ٤٨٥ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت گردید. فعالیت آنزیم پکتین‌استراز برحسب میکرومول متانل تولید شده در هر دقیقه در میلی‌لیتر محاسبه شد.

نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم پکتین‌استراز تا حدود ۰/۰۵ واحد آنزیمی قابل اندازه‌گیری است. در مقایسه با دیگر روش های استفاده شده، روش به کار رفته در این پژوهش روشی ساده، ارزان و حساس است. از این روش می‌توان در صنایع غذایی و صنایع تبدیلی، برای هدف‌های آنالیز پکتین و پکتین‌استراز استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: *پکتین، فعالیت پکتین‌استراز، روش اسپکتروفتومتری*

مقدمه

پکتین از مونومرهای اسید گالاکتورونیک و گالاکتورونیک متیل استر با اتصال آلفا ٤و١ تشکیل می‌شود. هم‌چنین، پکتین با فعالیت آنزیم‌های گروه پکتیناز هیدرولیز می‌گردد. تجزیه پکتین در بیماری‌های گیاهی، کامل شدن و رسیدن میوه، تغذیه و پایداری محصولات غذایی نقش بسیار مهمی دارد (۱). آنزیم پکتین‌استراز (پکتین، پکتیل هیدرولاز و EC.۳,۱.۱.۱۱) متیل استرهای پکتین را هیدرولیز می‌نماید. این آنزیم پکتین‌های حاوی هیدروکسیل را به پکتین‌های با هیدروکسیل کم و متانل تبدیل می‌کند. پکتین‌استراز علاوه بر گونه‌های گیاهی، توسط برخی از باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا نیز تولید می‌شود. آنزیم پکتین‌استراز گیاهی در تبدیل پروتوپکتین غیرمحلول به پکتین محلول و پکتات نقش مهمی دارد (۲). آنزیم پکتین‌استراز بر پکتین اثر کرده و گروه‌های کربوکسیل آزاد را بلوکه می‌نماید،

۱. به ترتیب دانشیار بیوشیمی و مربی میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

www.SID.ir

Archive of SID

و پکتین‌استراز پوست پرتقال محل گروه‌های متیل‌استر موجود در جوار گروه‌های کربوکسیل را هیدرولیز می‌کند (۳). پکتین‌استراز (پکتین، پکتیل هیدرولاز) مولکول پکتین را استریفیه می‌کند و مولکول‌های متانل و اسید پکتیک را آزاد می‌سازد (٤).

آنزیم پکتین‌استراز از میوه (موز، پرتقال و گوجه‌فرنگی)، قارچ‌ها و باکتری‌ها استخراج و خالص‌سازی شده است. وزن مولکولی این آنزیم با روش الکتروفورز با ژل پلی‌آکریل‌آمید حدود ۲۷۸۰۰ تا ۲۸٤۰۰ دالتون و با روش ژل کروماتوگرافی در حدود ۲۷٦۰۰ تا ۲۸۱۰۰ دالتون به دست آمده است. نقطه ایزوالکتریک آن برابر ٦/۸ است و مقدار Km آن در دمای ۳۰ درجه برابر با ٦۰۰۰ گرم در دسی‌لیتر و pH بهینه آن برابر با ۷ می‌باشد. مهارکننده این آنزیم سدیم پلی‌پکتات است (۵).

آنزیم پکتین‌استراز از مرکبات و پوست میوه‌های دیگر، از طریق رسوب دادن توسط آمونیوم سولفات و با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی استخراج شده است (٦). پکتین متیل استراز آنزیمی است که پکتین متیل هیدروکسیله را در دیواره سلول گیاهی استریفیه می‌کند (۷). روش‌های زیادی برای اندازه‌گیری محصول آنزیم پکتین‌هیدرولاز و فعالیت آنزیم پکتین استراز استفاده شده است. برای مثال، در یک روش متانول تولید شده توسط کروماتوگرافی و کالریمتری اندازه‌گیری شده است (۲). در روشی دیگر، اسید تولید شده از طریق تیتراسیون با استفاده از pH متر اندازه گرفته شده است. در یک روش دیگر هیدرولیز، پارانیتروفنیل استات توسط استراز با روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شده است. روش کروماتوگرافی برای اندازه‌گیری متانل بسیار حساس است، ولی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم معمول نمی‌باشد. برای انجام روش کالریمتری و تیتراسیون برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پکتین‌استراز، حجم‌های وسیع مواد اولیه مورد نیاز است و انجام آزمایش‌ها زمان زیادی طول می‌کشد.

