جداسازی و تخلیص آلژینات لیاز پایدار حرارتی موثر بر آلژینات *Pseudomonas aeruginosa* بیمارستانی

پریناز قدم*، خدیجه شهریاری آتشگاه، احیا عبدی عالی و پریسا محمدی

تهران، دانشگاه الزهرا(س)، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۴

چکیده

آلژینات لیازباکتریایی آنزیمی پری پلاسمی است که در تولید و تخریب آلژینات اهمیت دارد. خصوصیات این آنزیم اعم از وزن مولکولی، pI، مقاومت حرارتی، pH و دمای بهینه و تأثیر بر آلژینات باکتریایی در سویه های یک باکتری هم می تواند متفاوت می باشد. در این مطالعه، به منظور دسترسی به آلژینات لیازی با خصوصیات ویژه و کار آمد در تخریب آلژینات باکتریایی، ازجدایه موکوئیدی *Pseudomonas aeruginosa* به دست آمده از خلط بیمار مبتلا به عفونت ریوی استفاده شد . از آنجایی که آلژینات لیاز در تولید آلژینات نیز نقش دارد لذا این سویه برای مطالعه انتخاب شد. ابتدا آلژینات لیاز با روش شوک حرارتی از فضای پری پلاسمی استخراج و سپس با استفاده از غلظت مناسب سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی تعویض آنیونی خالص شد. فعالیت آنزیم با روش تیوباربیتوریک اسید تعیین گردید. وزن مولکولی نسبی این آنزیم حدود ۶۰ kDa تخمین زده شد. اثر زمان واکنش، pH، غلظت سوبسترا و دما بر فعالیت آلژینات لیاز بررسی گردید. نتایج نشان می دهد که آنزیم بهترین فعالیت را در غلظت ۰/۴ mg/ml از سوبسترا و بعد از ۲۰ دقیقه واکنش در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و pH ۸/۵ دارد. فعالیت باقیمانده آنزیم بعد از ۴ ساعت قرار گرفتن در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد، ۳۱/۳۳٪ تعیین گردید که نشان دهنده پایداری دمایی قابل توجه این آنزیم می باشد. این آنزیم توانایی تخریب آلژینات سویه *P. aeruginosa* ۸۸۲۱ M را دارد که این ویژگی همراه با پایداری حرارتی مناسب، آن را گزینه مناسبی برای درمان کمکی در مبارزه با عفونتهای مقاوم به آنتی بیوتیک *P. aeruginosa* می سازد.

واژه های کلیدی: *P. aeruginosa* ، آلژینات، آلژینات لیاز، آنزیم پایدار حرارتی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۰۹۱۲۸۱۵۸۳۶۸، پست الکترونیکی: pghadam@alzahra.ac.ir

مقدمه

P. aeruginosa پاتوژن فرصت طلبی است که در میزبانهای با ضعف ایمنی باعث ایجاد عفونت خون، مجاری ادراری و مجاری تنفسی می شود. باکتری *P. aeruginosa* به دلیل ترشح مقادیر زیاد اگزوپلی ساکارید آلژینات، ظاهری موکوئیدی دارد. البته بر حسب ترشح این پلیمر، میزان موکوئیدی بودن این باکتری هم متفاوت است و به سویه های موکوئیدی و غیر موکوئیدی تقسیم بندی می شود (۳).

آلژینات پلیمر خطی glycuronans $(1 \rightarrow 4)$ است که از رزیدوهای β-D-mannosyluronic acid (M) و یا اپیمرآن α-L gulosyluronic acid (G) تشکیل شده است. این رزیدوها مانند واحدهای ساختمانی هستند که از هوموپلیمر پلی M یا پلی G تشکیل می شوند یا هتروپلیمر MG را به وجود می آورند (۲۵). آلژینات به عنوان یکی از اعضای دیواره سلولی، توسط جلبکهای دریایی قهوه ای و به عنوان اگزوپلی ساکارید توسط بعضی باکتریهای متعلق به جنس ازتوباکتر و سودوموناس ساخته می شود. پلیمر آلژینات یکی از اعضای بسیار مهم بیوفیلم حاصل از

P. aeruginosa به خصوص سویه های موکوئیدی محسوب می گردد. بر خلاف آلژیناتی که توسط جلبکها ساخته می شود، این باکتریها پلی ساکاریدی را تولید می کنند که اغلب گروه استیل در موقعیت دو و یا سه واحد D-mannuronate دارد. علاوه بر آن بعضی از مراجع ذکر می کنند که آلژیناتی که توسط سودوموناس تولید می شود پلی G ندارد (۲۵). نوع مونومر تشکیل دهنده آلژینات و میزان استیله شدن آن تعیین کننده حساسیت آلژینات به تخریب می باشد(۲۵).

