



دانشکده کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی

پایان نامه کارشناسی ارشد

تولید، خالص سازی و بررسی مهارکننده های آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *M. phaseolina*

الناز فهیمی بایرامی

اساتید راهنما:

دکتر ناصر فرخی

دکتر سعید امین زاده

شهریور ۱۳۹۳

دانشگاه صنعتی شاهرود

دانشکده: کشاورزی

گروه: بیوتکنولوژی

پایان نامه کارشناسی ارشد خانم الناز فهیمی بایرانی

تحت عنوان: تولید، خالص سازی و بررسی مهار کننده های آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *M.phaseolina*

در تاریخ ۱۳۹۸/۰۸/۰۵ توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی مورد ارزیابی و با درجه عالی مورد پذیرش قرار گرفت.

امضاء	اساتید مشاور	امضاء	اساتید راهنما
—	نام و نام خانوادگی:		نام و نام خانوادگی: دکتر ناصر فرخی
—	نام و نام خانوادگی:	—	نام و نام خانوادگی: دکتر سعید امین زاده

امضاء	نماینده تحصیلات تکمیلی	امضاء	اساتید داور
	دکتر حسن مکاربان		نام و نام خانوادگی: دکتر محمدرضا عسریان
			نام و نام خانوادگی: دکتر شاهرخ قرنجیک
			نام و نام خانوادگی:
			نام و نام خانوادگی:

تقدیم به آستان حقیقت

تقدیم به،

پدر و مادر عزیز و مهربانم،

که در تمام مراحل زندگی پشتیبانم هستند.

تقدیم به،

الهی و پیمان عزیزم که قلبم لبریز از عشق به شماست.

تقدیم به،

همه‌ی آنان که مرا علم آموختند.

تشکر و قدردانی

پروردگار را ستایش می‌کنیم و او را سپاس می‌گوییم که بر ما منت نهاد و توفیق و همت داد تا در راه علم و دانش گام برداریم و از او می‌خواهیم ما را در این مسیر همراهی کند و نیرو بخشد.

سپاسگزاری می‌کنم از زحمات ارزشمند اساتید راهنمای گرانقدر و بزرگوارم، جناب آقای دکتر ناصر فرخی و جناب آقای دکتر سعید امین‌زاده که با دقت نظر و رویی گشاده، راهنمایی دلسوز در تمام امور تحصیلی و تحقیقی اینجانب بودند و دلسوزانه و بی‌دریغ مرا از دانش خود بهره‌مند ساختند.

بر خود لازم می‌دانم از تمام اساتید محترمی که از محضرشان مطلبی آموختم، سپاسگزاری نمایم.

همچنین از جناب آقای دکتر محمدرضا عامریان و جناب آقای دکتر شاهرخ قرنجیک جهت قبول زحمت داوری و تصحیح این پایان‌نامه کمال تشکر را دارم.

مراتب سپاس خود را از همراهی و همدلی دوستان عزیزم سرکار خانم آمنه یوسفی‌کیا و سرکار خانم معصومه کردی و دوستان و همکاران گرامی در آزمایشگاه دام و آبزیان پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، به‌ویژه سرکار خانم فاطمه زبردست و سرکار خانم سارا کاظم‌زاده ابراز می‌دارم.

از خانواده عزیزم که با مهر و دلسوزی فراوان مرا در رسیدن به این مقطع تحصیلی یاری نمودند و همواره انرژی بخش و دلگرم کننده من در طی این راه بودند، کمال تشکر را دارم.

الناز فهیمی شهریور ۹۳

تعهدنامه

اینجانب الناز فهیمی بایرانی دانشجوی دوره‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی بیوتکنولوژی گرایش کشاورزی دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه شاهرود نویسنده‌ی پایان‌نامه‌ی تولید، خالص‌سازی و بررسی مهارکننده‌های آنزیم پلی‌گالاکتوروناز قارچ *M. phaseolina* تحت راهنمایی دکتر ناصر فرخی و دکتر سعید امین‌زاده متعهد می‌شوم.

- تحقیقات در این پایان‌نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان‌نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام «دانشگاه شاهرود» و یا «Shahrood University» به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان‌نامه تأثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از پایان‌نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه‌ی مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت‌های آن‌ها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه‌ی مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که به حوزه‌ی اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه‌ی حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم‌افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه شاهرود می‌باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

