

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
شماره ۶۲ (تابستان ۱۳۸۳)، صفحات ۴۶-۴۰

خالص سازی آنزیم پلی گالاکتوروناز از سویه F۵۸ قارچ فوزاریوم اگزوسیپوروم

دکتر نصرت الله ضرغامی: استادیار گروه بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
بهرنگ علنی: مربی پژوهشی علوم سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز؛ نویسنده رابط
دکتر مصطفی مطلبی: دانشیار گروه زیست شناسی دانشگاه رازی کرمانشاه
دکتر محمد رضا زمانی: دانشیار گروه زیست شناسی دانشگاه رازی کرمانشاه
دکتر علی خسرو بیگی: 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 پلی گالاکتوروناز در محیط حاوی پکتین توسط طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها به خصوص سویه‌های قارچ فوزاریوم اگزوسیپوروم 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 اگزوسیپوروم که در این تحقیق مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت، از مرکز تحقیقات جهاد دانشگاهی کرمانشاه تهیه شده بود. قبلاً مشخص شد که این سویه توانایی تولید میزان بالای آنزیم را داراست. جهت خالص سازی آنزیم پلی گالاکتوروناز 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.

یافته‌ها: نتایج حاصل از کروماتوگرافی وجود اوج فعالیت آنزیمی را بر روی نمودار خالص سازی در ناحیه شیب نمکی ۰/۲ تا ۰/۴ مولار نشان داد. انتخاب نمونه‌های با فعالیت آنزیمی بسیار بالا در این ناحیه، تغلیظ و SDS-PAGE پروتئین‌های این ناحیه وجود دو نوار با وزنه‌های مولکولی حدود ۳۸ و ۴۰ کیلو دالتون را مشخص کرد. همچنین در بررسی فعالیت آنزیمی توسط ژل آکریلامید حاوی سوبسترای آنزیمی، دو نوار مجزا که نشان دهنده ایزوآنزیم‌های 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 واژه‌ها: فوزاریوم اگزوسیپوروم، پلی گالاکتوروناز، خالص سازی، کروماتوگرافی تبادل یونی

مقدمه

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 اگزوسیپوروم، از ترشح آن به محیط ممانعت می‌کند. بنابراین احتمالاً در برخی از ایزوآنزیم‌های پلی گالاکتورونازی گلیکوزیلاسیون این ناحیه نقش مهمی در ترشح آنزیم ایفا می‌کند (۳). بررسی خصوصیات بیوشیمیایی ایزوآنزیم‌های پلی گالاکتورونازی نشان داده است که در شرایط آزمایشگاهی در pH اسیدی و دمای ۳۰ تا ۵۰ درجه سانتیگراد حداکثر فعالیت را دارا هستند (۴). با وجود این، «رونسرو» و همکاران در ۱۹۹۶ نشان دادند که pH مطلوب برای فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز می‌تواند به نوع سوبسترا نیز بستگی داشته باشد. آنزیم پلی گالاکتوروناز خالص سازی شده از قارچ فوزاریوم اگزوسیپوروم در محیط حاوی پکتین در pH برابر ۵ و در

آنزیم پلی گالاکتوروناز^۱ (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 دimer وجود دارد. پکتیناز در گیاهان، نماتودها، باکتری‌ها و قارچ‌ها به خصوص قارچ فوزاریوم اگزوسیپوروم^۲ مشاهده می‌شود و هیدرولیز پیوندهای الف(۴→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 می‌شوند. در فرم القایی، تولید و ترشح آنزیم توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها به خصوص قارچ فوزاریوم اگزوسیپوروم در حضور مقادیر بسیار کم پکتین یا قطعات اولیگومر آن در محیط کشت صورت می‌گیرد. با وجود این، «واکس» و همکاران نشان دادند که ترشح

پروتئین‌های ترش‌چی مورد نیاز این تحقیق، قارچ به ارلن‌های یک لیتری حاوی محیط کشت مایع پکتین زیموگرام (۱۰ گرم پکتین [Merck] ۲/۶۴ گرم سولفات آمونیوم $[(NH_4)_2SO_4]$ ، ۰/۳۴ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4) و ۰/۱۴ گرم سولفات منیزیم

