استخراج و بررسی پایداری و پارامترهای ترمودینامیکی یکی از پلی‌گالاکتورونازهای قارچ *Macrophomiona phaseolina*

الناز فهیمی بایرامی[۱و۲]، ناصر فرخی[۲و۳] و سعید امین زاده[۱*]

[۱] **تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، گروه مهندسی زیست فرآیند**

[۲] **شاهرود، دانشگاه شاهرود، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات**

[۳] **تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده مهندسی فناوریهای نوین، گروه بیوتکنولوژی**

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۱۰

چکیده

پلی‌گالاکتورونازها (GH28)، عمدتاً در گیاهان سبب هیدرولیز سوبسترای پکتینی می‌شوند. پلی‌گالاکتورونازها به طور گسترده در گیاهان عالی و میکروارگانیسم‌ها موجود می‌باشند. استخراج پلی‌گالاکتورونازها از منابع قارچی، به علت بازدهی بالای تولید، کاربرد فراوان دارد. در این پژوهش، قارچ *M. phaseolina*، عامل بیماری پوسیدگی زغالی، برای تولید پلی گالاکتورونازها در محیط تولید آنزیم کشت و عصاره قارچی جدا گردید. بیشترین فعالیت پلی‌گالاکتورونازی محلول آنزیمی، در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد بود. این آنزیم از پایداری دمایی و اسیدیته بالایی برخوردار است به‌طوری که، نیمه عمر حرارتی آن در دمای ۵۰ و ۷۰ درجه سانتی گراد به‌ترتیب حدود ۶۲۷ و ۳۴۵ دقیقه و میزان تغییرات انرژی آزاد غیر فعال‌سازی حرارتی آنزیم در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد تقریباً معادل ۱۱۴ کیلو ژول بر مول بود که حاکی از پتانسیل بالای این آنزیم جهت کاربرد در صنایع می‌باشد. این آنزیم از پایداری بسیار بالایی در شرایط بسیار اسیدی و قلیایی برخوردار است. بررسی و مقایسه خصوصیات بیوشیمیایی پلی-گالاکتورونازهای منابع مختلف قارچی با استفاده از برنامه ProtParam نیز پلی‌گالاکتورونازهای *M. phaseolina* را در گروه پایدارترین پلی‌گالاکتورونازهای قارچی قرار داد.

واژه های کلیدی: *M. phaseolina*، پلی‌گالاکتورونازها، پایداری حرارتی و اسیدیته، ProtParam

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۴۴۷۸۷۴۱۲ ، پست الکترونیکی: aminzade@nigeb.ac.ir

مقدمه

در طبیعت میکروارگانیسم ها با پتانسیلهای مختلف موجود می‌باشند. آنها مجموعه‌ای از آنزیمها را تولید می‌نمایند که در ابعاد تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرند (۸). در میان آنزیمها، پکتینازها بسیار حائز اهمیت و دارای پتانسیل فوق‌العاده جهت ارائه در صنعت می‌باشند؛ به‌طوری که ۲۵ درصد از کل آنزیمهای با تولید تجاری صنایع غذایی را شامل می‌شوند (۱۳ و ۱۴). پکتینازها دارای کاربرد گسترده در صنایع گوناگون مانند نساجی، پردازش فیبرهای گیاهی(۱۴) ، چای (۶)، قهوه (۱۳)، استخراج نفت، کاغذسازی (۲۴ و ۲۵) و خالص سازی ویروسهای گیاهی (۲۶) می‌باشند و از اجزای کوکتل آنزیمی مورد استفاده جهت آماده‌سازی غذای حیوانات می‌باشد (۱۱). این آنزیمها دارای اهمیت بیولوژیکی، در تکنولوژی امتزاج پروتوپلاست و بیماری‌شناسی گیاهی می‌باشند. همچنین این آنزیمها، به‌عنوان جایگزین عملی و اقتصادی فرآیندهای سنتی، جهت کاهش زباله‌های آنیونی و آلودگیهای پساب صنایع کاغذسازی مورد استفاده قرار می گیرند (۱۵ و ۱۶). فرآیندهای صنایع گیاهی، منجر به ایجاد پساب حاوی مواد پکتینی‌می‌گردند. کاربرد گسترده پلی‌گالاکتورونازها در صنایع پالایش زیستی فاضلابهای