چکیده

پلی گالاکتوروناز قارچ *Macrophomina phaseolina* (عامل بیماری پوسیدگی ذغالی در طیف وسیعی از گیاهان) از عوامل مهم بیماریزایی قارچی جهت نفوذ به سلول میزبان گیاهی می باشد. در این پژوهش به منظور بررسی خصوصیات و افکتورها، این آنزیم با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی خالص سازی گردید. بیشترین فعالیت آنزیم خالص با وزن مولکولی تقریبی ۸۰ کیلو دالتون، در اسیدیته ۳ و دمای ۶۰ درجه سانتی گراد بود. آنزیم از پایداری دمایی و اسیدیته بالایی برخوردار بود به طوری که، نیمه عمر حرارتی آن در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد ۱۷۷ دقیقه است که حاکی از پتانسیل بالای این آنزیم جهت کاربرد در صنایع می باشد. انرژی اکتیواسیون و تغییرات آنتالپی غیر فعال سازی حرارتی آنزیم به ترتیب ۱۵/۲۶ KJ/mol و ۱۲/۴۱ KJ/mol بود. بررسی کینتیک آنزیم ($n_H = 1/1$) و ($R_s = 1/7$)، الگوی کینتیک غیر میکائلیس-منتن با اتصال تعاونی مثبت به سوبسترای پلی-گالاکتورونیک اسید را نشان داد. نمودار تغییرات سرعت در برابر غلظت های گوناگون سوبسترای پلی-گالاکتورونیک اسید با $K_{0.5} = 3 \text{ mg/ml}$ و $V_{max} = 0.008 \text{ } \mu\text{mol/min}$ ، سیگموئیدی بود. آنزیم آلوستریک است و حداقل دو جایگاه کاتالیتیک دارد. تریتون X-100، MnSO_4 ، FeSO_4 ، MnCl_2 ، CoCl_2 موجب افزایش و توپین ۲۰ و ۸۰، PMSF، NiSO_4 ، BaCl_2 ، CuSO_4 ، LiCl و تمامی نمک های فسفات موجب مهار فعالیت آنزیم گردیدند. یدواستامید و یدو استیک تاثیری بر فعالیت آنزیم نداشتند و احتمالاً سیستئین، اسید آمینه کاتالیتیکی آنزیم نمی باشد.

کلمات کلیدی: *Macrophomina phaseolina* پوسیدگی ذغالی، پلی گالاکتوروناز، آلوستریک، مهار کننده.

لیست مقالات مستخرج از پایان نامه

مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی پلی‌گالاکتورونازهای قارچی

الناز فهیمی، ناصر فرّخی، سعید امین‌زاده

چهارمین همایش ملی بیوانفورماتیک ایران (بهمن ماه ۱۳۹۱).

بررسی بیوانفورماتیکی خصوصیات بیوشیمیایی پلی‌گالاکتورونازهای قارچی

الناز فهیمی، ناصر فرّخی، سعید امین‌زاده

هشتمین همایش ملی بیوتکنولوژی و چهارمین همایش ملی ایمنی زیستی - تهران (تیرماه ۱۳۹۲).

مقایسه بیوانفورماتیکی پلی‌گالاکتورونازهای قارچی و باکتریایی

الناز فهیمی، ناصر فرّخی، سعید امین‌زاده

هشتمین همایش ملی بیوتکنولوژی و چهارمین همایش ملی ایمنی زیستی - تهران (تیرماه ۱۳۹۲).

تولید پلی‌گالاکتوروناز از قارچ عامل پوسیدگی زغالی جهت کاربرد در پالایش زیستی پساب صنایع کشاورزی و کاغذسازی

الناز فهیمی، سعید امین‌زاده، ناصر فرّخی

نخستین همایش تخصصی زیست‌پالایی، تهران، دانشگاه صنعتی شریف (آذرماه ۱۳۹۲).

فهرست مطالب

۱	فصل اول مقدمه و کلیات
۳	۱-۱ تاریخچه و اهمیت قارچ <i>Macrophomina phaseolina</i>
۴	۲-۱ جایگاه تاکسونومی، چرخه زندگی و علائم بیماری قارچ <i>Macrophomina phaseolina</i>
۹	۳-۱ ژنوم قارچ <i>Macrophomina phaseolina</i>
۹	۴-۱ روش‌های مبارزه و کنترل پوسیدگی ذغالی
۱۰	۵-۱ مواد پکتیکی
۱۴	۱-۵-۱ پکتین
۱۵	۶-۱ آنزیم
۱۹	۱-۶-۱ پکتینازها
۲۰	۲-۶-۱ طبقه‌بندی آنزیم‌های پکتینولیک
۲۱	۳-۶-۱ پلی‌گالاکتورونازها
۲۲	۱-۳-۶-۱ مکانیسم کاتالیتیکی آنزیم پلی‌گالاکتوروناز
۲۳	۷-۱ عوامل موثر بر فعالیت آنزیم
۲۳	۱-۷-۱ تاثیر اسیدیته بر فعالیت آنزیم
۲۴	۲-۷-۱ تاثیر دما بر فعالیت آنزیم
۲۴	۳-۷-۱ کوفاکتورها
۲۶	۸-۱ انواع آنزیم‌ها به لحاظ الگوی کینتیک
۲۶	۱-۸-۱ کینتیک هایپربولیک
۲۸	۲-۸-۱ کینتیک غیر هایپربولیک
۳۰	۹-۱ آنزیم‌های آلوستریک
۳۱	۱-۹-۱ تکامل آنزیم‌های آلوستریک
۳۲	۲-۹-۱ انواع مدل‌ها جهت آنالیز کینتیک آنزیم‌های آلوستریک