در این پژوهش با توجه به محدودیت‌های ذکر شده، روش ساده‌تر و حساس‌تری برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پکتین‌استراز طراحی شد، بدین ترتیب که روش اسپکتروفتومتری برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پکتین‌استراز مورد استفاده قرار گرفت و متانل آزاد شده در نتیجه فعالیت آنزیم پکتین‌استراز اندازه‌گیری شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

پرتقال از فروشگاه‌های محلی مازندران در فصل زمستان تهیه شد. نمک طعام، فسفات پتاسیم، سود، پکتین، پکتین‌استراز، الکل‌اکسیداز، پراکسیداز، ٤-آمینوآنتی‌پیرین و ام-هیدروکسی بنزوییک اسید از شرکت سیگما تهیه گردید. دیگر مواد شیمیایی و محلول‌ها در حد آزمایشگاهی بوده و از شرکت مرک تهیه شد.

روش آزمایش

پوست پرتقال گرفته شد و پنج گرم آن در بافر فسفات ۰/۵ مولار و محلول نمک طعام ۱۰٪ (W/V)، در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد هموژنیزه گردید. سپس هموژن تهیه شده در ۳۵۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی حاصل به یک لوله آزمایش دیگر انتقال یافت و pH آن با افزایش سود ۰/۱ مولار به ۷/۲۵ رسانده شد. پس از آن مقدار پنج میکروگرم پکتین، ۰/٦ واحد از الکل‌اکسیداز، ۰/٤ واحد از پراکسیداز، ۰/۸ میلی‌مول در لیتر از معروف ٤-آمینوآنتی‌پیرین، ۰/۲ میلی‌لیتر از ام-هیدروکسی بنزوییک اسید پنج میلی‌مول در لیتر و ۱۰ واحد از پراکسیداز برای انجام هر آزمایش به هر میلی‌لیتر محلول رویی حاصل افزوده شد و محلول نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید.

در این آزمایش، پکتین توسط پکتین‌استراز به متانل و پکتات تبدیل شد و متانل حاصل توسط الکل‌اکسیداز به فرم آلدیید و آب اکسیژنه تبدیل گردید و توسط آنزیم پراکسیداز در حضور معرف ٤-آمینوآنتی‌پیرین متیل بنزوییک اسید به کینون‌ایمین تبدیل شد. در طول موج ٤۸۵ نانومتر، جذب هر

www.SID.ir

Archive of SID

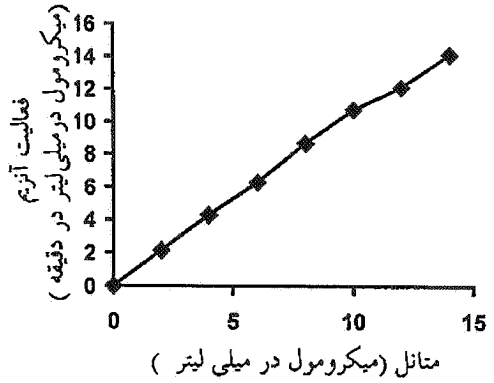
یک از نمونه‌ها اندازه‌گیری شد (۸). برای تهیه نمونه استاندارد پکتین، مقدار ۱۰ میکروگرم از پکتین به محلول گرماگذاری فوق اضافه و پس از آن مقدار ۵۰ میکرولیتر از پکتین‌استراز استاندارد افزوده شد. پس از ۱۰ دقیقه گرماگذاری، میزان جذب هر نمونه تهیه شده همانند نمونه‌های دیگر خوانده شد. فعالیت آنزیم پکتین‌استراز برحسب میکرومول متانل تولید شده در هر دقیقه در هر میلی‌لیتر محلول هموژنیزه محاسبه گردید.

