Archive of SID

مجلهٔ پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
شمارهٔ ۶۲ (تابستان ۱۳۸۳)، صفحات ۴۶-۴۰

خالص سازی آنزیم پلی گالاکتوروناز از سویه F۵۸ قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم*

دکتر نصرت الله ضرغامی: استادیار گروه بیوشیمی بالینی ، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
بهرنگ علنی: مربی پژوهشی علوم سلولی وملکولی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز : نویسنده رابط
دکترمصطفی مطلبی: دانشیار گروه زیست شناسی دانشگاه رازی کرمانشاه
دکترمحمد رضا زمانی: دانشیار گروه زیست شناسی دانشگاه رازی کرمانشاه
دکترعلی خسروبیگی: دانشجوی Ph.D بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر محمد رهبانی نوبر: استاد گروه بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

چکیده

زمینه و اهداف: آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در محیط حاوی پکتین توسط طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها به خصوص سویه‌های قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم* ترشح می‌شود که امروزه کاربردهای پزشکی، دارویی و صنعتی فراوانی دارد. هدف از این تحقیق استخراج و خالص سازی آنزیم پلی گالاکتوروناز از طریق کروماتوگرافی تبادل یونی بود.

روش بررسی: سویه F۵۸ قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم* که در این تحقیق مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت، از مرکز تحقیقات جهاد دانشگاهی کرمانشاه تهیه شده بود. قبلا مشخص شد که این سویه توانایی تولید میزان بالای آنزیم را داراست. جهت خالص سازی آنزیم پلی‌گالاکتوروناز از روش کروماتوگرافی تبادل یونی از نوع کاتیونی بر روی بستر CM-Sepharose Fast Flow با pH معادل ۵/۵ تنظیم شده توسط بافر استات سدیم ۵۰ میلی مول استفاده شد. برای جدا سازی پروتئین‌های متصل به ستون، شیب نمک کلرید سدیم یک مول به کار رفت.

یافته ها: نتایج حاصل از کروماتوگرافی وجود اوج فعالیت آنزیمی را بر روی نمودار خالص سازی در ناحیه شیب نمکی ۰/۲ تا ۰/٤ مولار نشان داد. انتخاب نمونه های با فعالیت آنزیمی بسیار بالا در این ناحیه ، تغلیظ و SDS-PAGE پروتئین های این ناحیه وجود دو نوار با وزنهای مولکولی حدود ۳۸ و ٤۰ کیلو دالتون را مشخص کرد. همچنین در بررسی فعالیت آنزیمی توسط ژل آکریلامید حاوی سوبسترای آنزیمی، دو نوار مجزا که نشان دهنده ایزوآنزیم های این آنزیم بودند، مشاهده شد.

نتیجه گیری: با توجه به اهمیت و کاربرد وسیع این آنزیم، بهینه سازی روند تولید، استخراج، تخلیص و عرضه این آنزیم می‌تواند نقش بسزایی در جهت برآورده شدن نیازهای پزشکی و صنعتی امروزی داشته باشد.

کلید واژه ها: *فوزاریوم اگزیسپوروم* ، پلی گالاکتوروناز، خالص سازی، کروماتوگرافی تبادل یونی

مقدمه

آنزیم پلی گالاکتوروناز[1] (EC 3.2.1.15) با نام تجاری پکتیناز دارای ساختار گلیکوپروتئینی است. این آنزیم عضو خانواده ۲۸ گلیکوزیل هیدرولازها با عملکرد هیدرولازی است که بسته به نوع ارگانیسم تولید کننده آن به شکل مونومر یا دیمر وجود دارد. پکتیناز درگیاهان، نماتودها، باکتری‌ها و قارچ‌ها به خصوص قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم*[2] مشاهده می شود و هیدرولیز پیوندهای آلفا(٤←۱) گلیکوزیدی در بین زنجیرهای پکتینی و تبدیل آن به زیرواحدهای مونو و دی گالاکتورونیک اسید را کاتالیز می‌کند (۱). ایزوآنزیم‌های پلی گالاکتورونازی بسته به ارگانیسم مولد دایمی یا القایی تولید می شوند. در فرم القایی، تولید و ترشح آنزیم توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها به‌خصوص قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم* در حضور مقادیر بسیار کم پکتین یا قطعات اولیگومر آن در محیط کشت صورت می گیرد. با وجود این، «وازکس» و همکاران نشان دادند که ترشح القایی آنزیم به محیط کشت توسط مهارکننده‌های متابولیتی نظیر گلوکز متوقف می‌شود(۲). همچنین آنتی بیوتیک تونیکامایسین با مهار گلیکوزیلاسیون انتهای آمینی آنزیم در قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم*، از ترشح آن به محیط ممانعت می کند. بنابراین احتمالاً در برخی از ایزوآنزیم‌های پلی گالاکتورونازی گلیکوزیلاسیون این ناحیه نقش مهمی در ترشح آنزیم ایفا می کند (۳). بررسی خصوصیات بیوشیمیایی ایزوآنزیم های پلی گالاکتورونازی نشان داده است که درشرایط آزمایشگاهی در pH اسیدی و دمای ۳۰ تا ۵۰ درجه سانتیگراد حداکثر فعالیت را دارا هستند (٤). با وجود این، «رونسرو»و همکاران در ۱۹۹٦ نشان دادند که pH مطلوب برای فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز می‌تواند به نوع سوبسترا نیز بستگی داشته باشد.آنزیم پلی گالاکتوروناز خالص‌سازی شده از قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم* در محیط حاوی پکتین در pH برابر ۵ و در