۳۳	۱۰-۱ بازدارنده‌های آنزیمی
۳۵	۱-۱۰-۱ انواع مکانیسم بازدارندگی در آنزیم‌های آلوستریک
۳۵	۱۱-۱ خالص سازی پروتئین‌ها
۳۶	۱۲-۱ روش‌های سنجش فعالیت آنزیمی
۳۷	۱-۱۲-۱ روش‌های سنجش فعالیت پلی‌گالاکتورونازها
۳۸	۱۳-۱ ارتباط ساختار با عملکرد و پایداری آنزیم
۳۹	۱-۱۳-۱ فلورسانس
۴۰	۱۴-۱ اهداف پژوهش
۴۳	فصل دوم مرور منابع
۴۴	۱-۲ مروری بر مطالعات بررسی ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی پلی‌گالاکتورونازها
۴۶	۲-۲ مروری بر مطالعات بررسی بازدارنده‌های پلی‌گالاکتورونازها
۴۷	۱-۲-۲ بازدارنده‌های طبیعی پلی‌گالاکتوروناز
۴۸	۲-۲-۲ مهار اختصاصی پلی‌گالاکتورونازها
۴۹	۳-۲-۲ بازدارنده آلوستریک پلی‌گالاکتورونازها
۵۰	۳-۲ مروری بر مطالعات ساختاری پلی‌گالاکتوروناز
۵۱	فصل سوم مواد و روش‌ها
۵۲	۱-۳ مواد شیمیایی مورد استفاده
۵۳	۲-۳ محیط‌های کشت
۵۳	۳-۳ القای تولید آنزیم پلی‌گالاکتوروناز توسط قارچ <i>Macrophomiona phaseolina</i>
۵۴	۴-۳ خالص سازی نسبی آنزیم پلی‌گالاکتوروناز
۵۵	۵-۳ سنجش فعالیت پلی‌گالاکتورونازی

- ۵۶ ۶-۳ به دست آوردن فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز بر حسب واحد آنزیمی
- ۵۷ ۷-۳ تعیین غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد
- ۵۸ ۸-۳ کروماتوگرافی تعویض یونی
- ۵۹ ۱-۸-۳ آماده سازی ستون کروماتوگرافی
- ۶۰ ۲-۸-۳ تخلیص آنزیم پلی گالاکتوروناز
- ۶۰ ۹-۳ الکتروفورز در ژل پلی اکریلامید در حضور سدیم دودسیل سولفات
- ۶۳ ۱-۹-۳ رنگ آمیزی ژل با کوماسی بلو R-۲۵۰
- ۶۳ ۲-۹-۳ رنگ آمیزی ژل با نیترا ت نقره
- ۶۴ ۱۰-۳ بررسی تأثیر pH بر روی فعالیت آنزیم و بدست آوردن pH بهینه (pH Profile)
- ۶۴ ۱۱-۳ بررسی تأثیر دما بر فعالیت آنزیم و بدست آوردن دمای بهینه (Temperature Profile)
- ۶۵ ۱۲-۳ تعیین پارامترهای کینتیکی
- ۶۸ ۱۳-۳ تعیین الگوی کینتیک آنزیم و وضعیت تعاون اتصال
- ۷۰ ۱۴-۳ بررسی اثر یون ها، شلات کننده ها و ترکیبات شیمیایی بر فعالیت آنزیم
- ۷۰ ۱-۱۴-۳ رسم نمودار Dose-Response جهت تعیین میزان IC_{50} افکتورها
- ۷۱ ۲-۱۴-۳ تعیین الگوی کینتیک اشباع آنزیم در غلظت های گوناگون افکتور
- ۷۱ ۳-۱۴-۳ تعیین وضعیت تعاونی اتصال افکتور به آنزیم
- ۷۲ ۴-۱۴-۳ رسم نمودار دیکسون جهت تعیین میزان K_i
- ۷۲ ۱۵-۳ بررسی پایداری آنزیم
- ۷۴ ۱-۱۵-۳ بررسی پایداری آنزیم در pH های مختلف (pH Stability)
- ۷۴ ۲-۱۵-۳ بررسی پایداری آنزیم نسبت به pH های ۳، ۷، ۱۲ در زمان های مختلف
- ۷۵ ۳-۱۵-۳ بررسی غیرفعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر آنزیم در درجه حرارت های مختلف