آنزیم آلژینات لیاز پیوند گلیکوزیدی آلژینات را از طریق واکنش حذف بتا می شکند و الیگویورونیک اسید غیر اشباع در انتهای غیر احیای آن تولید می کند (۲۵). بر اساس ساختمان اولیه آنزیم، آلژینات لیازها در سه خانواده PL-5,7,14 دسته بندی می شوند (۱۲). اغلب اعضای خانواده PL-5و PL-7 به طور ویژه و به ترتیب پلی M و پلی G را تخریب می کنند ولی خانواده PL-14 شامل آنزیمهای ویژه ای برای پلی M یا پلی G است (۲۵). آلژینات لیاز آلژینات را از سطح سلولهای موکوئیدی سودوموناس برداشته و مانع چسبیدن سویه های موکوئیدی *P. aeruginosa* می شود(۲۵).

از آلژینات لیاز به عنوان عامل کمک درمانی برای درمان عفونتهای حاصل از سویه های موکوئیدی*P. aeruginosa* و تخریب بیوفیلم می توان استفاده کرد (۸ و ۱۴). از بیماریهای مرتبط با عفونت سودوموناس که ناشی از تشکیل بیوفیلم این باکتری است می توان به فیبروز سیستیک، عفونتهای مزمن ریوی و عفونتهای ادراری مرتبط با سوندهای ادراری اشاره کرد(۹، ۱۱ و ۱۶). به خصوص نوعی از این آنزیمها که آلژینات پلی M استیله را تخریب می کند قابل توجه تر است (۲۵). از آنجا که تعداد کمی از آنزیمهای آلژینات لیاز این خاصیت را دارند (۱۳ و ۲۵) بنابر این یکی از نکات قابل توجه برای محققین، یافتن آلژینات لیازهایی با این خصوصیت است تا نهایتاً در تخریب بیوفیلم باکتریایی از آنها استفاده شود.

از آنجا که آلژینات لیاز در تولید آلژینات نیز نقش دارد (۱۰، ۱۶ و ۱۹) در این تحقیق جدایه موکوئیدی *P. aeruginosa* از خلط بیمار انتخاب شد که به دلیل فنوتیپ موکوئیدی، آلژینات لیاز زیادی تولید می کرد و به منظور یافتن آنزیمی کار آمد در تخریب آلژینات باکتریایی، خصوصیات آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

سویه باکتری: در این بررسی از جدایه موکوئیدی *P. aeruginosa* از خلط بیمار استفاده شد. تشخیص سویه توسط ظاهر کلنی، رنگ آمیزی گرم و آزمونهای بیوشیمیایی انجام شد.

کشت باکتری و جمع آوری بیومس: ابتدا باکتری روی محیط Tryptic Soy Agar (TSA) رشد کرد. باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرما گذاری شد و سپس از کشت ۲۴ ساعته در محیط مایع YTG (Yeast extract, Trypton, Glucose) تلقیح شد. در این محیط باکتری در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ ساعت رشد کرد. سپس مقداری از این محیط تا استاندارد نیم مک فارلند رقیق و به محیط کشت اصلی (محیط کشت مایع YTG) تلقیح گردید و در نهایت هر ساعت یکبار جذب این محیط ها خوانده و نمودار رشد باکتری رسم شد و هر دو ساعت یکبار بیوماس توسط سانتریفیوژ g۱۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد جمع آوری شد (۵).

استخراج آنزیم با استفاده از شوک دمایی: هر دو ساعت یکبار ۱۰۰ سی سی از محیط کشت مایع برداشته و بیوماس جمع آوری گردید. برای استخراج آنزیم ابتدا سلولهای باکتری جدا شده از محیط کشت در بافر شستشو شامل

Tris-HCl ۰/۰۳ مولار با pH ۷/۵و MgCl2 ۰/۲ مولار سوسپانسیون شد و با استفاده از سانتریفوژ g۷۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه مایع رویی جدا و دور ریخته شد و سپس سلولهای باکتری جدا شده در هر مرحله در۱ میلی لیتر بافرشوک حرارتی حاوی Tris-HCl ۰/۰۵ مولار با pH ۷/۳و MgCl2 ۰/۲ مولار با ورتکس سوسپانسیون شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و بلافاصه در ظرف یخ با دمای صفر درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. مراحل فوق چهار مرتبه تکرار شد. بعد از این طی دو مرحله با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با ۷۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی گراد، مایع رویی حاوی آنزیم مورد نظر از سلولهای باکتری جدا و مایع رویی بلافاصه برای سنجش آنزیمی آماده شد (۱۳).

روش سنجش تیوباربیتوریک اسید (TBA): در این روش مخلوط واکنش با حجم مشخص ۲۵۰ میکرو لیتر شامل ۵۰ میکرو لیتر آلژینات سدیم با منبع جلبکی (سیگما ۱۸۰۹۴۷) با غلظت اولیه ۲ میلی گرم بر میلی لیتر ، ۱۰۰ میکرو لیتر مایع رویی حاصل از شوک دمایی و ۱۰۰ میکرولیتر از بافر حاوی (Tris-HCl ۰/۰۳ مولار با pH ۸/۵ ، MgCl2 ۹ میلی مولار و NaCl ۰/۵ مولار) آماده شد. به مخلوط واکنش ۰/۵ میلی لیتر اسید پریودیک (HIO4) ۰/۰۲۵ مولار محلول در H2SO4 ۰/۱۲۵ نرمال اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس ۱ میلی لیترسدیم ارسنیت (NaAsO2) ۲ درصد محلول در HCl ۰/۵ مولار به آرامی (قطره قطره) همراه با تکان دادن (با ورتکس) به مخلوط واکنش اضافه شد و مخلوط مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق ماند سپس ۲ میلی لیتر از TBA ۰/۳ درصد با ۲ pH همراه با تکان دادن (با ورتکس) اضافه گردید و در نهایت مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس جذب در طول موج ۵۴۸ نانومتر خوانده شد. یک واحد از فعالیت آنزیم برابر با تولید یک نانومول بتا فورمیل پیرووات بر دقیقه بر میلی لیتر است و جذب ۰/۲ دراین طول موج به معنی حضور ده واحد از آنزیم آلژینات لیاز می باشد(۳).