حاوی مواد پکتینی نیز گزارش شده است (۱۱). پلی-گالاکتورونازها، گروهی از آنزیمهای دارای ساختار گلیکوپروتئینی و عملکرد پکتینولیتیک می‌باشند که از طریق اکسیژن مولکول آب (حمله اکسیژن مولکول آب به کربن گروه کربونیل)، برش هیدرولیتیکی زنجیره پلی-گالاکتورونیک اسید را کاتالیز می‌نمایند (۲۷). مواد پکتینی ترکیب اصلی دیواره سلولهای گیاهی می‌باشند (۱). پلی-گالاکتورونازها با تجزیه پلیمرهای پکتینی دیواره سلولی، تشکیل کلنیهای قارچی را روی گیاه میسر می‌سازند (۹، ۱۲ و ۲۱) و فاکتور اصلی تخریب بافتهای گیاهی در فرآیند نفوذ فیتوپاتوژن می‌باشند (۴). این آنزیمها به طور گسترده در گیاهان عالی و میکروارگانیسم‌ها موجود می‌باشند (۳۲) و در میان خانواده آنزیمهای پکتینولیتیک بیشترین سهم مطالعات را به خود اختصاص داده‌اند. تقریباً تمام ظرفیتهای تجاری آنزیمهای پکتینولیتیک متعلق به منابع قارچی می-باشند (۱۳). انتخاب منبع میکروبی مناسب جهت تولید پلی‌گالاکتورونازها به فاکتورهای مختلف، از قبیل ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی، مانند pH و پایداری حراتی آنزیمها بستگی دارد. با توجه به کاربرد گسترده آنزیم پلی-گالاکتوروناز در صنایع گوناگون، مطالعه خواص بیوشیمیایی این آنزیمها جهت ارتقای سطح تولید و فعالیت آنها و نیز تعیین منبع مناسب تولید آنزیم ضروری می‌باشد. در این مطالعه تولید و بررسی ویژگیهای کاتالیتیکی و پایداری حرارتی و اسیدیته آنزیم پلی‌گالاکتوروناز قارچ *M. phaseolina* به‌منظور تعیین پتانسیل این آنزیم جهت کاربرد در صنعت و البته شناخت نسبی ساختار آنزیم، مورد توجه قرار گرفته است. خصوصیات بیوشیمیایی پلی-گالاکتورونازهای این قارچ و سایر منابع قارچی به لحاظ بیوانفورماتیکی نیز مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

مواد و روشها

قارچ *M. phaseolina* اهدایی آقای دکتر ابوالفضل سرپله از مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور بود. پلی-گالاکترونیک‌اسید، α-D-گالاکترونیک‌اسید و ۵،۳-دی-نیتروسالیسیلیک‌اسید (DNS) از شرکت سیگما و سایر مواد شیمیایی از شرکت مرک (Darmstadt,Germany) تهیه گردید.

تولید پلی‌گالاکتوروناز از قارچ *M. phaseolina* : قارچ *M. phaseolina*، پس از تکثیر در محیط مایع PDB، جهت نگهداری در محیط جامد PDA کشت شد. جهت القای تولید آنزیم پلی‌گالاکتوروناز، قارچ *M. phaseolina* در شرایط استریل از محیط PDA به محیط بهینه تولید پلی-گالاکتوروناز (۵ گرم در لیتر پلی‌گالاکترونیک اسید، ۳ گرم در لیتر سولفات آمونیوم، ۱۰ گرم در لیتر فسفات دی-هیدروژن پتاسیم، ۲ گرم در لیتر سولفات منیزیم، ۰/۷ میلی-گرم در لیتر بورات سدیم، ۰/۵میلی‌گرم در لیتر مولیبدات آمونیوم، ۱۰ میلی‌گرم در لیتر فروسولفات آهن، ۰/۳ میلی-گرم در لیتر سولفات مس، ۰/۱۱ میلی‌گرم در لیتر سولفات منگنز، ۱۷/۶ میلی‌گرم در لیتر سولفات روی، ۴ = pH) منتقل گردید و به مدت ۷۲ ساعت در شیکر انکوباتور (۳۵ درجه سانتی گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه) قرار گرفت. محیط کشت حاوی قارچ تکثیر یافته، از کاغذ صافی عبور داده - شد. عصاره حاوی آنزیمهای ترشحی، مورد سنجش پایداری حرارتی و اسیدیته فعالیت پلی‌گالاکتورونازی قرار گرفت.

سنجش فعالیت پلی‌گالاکتورونازی: میزان فعالیت پلی-گالاکتورونازی محلول واکنش با استفاده از روش DNS (۲۰) تخمین زده شد. در این روش، محلول واکنش برای مدت زمان مشخصی انکوبه گردید و با حرارت و معرف رنگی حاوی سود، واکنش متوقف شد و میزان فعالیت آنزیمی بر اساس میزان محصول تولیدی محاسبه گردید. فعالیت پلی‌گالاکتورونازی با اندازه‌گیری میزان واحدهای D-گالاکترونیک اسید آزاد شده (میزان محصولی که تولید شده است) به عنوان گروههای احیاءیی سنجیده شد. محلول سوبسترای پلی‌گالاکترونیک اسید یک درصد

وزنی/ حجمی در بافر استات ۲۰ میلی‌مولار (pH = ۴) و محلول رنگی۳و۵-دی‌نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) برای سنجش فعالیت آنزیم به کار رفت. . جهت سنجش فعالیت پلی‌گالاکتورونازی، ۲۰۰ میکرولیتر محلول پروتئینی به ۲۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا افزوده شد. ویال محتوی محلول واکنش به‌مدت ۴۵ دقیقه در بن ماری دمای ۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از این مدت ۴۰۰ میکرولیتر محلول رنگی ۳ و ۵ دی نیترو سالیسیک اسید(DNS) افزوده شد تا فعالیت آنزیمی متوقف گردد. ویالها به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. پس از خنک شدن در دمای اتاق در g × ۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و جذب مایع رویی در ۵۳۰ نانومتر خوانده شد. DNS قادر به شناسایی انتهای احیاءکننده گروه هیدروکسیل (OH-) کربن شماره یک کربوهیدرات می‌باشد و با آن تشکیل کمپلکسی می‌دهد که دارای جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر می‌باشد. نواحی احیاءی D-گالاکتورونیک اسید تولیدی(در اثر فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتورونازبر سوبسترای پلی‌گالاکتورونیک اسید) در واکنش با معرف DNS، موجب افزایش جذب (رنگ قرمز تیره) در محلول واکنش می‌گردد. هر چه میزان جذب بالاتر(رنگ تشکیل شده تیره‌تر) باشد، حاکی از تولید میزان بیشتری از D-گالاکتورونیک اسید و به تبع آن فعالیت و غلظت (۵) پلی‌گالاکتورونازی بیشتر می‌باشد.