نتایج

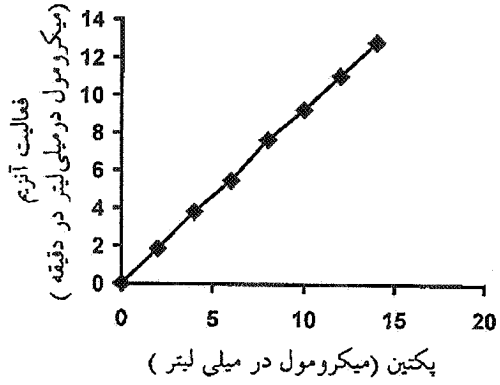
در این پژوهش، روشی حساس برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پکتین‌استراز طراحی شد، به طوری که پیوندهای استری پکتین توسط آنزیم پکتین‌استراز هیدرولیز و متانل و پکتات تولید گردید. متانل تولید شده توسط الکل‌اکسیداز به فرم آلدیید و آب اکسیژنه تبدیل شد. آب اکسیژنه تولید شده با استفاده از معرف ٤-آمینوآنتی‌پیرین به کینون تبدیل و با روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری گردید. منحنی کالیبراسیون فعالیت آنزیم پکتین‌استراز پوست پرتقال، بر حسب تغییرات غلظت متانل در نمودار ۱ نشان داده شده است. همان گونه که در این نمودار دیده می‌شود، تا حدود ۱۰ میکرومول در میلی‌لیتر، منحنی به صورت خطی است، که در حدود غلظت نمونه‌های تهیه شده است و حداکثر تا ١٦ میکرومول در میلی‌لیتر نیز می‌توان از این نمودار استفاده کرد.

فعالیت آنزیم پکتین‌استراز پوست پرتقال بر حسب غلظت سوبسترا در نمودار ۲ نشان داده شده است. این نمودار نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم پکتین‌استراز را در غلظت‌های بسیار کم سوبسترا می‌توان اندازه‌گیری نمود. به طوری که در حدود میکروگرم سوبسترا فعالیت آنزیم پکتین‌استراز قابل اندازه‌گیری است.

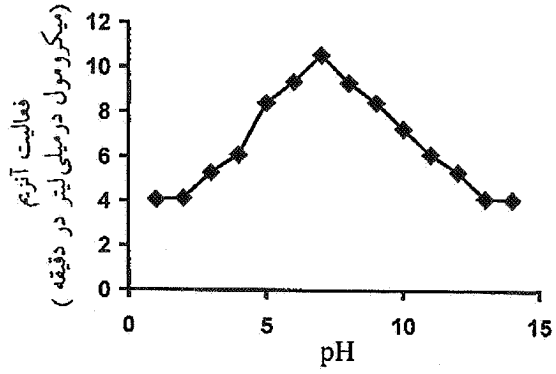
فعالیت آنزیم پکتین‌استراز بر حسب تغییرات pH در نمودار ۳ نشان داده شده است. این نمودار بیانگر این است که مناسب‌ترین pH برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پکتین‌استراز در حدود ٦-٨ است. مقادیر فعالیت آنزیم پکتین‌استراز پوست



نمودار ۱. منحنی کالیبراسیون فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف محصول واکنش (هر یک از نقاط به صورت Mean±SD ارائه شده و حاصل شش بار تکرار آزمایش است).



نمودار ۲. منحنی کالیبراسیون فعالیت آنزیم (هر یک از نقاط به صورت Mean±SD ارائه شده و حاصل شش بار تکرار آزمایش است).