تعیین فعالیت ویژه: به منظور بررسی درجه خلوص آنزیم فعالیت ویژه آن از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{فعالیت ویژه} = \frac{\text{فعالیت}}{\text{مقدار پروتئین}}$$

تعیین غلظت پروتئین: مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از غلظتهای مختلف محلول پروتئین آلبومین با استفاده از بافر Tris ۰/۰۳مولار pH ۷/۳ تهیه شد و به هر یک از لوله ها ی آزمایش ۵ میلی لیتر از محلول رنگی کوماسی بلو G250 ۰/۰۱در صد در اتانول ۹۵ در صد و اسید فسفریک ۸۵ در صد اضافه و جذب در ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. سپس نمودار استاندارد رسم و از نمونه های مورد بررسی مقداری برداشته شد و با بافر Tris ۰/۰۳مولار pH ۷/۳ به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسید و جذب در ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. در ادامه با استفاده از نمودار استاندارد و معادله به دست آمده غلظت کل پروتئین استخراج شده محاسبه گردید(۷).

تخلیص آلژینات لیاز: رسوب دهی با آمونیوم سولفات: از پودر آمونیوم سولفات برای رسوب دادن پروتئینها به روش salting out استفاده شد. بعد از تهیه محلولهای با غلظت ۹۰-۲۰ درصد از آمونیوم سولفات، سوسپانسیونهای به دست آمده توسط سانتریفیوژ g۲۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد رسوب داده شد. رسوب به دست آمده در مقابل بافر شوک حرارتی دیالیز شد و مورد آنالیز قرار گرفت (۱۹).

کروماتوگرافی تعویض آنیونی: مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از جزئی که فعالیت آنزیمی داشت بر روی ستون DEAE sepharose Cl-6B به تعادل رسیده با بافر Tris ۲۰ میلی مولار pH۷/۸، شامل استات سدیم ۱۰ میلی مولارو سوکروز ۰/۲۵ مولار قرار داده شد. پس از اینکه ستون با

این بافر شسته شد، پروتئینها با شیب غلظت NaCl ۲-۰/۱مولاراز ستون خارج شدند.

تعیین خصوصیات آنزیم: تعیین وزن مولکولی نسبی آنزیم توسط الکتروفورز: به منظور بررسی پروتئینهای استخراج شده مطابق با روش لاملی از الکتروفورز غیر پیوسته ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد حاوی SDS و سپس برای رنگ آمیزی از کوماسی بلو R 250 استفاده شد و رنگ بری با محلول متانول -اسید استیک انجام گرفت (۱۴) و در موارد خاص رنگ آمیزی نیترات نقره انجام شد (۴).

برای تعیین وزن مولکولی نسبی پروتئین ابتدا پروتئینهای مارکر وزن مولکولی و پروتئین مورد نظر را بر روی ژل پلی آکریل آمید حاویSDS الکتروفورز کرده و سپس لگاریتم وزن مولکولی پروتئینهای مارکر تعیین شد و نمودار آن در مقابل R_f ($R_f=\frac{\text{مسافت طی شده توسط پروتئین بر روی ژل}}{\text{مسافت طی شده توسط بلو فنل برمو بر روی ژل}}$) به عنوان نمودار استاندارد رسم شد و از روی R_f پروتئین مورد نظر و مقایسه آن با نمودار استاندارد وزن مولکولی نسبی پروتئین مورد بررسی تعیین شد.

بررسی اثر غلظتهای مختلف سوبسترا بر عملکرد آنزیم: در بررسی اثر افزایش غلظت سوبسترا روی فعالیت آنزیم غلظتهای ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶،۰/۸و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر (غلظت نهایی از سوبسترا) استفاده شد و برای هر غلظت یک شاهد دقیق مثل خودش آماده گردید سپس سنجش TBA انجام شد.

بررسی اثر زمان واکنش بر عملکرد آنزیم: برای بررسی اثر زمان واکنش، مواد لازم برای سنجش تهیه و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گذاشته شد و به ترتیب بعد از گذشت زمانهای مختلف (۲۰ دقیقه ای یکبار) سنجش انجام گردید.

بررسی اثر دما بر عملکرد آنزیم: مخلوط واکنش به مدت ۲۰ دقیقه در دماهای مختلف (۸۰-۴درجه سانتی گراد) قرار داده شد و سپس با روش سنجش اصلی (TBA) فعالیت آنزیم اندازه گیری شد.