بررسی تأثیر دما بر فعالیت آنزیم و به دست آوردن دمای بهینه (Temperature Profile): جهت تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیمی، تأثیر دماهای ۲۰ تا ۸۰ درجه سانتی گراد بر فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا به ۲۰۰ میکرولیتر آنزیم، افزوده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دماهای ۲۰ تا ۸۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. بعد از گذشت این زمان به مخلوط سوبسترا و آنزیم، ۴۰۰ میکرولیتر DNS اضافه گردید و از طریق سنجش فعالیت آنزیمی جذب هر کدام از نمونه‌ها در ۵۳۰ نانومتر خوانده شد.

بررسی غیر فعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم در زمانهای مختلف و در درجه حرارت ۷۰ درجه سانتی گراد: به‌منظور بررسی غیر فعال‌سازی حرارتی برگشت-ناپذیر پلی‌گالاکتورونازآنزیم در دماهای ۵۰ و ۷۰ درجه سانتی گراد در زمانهای صفر تا ۶۰ دقیقه انکوبه و سپس در حضور محلول سوبسترای پلی‌گالاکتورونیک اسید، مورد سنجش فعالیت آنزیمی، قرار گرفت. باقیمانده فعالیت آنزیمی از طریق رابطه (۱) محاسبه می‌شود (۳):

$$\text{Residual PG activity } \% = 100(A_t/A_o) \quad \text{رابطه ۱}$$

در این رابطه A_t میزان فعالیت آنزیم در زمان t و بر حسب ثانیه، A_0 میزان فعالیت آنزیم در زمان صفر می‌باشد.

غیر فعال شدن حرارتی آنزیم اغلب با مدل کینتیکی first-order توصیف می‌شود. یعنی فعالیت آنزیم به صورت لگاریتمی خطی با گذشت زمان کاهش پیدا می‌کند که به صورت رابطه (۲) نشان داده می‌شود (۳):

$$\mathrm{Ln}(A_t/A_O) = -kt \quad \text{رابطه ۲}$$

در این رابطه A_t میزان فعالیت آنزیم در زمان t و A_0 میزان فعالیت اولیه آنزیم، t زمان تیمار آنزیم و k ثابت سرعت غیر فعال شدن می‌باشد.

محاسبه پارامترهای ترمودینامیکی: میزان انرژی آزاد برای غیر فعال سازی آنزیم پلی‌گالاکتورونازآنزیم ($\Delta G^{\#}$)، با استفاده از رابطه (۳) محاسبه می‌گردد (۳):

$$\Delta G^{\#} = -RT \ln(kh/K_B T) \quad \text{رابطه ۳}$$

که h (6.62×10^{-34} J.s) ثابت پلانک و K_B (1.3806×10^{-23} JK^{-1}) ثابت بولتزمن می‌باشد.

جهت محاسبه میزان نیمه عمر حرارتی آنزیم، از رابطه (۴) استفاده می‌شود (۳):

$$T_{1/2} = \ln(2)/k \ (\min^{-1}) \quad \text{رابطه ۴}$$

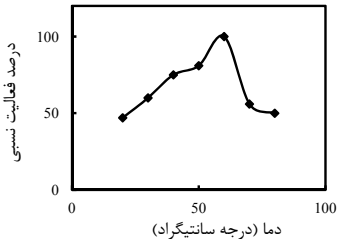
که در آن $t_{1/2}$ نیمه عمر حرارتی آنزیم و k ثابت سرعت غیر فعال سازی است که از روی شیب منحنی لگاریتم درصد فعالیت نسبت به زمان قابل محاسبه می‌باشد.

بررسی پایداری آنزیم در pHهای مختلف: جهت بررسی پایداری فعالیت پلی‌گالاکتورونازی محلول پروتئینی در pHهای مختلف، ابتدا بافر مخلوط ۵ میلی‌مولار از فسفات سدیم، استات سدیم و گلایسین در pHهای ۳ تا ۱۲ تهیه شد. محلولهای آنزیمی به هر یک از بافرهای مخلوط (pH-های ۳ تا ۱۲) افزوده‌شد و این محلولهای آنزیمی در pH-های مختلف به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از گذشت این زمان، محلول سوبسترای پلی-گالاکتورونیک اسید به نمونه‌ها افزوده شد و ویالهای محتوی محلول واکنش به‌مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری و در دمای بهینه فعالیت آنزیم قرار گرفت. سپس از طریق سنجش فعالیت آنزیمی، جذب هر کدام از نمونه‌ها در ۵۳۰ نانومتر خوانده‌شد.