1. Polygalacturonase
2. Fusarium oxysporum

www.SID.ir

Archive of SID

محیط حاوی پلی گالاکتورونیک اسید در pH برابر۷ حداکثر فعالیت را ازخود نشان داد (۵). pH ایزوالکتریک ایزوآنزیم‌های آن بین ۳ تا ۸ متغیر است (٦).

امروزه این آنزیم کاربرد فراوانی در زمینه های مختلف از قبیل پزشکی، صنایع دارویی وغذایی دارد. از آن جا که در بیماری «آندرسن»[1] (گلیکوژنوزیس نوع٤) به دلیل نقص در فعالیت آنزیم ۱و٤ گلوکان ٦ گلیکوزیل ترانسفراز، ترکیبات پلی‌ساکاریدی در کبد و سیستم رتیکولوآندوتلیال رسوب می‌کنند، بررسی تاثیر آنزیم‌های مختلف بر روی تجزیه آنها نشان داد که این رسوبات نسبت به افزوده آنزیمی پکتیناز حساس ولی به آلفا آمیلاز مقاوم هستند (۷). همچنین بررسی خواص ضد سرطانی شیرابه به‌دست آمده از افزوده آنزیمی تفاله چای سفید و تأثیر آن بر روی سلولهای لنفوم هیستوسیت U ۹۳۷ انسانی نشان داد که شیرابه حاصل از افزودن ترکیب سه آنزیمی پکتیناز، سلولاز و پروتئاز سبب القای فرایند آپوپتوز در این سلولها در مقایسه با سایر افزوده‌های آنزیمی می‌شود (۸). از آن‌جا که لیکوپن در درمان بیماریهای مختلف از قبیل سرطان، بیماریهای قلبی و غیره کاربرد فراوانی دارد و میزان خلوص بالای این ماده باعث افزایش جذب و عملکرد بالای آنها می شود، از آنزیم پلی گالاکتوروناز جهت استخراج این ترکیب به روش آنزیمی به منظور افزایش خلوص این مواد استفاده می‌شود (۹). علاوه بر این، آنزیم پلی گالاکتوروناز به عنوان یکی از ترکیبات داروهای گیاهی پیشگیری کننده سرطان و بیماریهای قلبی، کاهش وزن و مسهل گوارشی به بازار عرضه شده است (۱۰). باوجود این، «چاردین» و همکاران در ۲۰۰۳ با بررسی سطح سرمی بیماران دارای آلرژی نسبت به گرده شلغم روغنی دو ایزوفرم آنزیم پلی گالاکتوروناز را به عنوان آلرژن جدید معرفی کردند (۱۱).

آنزیم پلی گالاکتوروناز در صنایع مختلف از قبیل آب میوه و نوشابه سازی به منظور شفاف سازی و بالابردن بازده آب میوه نیز به‌کار می‌رود (۱۲). با توجه به این‌که این آنزیم از منابع مختلفی مانند گیاهان، باکتری‌ها و قارچها استخراج می شود ولی پلی گالاکتوروناز به‌دست آمده از قارچها به علت تولید با بازده بالا در تمام مراحل چرخه زندگی قارچ ها که از نظر هزینه هم مقرون به صرفه است، کاربرد بیشتری دارد و توسط محققین متعددی با استفاده از روشهای مختلفی از قارچها تولید و خالص سازی شده است (۱۳). اخیراً «دونش» و همکاران تخلیص این آنزیم از سویه‌های قارچی به وسیله روشهای مختلف خالص سازی را گزارش کرده اند (۱٤). بنابر اهمیت بسیار زیاد این آنزیم در زمینه های مختلف تحقیقاتی، در این مطالعه خالص‌سازی آنزیم پلی گالاکتوروناز از قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم* انجام شد.