بررسی پایداری دمایی آنزیم: برای بررسی پایداری آنزیم در دماهای مختلف و در نتیجه بررسی فعالیت باقیمانده آنزیم، ابتدا آنزیم در هر دمایی به مدت ۱ ساعت قرار گرفت و نهایتاً در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد سنجش انجام گردید.

بررسی اثر pH بر فعالیت آنزیم: برای بررسی اثر pH های مختلف بر عملکرد آنزیم، مخلوط واکنش به مدت۲۰دقیقه با بافر استات ۱۰۰ mM با pH (۵/۶-۳/۶) و بافر Tris-HCl (M۰/۰۳) با pH (۹/۵-۶/۵) و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گذاشته و سپس مطابق سنجش اصلی سنجش شد.

بررسی اثر آلژینات لیاز بر آلژینات سویه M ۸۸۲۱ *P. aeruginosa* : به منظور تعیین اثر آنزیم برآلژینات باکتریایی، مطابق روش سنجش فعالیت آنزیم انجام شد ولی به جای سوبسترا که آلژینات جلبکی بود از آلژینات **سویه M ۸۸۲۱** *P. aeruginosa* استفاده شد (۲۱).

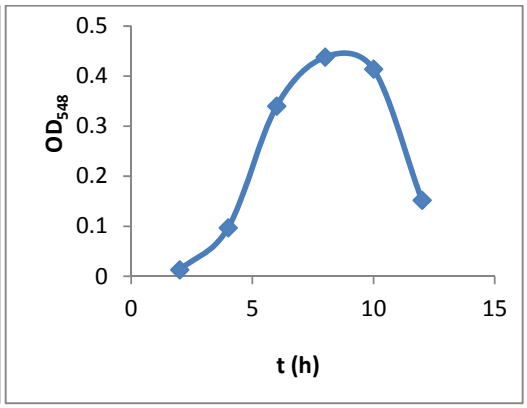
نتایج و بحث

باکتری *P. aeruginosa* باکتری فرصت طلبی است که به دلیل تولید بیوفیلم ایجاد عفونت های مقاوم به آنتی بیوتیک می کند (۱ و ۲). لذا محققین زیادی در پی یافتن راهی برای تخریب بیوفیلم این باکتری هستند تا پاسخدهی آن به آنتی بیوتیکها را بهبود بخشند. با توجه به اینکه بیوفیلم این باکتری حاوی پلی ساکارید آلژینات است و مشخص شده است که جنس آلژینات آن اکثراً از نوع پلی M استیله می باشد که هر آلژینات لیازی نمی تواند آن را تخریب کند بنابراین دسترسی به آلژینات لیازی با توانایی تخریب آلژینات پلی M استیله مد نظر محققین می باشد.

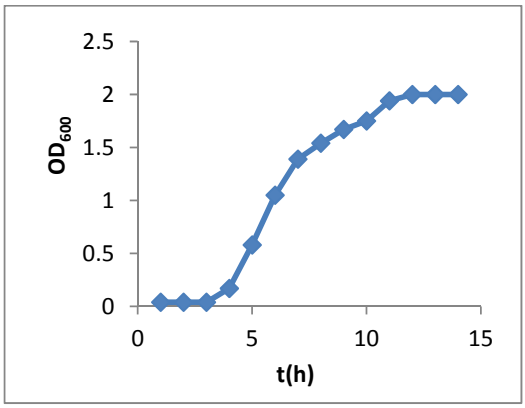
از آنجا که آلژینات لیاز در تولید آلژینات هم نقش دارد، بنابراین سویه های موکوئیدی برای تهیه آلژینات لیاز

مناسب ترند به همین منظور در این تحقیق باکتری از خلط بیمار جدا شد و با آزمونهای مورفولوژیکی، رنگ آمیزی گرم و آزمایشهای بیوشیمیایی وجود سویه موکوئیدی *P. aeruginosa* تأیید گردید(داده ها نشان داده نشده اند).

سپس نمودار رشد باکتری در محیط YTG رسم (شکل ۱) و هر دو ساعت بر نمونه باکتریایی سنجش فعالیت آلژینات لیاز با روش TBA انجام شد. مطابق شکل ۲ بیشترین تولید آنزیم بعد از ۱۰-۸ساعت رشد باکتری در محیط YTG مشاهده گردید.