- ۷۵ ۳-۱۵-۴ بررسی غیر فعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم در زمان‌های مختلف و در درجه حرارت‌های ۵۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد
- ۷۶ ۳-۱۶ مطالعه پارامترهای ترمودینامیکی
- ۷۷ ۳-۱۷ بررسی مطالعات ساختاری آنزیم پلی‌گالاکتوروناز
- ۷۸ ۳-۱۷-۱ فلورسانس
- ۷۸ ۳-۱۷-۱-۱ مطالعات فلورسانس ذاتی
- ۷۸ ۳-۱۷-۲ مطالعات فلورسانس خارجی
- ۷۹ ۳-۱۷-۲ مطالعات جایگاه فعال از طریق اعمال تغییرات شیمیایی
- ۸۱ فصل چهارم نتایج
- ۸۲ ۴-۱ تولید و خالص‌سازی پلی‌گالاکتوروناز قارچ *M. phaseolina*
- ۸۴ ۴-۲ تعیین خصوصیات کینتیکی
- ۸۸ ۴-۳ بررسی خصوصیات کاتالیتیکی آنزیم
- ۸۹ ۴-۳-۱ بررسی تأثیر pH بر روی فعالیت آنزیم و بدست آوردن pH بهینه (pH Profile)
- ۸۹ ۴-۳-۲ بررسی تأثیر دما بر فعالیت آنزیم و بدست آوردن دمای بهینه (Temperature Profile)
- ۹۱ ۴-۳-۳ بررسی پایداری آنزیم در pH‌های مختلف (pH Stability)
- ۹۱ ۴-۳-۴ بررسی پایداری آنزیم در pH‌های ۲، ۷ و ۱۲ در زمان‌های مختلف
- ۹۱ ۴-۳-۵ بررسی پایداری حرارتی آنزیم در دماهای مختلف
- ۹۲ ۴-۳-۶ بررسی غیر فعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم در زمان‌ها و دماهای مختلف
- ۹۲ ۴-۳-۷ محاسبه نیمه عمر حرارتی آنزیم
- ۹۲ ۴-۳-۸ محاسبه انرژی فعال‌سازی غیر فعال شدن برگشت‌ناپذیر حرارتی آنزیم
- ۹۶ ۴-۳-۹ محاسبه پارامترهای ترمودینامیکی غیر فعال شدن برگشت‌ناپذیر حرارتی آنزیم

۹۶	۴-۴ بررسی افکتورهای آنزیم پلی گالاکتوروناز
۹۷	۱-۴-۴ مطالعه فعالیت پلی گالاکتوروناز در حضور یونهای فلزی
۹۷	۲-۴-۴ بررسی تاثیر دترجنتها بر فعالیت پلی گالاکتوروناز
۱۰۱	۳-۴-۴ مطالعه تاثیر هورمونها و حلالهای آلی و آسکوربیک اسید بر فعالیت پلی گالاکتوروناز
۱۰۱	۵-۴ بررسی مطالعات ساختاری آنزیم پلی گالاکتوروناز
۱۰۱	۱-۵-۴ بررسی طیف فلورسانس ذاتی آنزیم در pHهای ۱ تا ۱۲
۱۰۲	۲-۵-۴ بررسی طیف فلورسانس خارجی آنزیم در pHهای ۱ تا ۱۲ با استفاده از ANS
۱۰۲	۳-۵-۴ مطالعات جایگاه فعال از طریق اعمال تغییرات شیمیایی
۱۰۵	فصل پنجم بحث و پیشنهادات
۱۱۲	پیشنهادات
۱۱۳	فهرست منابع
۱۲۰	چکیده لاتین