$[MgSO_4 \cdot 7H_2O]$ با $pH = 4/5$ تلقیح و سپس به انکوباتور منتقل شد. دستگاه در حالت مخلوط کن در وضعیت ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد تنظیم شد. پس از ده روز ارلن‌ها از انکوباتور خارج و با استفاده از کاغذ صافی (واتمن ۱) محیط کشت‌ها صاف شدند (۱۶). از محیط کشت صاف شده به عنوان محلول حاوی پروتئین‌های ترش‌چی استفاده شد و تغلیظ پروتئین‌ها با سولفات آمونیم ۷۰٪ انجام گرفت. پروتئین‌های تغلیظ شده با استفاده از کیسه‌های دیالیز شرکت «بیوژن»^۱ که دارای منافذ ۱۲ کیلو دالتون بود، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد مقابل بافر استات سدیم ۵۰ میلی مول با pH برابر ۵/۵ دیالیز و سپس در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد. مقدار پروتئین استخراجی بر طبق روش «برادفورد» با استفاده از رنگ آبی کوماسی $G 250$ ^۲ و منحنی استاندارد آلومین سرم گاوی (BSA) تعیین گردید (۱۷). میزان فعالیت آنزیم پلی گالاتوروناز با اندازه‌گیری مقدار محصول اسید دی گالاتورونیک تولید شده از سوپسترای اسید پلی گالاتورونیک در مخلوط واکنش به وسیله معرف مس و معرف آرسنو مولیدات بر اساس روش «کالمر» صورت گرفت. میزان فعالیت این آنزیم به طور غیر مستقیم با استفاده از منحنی استاندارد اسید دی گالاتورونیک تعیین شد

(۱۸). جهت تخلیص آنزیم از روش کروماتوگرافی تبادل یونی از نوع کاتیونی بر روی بستر CM-Sephrose Fast Flow با pH معادل ۵/۵ تنظیم شده توسط بافر استات سدیم ۵۰ میلی مول انجام گرفت و مقدار یک 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 لوله‌هایی با حجم ۲ میلی لیتر جمع‌آوری شدند. مقدار پروتئین هر جزء با استفاده از روش «برادفورد» و فعالیت آنزیمی نمونه‌های 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. نمونه‌های 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»^۳ استفاده شد. الکتروفورز در سیستم ناپیوسته انجام شد، به طوری که در آن ژل نگهدارنده ۵٪ 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»^۴ (میوزین با ۲۱۲ کیلو دالتون، فسفوریلاز b با ۹۷ کیلو دالتون، فسفوریلاز b با ۶۶ کیلو دالتون، و آلومین با ۴۵ کیلو دالتون، کربونیک انهدراز با ۳۰ کیلو دالتون و

محیط حاوی پلی گالاتورونیک اسید در pH برابر ۷ حداکثر فعالیت را از خود نشان داد (۵). pH ایزوالکتریک ایزوآنزیم‌های آن بین ۳ تا ۸ متغیر است (۶).

امروزه این آنزیم کاربرد فراوانی در زمینه‌های مختلف از قبیل پزشکی، صنایع دارویی و غذایی دارد. از آن‌جا که در بیماری «آندرسن»^۱ (گلیکوژنوزیس نوع ۴) به دلیل نقص در فعالیت آنزیم ۱ و ۴ گلوکان ۶ گلیکوزیل ترانسفراز، ترکیبات پلی ساکاریدی در کبد و سیستم رتیکیولوآندوتلیال 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 به دست آمده از افزوده آنزیمی تفاله چای سفید و تاثیر آن بر روی سلولهای لنفوم هیستوسیت ۹۳۷ U 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 لیکوپین 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 می‌شود، از آنزیم پلی گالاتوروناز جهت استخراج این ترکیب به روش آنزیمی به منظور افزایش خلوص این مواد استفاده می‌شود (۹). علاوه بر این، آنزیم پلی گالاتوروناز به عنوان یکی از ترکیبات داروهای گیاهی پیشگیری کننده سرطان و بیماریهای قلبی، کاهش وزن و مسهل گوارشی به بازار عرضه شده است (۱۰). با وجود این، «چاردین» و همکاران در ۲۰۰۳ با بررسی سطح سرمی بیماران دارای آلرژی نسبت به گرده شلغم روغنی دو ایزوفرم آنزیم پلی گالاتوروناز را به عنوان آلرژن جدید معرفی کردند (۱۱).

آنزیم پلی گالاتوروناز در صنایع مختلف از قبیل آب میوه و نوشابه سازی به منظور شفاف سازی و بالابردن بازده آب میوه نیز به کار می‌رود (۱۲). با توجه به این که این آنزیم از منابع مختلفی مانند گیاهان، باکتری‌ها و قارچ‌ها استخراج می‌شود ولی پلی گالاتوروناز به دست آمده از قارچها به علت تولید با بازده بالا در تمام مراحل چرخه زندگی قارچ‌ها 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 خلص سازی شده است (۱۳). اخیراً «دونش» و همکاران تخلیص این آنزیم از سویه‌های قارچی به وسیله روشهای مختلف خلص سازی را گزارش کرده اند (۱۴). بنابر اهمیت بسیار زیاد این آنزیم در زمینه های مختلف تحقیقاتی، در این مطالعه خلص سازی آنزیم پلی گالاتوروناز از قارچ فوزاریوم آگریسپوروم انجام شد.