شکل ۲: نمودار سنجش آنزیمی با روش TBA



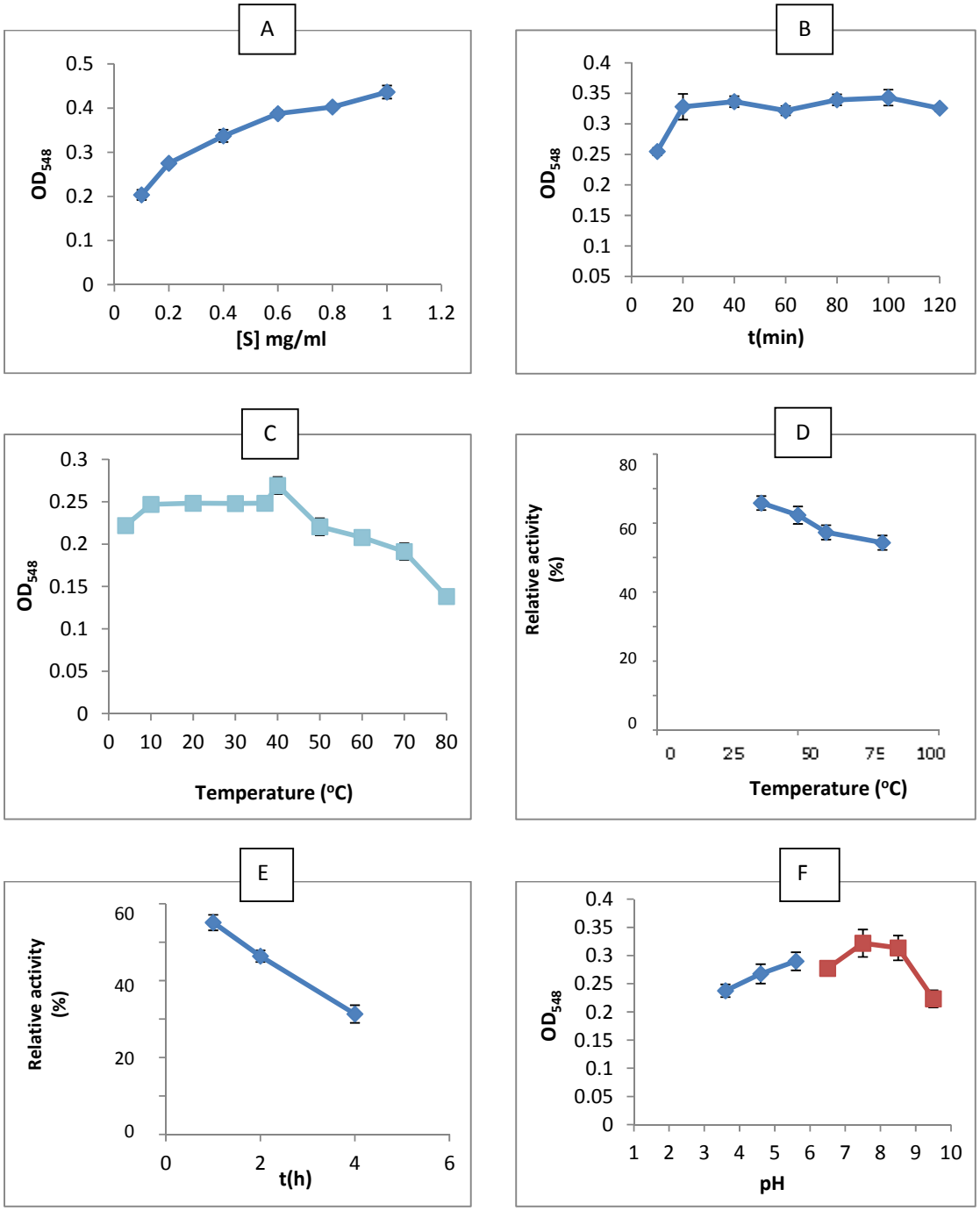
شکل ۱: نمودار رشد *P. aeruginosa* در محیط YTG

از آنجا که آنزیم درفضای پری پلاسمی قرار دارد توسط روش شوک حرارتی آنزیم از فضای پری پلاسمی باکتری خارج شد و خصوصیات آن بررسی گردید و هر آزمایش حداقل سه بار تکرار شد. با استفاده از غلظتهای مختلف آلژینات (با منبع جلبکی و خریداری شده از سیگما) مشخص گردید که بهترین فعالیت آنزیم مربوط به غلظت حدود mg/ml ۰/۴ می باشد و از آن بیشتر اثر زیادی بر فعالیت آنزیم ندارد ولی مشکلاتی همچون مصرف بیشتر ماده و تولید محلول ویسکوز به وجود می آورد که به همین علت برای بررسیهای بعدی غلظت mg/ml ۰/۴استفاده شد(شکل A ۳).

همانطور که در شکل B ۳ مشخص است زمان بهینه واکنش برای فعالیت آنزیمی ۲۰ دقیقه می باشد که از لحاظ غلظت بهینه سوبسترا و زمان مناسب واکنش مشابه FRD1 *P. aeruginosa* بود (۲۴). به منظور بررسی اثر دما بر فعالیت آنزیم، فعالیت آنزیم در گستره دمایی ۸۰-۴ درجه سانتی گراد اندازه گیری و مشخص گردید که بیشترین فعالیت مربوط به ۴۰-۳۷ درجه سانتی گراد است (شکل C ۳). پایداری دمایی این آنزیم نیز با گرما گذاری آن به مدت یک ساعت در دمای ۸۰-۳۷ درجه سانتی گراد بررسی شد. مطابق شکل D ۳ بهترین پایداری دمایی در ۳۷ درجه سانتی گراد است ولی این آنزیم حتی در ۸۰ درجه نیز پایداری داشت به طوری که پس از ۴ ساعت انکوباسیون در ۸۰ درجه هنوز ۳۱/۳۳ درصد از فعالیت آن باقی ماند (شکل E ۳) که از این نظر مشابه آنزیم آلژینات لیاز اسفنگوموناس بود(۱۸).