مواد و روش ها

سویه F٥٨ قارچ فوزاریوم *اگزیسپوروم*[u] که در این تحقیق مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت، از مرکز تحقیقات جهاد دانشگاهی کرمانشاه تهیه شد. قبلا مشخص شده بود که این سویه توانایی تولید میزان بالای آنزیم را دارد (۱٥). قارچ بعد از ۸ روز کشت در درون لوله‌های ۳۰ میلی لیتری درپوش‌دار در دمای ۲٥ درجه سانتیگراد بر روی محیط پوتاتو دکستروز آگار، به منظور نگهداری کوتاه مدت در ٤ °C نگهداری شد. برای به دست آوردن پروتئین‌های ترشحی مورد نیاز این تحقیق، قارچ به ارلن‌های یک لیتری حاوی محیط کشت مایع پکتین زیموگرام (۱۰ گرم پکتین [Merck]. ۲/٦٤ گرم سولفات آمونیوم $[(NH_4)_2SO_4]$ ، ۰/۳٤ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات (k_2HPO_4) و۰/۱٤ گرم سولفات منیزیم $[MgSO_4 \cdot 7H_2O]$ با pH = ٤/٥) تلقیح و سپس به انکوباتور منتقل شد. دستگاه در حالت مخلوط کن در وضعیت ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲٥ درجه سانتیگراد تنظیم شد. پس از ده روز ارلن ها از انکوباتور خارج و با استفاده از کاغذ صافی (واتمن ۱)[2] محیط کشت ها صاف شدند (۱٦). از محیط کشت صاف شده به عنوان محلول حاوی پروتئین‌های ترشحی استفاده شد و تغلیظ پروتئین‌ها با سولفات آمونیم ۷۰٪ انجام گرفت. پروتئین های تغلیظ شده با استفاده از کیسه های دیالیز شرکت «بیوژن»[3] که دارای منافذ ۱۲ کیلو دالتون بود، به مدت ۲٤ ساعت در دمای ٤ درجه سانتیگراد مقابل بافر استات سدیم ٥۰ میلی مول با pH برابر ٥/٥ دیالیز و سپس در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد. مقدار پروتئین استخراجی بر طبق روش « برادفورد» با استفاده از رنگ آبی کوماسی۲٥۰ G [4] و منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی (BSA) تعیین گردید (۱۷). میزان فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز با اندازه گیری مقدار محصول اسید دی گالاتورونیک تولید شده از سوبسترای اسید پلی گالاکتورونیک در مخلوط واکنش به وسیله معرف مس و معرف آرسنو مولیبدات بر اساس روش « کالمر » صورت گرفت. میزان فعالیت این آنزیم به طور غیر مستقیم با استفاده از منحنی استاندارد اسید دی گالاکتورونیک تعیین شد (۱۸). جهت تخلیص آنزیم از روش کروماتوگرافی تبادل یونی از نوع کاتیونی بر روی بسترCM-Sepharose Fast Flow با pH معادل ٥/٥ تنظیم شده توسط بافر استات سدیم ٥۰ میلی مول انجام گرفت و مقدار یک میلی لیتر محلول پروتئین تغلیظ شده روی ستون ریخته شد. جهت جدا سازی پروتئین‌های متصل به ستون از شیب نمک کلرید سدیم یک مولار استفاده شد. در طی این مراحل لوله هایی با حجم ۲ میلی لیتر جمع آوری شدند. مقدار پروتئین هر جزء با استفاده از روش «برادفورد» و فعالیت آنزیمی نمونه های حاصل از کروماتوگرافی با روش« کالمر» تعیین گردید. فعالیت ویژه آنزیمی هر کدام از اجزا محاسبه و سپس نمودار مربوطه با استفاده از نرم افزار آماری اکسل رسم شد. نمونه های با فعالیت آنزیمی بسیار بالا در این ناحیه انتخاب و بعد از مخلوط شدن و رسوب دهی با استون در آب مقطر دو بار تقطیر حل شدند تا در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرند. جهت مشخص کردن خلوص پروتئین از روش SDS-PAGE مطابق روش « لاملی »[5] استفاده شد. الکتروفورز در سیستم ناپیوسته انجام شد، به طوری‌که در آن ژل نگهدارنده ٥٪ و ژل جداکننده ۱۲٪ بود. پس از انجام الکتروفورز، ژل حاصل به روش آبی کماسی رنگ آمیزی گردید که در این حالت پروتئین‌ها به صورت نوارهای آبی رنگ مشاهده شد (۱۹). برای تخمین وزن ملکولی از مارکرهای وزن ملکولی استاندارد ساخت شرکت «فارماسیا»[6] (میوزین با ۲۱۲ کیلو دالتون، فسفوریلاز b با ۹۷ کیلو دالتون، فسفوریلاز b با ٦٦ کیلو دالتون، وآلبومین با ٤٥ کیلودالتون، کربونیک انهیدراز با ۳۰ کیلو دالتون و