بررسی و مقایسه بیوانفورماتیکی خصوصیات بیوشیمیایی پلی‌گالاکتورونازهای *M. phaseolina* و سایر منابع قارچی: توالی پروتئینی پلی‌گالاکتورونازهای قارچی از سایت CaZy (www.afmb.cnrs-mrs.fr/cazy) جمع‌آوری گردید. تمامی این آنزیمها در خانواده ۲۸ طبقه‌بندی شده-اند. تنها پلی‌گالاکتورونازهایی که به عنوان اندو و اگزو پلی‌گالاکتورونازِ معرفی شده‌اند جهت آنالیز استفاده شد. نتایج آنالیز ژنوم *M. phaseolina*، حاکی از وجود هفت پلی‌گالاکتورونازِ در این قارچ، با شماره دستیابی ۴۰۷۹۲۳۹۰، ۴۰۷۹۲۲۷۷۱، ۴۰۷۹۱۷۱۷۰، ۴۰۷۹۲۵۹۴۹، ۴۰۷۹۲۴۳۲۹، ۴۰۷۹۲۱۲۶۶، ۴۰۷۹۲۰۹۱۱ و ۴۰۷۹۲۵۰۰۴ در پایگاه داده های بیوتکنولوژی (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) می‌باشد. خصوصیات بیوشیمیایی پلی‌گالاکتورونازهای قارچ *M. phaseolina* و سایر منابع قارچی با استفاده از برنامه ProtParam (http://www.expasy.ch/tools/) مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت (۱۰).

نتایج و بحث

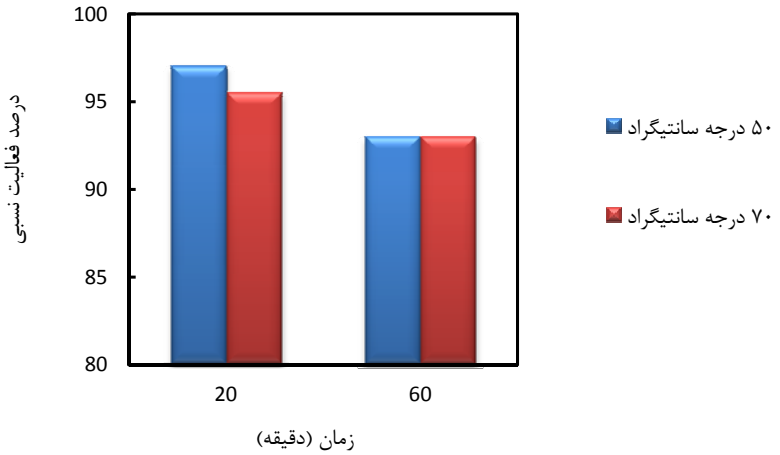
اغلب فرآیندهای آنزیمی در صنعت، در دمای بسیار بالا صورت می‌گیرند و در این رابطه آنزیمهای ترموفیل از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند. افزایش حلالیت سوبسترا و سرعت واکنش و کاهش خطر آلودگی میکروبی که عمدتاً از منبع استخراج آنزیم ناشی می‌شود، از مزایای مهم استفاده از دمای بالا در این صنایع می‌باشند. اکثر پلی-گالاکتورونازها در محدوده دمایی ۴۰-۳۰ درجه سانتی گراد فعالیت می‌نمایند (۱۳) اما معدودی از آنها مانند پلی-گالاکتورونازهای جدا شده از *Bacillus licheniformis* (۲۷) و *Fusarium oxysporum* (۲۳)، ترموفیل می‌باشند و دارای اپتیمم فعالیت در محدوده دمایی۵۰ تا ۶۰ درجه سانتی گراد می‌باشند (۱۳) در این مطالعه پلی‌گالاکتورونازِ قارچ *M. phaseolina* در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد دارای بیشترین میزان فعالیت بود. همچنین مشخص گردید آنزیم مورد بررسی در دماهای ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی گراد دارای بیش از ۵۰ درصد فعالیت حداکثر می‌باشد (شکل ۱).



شکل۱ – بررسی تأثیر دما بر میزان فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتورونازِ در حضور سوبسترای پلی‌گالاکتورونیک اسید و pH = ۳، آنزیم در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد دارای فعالیت بیشینه می باشد.

پایداری دمایی پروتئینهای ترموفیل ویژگی ذاتی است و به ترتیب و نوع اسیدهای آمینه موجود در ساختار اول آنها بستگی دارد. پایداری دمایی پروتئینها، نتیجه بهینه نمودن

برهمکنشهای درون مولکولی، تراکم ساختاری و آرایش داخلی اسیدهای آمینه هیدروفوب و در سطح پروتئین قرار گرفتن اسیدهای آمینه هیدروفیل می‌باشد. پایداری آنزیم پلی-گالاکتورونات در دماهای ۵۰ و ۷۰ درجه سانتی گراد بررسی گردید (شکل ۲). این آنزیم پس از ۶۰ دقیقه تیمار در این دماها، حدود ۹۳ درصد از فعالیت خود را حفظ نمود. در هیچ یک از مطالعاتی که تاکنون در مورد پایداری حرارتی پلی-گالاکتورونازهای منابع گوناگون صورت گرفته این میزان از پایداری حرارتی آنزیم گزارش نشده است به‌طوری که مارتینز و همکاران (۲۰۱۳) دمای اپتیمم فعالیت آنزیم را ۶۰ درجه سانتی گراد گزارش نمودند، با این‌حال آنها اعلام نمودند این آنزیم نسبتاً ترموفیل، پس از ۶۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد ، ۹۰ درصد فعالیت خود را از دست می‌دهد (۱۹).