اثر pH بر فعالیت آنزیم در گستره ۹-۳ بررسی شد و مشخص گردید که آنزیم در این گستره فعالیت دارد ولی مشابه مطالعات Schiler ، pH بهینه بین ۸-۷/۵ بود(۲۴) و فعالیت این آنزیم به طور قابل توجهی در pH بالاتر از ۸/۵ کاهش می یافت (شکل F ۳).

آلژینات لیاز مؤثر در تخریب بیوفیلم *P. aeruginosa* باید بر آلژینات آن تاثیر بگذارد. این آلژینات علی رغم آلژینات تولیدی توسط جلبکها، پلی M استیله است که اغلب آلژینات لیازهای باکتریایی نمی توانند آن را تخریب کنند.



شکل ۳- تعیین خصوصیات آنزیم. A: اثر غلظت سوبسترا بر فعالیت آنزیم، B :اثر زمان واکنش بر فعالیت آنزیم، C :اثر دما بر فعالیت آنزیم، D : فعالیت باقی مانده آنزیم در ۸۰ درجه ، E :اثر pH بر فعالیت آنزیم .بافر Tris ۳۰ mM (■) ،بافر استات ۱۰۰ mM (♦)

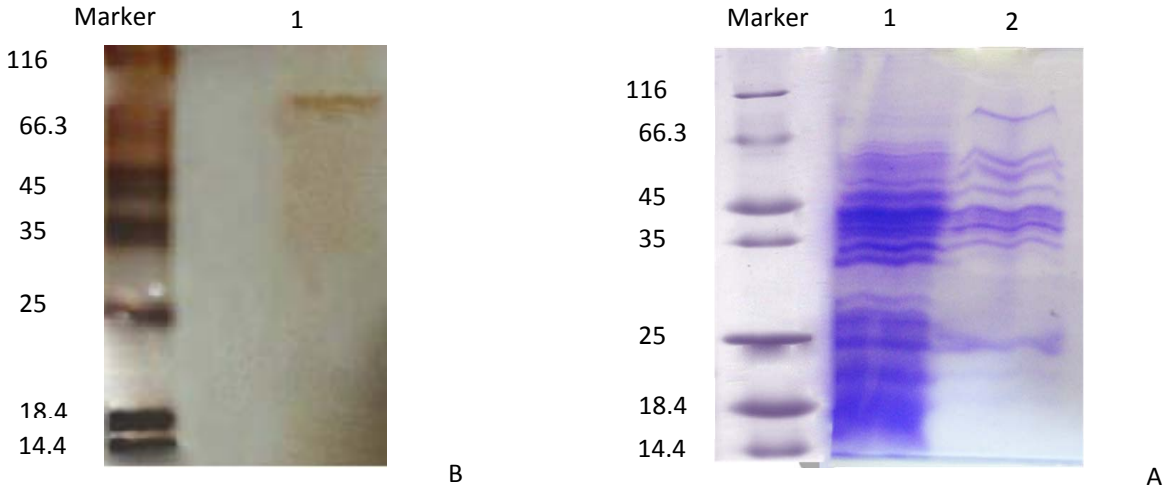
در این مطالعه آلژینات لیاز تولید شده توسط سویه بالینی به خوبی توانست آلژینات سویه *P. aeruginosa* ۸۸۲۱ M را تجزیه کند و تست TBA آن مثبت شد، بنابراین آنزیم مذکور می تواند کاندیدای مناسبی برای مبارزه با عفونتهای ناشی از بیوفیلم *P. aeruginosa* به علت تولید آلژینات فراوان باشد.

به منظور تخلیص آنزیم استخراج شده از فضای پری پلاسمی، از نمک آمونیوم سولفات استفاده شد که رسوب

به دست آمده از محلول ۵۰ درصد اشباع آمونیوم سولفات فعالیت آنزیمی نشان داد. رسوب به دست آمده پس از حل شدن در بافر Tris ۲۰ میلی مولار ۷/۸pH، شامل استات سدیم ۱۰ میلی مولارو سوکروز ۰/۲۵ مولار و دیالیز در مقابل این بافر بر روی ستون تعویض آنیونی DEAE sepharose Cl-6B قرار داده شد و مشخص گردید که در۷/۸ pH آنزیم به سستی به ستون متصل می شود به طوری که با NaCl M۰/۱ از ستون جدا می گردد. از آنجا که ماده فاز ثابت فوق، بار مثبت دارد و در۷/۸ pH آنزیم مورد بررسی با غلظت اندکی ازNaCl از ستون جدا شد بنابر این آنزیم در این pH بار منفی اندکی دارد. این آنزیم در ۷/۵ pH اصلا به ماده فاز ثابت فوق متصل نشد بنابراین به نظر می رسد که pI این آنزیم بین ۷/۵ و ۷/۸ می باشد. نتایج تخلیص آنزیمی در جدول ۱ خلاصه شده است. توسط ژل آکریل آمید حاوی SDS ۱۲ درصد وزن مولکولی نسبی آنزیم حدود ۶۰ کیلو دالتون تخمین زده شد (شکل ۴). البته در مطالعات دیگر آنزیمهای آلژینات لیاز با گستره وزن مولکولی ۲۳ تا ۶۰ کیلو دالتون گزارش شده اند (۶، ۹، ۱۲، ۱۶، ۱۷، ۲۰، ۲۲، ۲۳ و ۲۴).