فهرست اشکال

۷	شکل ۱-۱ آلودگی گیاه جوت توسط قارچ <i>Macrophomina phaseolina</i>
۱۳	شکل ۲-۱ ساختار پکتین
۱۶	شکل ۳-۱ مدل ساختاری شماتیک از دیواره سلولی تیپ I و II در نماینده‌های گیاهان دولپه‌ای و تک لپه‌ای
۲۷	شکل ۴-۱ نمایش انواع الگوی کینتیک در آنزیم‌ها
۶۷	شکل ۱-۳ نمودار میکائیلیس-منتن، لاین-ویوربورک و هیل در شرایط V_{Max} و K برابر با یک و به ازای ۱ و ۲ n = ۰/۵
۶۷	شکل ۲-۳ نمودار ادی-هافستی پروتئینی با n جایگاه اتصال
۷۳	شکل ۳-۳ نمودارهای خطی دیکسون (۱/۷ در برابر i) و s/v در برابر i، جهت توصیف انواع مکانیسم بازدارندگی آنزیم
۸۳	شکل ۱-۴ کروماتوگرام مربوط به جذب ۲۸۰ نانومتر فرکشن‌های جمع‌آوری شده از ستون کروماتوگرافی DEAE
۸۳	شکل ۲-۴ ژل SDS-PAGE مراحل گوناگون خالص‌سازی پلی‌گالاکتوروناز جهت تعیین وزن مولکولی و تایید خلوص آنزیم
۸۵	شکل ۳-۴ نمودار استاندارد جذب غلظت‌های متفاوت دی‌گالاکتورونیک اسید
۸۶	شکل ۴-۴ نمودار سیگموئیدی تغییرات فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف سوبسترای پلی‌گالاکتورونیک اسید
۸۷	شکل ۵-۴ بررسی الگوی کینتیک و وضعیت تعاون اتصال در پلی‌گالاکتوروناز
۹۰	شکل ۶-۴ بررسی تاثیر pH بر میزان فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز
۹۰	شکل ۷-۴ بررسی تاثیر دما بر میزان فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز
۹۳	شکل ۸-۴ بررسی پایداری پلی‌گالاکتوروناز در pHهای مختلف و در زمان‌های ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه
۹۳	شکل ۹-۴ بررسی پایداری حرارتی آنزیم در دماهای مختلف
۹۴	شکل ۱۰-۴ نمودار بررسی پایداری حرارتی آنزیم در زمان‌های مختلف و در دماهای ۵۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد
۹۴	شکل ۱۱-۴ نمودار بررسی غیر فعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم در زمان‌های مختلف و در دماهای ۵۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد
۹۵	شکل ۱۲-۴ نمودار آرنیوس برای غیر فعال شدن حرارتی آنزیم

- شکل ۴-۱۳ نمودار بررسی فعالیت آنزیم در حضور غلظت ۱ میلی‌مولار یون‌های فلزی ۹۸
- شکل ۴-۱۴ نمودار کینتیک اشباع یون‌های فلزی افکتور آنزیم پلی‌گالاکتوروناز ۹۹
- شکل ۴-۱۵ نمودار هیل کلرید منیزیم و باریم برای پلی‌گالاکتوروناز ۹۹
- شکل ۴-۱۶ نمودار بررسی فعالیت آنزیم در حضور دترجنت‌ها ۱۰۰
- شکل ۴-۱۷ نمودار مطالعه تاثیر غلظت ۲۰ میلی‌مولار هورمون‌ها و آسکوربیک اسید بر فعالیت پلی‌گالاکتوروناز ۱۰۰
- شکل ۴-۱۸ فلورسانس ذاتی آنزیم در pHهای ۱ تا ۱۲ ۱۰۳
- شکل ۴-۱۹ طیف فلورسانس خارجی پلی‌گالاکتوروناز در حضور ANS و در pHهای ۱ تا ۱۲ ۱۰۳

فهرست جداول

۵	جدول ۱-۱ طبقه‌بندی قارچ
۱۲	جدول ۲-۱ وزن مولکولی برخی مواد پکتیکی
۱۷	جدول ۳-۱ میزان پکتین در میوه‌ها و سبزیجات
۴۵	جدول ۱-۲ خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی پلی‌گالاکتورونازهای منابع مختلف قارچی و باکتریایی
۸۵	جدول ۱-۴ تعیین ویژگی‌های پلی‌گالاکتوروناز خالص
۸۶	جدول ۲-۴ پارامترهای کینتیکی پلی‌گالاکتوروناز
۹۵	جدول ۳-۴ پارامترهای ترمودینامیکی غیر فعال‌سازی حرارتی آنزیم پلی‌گالاکتوروناز