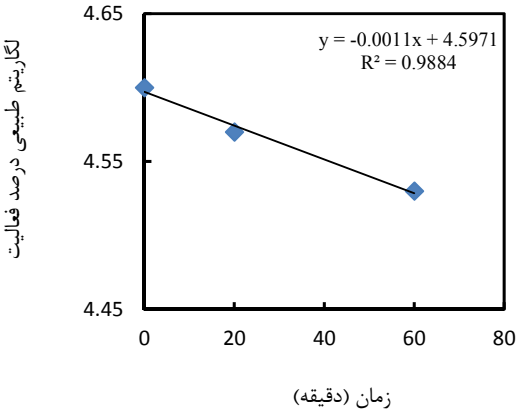


شکل ۲ – نمودار بررسی پایداری حرارتی پلی‌گالاکتورونات در زمانهای ۲۰ و ۶۰ دقیقه در دماهای ۵۰ و ۷۰ درجه سانتی گراد، این آنزیم پس از ۶۰ دقیقه تیمار در دمای ۵۰ و ۷۰ درجه سانتی گراد، ۹۳ درصد از فعالیت خود را حفظ نمود.

محاسبه نیمه عمر حرارتی و میزان انرژی آزاد برای غیر فعال سازی حرارتی آنزیم ($\Delta G^{\#}$) با استفاده از ثابت سرعت غیر فعال‌سازی حرارتی آنزیم صورت گرفت. این ثابت، معادل شیب خطوط نمودار غیر فعال‌سازی حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم می باشد که در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد معادل (۱/min) ۰/۰۰۱۱ تخمین زده شد (شکل ۳). به‌همین ترتیب ثابت سرعت غیر فعال‌سازی آنزیم در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد معادل(۱/min) ۰/۰۰۲ تخمین زده شد. نتایج نشان داد پلی-گالاکتورونات قارچ *M. phaseolina* در دمای ۵۰ و ۷۰ درجه سانتی گراد احتمالاً به‌ترتیب دارای نیمه عمر حرارتی معادل تقریباً ۶۲۷ و ۳۴۵ دقیقه می‌باشد. مقدار نیمه عمر حرارتی پلی-گالاکتورونات این قارچ بسیار بزرگتر از مقدار محاسبه شده برای پلی‌گالاکتورونات *Tetracoccosporium sp.* (۶۳/۰۱ دقیقه)(۳) و *Aspergillus giganteus* (۳۰ دقیقه)(۲۲)، در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد، می‌باشد که بر پایداری حرارتی بسیار بالای پلی‌گالاکتورونات قارچ *M. phaseolina* دلالت دارد. مقدار تغییرات انرژی آزاد غیر فعال‌سازی حرارتی آنزیم در دمای۵۰ و ۷۰ درجه سانتی گراد، به‌ترتیب حدود ۱۰۹ و ۱۱۴ کیلو ژول بر مول بود. میزان بالای این پارامتر حاکی از ثبات قابل ملاحظه ساختمان شیمیایی و سه‌بعدی آنزیم و مقاومت آن نسبت به حرارت می‌باشد. بنابراین مشخص گردید، آنزیم قادر به حفظ فعالیت خود در درجه حرارت بسیار بالا در مدت زمان طولانی می‌باشد. مقدار تقریباً مشابهی برای تغییرات انرژی آزاد غیر فعال‌سازی حرارتی پلی‌گالاکتورونات *Tetracoccosporium* sp. (۹۴/۳۵ کیلوژول بر مول)(۳) و *Erwinia carotovora* (۸۳ تا ۸۶/۱ کیلوژول بر مول)(۱۷) تخمین زده شده است.

مطالعات صورت گرفته تاکنون، پایداری پلی‌گالاکتورونازهای منابع مختلف را در pHهای اسیدی (۱۸)، قلیایی (۱۷) و یا در بازه میانی اسیدیته (۷، ۲۸، ۲۹، ۳۰ و ۳۱) گزارش نموده‌اند. بررسی پایداری اسیدیته پلی‌گالاکتورونات *M. phaseolina* نشان داد ساختار آنزیم در pHهای ۲ تا ۱۲ از پایداری قابل توجهی برخوردار می‌باشد. به‌طوری که در pH های ۲ و ۱۲ پس از ۹۰

دقیقه به‌ترتیب حدود ۶۰ و ۵۰ درصد فعالیت آنزیم حفظ گردید. امین‌زاده و فرخی (۲۰۱۳) گزارش نمودند پلی‌گالاکتوروناز *M. phaseolina*، در pH = ۳ دارای حداکثر فعالیت آنزیمی می باشد (۲). براساس نتایج حاصل از بررسی پایداری اسیدیته پلی‌گالاکتوروناز *M. phaseolina* در مطالعه حاضر، آنزیم در pH ۵ و ۷ به‌میزان ۱۴ درصد، پایداری بیشتری نسبت به pH بهینه نشان داد. همچنین مشخص شد میزان پایداری آنزیم پس از ۹۰ دقیقه تیمار در pH بهینه، بیشتر از میزان پایداری پس از ۳۰ دقیقه تیمار در این pH است. به‌نظر می‌رسد ساختار آنزیم جهت داشتن حداکثر فعالیت در pH بهینه تا حدی از حالت فولدینگ خارج و همچنین احتمالاً شکل تاخورده کامل آنزیم در این pH تشکیل نمی‌شود. میزان پایداری در pHهای ۷ تا ۱۲ کاهش یافت و به‌نظر می‌رسد بررسی حدواسطهای ساختار آنزیمی در این pH ها امکان‌پذیر باشد. تاکنون چنین گزارشی از الگوی پایداری اسیدیته پلی‌گالاکتوروناز‌ها ارائه نشده است.