جدول ۱- مراحل تخلیص آنزیم آلژینات لیاز

Purification Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific Activity U/mg	Purification Fold	Degree of purification %	Yield %
Cell extract	۰/۳۱۶	۳۶۰	۱۱۳۹/۲۴	۱	۱	۱
Ammonium sulfate	۰/۰۴۶	۱۴۹	۳۲۳۹/۱۳	۲/۸۴	۲/۸۴	۴۱/۳۹
DEAE Sepharose Cl-6B	۰/۰۱۳	۱۳۵	۱۰۳۸۴/۶۲	۹/۱۲	۳/۲۰۵	۳۷/۵



شکل ۴- ژل پلی آکریل آمید حاوی SDS .A :رنگ آمیزی کوماسی بلو،۱ :مخلوط پروتئینی حاصل از شوک حرارتی، ۲:رسوب حاصل از آمونیوم سولفات ، B :رنگ آمیزی نقره ۱: آنزیم آلژینات لیاز خالص شده با ستون کروماتوگرافی DEAE sepharose Cl-6B

نتیجه گیری

آنزیم مورد بررسی در این تحقیق خصوصیات مهمی مثل مقاومت حرارتی دارد که کار با این آنزیم را تسهیل می کند. همچنین تخلیص ساده و دو مرحله ای این آنزیم از جمله نکات مهم این تحقیق محسوب می شود. از آنجا که هدف از بررسی این آنزیم در منابع مختلف به دست آوردن آنزیمی است که بتواند آلژینات باکتریایی را تخریب کند، از این لحاظ نیز آنزیم به دست آمده می تواند کاندیدای مناسبی به عنوان درمان کمکی در عفونتهای ناشی از *P.aeruginosa* محسوب شود. بنا بر دلایل ارائه شده مطالعات بیشتری در مورد اثر این آنزیم بر بیوفیلم *P. aeruginosa* و بررسی ژن این آنزیم به منظور بیان آن لازم به نظر می رسد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق توسط معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا(س) حمایت شده است.

منابع

۱- احیا عبدی عالی، وجیهه سادات نیک بین، محمد مهدی فیض آبادی، سارا غروی و زهرا فلاحی (۱۳۸۴)، مطالعه پروفیل پلاسمیدی و مقاومت آنتی بیوتیکی در *Pseudomonas aeruginosa*بیمارستانی، مجله زیست شناسی ایران، ۱۸(۲): ۱۴۱-۱۵۰.

۲- آزاده رحمانی بادی، احیا عبدی عالی، طاهره فلسفی و زهرا فلاحی (۱۳۸۷)، نقش ناقل های تراوشی در مقاومت *Pseudomonas aeruginosa* به فلوروکینولونها، مجله زیست شناسی ایران، ۲۱(۲) :۲۳۱-۲۴۰.

3. Albrecht M.T. and Schiller N.L. (2005), Alginate Lyase (AlgL) activity is required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*, J Bacteriol, 187: 3869-3872.

4. Bassam B., Caetano-Anolles G. (1993), DNA amplification finger printing using arbitrary oligonucleotide primers. Appl Biochem Biotechnol, 42:189-200.

5. Boyd A. and Chakrabarty A.M. (1995), *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide, J Ind Microbiol, 15:162-168.

6. Boyd A., Ghosh M., May T.B., Shinabarger D., Keogh R. and Chakrabarty A.M. (1993), Sequence of the *algL* gene of *Pseudomonas aeruginosa* and purification of its alginate lyase product, Gene, 131: 1-8.

7. 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.

8. Bugli F., Posteraro B., Papi M., Torelli R., Maiorana A., Sterbini F., Posteraro P., Sanguinetti M. and De Spirito M. (2013), In Vitro Interaction between Alginate Lyase fumigatus and AmphotericinB against Aspergillus Biofilm Determined by Different methods, Antimicrob Agents Chemother, 57:1275-1282

9. Dunne W.M. and Buckmire F. (1985), Partial purification and characterization of a polymannuronic acid depolymerase produced by a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a patient with cystic fibrosis, Appl Environ Microbiol, 50: 562-567.

10. Hatch R.A. and Schiller N.L. (1998), Alginate Lyase Promotes Diffusion of Aminoglycosides through the Extracellular Polysaccharide of Mucoid Pseudomonas aeruginosa, Antimicrob Agents Chemother, 42: 974- 977.

11. Henrissat B., Coutinho P. and Deleury E. (2005), CAZy-Carbohydrate- Active Enzymes: Polysaccharide Lyase Families. http://afmb.cnrsmrs. fr/_cazy/CAZY/index.Html (viewed Apr 27).