1. Andersen's Disease
2. Watman No 1
3. Biogene
4. Commasee Blue G250
5. Laemmlli
6. Pharmacia

www.SID.ir

Archive of SID

مهارکننده تریپسین با ۲۰ کیلو دالتون) و برنامه نرم افزاری *UVIDoc* استفاده شد. پس از تنظیم و تعیین میزان دقت تمایز برنامه نرم‌افزاری، وزن ملکولی هر یک از نوارهای مربوط به پروتئین‌های مارکری وارد برنامه شد. خروجی برنامه بر روی صفحه نمایشگر ظاهر گردید و وزن ملکولی پروتئین های خالص شده مشخص شد. جهت بررسی فعالیت آنزیم‌های خالص شده بعد از الکتروفورز بر روی ژل پکتین- اکریل آمید، از روش رنگ آمیزی آنزیم[1] بر طبق روش
«کروک شانک» استفاده شد. در این روش نمونه‌های محلول تغلیظ شده اولیه ونمونه‌های خالص شده به موازات یکدیگر، روی ژل آکریل آمید محتوی سوبسترای آنزیم الکتروفورز شدند. پس از رنگ آمیزی ژل حاصل با روتینیوم قرمز، جایگاه فعالیت آنزیم به صورت نوارهای روشن ظاهر شد (۲۰).

یافته ها

نتایج حاصل از تغلیظ محیط کشت صاف شده با استفاده از غلظت‌های مختلف نمک سولفات آمونیوم نشان داد که در غلظت نمکی ۷۰ ٪ بالاترین میزان از نظر رسوب پروتئین، فعالیت آنزیمی و فعالیت ویژه حاصل می شود. به طوری که این مقادیر در نمونه تغلیظ شده به ترتیب به ۳ ، ۱۷ و ۱/۹ برابر نسبت به محیط کشت صاف شده افزایش یافت. پس از خالص سازی آنزیمی بر روی ستون کروماتوگرافی تبادل یونی CM-Sepharose Fast Flow، نمودار مربوط به مقدار پروتئین، میزان فعالیت آنزیم و فعالیت ویژه آنزیمی هر یک از اجزای جمع آوری شده از ستون، با استفاده از نرم افزار آماری اکسل رسم شد (*نمودار ۱*). محورهای عمودی نمودار از چپ به راست به ترتیب شامل مقدار پروتئین، میزان فعالیت ویژه آنزیمی، میزان فعالیت آنزیمی و غلظت نمک NaCl است. در نمودار حاصل نقاط اوجی قابل مشاهده هستند. این نقاط اوج در سه بار تکرار کروماتوگرافی در همین نواحی وجود داشتند که بیانگر تکرار پذیری این روش بود. این نقاط اوج در ناحیه اجزایی وجود دارند که نسبت به بقیه اجزا، برحسب مورد، دارای بیشترین مقدار پروتئین و فعالیت آنزیمی و فعالیت ویژه آنزیمی باشند. محورهای افقی مربوط به شماره اجزای جمع‌آوری شده از زیر ستون کروماتوگرافی هستند. اجزای ۱ تا ٤٠ نمونه های پروتئینی دارای بار موافق با بستر CM-Sepharoseدارند که در طی مرحله شستشو با بافر استات سدیم از ستون جمع آوری شده‌اند. در حالی که اجزای شماره ٤١ تا آخرین شماره در طی اعمال شیب غلظت نمکی از ستون جمع آوری شده. شیب غلظت به کار رفته از نوع خطی است و کلیه اجزای با حجم های ۳ میلی لیتر از زیر ستون جمع آوری شده‌اند. بنابراین دو جزء متوالی تحت شرایطی جمع آوری شده‌اند که تفاوت بسیار اندکی با هم داشته