شکل ۳ – نمودار بررسی غیر فعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم در زمانهای مختلف و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد، شیب خط معادل ضریب سرعت غیرفعال‌سازی آنزیم در این دما می‌باشد.

بررسی و مقایسه بیوانفورماتیکی خصوصیات بیوشیمیایی پلی‌گالاکتورونازهای *M. phaseolina* و سایر منابع قارچی: خصوصیات بیوشیمیایی تمامی اندو و اگزو پلی-گالاکتورونازهای قارچی(جدول۱) و پلی‌گالاکتورونازهای *M. phaseolina* (جدول ۲) مورد بررسی قرار گرفت. بررسی خصوصیات بیوشیمیایی پلی‌گالاکتورونازها با استفاده از برنامه protparam نشان داد، وزن مولکولی محاسبه شده و نقطه ایزو الکتریک پیش‌بینی شده، دارای تنوع فاحشی بین انواع پلی‌گالاکتورونازها در منابع مختلف قارچی می‌باشد. مطالعات انجام گرفته بر روی ساختار مولکولی ایزوآنزیمهای مختلف این آنزیم نشان داده است که توالی اسید آمینه‌ای کلیه ایزوآنزیمها جز در بخشی از ناحیه کربوکسیلی آنها، که جایگاه فعال آنزیم در آن قرار دارد، دارای همولوژی بسیار کمی می‌باشد و این عامل سبب بروز خصوصیات فیزیکی و شیمیایی متفاوت ایزوآنزیمهای مختلف این آنزیم در بین سویه‌های مختلف قارچی و حتی در درون یک سویه، خصوصاً از نظر وزن مولکولی و pH ایزوالکتریک آنها شده است (۱۸). شاخص ناپایداری پروتئینها بیانگر میزان پایداری آنها در لوله آزمایش می‌باشد به طوری که پروتئینهایی با شاخص کمتر از ۴۰ جزء پروتئینهای پایدار تقسیم‌بندی می‌شوند (۸). شاخص ناپایداری اندوپلی‌گالاکتورونازها بین (۵/۶۷) در قارچ *Heterobasidion aff.annosum* که دارای اندوپلی-گالاکتوروناز با ۷۹ اسید آمینه تا ۳۶/۳۹ در قارچ *Aspergilus niger* که دارای اندوپلی‌گالاکتوروناز با ۴۹۵ اسید آمینه می‌باشد، متفاوت است، که حاکی از پایداری این آنزیم در قارچ *H.annosum* نسبت به قارچ *A.niger* می‌باشد. میزان شاخص ناپایداری پلی‌گالاکتورونازهای قارچ *M. phaseolina* نیز بر پایداری این آنزیمها دلالت دارد. همان‌طور که اشاره شد، پایداری حرارتی و فعالیت پلی‌گالاکتورونازها در فرآیندهای بیوتکنولوژیکی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. شاخص آلیفاتیک به عنوان یک عامل مهم به منظور برآورد مقاومت پروتئینها در برابر حرارت می‌باشد، پلی‌گالاکتورونازهای قارچ *M. phaseolina* براساس این پارامتر نیز در گروه پایدارترین پلی گالاکتورونازهای قارچی قرار می‌گیرد.

جمع‌بندی

نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت و پایداری حرارتی و اسیدیته پلی‌گالاکتورونازی که توسط قارچ *M. phaseolina* تولید گردید، حاکی از ثبات بسیار بالای ساختار شیمیایی و مولکولی این آنزیم و مقاومت بسیار بالای آن نسبت به حرارت و شرایط گوناگون اسیدیته می‌باشد. بنابراین این قارچ به عنوان منبع مناسب جهت تولید آنزیم پلی‌گالاکتوروناز به منظور استفاده در صنعت، پیشنهاد می‌گردد.

بر اساس نتایج حاصل از بررسی خصوصیات بیوشیمیایی پلی‌گالاکتورونازهای منابع مختلف قارچی، پلی‌گالاکتورونازهای *M. phaseolina*، مقاوم در برابر حرارت می‌باشند. همچنین قارچ *Chondrostereum purpureum* با شاخص ناپایداری ۱۴/۹۶ به عنوان منبع میکروبی مناسب جهت تولید آنزیم پلی‌گالاکتوروناز به منظور استفاده در صنعت، پیشنهاد می‌گردد.