نمودار ۳. فعالیت آنزیم در pH های مختلف (هر یک از نقاط به صورت Mean±SD ارائه شده و حاصل شش بار تکرار آزمایش است).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. فعالیت آنزیم بر حسب میکرومول متانول تولید شده در میلی‌لیتر در دقیقه، در نمونه‌های مختلف تهیه شده از پوست پرتقال

شماره آزمایش	حجم نمونه (میلی‌لیتر)	فعالیت آنزیم (میکرومول در میلی‌لیتر در دقیقه)
۱	۰/۱	۰/۰۵±۰/۰۲
۲	۱	۱/۹۶±۰/۱٤
۳	۲	۲/۷٤±۰/۱۵
٤	۳	٤/۸۳±۰/۱۲
۵	٤	٦/۵۲±۰/۱٤
٦	۵	۸/٤۹±۰/۱۳

پرتقال در نمونه‌های مختلف هموژنیزه پوست پرتقال در جدول ۱ نشان داده شده است. این جدول نشان می‌دهد که با حجم نمونه در حدود ۰/۱ میلی‌لیتر می‌توان فعالیت آنزیم پکتین‌استراز را اندازه‌گیری نمود. در صورتی که در روش‌های دیگر (۲، ۳ و ۱۱) حداقل پنج میلی‌لیتر از نمونه لازم است.

بحث

در صنعت، تبدیل پروتوپکتین غیر محلول میوه‌ها توسط آنزیم پکتین‌استراز به پکتین و پکتات محلول اهمیت زیادی دارد. برای سنجش مقدار فعالیت آنزیم مورد نیاز، با توجه به دقت و سادگی، روش اندازه‌گیری متانل آزاد شده توسط اسپکتروفتومتری بسیار مناسب است. تا به حال، فعالیت آنزیم پکتین‌استراز از طریق تیتراسیون گروه‌های کربوکسیل آزاد شده در طول انکوباسیون نمونه‌های حاوی پکتین در حضور آنزیم پکتین‌استراز و یا از طریق اندازه‌گیری متانل آزاد شده صورت می‌گرفت (۱). در روش شرح داده شده در این پژوهش، پیوندهای استری‌پکتین توسط آنزیم پکتین‌استراز هیدرولیز گردید و متانل، اسید و پکتات تولید شد. متانل تولید شده با استفاده از الکل‌اکسیداز به فرم آلدیید و آب اکسیژنه درآمد. آب اکسیژنه تولید شده با استفاده از واکنش با معرف ٤-آمینوآنتی‌پیرین و ام-هیدروکسی بنزوییک اسید، در حضور پراکسیداز به کینون و آب تبدیل گردید. میزان جذب محلول‌های تهیه شده توسط اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد.

روش حاضر در مقایسه با روش‌های دیگر (۲و۳) مراحل آزمایش کمتری دارد و زمان و هزینه کمتری صرف می‌شود. هم‌چنین، معرف ٤-آمینوآنتی‌پیرین و ام-هیدروکسی بنزوییک اسید در حضور آنزیم پراکسیداز و تبدیل آب اکسیژنه به ترکیب رنگی کینون، در این پژوهش برای اولین بار در اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پکتین‌استراز پوست پرتقال مورد استفاده قرار گرفت. روش اسپکتروفتومتری استفاده شده در این آزمایش، مقادیر متانل آزاد شده در طی واکنش انجام شده را از مقدار ۰/۱ تا ۱۰ میکرومول در لیتر اندازه‌گیری می‌کند و منحنی کالیبراسیون تا مقدار ۱۰ میکرومول در میلی‌لیتر به صورت خطی است (منحنی ۱)، و می‌توان تا حدود ۱٦ میکرومول در میلی‌لیتر از این نمودار استفاده کرد. در روش‌هایی که اندازه‌گیری pH و تغییرات غلظت یون هیدروژن مورد بررسی قرار می‌گیرد، حجم محلول زیاد (حداقل یک میلی‌لیتر) و مقدار سوبسترای زیاد (حداقل ۱۰۰ میکروگرم) لازم است (۱۱)، در حالی که در روش حاضر مقدار سوبسترای لازم خیلی کم و در حد میکروگرم است (منحنی ۲). بنابراین، با روش به کار گرفته شده در این پژوهش، می‌توان مقادیر کم پکتین را در نمونه اندازه‌گیری نمود (جدول ۱).