اند. به همین دلیل، محتوای پروتئینی دو جزء متوالی تفاوت کمی با یکدیگر دارند. منحنی مربوط به فعالیت آنزیمی دارای دو اوج در شماره های ۱ تا۲۵ و ٦٨ تا ۹۲ است. چون اجزای شماره ۱ تا ٤٠ در مرحله شستشو با بافر اولیه از ستون جمع آوری شده بودند، وجود این اوج نشان می‌دهد که مقداری ازآنزیم پلی گالاکتوروناز به همراه سایر پروتئین‌ها از ستون خارج شده است و عملاً این مقدار از آنزیم ها از دست رفته‌اند. اما اجزای شماره های ٦٨ تا ۹۲ که در مرحله شستشوی ستون با شیب غلظت نمک از ستون خارج شده‌اند و در ناحیه غلظت نمکی بین ۰/۲ و ۰/٤ مولار قرار دارند، می‌توانند در مراحل بعدی کاربرد داشته باشند. زیرا این اوج فعالیت آنزیمی داخل اوج مقدار پروتئین وجود دارد. به عبارت دیگر، منحنی مقدار پروتئین و فعالیت آنزیمی در این شماره‌ها با یکدیگر همپوشانی دارند و این امکان وجود دارد که بخش اعظم پروتئین های این اجزا را آنزیم پلی گالاکتوروناز تشکیل داده باشد. برای این منظور، اجزای شماره های ٦٨ تا ٧٨ که بیشترین میزان فعالیت آنزیمی و فعالیت ویژه را نشان می‌دادند مخلوط و پروتئین آنها به روش استون سرد رسوب داده شد. مجدداً مقدار پروتئین، میزان فعالیت آنزیمی، فعالیت ویژه آنزیم و بازده آنزیم اندازه گیری و محاسبه و با مقادیر محاسبه شده ماقبل خالص‌سازی مقایسه شد(*جدول ۱*). محاسبه میزان فعالیت ویژه آنزیمی نشان داد که این مقدار نسبت به محیط کشت صاف شده به ۱۹/۱ برابر افزایش یافته است. برای اطمینان خاطر از میزان خلوص آنزیم، پروتئین حاصل به روش SDS-PAGE الکتروفورز شد. پس از انجام الکتروفورز و رنگ‌آمیزی ژل به روش آبی کماسی ، دو نوار پروتئینی مربوط به نمونه‌های خالص شده به دست آمد که نشان می دهد یکی از نوارهای موجود در نمونه آنزیم پلی گالاکتوروناز است یا این که هر دو این نوارها، در اصل، ایزوآنزیم‌های متعلق به آنزیم پلی گالاکتوروناز هستند (*تصویر۱ـ الف*). در این تصویر ستون‌های یک تا پنج از چپ به راست به ترتیب مربوط به کنترل منفی، پروتئین های مارکری، الگوی پروتئینی سویهF٥٨، پروتئین‌های مربوط به اجزای دارای بیشترین فعالیت آنزیمی و فعالیت آنزیمی ویژه آنزیم پلی گالاکتوروناز و ستون پنجم سایر پروتئین‌های خارج شده از ستون است. ستون چهارم وجود دو نوار خالص شده را نشان می دهد. تخمین دقیق‌تر وزن ملکولی پروتئین‌های خالص شده با استفاده از مارکرهای وزن مولکولی استاندارد پروتئین و برنامه نرم افزاری UVIDoc نشان داد که وزن ملکولی پروتئین‌های تخلیص شده برابر ۳۸ و ٤٠ کیلو دالتون است (*تصویر۱– ب*). در این تصویر ستون‌های یک تا سه به ترتیب مربوط به پروتئین‌های مارکری، الگوی پروتئینی سویهF٥٨ و پروتئین‌های تخلیص شده است.