جدول ۱ – خصوصیات بیوشیمیایی پلی‌گالاکتورونازهای منابع مختلف قارچی

قارچ‌ها	ماهیت پلی-گالاکتورونازی	ProtParam			
		وزن مولکولی (دالتون)	نقطه ایزوالکتریک	شاخص ناپایداری	شاخص آلیفاتیک
Alternaria macrospora	اندو	۳۸۸۱۲/۱	۴/۸۵	۲۱/۸۸	۷۵/۰۴
Emericella nidulans	اگزو	۴۹۱۶۱/۱	۵/۵۱	۳۱/۹۲	۸۴/۰۳
Aspergillus niger	اندو	۵۰۷۸۲/۵	۴/۲۸	۳۶/۳۹	۷۴/۵۳
spergillus niger	اگزو	۴۸۳۸۳/۲	۴/۶۴	۳۲/۷۱	۸۶/۳۵
Bispora sp. MEY-1	اندو	۴۹۰۱۴/۴	۴/۲۶	۳۲/۴۸	۶۹/۴۸
Botryotinia fuckeliana	اندو	۳۵۰۰۵/۷	۵/۹۴	۲۷/۱۵	۷۸/۴۱
Botryotinia fuckeliana	اگزو	۴۹۴۶۸/۰	۴/۹۷	۳۸/۲۳	۷۸/۶۸
Botrytis fabae	اندو	۴۶۷۲۲/۱	۴/۷۰	۲۹/۰۷	۷۵/۰۶
Chondrostereum purpureum	اندو	۱۵۵۶۵۲/۳	۴/۹۷	۱۴/۹۶	۷۲/۴۳
Fusarium oxysporum f. cubense	اگزو	۵۱۶۵۴/۴	۸/۵۶	۲۹/۸۴	۷۱/۰۳
Gibberella intermedia	اندو	۳۸۷۶۹/۸	۶/۱۳	۲۴/۶۷	۷۶/۱۰
Heterobasidion aff. annosum	اندو	۷۹۱۵/۷	۷/۹۳	۵/۶۷	۹۶/۲۰
Penicillium sp. CGMCC 1669	اندو	۳۸۱۴۵/۵	۷/۰۹	۲۱/۷۷	۸۵/۴۴
Sclerotinia sclerotiorum	اندو	۳۹۳۶۸/۲	۵/۲۱	۳۰/۹۲	۷۲/۶۵
Sclerotinia sclerotiorum	اگزو	۲۸۶۴۴/۳	۶/۳۸	۳۴/۵۴	۵۸/۸۵
Thanatephorus cucumeris	اندو	۳۷۵۱۷/۹	۸/۹۳	۲۰/۹۶	۷۲/۹۱

جدول ۲ – خصوصیات بیوشیمیایی پلی‌گالاکتورونازهای *M. phaseolina*

شماره دستیابی	وزن مولکولی (دالتون)	نقطه ایزوالکتریک	شاخص ناپایداری	شاخص آلیفاتیک
gi|407923909|	۴۶۵۴۲/۶	۴/۴۱	۳۳/۸۱	۷۴/۴۶
gi|407922771|	۴۴۳۲۸/۸	۴/۷۷	۳۳/۹۶	۶۷/۶۱
gi|407917170|	۳۷۴۲۹/۸	۶/۴	۲۲/۱۹	۸۷/۴۸
gi|407925949|	۵۴۶۳۸/۲	۴/۴	۲۹/۳۲	۶۷/۶۱
gi|407924329|	۳۸۱۹۸/۹	۴/۴	۲۱/۶	۷۵/۶۳
gi|407921266|	۴۸۶۷۱/۷	۴/۵۸	۳۴/۶۴	۷۷/۵۱
gi|407920911|	۴۱۳۱۶/۹	۴/۴۹	۲۹/۷۸	۸۱/۶۰

منابع

۱- دشت بزرگی، س، سپهری، ح، گلیایی، ب، دلفی، ل، جان زمین، الف، ۱۳۹۲، بررسی اثر مشتقات پکتینی در القای مرگ برنامه‌ریزی شده یا آپاپتوز در دودمان سلولی سرطان پروستات انسانی DU145، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست-شناسی ایران)، شماره ۲، جلد ۲۶.

2- Aminzadeh, S, Farrokhi, N, 2013, Product optimization, purification and characterization of a novel polygalacturonase produced by *Macrophomina phaseolina*, Biological Journal of Microorganism, 1(4), 21-34.

3- Aminzadeh, S, Naderi-Manesh, H, Khajeh, Kh, Naderi-Manesh, M, 2006, Purification, characterization, kinetic properties, and thermal behavior of extracellular polygalacturonase produced by filamentous fungus *Tetracoccosporium* sp, Applied Biochemistry and Biotechnology, 135(3), 193-208

4- Angayarkanni, J, Palaniswami, M, Murugesan, S. & Swaminathan, k, 2002, Improvement of tea leaves fermentation with *Aspergillus spp*. Pectinase, Journal of Bioscience and Bioengineering, 94(4), 299-303.

5- 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.

6- Carr, JG, 1985, Tea, coffee and cocoa, In:Wood BJB, editor. Microbiology of fermented foods, vol. 2. London: Elsevier Science Ltd. p, 133–54.

7- Day, A, Karmakar, M, Ray, R.R, 2011, Extracellular Thermostable Polygalacturonase from *Bacillus* sp, AD 1. Der Pharmacia Lettre, 3(2), 358-367.

8- Dayanand, A, Patil S. R, 2003, In: Detection of potential fungal isolates for the production of pectinase from deseeded dried sunflower head.

9- D'Ovidio, R, et al, 2004, Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant–pathogen interactions. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 1696(2), 237-244.

10- Gasteiger, E, Hoogland, C, Gattiker, A, Duvaud, S, Wilkins, M.R, Apple, R.D, et al, 2005, Protein identification analysis tools on the EXPAZY server, 571-607.

11- Hoondal, GS, Tiwari, RP, Tiwari, R, Dahiya, N, 2000, Microbial alkaline pectinases and their applications: a review. Appl Microbiol Biotechnol, 59,409–18.

12- Idnurm, A, Howlett, B.J, 2001, Pathogenicity genes of phyto-pathogenic fungi, Mol. Plant Pathol, 2, 241–255.

13- Jayani, R.S, Saxena, S, Gupta, R, 2005, Microbial pectinolytic enzymes: a review. Process Biochemistry, 40(9), 2931-2944.