فصل اول

مقدمه و کلیات

گیاهان همواره در معرض تنش‌های زنده، اعمال شونده از جانب میکروارگانیسم‌ها می‌باشند. ژنوم پاتوژن از طریق ایجاد ابزارهای بیماریزایی متنوع شامل انواع توکسین‌ها و آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی، چارچوب فرآیند بیماریزایی را در سطح سلولی و مولکولی و در جهت نابودی میزبان فراهم می‌سازد. توانایی پاتوژن‌های گیاهی برای تولید آنزیم‌هایی که پلی‌ساکاریدهای پیچیده دیواره سلولی گیاه را تجزیه می‌کند، احتمالاً نخستین مرحله در فرآیند بیماریزایی است. اغلب فرآیندهای بیولوژیک توسط کمپلکس‌های پروتئینی و به‌صورت تنظیمی صورت می‌گیرند. به‌نظر می‌رسد مکانیسم بیماریزایی توسط پاتوژن‌های گیاهی به‌عنوان یک مسیر بیولوژیک، توسط کمپلکس‌های آنزیمی و به‌صورت تنظیمی صورت می‌گیرد که موجب افزایش انعطاف‌پذیری و اختصاصیت عملکرد در مسیر بیماریزایی آن‌ها می‌گردد. ترشح آنزیم‌های هیدرولیز کننده بافت گیاهی در بیمارگرهای قارچی و باکتریایی، نقش بسیار کلیدی در فرایندهای پاتوژنیک نفوذ، آلودگی و تخریب ایفا می‌نماید. آنزیم‌های پکتینولیتیک جزء اولین آنزیم‌هایی هستند که توسط عوامل بیماریزای قارچی جهت نفوذ به سلول گیاهی ترشح می‌شوند، از میان پکتینازها، پلی-گالاکتورونازها، نقش مهمی در تجزیه دیواره سلول گیاهی دارند. قارچ‌های فیتوپاتوژنیک از طریق ترشح پلی‌گالاکتوروناز خارج سلولی پس از برداشت میوه‌ها و سبزیجات موجب ایجاد پوسیدگی نرم و لزج شدن بافت در آنها می‌شوند. بنابراین شناخت آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی که توسط پاتوژن ترشح می‌شود و در راس آن‌ها پلی‌گالاکتورونازها، به‌عنوان ابزاری کارآمد در جهت طراحی استراتژی منطقی برای کنترل بیماری و در نهایت، تضمین امنیت تولید محصولات کشاورزی در سطح جهانی می‌باشد. شناسایی و معرفی مهارکننده‌های پلی‌گالاکتورونازها برای کنترل قارچ‌های فیتوپاتوژنیک مورد توجه قرار گرفته است. پلی‌گالاکتورونازها دارای کاربرد گسترده در صنایع گوناگون پزشکی، نساجی، پردازش فیبرهای گیاهی، چای، قهوه، استخراج نفت، صنایع پالایش فاضلاب‌های حاوی مواد پکتیکی، صنایع کاغذ سازی و خالص سازی ویروس‌ها می‌باشند. انتخاب منبع میکروبی مناسب جهت تولید پلی‌گالاکتورونازها به

فاکتورهای مختلف، از قبیل ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی، مانند pH و پایداری حرارتی آنزیم‌ها بستگی دارد. مطالعه روش‌های تولید و خالص سازی پلی‌گالاکتورونازها جهت مطالعه ویژگی‌های سینتیکی و مهار کننده‌های این آنزیم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. در این پژوهش تولید و خالص سازی پلی-گالاکتوروناز ترش‌حی از قارچ *M. phaseolina* جهت مطالعه ویژگی‌های سینتیکی و افکتورهای فعال کننده و بازدارنده آن، به منظور مدیریت بیمارگر و البته کاربرد این آنزیم در صنعت مورد توجه قرار گرفته است. جهت بررسی پایداری و حدواسط‌های فولدینگ، آنزیم خالص به لحاظ برخی ویژگی‌های ساختاری نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش امکان ارائه الگویی پایدار، توسط مطالعات تکمیلی در راستای حذف خسارت فیتوپاتوزن از مزارع را فراهم می‌آورد. در این فصل در خصوص تاریخچه، اهمیت، ژنوم، تاکسونومی، علائم و روش‌های مبارزه و کنترل علائم بیماری قارچ *M. phaseolina*، انواع و ساختار مواد پکتینی، طبقه‌بندی و کاربرد آنزیم‌ها و به‌طور ویژه پکتینازها و معرفی و نحوه عمل پلی-گالاکتورونازها، صحبت خواهیم کرد. همچنین عوامل موثر بر فعالیت آنزیم، انواع الگوی کینتیک در آنزیم‌ها، آنزیم‌های آلوستریک، انواع مکانیسم بازدارندگی، روش‌های خالص سازی پروتئین‌ها، انواع روش‌های سنجش فعالیت آنزیمی و مفهوم ارتباط ساختار با عملکرد و پایداری آنزیم و مباحث زیر مجموعه آنها شرح داده می‌شود.

۱-۱ تاریخچه و اهمیت قارچ *Macrophomina phaseolina*

قارچ *Macrophomina phaseolina (Tassi) Goidanich* عامل پوسیدگی ذغالی^۱ در گیاهان است که به بیماری پژمردگی تابستان یا پژمردگی آب و هوای خشک نیز شناخته می‌شود. این بیماری به عنوان بیماری وابسته به استرس تعریف می‌گردد (خان، ۲۰۰۷). این قارچ دامنه میزبانی وسیعی دارد و در بیش

^۱. Charcoal rot

از ۵۰۰ گونه در ۷۵ خانواده گیاهی موجب بیماریزایی می‌گردد. از بین این گیاهان، لوبیا و انواع نخود به آن حساس تر هستند و قارچ روی آن‌ها بهتر رشد می‌نماید و تکثیر می‌شود، ولی پنبه، ذرت و سورگوم به آن حساسیت کمی دارند. ماکروفومینا سبب کاهش عملکرد گیاهان دانه روغنی مانند آفتابگردان و سویا می‌گردد و پوسیدگی ساقه از علائم شاخص و مهم بیماری می‌باشد (منگیستو و همکاران، ۲۰۰۹؛ مطلبی و همکاران، ۲۰۰۸).