الکتروفورز نمونه تغلیظ شده پروتئینی و نمونه خالص شده که به موازات هم بر روی ژل پلی آکریل آمید محتوی سوبسترای آنزیم به وسیله روش فعالیت از طریق رنگ آمیزی آنزیم انجام گرفت، جایگاه فعالیت آنزیم را به صورت نوارهایی روشن نشان داد. از آنجا که ایزوآنزیم‌های مربوط به آنزیم سرعت حرکت الکتروفورزی متفاوتی داشتند، هر یک به صورت نوارهای مجزایی مشاهده شدند. همان‌گونه که در تصویر ملاحظه می شود، وجود دو نوار در نمونه‌های خالص سازی شده تأیید کننده دو ایزوآنزیم مربوط به آنزیم پلی گالاکتوروناز است (*تصویر۲*). در این تصویر ستون‌های ۱ و ۲ به ترتیب از سمت چپ به راست عبارتند از نمونه‌های محلول تغلیظ شده اولیه ونمونه‌های خالص شده که به موازات یکدیگر روی ژل آکریل آمید محتوی سوبسترای آنزیم الکتروفورز شدند.

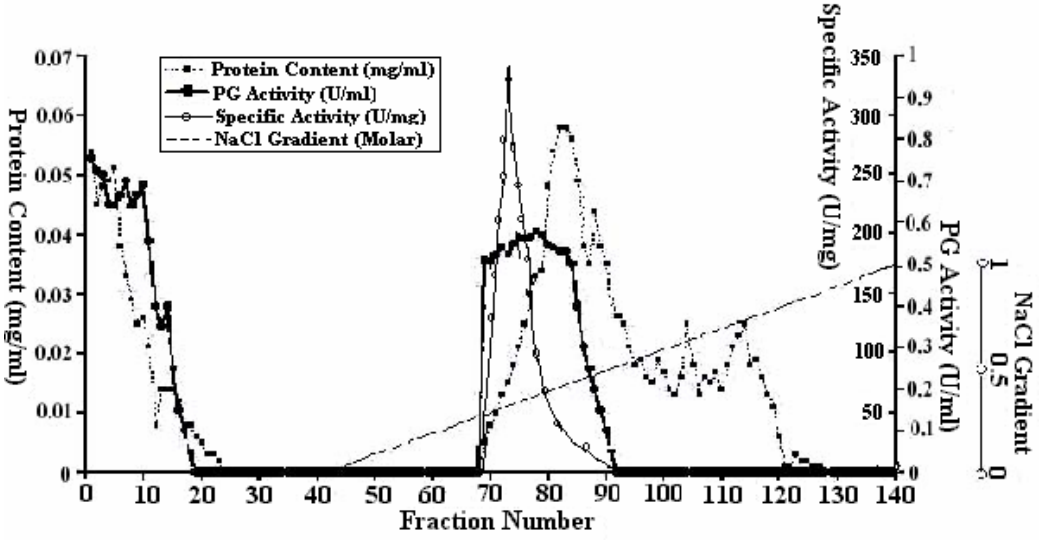
1. Activity Staining

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

از آن جا که کاربرد آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در زمینه های مختلف پزشکی، دارویی و صنایع غذایی از اهمیت بسزایی برخوردار است، اولین قدم در تولید انبوه آن استخراج و خالص سازی آنزیم به منظور بررسی خصوصیات فیزیکی- شیمیایی آن است.



نمودار ۱: مقدار پروتئین ، میزان فعالیت آنزیمی و فعالیت ویژه آنزیمی هر یک از اجزای ستون کروماتوگرافی تبادل یونی در سویه F۵۸ قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم*

پروتئین های خالص شده	نمونه پروتئینی صاف شده	مارکر پروتئینی	۵	٤	۳	۲	۱

تصویر ۱- الف

تصویر ۱- ب

www.SID.ir

Archive of SID

تصویر ۱ الف : بررسی خلوص پروتئین های تخلیص شده مربوط به اجزای تفکیک شده حال از ستون کروماتوگرافی بر روی ژل SDS-PAGE با رنگ آمیزی آبی کماسی G ۲۵۰. **تصویر ۱ ب:** تخمین وزن ملکولی پروتئین‌ها با استفاده از برنامه نرم افزاری *UVIDoc* .

جدول۱: مقدار پروتئین، میزان فعالیت آنزیمی، فعالیت ویژه آنزیمی، و بازده در مراحل مربوط به خالص سازی آنزیم پلی گالاکتوروناز

مراحل خالص سازی	حجم	پروتئین تام (mg)	فعالیت تام ($U \times 10^3$)	فعالیت ویژه (U/mg)	بازده (%)
محیط کشت صاف شده	۲۵۰ میلی لیتر	۱۴۳ میلی گرم	۱۳	۹۰	۱۰۰
سولفات آمونیوم ۷۰٪	۱۰ میلی لیتر	۵۲/۶ میلی گرم	۹	۱۷۱/۱	۶۹/۲۳
مقدار نمونه بار شده بر روی ستون	۱ میلی لیتر	۵/۲۶ میلی گرم	۰/۹	۱۷۱/۱	–
CM - Sepharose Fast Flow و رسوب نمونه با استون	۱۰۰ میکرولیتر	۶۳۸ میکروگرم	۰/۸	۱۷۲۴	۴۲/۱۰

۱ ۲

تصویر ۲: الگوی فعالیت از طریق رنگ آمیزی آنزیم ایزوآنزیم‌های پلی گالاکتورونازی بر روی ژل پکتین- اکریل آمید .

هدف از بررسی این خصوصیات، از یک طرف، دستکاری در ساختار آنزیم در جهت افزایش فعالیت آن از طریق ایجاد آنزیم نوترکیب و، از طرف دیگر، امکان وارد کردن cDNA آنزیم نوترکیب به درون گنجینه ژنومی سایر میکروارگانیسم‌ها از طریق روشهای مهندسی ژنتیک بود تا افزایش بیان آنزیم هموار شود و در نهایت تولید آنزیم از اشل آزمایشگاهی به‌سمت مقیاس‌های صنعتی و نیمه صنعتی دنبال گردد (۲۱).