14- Kapoor, M, Beg, QK, Bhushan, B, Singh, K, Dadhich, KS & Hoondal, GS, 2001, Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2 in degumming of ramie (Boehmeria nivea) and sunn hemp (Crotalaria juncea) bast fibers, Process Biochemistry, 36, 803–807.

15- Kirk, T.K, Jeffries, T.W, 1996, Roles for microbial enzymes in pulp and paper processing. in ACS Symposium Series, Washington, DC: American Chemical Society,[1974].

16- Maijala, P, et al., 2008, Biomechanical pulping of softwood with enzymes and white-rot fungus *Physisporinus rivulosus.* Enzyme and microbial technology, 2008. 43(2),169-177.

17- Maisuria, V.B, et al, 2010, Biochemical and Thermal Stabilization Parameters of Polygalacturonase from *Erwinia carotovora* subsp. carotovora BR1. J. Microbiol. Biotechnol., 20(7), 1077-1085.

18- Margo, P, Varvaro, L, Chilosi, G, Avanzo, C, Balestra, GM, 1994, Pectinolytic enzymes produced by Pseudomonas syringae pv. Glycinea, FEMS Microbiol Lett,117,1–6.

19- Martins, E.d.S, et al, 2013, Purification and Properties of Polygalacturonase Produced by Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 on Solid-State Fermentation, Enzyme research.

20- Miller, G.L, 1959, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Anal. Chem, 31, 426-428.

21- Niture, S.K, et al, 2008, Inactivation of polygalacturonase and pectate lyase produced by pH tolerant fungus *Fusarium moniliforme* NCIM 1276 in a liquid medium and in the host tissue, Microbiological research, 163(1), p. 51-62.

22- Pedrolli, D.B, et al, 2008, Studies on productivity and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus giganteus* submerged culture using citrus pectin and orange waste, Appl Biochem Biotechnol, 2008. 144(2),191-200.

23- Pietro, AD, Roncero, MIG. 1996, Purification and characterization of an exo-polygalacturonase from the tomato vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici, FEMS Microbiol Lett,145, 295–8.

24- Viikari, L, Tenakanen, M, Suurnakki, A, 2001, Biotechnology in the pulp and paper industry, In: Rehm HJ, editor. Biotechnology, VCH-Wiley, 523–46.

25- Reid, I, Richard, M, 2004, Purified pectinase lowers cationic demand in peroxide-bleached mechanical pulp, Enzyme Microbial Technol, 34,499–504.

26- Salazar, L, Jayasinghe, U, 1999, Fundamentals of purification of plant viruses, In: Techniques in plant, virology, CIP, Training Manual, J.O, Virus Purification, International Potato Centre, Peru, 1–10.

27- Schnitzhofer, W, Weber, H.-J, Vrˇsansk´, M, Biely, P, Cavaco-Paulo, A, Guebitz, G.M, 2007 Purification and mechanistic characterisation of two polygalacturonases from *Sclerotium rolfsii*,40, 1739–1747.

28- Singh, .SA, Ramakrishna, M, Rao AGA, 1999, Optimization of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented broth of *Aspergillus carbonarious*, Process Biochem, 35, 411–7.

29- Takao, M, Nakaniwa, T, et al, 2001, Molecular cloning, DNA sequence, and expression of the gene encoding for thermostable pectate lyase of thermophilic Bacillus sp. TS 47, Biosci Biotechnol Biochem, 65,322–9.

30- Torres, S, et al, 2011, A colorimetric method to quantify endo-polygalacturonase activity. Enzyme and microbial technology, 48(2),123-128.

31- Wakabayashi, K, and Huber, D, 2001, Purification and catalytic properties of polygalacturonase isoforms from ripe avocado (*Persea americana*) fruit mesocarp. Physiologia-Plantarum, 113, 210-216.

32- Whitaker JR, 1990, Microbial pectinolytic enzymes. In: Fogarty WM, Kelly CT, editors. Microbial enzymes and biotechnology. 2nd ed. London, Elsevier Science Ltd.,1990. P, 133–76.

Extraction of a polygalacturonase from *Macrophomiona phaseolin*a and analysis of its stability

Elnaz Fahimi Bayrami[1,2], Naser Farrokhi[2,3] and Saeed Aminzadeh[1]

[1] Bioprocess Engineering Group, Industrial and environmental Biotechnology Dept., National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran

[2] School of Agricultural Engineering, University of Shahrood, Shahrood, I.R. of Iran

[3]Biotechnology group, Faculty of New Technologies Engineering, Sahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Polygalacturonases (GH28) hydrolyze the pectic substances, present mostly in plants. Polygalacturonases are widely distributed among microorganisms and higher plants. Microbial polygalacturonases, mainly produced by fungi, are utilized in many large-scale industrial processes. Production of a polygalacturonase from a fungal phytopathogen, *M. phaseolina* was evaluated. *M. phaseolina* was cultured in production medium. The crude extract was separated from fungal cells. The highest enzyme activity was observed at 60 °C. This enzyme had a high stability at wide ranges of pH and temperature and exhibited a $t_{1/2}$ of 400 min at 70 °C. The value for free energy of the heat inactivation at the temperature of 70 °C was about 108 kJ, suggesting its potential to be used as an industrial enzyme. Analysis of biochemical characteristics of polygalacturonase from different fungi using ProtParam demonstrated that the *M. phaseolina* polygalacturonase was amongst the most stable fungal polygalacturonases.

Key words: Polygalacturonases; *Macrophomiona phaseolin*a; Thermal and pH stability; ProtParam