مواد و روش‌ها

سویه F۵۸ قارچ فوزاریوم آگریسپوروم^۵ که در این تحقیق مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت، از مرکز تحقیقات جهاد دانشگاهی کرمانشاه تهیه شد. قبلاً مشخص شده بود که این سویه توانایی تولید میزان بالای آنزیم را دارد (۱۵). قارچ بعد از ۸ روز کشت در درون لوله‌های ۳۰ میلی لیتری درپوش‌دار در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد بر روی محیط پوتاتو دکستروز آگار، به منظور نگهداری کوتاه مدت در ۴ °C نگهداری شد. برای به دست آوردن

غلظت نمک از ستون خارج شده‌اند و در ناحیه غلظت نمکی بین ۰/۲ و ۰/۴ 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 پروتئین‌های این اجزا را آنزیم پلی گالاکتوروناز تشکیل داده باشد. برای این منظور، اجزای شماره‌های ۶۸ تا ۷۸ 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 اندازه‌گیری 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 می‌دهد 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 (تصویر ۱-الف). در این تصویر ستون‌های یک تا پنج از چپ به راست به ترتیب مربوط به کنترل منفی، پروتئین‌های مارکری، الگوی پروتئینی سویه F508، پروتئین‌های مربوط به اجزای دارای بیشترین فعالیت آنزیمی و فعالیت ویژه آنزیم پلی گالاکتوروناز و ستون پنجم سایر پروتئین‌های خارج شده از ستون است. ستون چهارم وجود دو نوار خالص شده را نشان می‌دهد. 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 ۴۰ کیلو دالتون است (تصویر ۱-ب). در این تصویر ستون‌های یک تا سه به ترتیب مربوط به پروتئین‌های مارکری، الگوی پروتئینی سویه F508 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. آن‌جا که ایزوآنزیم‌های مربوط به آنزیم سرعت حرکت الکتروفورزی متفاوتی داشتند، هر یک به صورت نوارهای مجزایی مشاهده شدند. همان‌گونه که در تصویر ملاحظه می‌شود، وجود دو نوار در نمونه‌های خالص سازی شده تأیید کننده دو ایزوآنزیم مربوط به آنزیم پلی گالاکتوروناز است (تصویر ۲). در این تصویر ستون‌های ۱ و ۲ به ترتیب از سمت چپ به راست عبارتند از نمونه‌های محلول تغلیظ شده اولیه و نمونه‌های خالص شده که به موازات یکدیگر روی ژل آکریل آمید محتوی سوبسترای آنزیم الکتروفورز شدند.

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 پروتئین‌های خالص شده مشخص شد. جهت بررسی فعالیت آنزیم‌های خالص شده بعد از الکتروفورز بر روی ژل پکتین-اکریل آمید، از روش رنگ آمیزی آنزیم^۱ بر طبق روش «کروک شانک» استفاده شد. در این روش نمونه‌های محلول تغلیظ شده اولیه و نمونه‌های 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).