آنزیم پلی گالاکتوروناز از طریق روشهای مختلفی خالص سازی شده است، ولی از آن‌جا که بازده کمی و کیفی روش کروماتوگرافی تبادل یونی در امر استخراج آنزیم نسبت به سایر روشها بالاست، در این تحقیق نیز از همین روش استفاده شد (۲۲). همچنین از میان بسترهای مختلف، بستر CM-Sepharose Fast Flow، به دلیل دارا بودن سرعت جریان بالا، دامنه تفکیک وسیع‌تر و محدوده pH بین ۴ تا ۱۳ جهت خالص سازی آنزیم انتخاب کنند.

«جین» و همکاران در ۲۰۰۱ با به کار گیری روش ایزوالکتریک فوکوسینگ گزارش دادند که pH ایزوالکتریک (pI) این آنزیم در بین سویه‌های مختلف قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم* بین ۳ تا ۸ متغیر است (۶). از آن جا که هیچ اطلاعاتی در مورد pI آنزیم فوق

www.SID.ir

Archive of SID

درسویه مورد مطالعه جهت تنظیم pH ستون کروماتوگرافی وجود نداشت، pH ستون بین ۳ تا ۸ تنظیم و در نهایت مشخص شد که pH برابر ۵/۵برای خالص سازی این آنزیم مؤثرتر است. در مطالعه ما آنزیم با ۱۹/۱ برابر افزایش در فعالیت ویژه و بازده ۴۲/۱۰ درصد خالص سازی شد. در بررسی میزان خلوص آنزیم با استفاده از روش الکتروفورز، دو نوار پروتئینی با وزنهای مولکولی ۳۸ و ۴۰ کیلو دالتون به دست آمد که با کاربرد روش فعالیت از طریق رنگ آمیزی آنزیم مشخص شد که هر دو آنها ایزوآنزیم‌های آنزیم پلی گالاکتوروناز هستند. خالص سازی آنزیم پلی گالاکتوروناز در یک سویه قارچ فوزاریوم *اگزیسپوروم* با ۵۶ برابر افزایش در فعالیت ویژه و وزن ملکولی ۳۷ کیلو دالتون را « استرند» و همکارانش در ۱۹۷۷ گزارش کردند (۲۳). « رونسرو» و همکارانش نیز در ۱۹۹۷ با استفاده از این روش موفق به خالص سازی آنزیم پلی گالاکتوروناز با ۴۳ برابر افزایش در فعالیت ویژه سویه‌ای از همین قارچ با وزن ملکولی ۶۳ کیلو دالتون شدند (۵). مطالعات فوق نشان دادند که علت اصلی میزان بالای بازدهی این دو تحقیق بالا بودن تولید این آنزیم در سویه‌های مورد استفاده توسط آنها نسبت به سویه ما بوده است. به طوری که سویه مورد استفاده ما، در مقام قیاس، قدرت تولید کمی داشت. مطالعات انجام گرفته بر روی ساختار ملکولی ایزوآنزیم‌های مختلف این آنزیم نشان داده است که توالی اسید آمینه ای کلیه ایزوآنزیم‌ها بجز قسمتی از ناحیه کربوکسیلی آنها، که جایگاه فعال آنزیم در آن قرار دارد، در بقیه قسمت‌های ساختمان تشابه بسیار کمتری دارند و این عامل سبب بروز خصوصیات فیزیکی- شیمیایی متفاوت ایزوآنزیم‌های مختلف این آنزیم در بین سویه‌های مختلف قارچی و حتی در درون یک سویه، خصوصاً از نظر وزن ملکولی و pH ایزوالکتریک آنها شده است (۲۴)، به طوری که «آترس» و همکارانش در ۱۹۹۱ با استفاده از روش کروماتوگرافی تبادل یونی دو ایزوآنزیم پلی گالاکتوروناز را با وزنهای مولکولی ۴۴ و ۷۶ کیلو دالتون در یک سویه از قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم به دست آوردند(۲۵). این دو ایزوآنزیم به دلیل داشتن pH ایزوالکتریک نزدیک به هم به صورت همزمان از ستون خارج شدند و تفاوت در وزن ملکولی این دو ایزوآنزیم امکان جداسازی آنها را از طریق روش فیلتراسیون ژلی فراهم آورد تا بتوانندبه بررسی خصوصیات هریک از ایزو آنزیم‌ها بپردازند (۲۵). چون دو ایزوآنزیم به دست آمده از مطالعه ما به علت داشتن pH ایزوالکتریک نزدیک به هم، به صورت همزمان از ستون کروماتوگرافی تبادل یونی خارج شدند و از طرفی، به علت این که وزنهای ملکولی بسیار نزدیکی دارند و جداسازی این دو ایزوآنزیم از یکدیگر از طریق فیلتراسیون ژلی امکان پذیر نیست، پیشنهاد می شود که جداسازی با استفاده از روشهای مکمل دیگری نظیر روش ایزوالکتریک فوکوسینگ صورت پذیرد و به بررسی خصوصیات هر یک از ایزوآنزیم‌ها پرداخته شود.