۲-۱ جایگاه تاکسونومی، چرخه زندگی و علائم بیماری قارچ *Macrophomina phaseolina*

ماکروفومینا، بیماری‌گری خاکزاد، متعلق به خانواده بوتریسفاریاسه^۲، دارای دو گونه *Macrophomina limbalis* و *Macrophomina phaseolina* می‌باشد (ادراکی و همکاران، ۲۰۱۱). از گونه‌های هم‌نام نسبت داده شده به *Macrophomina phaseolina* می‌توان به *M. conjani*، *M. conchoci* و *Rizoctonia bataticola* اشاره نمود (پرمامالینی و همکاران، ۲۰۱۲؛ جدول ۱-۱).

قارچ ماکروفومینا قارچی گرمادوست می‌باشد و در مناطقی که دارای فصل گرم و خشک در طول دوره رویش گیاه می‌باشند شیوع دارد. دمای بهینه برای فعالیت قارچ ماکروفومینا ۳۲-۲۶ درجه سانتی‌گراد است و دمای بیشینه و کمینه آن به ترتیب ۴۴ و ۱۶ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. اسیدیته مطلوب برای فعالیت ماکروفومینا بین ۵ تا ۸ است و این قارچ عملاً در کلیه خاک‌های اسیدی و قلیایی گسترش دارد (آهنگر و همکاران، ۲۰۱۱). عامل توسط این پاتوژن، ظهور تغییر رنگ خاکستری در بافت ساقه گیاه و بخش بالایی ریشه عمودی اصلی، پس از گلدهی می‌باشد. چنانچه اپیدرم جدا شود وجود میکرواسکلروت^۳

^۲. Botryosphaeriaceae

^۳. Microsclerotia

جدول ۱-۱ طبقه‌بندی قارچ (*Macrophomina phaseolina*) [http:// www.gwannon.com/species/ Macrophomina- phaseolina](http://www.gwannon.com/species/Macrophomina-phaseolina) ((۱۳۹۲/۴/۵)).

Saccharomyceta	سلسله
Ascomycota	شاخه
Pezizomycotina	زیرشاخه
Dothideomycetes	رده
Botryosphaeriales	راسته
Botryosphaeriaceae	تیره
<i>Macrophomina</i>	جنس
<i>Phaseolina</i>	گونه

های اصلی بقاء ماکروفومینا به صورت سختینه^۴ در خاک و بقایای گیاهی می باشد و مقدار سختینه موجود در خاک ارتباط مستقیم با بیماریزایی پاتوژن دارد (آل قمدی و همکاران، ۲۰۰۱). این قارچ دارای ریشه-های هتروکاریوت^۵ می باشد که سیستم های آوندی ریشه و جوانه های جانبی را متأثر می سازد و انتقال آب و مواد مغذی به بخش های بالایی گیاه را مختل می نماید. پژمردگی پیشرو، مرگ زودرس، از دست دادن قدرت رشد و کاهش عملکرد، ویژگی های شاخص عفونت ایجاد شده توسط *M. phaseolina* می باشد. همچنین این پاتوژن موجب سوختگی گیاهچه، مرگ گیاهچه، پوسیدگی ریشه، پوسیدگی ساقه جانبی و بلوغ زودرس می گردد. علامت بارز بیماری سیاه و سفید، منظره خاکستری رنگ به بافت گیاه می دهند (خان، ۲۰۰۷). زخم های ایجاد شده توسط ماکروفومینا روی هیپوکوتیل لوبیا چشم بلبلی هنگامی که گیاه تحت استرس آب قرار می گیرد، گسترش می یابد و به دنبال آن علائم آلودگی طبیعی مانند سوختگی و پژمردگی ساقه و برگ ها ظاهر می شود (آل قمدی و همکاران، ۲۰۰۱). در گیاه نخود، ماکروفومینا سبب کاهش وزن دانه به میزان ۷/۸ درصد در مرحله تشکیل غلاف و ۴۸/۹ درصد در مرحله قبل از برداشت می گردد. در لوبیای معمولی و در لوبیای چشم بلبلی، این قارچ در پوشش بذر نفوذ و سبب ترک خوردگی پوشش بذر می شود. در اثر آلودگی محتوی نشاسته بذر کاهش، کمیت و کیفیت بذر دچار افت شدید می شود (شوآرتز و همکاران، ۲۰۰۵؛ آل قمدی و همکاران، ۲۰۰۱). این سختینه ها از نظر متابولیکی غیر فعال و فقط در صورت مجاورت و تماس با ریشه و طوقه گیاه میزبان جوانه می زند و پس از تولید هیف، اندام گیاهی را سریعاً کلونیزه می نماید ولی ریشه و طوقه ظاهراً سالم به نظر می رسند. همزمان با تشکیل سختینه مواد پکتینی و سلولزی در محل آلودگی به سرعت تجزیه و مقدار آنها شدیداً کاهش می یابد در حالی که هیچ کاهشی در مواد لیگنینی در محل آلودگی مشاهده نمی شود (شکل ۱-۱). ماکروفومینا دارای دو مرحله زندگی مشخص می باشد، مرحله پارازیتی که همان مرحله میسلیمی قارچ و مرحله غیر