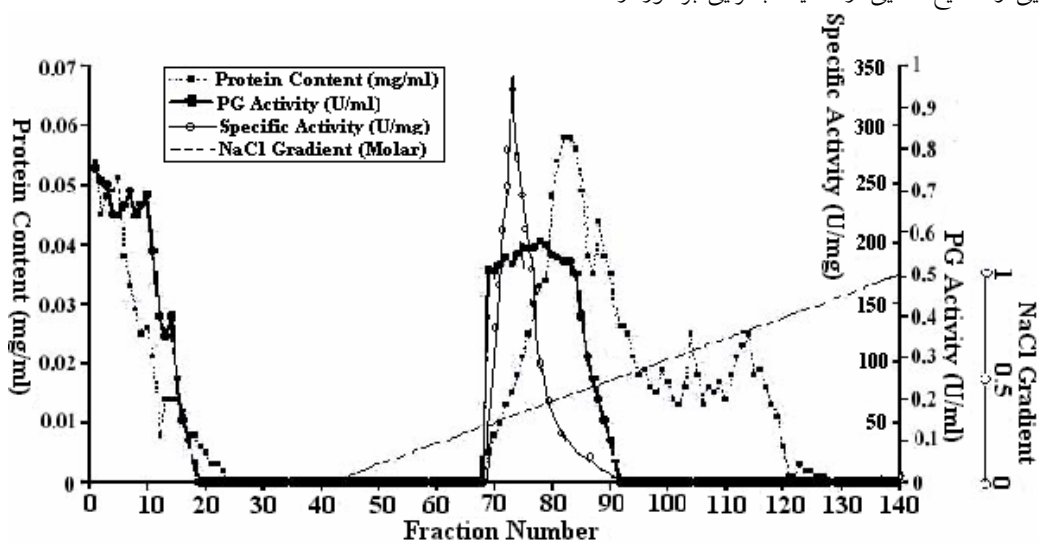
یافته‌ها

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 می‌شود. 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 ۴۰ نمونه‌های پروتئینی دارای بار موافق با بستر- CM-Sepharose دارند که در طی مرحله شستشو با بافر استات سدیم از ستون جمع‌آوری شده‌اند. در حالی که اجزای شماره ۴۱ تا آخرین شماره در طی اعمال شیب غلظت نمکی از ستون جمع‌آوری شده. شیب غلظت به کار رفته از نوع خطی است و کلیه اجزای با حجم‌های ۳ میلی لیتر از زیر ستون جمع‌آوری شده‌اند. بنابراین دو جزء متوالی تحت شرایطی جمع‌آوری شده‌اند که تفاوت بسیار اندکی با هم داشته‌اند. به همین دلیل، محتوای پروتئینی دو جزء متوالی تفاوت کمی با یکدیگر دارند. منحنی مربوط به فعالیت آنزیمی دارای دو اوج در شماره‌های ۱ تا ۲۵ و ۶۸ تا ۹۲ است. چون اجزای شماره ۱ تا ۴۰ در مرحله شستشو با بافر اولیه از ستون جمع‌آوری شده بودند، وجود این اوج نشان می‌دهد که مقداری از آنزیم پلی گالاکتوروناز به همراه سایر پروتئین‌ها از ستون خارج شده است و عملاً این مقدار از آنزیم‌ها از دست رفته‌اند. اما اجزای شماره‌های ۶۸ تا ۹۲ که در مرحله شستشوی ستون با شیب

بحث

اولین قدم در تولید انبوه آن استخراج و خالص سازی آنزیم به منظور بررسی خصوصیات فیزیکی- شیمیایی آن است.

از آن جا که کاربرد آنزیم پلی گالاکتوروناز در زمینه های مختلف پزشکی، دارویی و صنایع غذایی از اهمیت بسزایی برخوردار 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 آگزیسپوروم

۱	۲	۳	۴	۵	مارکر پروتئینی	نمونه پروتئینی صاف شده	پروتئین های خالص شده
---	---	---	---	---	----------------	------------------------	----------------------

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 پروتئین ها با استفاده از برنامه نرم افزاری UVIDoc. **جدول ۱:** مقدار پروتئین، میزان فعالیت آنزیمی، فعالیت ویژه آنزیمی، و بازده در مراحل مربوط به خلص سازی آنزیم پلی گالاتوروناز

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

۱

۲

تصویر ۲: الگوی فعالیت از طریق رنگ آمیزی آنزیم ایزوآنزیم های پلی گالاتورونازی بر روی ژل پکتین-اکریل آمید.

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 وسیع تر و محدوده pH بین ۴ تا ۱۳ جهت خلص 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 سویه های مختلف قارچ فوزاریوم / گزیرپوروم بین ۳ تا ۸ متغیر است (۶). از آن جا که هیچ اطلاعاتی در مورد pI آنزیم فوق

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 میکروارگانیسم ها از طریق روشهای مهندسی ژنتیک بود تا افزایش بیان آنزیم هموار شود و در نهایت تولید آنزیم از اشل آزمایشگاهی به سمت مقیاس های صنعتی و نیمه صنعتی دنبال گردد (۲۱).

آنزیم پلی گالاتوروناز از طریق روشهای مختلفی خلص سازی شده است، ولی از آن جا که بازده کمی و کیفی روش کروماتوگرافی

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 «آتس» 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 آگریسپوروم 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 بتوانند به 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.

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 ۵/۵ برای 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 آگریسپوروم 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

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 radidis 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. *Phytopath* 1996; 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. Glycogenesis Type - IV and Andersens Disease. [Htp :/ /moon. ousch. edu/ kfung /Neuro Help/ ZNN0IIE25.htm](http://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](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 MI, 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.

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 سویه های قارچ فوزاریوم آگریسپوروم 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 آگریسپوروم با استفاده از Zymogram grouping و Overlaying و مطالعه آنزیم های پکتیکی. پایان نامه 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 enzyme* 1988; 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 stolonifer*. *Biotech let* 1987; 9: 219-24.
22. Janson JC, Ryden L. Protein purification: Principles, High Resolution Methods and Application. 3rd ed. VCH Publisher 1997; 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.