تقدیر و تشکر

از مساعدت‌های آقای دکتر مصطفایی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، و دکتر سیروس قبادی، استادیار دانشگاه رازی کرمانشاه، قدردانی می‌شود.

References

1. Sakai T, Sakamoto T, and Hallaert J. Pectin, Pectinase and protopectinase production, properties and applications. Adv appl microb 1993; 39: 213-94.
2. Vazques C, Patino B, Posada ML, Jean MT. Control of polygalacturonase synthesis in *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*. Can j microbe 1997; 43: 1084-90.
3. Pietro AD, Isabel M, and Roncero G. Endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*: Purification, characterization, and production during infection of tomato plants. Phytopath1996; 86: 1324-30.
4. Hoondal GS, Kapoor M, Beg QK. Production and partial purification and characterization of a Thermo-alkali stable polygalacturonase from bacillus sp. MG-cp-2. Proc biochem 2000; 36: 467-73.
5. Roncero G, Isabel M, and Pietro A D. Purification and characterization of a novel exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*. FEMS Microbe let 1997; 154: 37-43.
6. Jean G, Vazquez C, and Mirete S. Comparative analysis of polygalacturonase in isolates of seven species of *Fusarium* from Pinus pinea. Mycol Res 2001; 105: 100-4.
7. Glycogenosis Type - IV and Andersens Disease. Htp :/ /moon. ousch. edu/ kfung /Neuro Help/ ZNN0IIE25.htm.
8. Katsuno Y, Koyama Y, Saeki K, Sazuka M, Ookawa K, Isemura M. Apoptosis-inducing activity of a Driselase digest fraction of Green Tea residue. Biosci, biotech, biochem 2001; 65: 198-201.
9. Dasgupta A. Pectinase TMT Improves Lycopene extraction and tomato based products. http://www.biocon.com/html/biopulse/issue13.5htm.
10. Christs S. Herbal formulas for health maintenance. Http :// members. aol.com/ healinglvs/ healinglvs.
11. Chardin H, Mayer C, Senechal H, Poncet P, Clement G, Wal MJ, et al. Polygalacturonase (pectinase), a new oilseed rape allergen. Allergy 2003, 58: 407-11.
12. Alkorta I, C.Garbisu J, Liama Ml, Serra J. Industrial applications of pectic enzymes: a review. Proc biochem 1998; 33: 21-28.
13. Stratilova E, Markovic Q, and Skrovinova D. Pectinase from Aspergillus Polygalacturonase: Multiplicity, Divergence and structural Patterns linking fungal, bacterial and plant polygalacturonase. J Prot Chem 1993; 12:15-22.

www.SID.ir

Archive of SID

14. Doneche B, Cabanne C. Purification and characterization of two isozymes of polygalacturonase from *Botrytis cinerea* and effects of calcium ions on polygalacturonase activity. Microbe res 2002; 157:1-7.

۱۵. عارف پور م. دسته بندی سویه‌های قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم* با استفاده از الگوی پروتئینی و تولید آنزیم پلی گالاکتوروناز. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده علوم دانشگاه رازی،۱۳۷۷.

۱۶. حریقی، م ج، ،دسته بندی سویه های قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم* با استفاده از Zymogram grouping و Overlaying و مطالعه آنزیم های پکتیکی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشکده علوم دانشگاه رازی، ۱۳۷۸.

17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.
18. Collmer AJ, Ried L, Mount M S. Assay method for pectic enzymes. Method enzyme1988; 161: 329- 35.
19. Laemmlli U.Cleavage of structural proteins during the assembly of a head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-85.
20. Cruickshank RH. Detection of pectic enzymes in pectin Acrylamide gels. Anal Biochem. 1980, 107: 177 - 80.
21. Manachini PL, Fortina MG, and Parini C. Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by Rhizopus stolanifer. Biotech let 1987; 9: 219-24.
22. Janson JC, Ryden L. Protein purification: Principles, High Resolution Methods and Application. 3rd ed. VCH Publisher1997; p: 107-49.
23. Strand L, Malcolm E, and Donald L. Characterization of two endopolygalacturonase isozymes produced by *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*. Biochem Biophys Acta 1976; 429:870-83.
24. Bennett B, and Hadfield KA. Polygalacturonase: many genes in search of a function. Plant physiol 1998; 117, 337-43.
25. Atres EP, Tena M. Purification and characterization of pectic enzymes from two race of *Fusarium oxysporum f.sp cicera* differing in virulence to chickpea (*Cicer arietinum* L.). Physiol mole plant pathol .1990, 37: 107-24.

www.SID.ir