12. Hisano T., Nishimura M., Yonemoto Y., Abe S., Yamashita T., Sakaguchi K., Kimura A. and Murata K. (1993), Bacterial Alginate lyase highly active on acetylated alginates, J ferment bioeng, 75: 332-335.

13. Hoshino, T. and M. Kageyama. (1980), Purification and properties of a binding protein for branched-chain amino acids in *Pseudomonas aeruginosa*, J. Bacteriol, 141: 1055-1063.

14. Laemmeli U (1970).Cleavage of structural proteins during the assemble of the head of bacteriophage T4.Nature, 227:680-685.

15. Lamppa J.W. and Griswold K.E.(2013), Alginate Lyase Exhibits Catalysis-Independent

Biofilm Dispersion and Antibiotic Synergy, Antimicrob. Agents Chemother, 57:137 -145.

16. Li J.W., Dong S., Song J., Li C.B., Chen X.L., Xie B.B. and Zhang Y.Z. (2011), Purification and characterization of a bifunctional alginate lyase from *Pseudoalteromonas* sp. *SM0524*, Marine Drugs, 9: 109-123.

17. Ma L.Y., Chi Z.M., Li J.and Wu L. F. (2008), Overexpression of alginate lyase of *Pseudoalteromonas elyakovii* in *Escherichia coli*, purification, and characterization of the recombinant alginate lyase, World J Microbiol Biotechnol, 24: 89–96.

18. Miyake O., Hashimoto W. and Murata K. (2003), An exotype alginate lyase in *Sphingomonas sp. A1*: overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of alginate lyase IV (A1-IV), Protein Expr Purif, 29: 33–41.

19. Nakamura M., Yamanobe T. and Takase M. (1994), Localization and purification of serum albumin in the testis of Xenopus laevis, Zoology Sci., 11:285-290.

20. Nibu Y., Satoh T., Nishi Y., Takeuchi T., Murata K. and Kusakabe I. (1995), Purification ana characterization Of extracellular alginate lyase from *Entrobacter cloacae M-1,* Biosci. Biotech. Biochem, 59: 632-637.

21. Pedersen S.S., Espersen F., Hqiby H. and Shand G.H. (1989), Purification, Characterization, and Immunological Cross-Reactivity of Alginates Produced by Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* from Patients with Cystic Fibrosis, J clin Microbiol, 27: 691-699.

22. Rehm B.H.A. (1998), Alginate lyase from *Pseudomonas aeruginosa CF1/M1* prefers the hexameric oligomannuronate as substrate, FEMS Microbiol Lett, 165: 175-180.

23. Schiller N.L., Monday S.R., Boyd C.M., Keen N.T. and Ohman D.E. (1993), Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* alginate lyase gene (*algL*): cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*, J Bacteriol, 175: 4780-4789.

24. Xiao L., Han F., Yang Z., Lu X. and Yu W. (2006), A novel alginate lyase with high activity on acetylated alginate of *Pseudomonas aeruginosa FRD1* from *Pseudomonas sp. QD03*, World J Microbiol Biotechnol, 22: 81–88.

25. Yamasaki M., Moriwaki S., Miyake O., Hashimoto W., Murata K. and Mikami B. (2004), Structure and Function of a Hypothetical *Pseudomonas aeruginosa* Protein PA1167 Classified into Family PL-7, J Biol Chem, 279: 31863–31872.

Isolation and purification of an effective thermal stable alginate lyase on hospital *Pseudomonas aeruginosa* alginate

Ghadam P., Shahriari Atashgah Kh., Abdi Ali A. and Mohammadi P.

Department of biology, Faculty of sciences, Alzahra University, Tehran, I.R.Iran

Abstract

The bacterial alginate lyase is a periplasmic enzyme that is important in the production and disruption of alginate. Characterization of this enzyme such as molecular weight, pI, thermal stability, optimum pH and temperature, and effectiveness on bacterial alginate can differ in the strains of a bacterium. In this study, to obtain an alginate lyase containing specific and efficient properties in destroying of bacterial alginate, a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patient‘s sputum was used. Since alginate lyase also has a role in alginate production, this strain was selected for this assay. Alginate lyase was extracted from periplasmic space by heat shock method and was purified by using suitable concentration of ammonium sulfate as well anionic exchange chromatography. Subsequently, enzyme activity was assayed by using thiobarbitoric acid method. The relative molecular weight of the enzyme was estimated about 60 kDa. The effect of reaction time and pH, substrate concentration and impact of temperature on alginate lyase activity was surveyed. Results showed that the optimum activity of the enzyme was achieved at 0.4 mg/ml substrate concentration after 20 min in 37°C and pH 8.5. The enzymatic residual activity after 4 hours incubation in 80°C was determined 31.33% that indicated to the spectacular thermal stability of the enzyme. This enzyme has the ability to disrupt the alginate of *P. aeruginosa* M 8821, and this ability associated with the thermal stability make it an excellent option for adjunctive therapy in the combat against antibiotic-resistant of *P. aeruginosa* infections.

Key words: *P. aeruginosa*, Alginate, Alginate lyase, Thermal stable enzyme