در این روش محلول‌هایی از پکتین پوست پرتقال از صفر تا ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده گردید و فعالیت آنزیم پکتین‌استراز پوست پرتقال اندازه‌گیری شد. نتایج به دست آمده با گزارش پژوهشگران دیگر (۹ و ۱۰) هم‌خوانی دارد. روش

www.SID.ir

Archive of SID

اسپکتروفتومتری یاد شده روشی ساده برای اجرا است و به حجم سوبسترای کم (۰/۱ میلی‌لیتر) نیاز دارد. این روش نسبت به روش‌های دیگر حساس، دقیق (۰/۰۵-۸/۴۹ میکرومول در میلی‌لیتر در دقیقه)، و از نظر اقتصادی، با توجه به مراحل کم و زمان کمتر، بسیار مناسب است و به تجهیزات پرهزینه نیاز ندارد، زیرا اسپکتروفتومتر در همه آزمایشگاه‌ها موجود است (۱۱، ۱۲ و ۱۳). از روش استفاده شده در این پژوهش می‌توان برای اندازه‌گیری فعالیت دیگر آنزیم‌های دسته استراز استفاده کرد.

منابع مورد استفاده

1. Hagerman, A. E. and P. J. Austin. 1986. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. J. Agric. Food Chem. 34: 440-447.
2. Mangos, T. J. and M. J. Hass. 1997. A spectrophotometric assay for the enzymatic demethoxylation of pectins and the determination of pectinesterase activity. Anal. Biochem. 244: 357-366.
3. Lee, M. and J. D. Macmillan. 1970. Mode of action of pectic enzymes. III. Site of initial action of tomato pectinesterase on highly esterified pectin. Biochem. 9: 1930-1934.
4. Forster, H. 1988. Pectinesterase from phytophthora infestans. Methods in Enzymol. 38: 355-361.
5. Schejter, A. and L. Marcus. 1988. Isoenzyme of pectinesterase and polygalacturonase from *Botrytis cinerea* Pers. Methods in Enzymol. 40: 366-373.
6. Christensen, I. M., J. E. Nielsen, J. D. Kreiberg, P. Rasmussen and J. D. Mikkelsen. 1998. Pectin methyl esterase from orange fruit. Characterization and localization by in-situ hybridization and immunohistochemistry. Planta 206(4): 493-503.
7. Gaffe, J., M. E. Liznado and A. K. Handa. 1997. Characterization and functional expression of a ubiquitously expressed tomato pectin methylesterase. Plant Physiol. 114(4): 1547-1556.
8. Trinder, P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. Anal. Clin. Biochem. 6(2): 101-105.
9. Downie, B., L. M. Dirk, K. A. Hadfield, A. B. Bennett and K. J. Bradford. 1998. A gel diffusion assay for quantification of pectin methyl esterase activity. Anal. Biochem. 264(2): 149-157.
10. Catoire, L., M. Pierron, C. Morvan, C. H. Penhoat and R. Goldberg. 1998. Investigation of the action patterns of pectin methyl esterase isoforms through kinetic analyses and NMR spectroscopy. Implications in cell wall expansion. J. Biol. Chem. 273(50): 33150-33156.
11. Wood, P. J. and I. R. Siddiqui. 1971. Determination of methanol and its application measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity. Anal. Biochem. 39: 418-428.
12. Zimmerman, R. E. 1978. A rapid assay for pectinesterase activity which can be used as a prescreen for pectinesterase inhibitors. Anal. Biochem. 85: 219-223.
13. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

www.SID.ir