4. Sclerotia

5. Heterokaryot



شکل ۱-۱، آلودگی گیاه جوت توسط قارچ *Macrophomina phaseolina* (الف) عکس میکروسکوپی از اسکلروت (سختینه) در بقایای خاک و محصول، (ب) تولید گسترده هیف توسط پاتوژن جهت حمله و نفوذ به ساقه، (ج) میسلیموم و اسکلروت داخل و خارج سلولی در بخش طولی ساقه، (د) در اوایل فصل باران هیف به داخل دیواره سلولی گیاه نفوذ و علائم بیماری ظهور می‌کند، (ه) عکس میکروسکوپی از کنیدی، پکنیدیوم و استیولات قارچ، (و) آلودگی ساقه گیاه بیمار که در نهایت موجب پژمردگی و مرگ زودرس گیاه می‌گردد (اسلام و همکاران، ۲۰۱۲).

پارازیتی که همان مرحله سختینه‌ای قارچ است. با توجه به اینکه سختینه‌ها در بافت‌های سبز ساقه یافت نمی‌شوند و بیشتر در بافت‌های مرده پیدا می‌شوند می‌توان گفت تبدیل تدریجی مرحله میسلیمی قارچ به مرحله سختینه‌ای منجر به زوال تدریجی گیاه می‌گردد و تشکیل این سختینه‌ها هم‌زمان با شروع مرگ و میر سلول‌ها و بافت‌های آلوده می‌باشد (آلمیدا و همکاران، ۲۰۰۳). این قارچ در بقایای بوته‌های بیمار در خاک خشک به مدت طولانی زنده می‌ماند ولی همین قارچ در خاک‌های مرطوب، تنها به مدت ۷ الی ۸ هفته زنده باقی می‌ماند و قابلیت آن را دارد که حتی از روی پوسته بذر وارد مزرعه گردد که در این حالت بذره‌های آلوده یا جوانه نمی‌زنند یا گیاهچه‌های آنها به مدت کوتاهی پس از خارج شدن از خاک، خشک می‌شوند. قارچ در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد فعال و به گیاهچه‌ها حمله می‌کند، این قارچ می‌تواند هاگدان غیرجنسی کروی یا کوزه‌ای شکل به نام پیکنیدیوم^۶ تولید نماید (رعیت پناه و علوی، ۱۳۸۴). دو عامل اساسی تجزیه و متلاشی شدن بافت در مراحل پیشرفته بیماری، تشکیل و تولید آنزیم‌های پکتینولیتیک و سلولیتیک هم‌زمان با گسترش هیف در داخل میزبان است، از جمله این آنزیم‌ها، آنزیم-های پلی‌گالاکتورونازی می‌باشند و مشخص شده است که رابطه مستقیم بین تولید این آنزیم و بیماریزایی ماکروفومینا وجود دارد (کور و همکاران، ۲۰۱۲؛ ام- ویلامیل و همکاران، ۲۰۰۸). عامل دیگر تشکیل سختینه و تکمیل و بلوغ آن در داخل سلول‌های گیاهی است که باعث متلاشی شدن سلول‌ها می‌گردند (آهنگر و همکاران، ۲۰۱۱). پرماملینی و همکاران (۲۰۱۲) وجود بقایای این قارچ را در محصولات کشاورزی برای سلامت انسان به‌دلیل آسیب رساندن به سیستم ایمنی، مخاطره آمیز گزارش نمودند.

^۶. Picnidium

۱-۳ ژنوم قارچ *Macrophomina phaseolina*

ژنوم قارچ *M. phaseolina* از طریق ایجاد آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی، ابزار فرآیند بیماریزایی را در جهت نابودی میزبان فراهم می‌سازد. بنابراین شناخت ژنوم این قارچ و آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی که توسط آن ترشح می‌شود و در راس آن‌ها پکتینازها، به‌عنوان ابزاری کارآمد در جهت طراحی استراتژی منطقی برای کنترل بیماری و در نهایت، تضمین امنیت تولید محصولات کشاورزی در سطح جهانی می‌باشد. قارچ‌های فیتوپاتوزن، آنزیم‌های ترش‌هی هیدرولیتیک (شامل آنزیم‌های کربوهیدرات-فعال، CAZyme) را جهت نفوذ به سلول میزبان تولید می‌نمایند (اسچفر و همکاران، ۱۹۹۴). ژنوم قارچ *M. phaseolina* با سایز ۴۹/۲۹۵ Mb و ۱۴۲۴۹ عدد ژن، ۳۶۲ CAZyme را کد می‌نماید که شامل ۲۱۹ گلیکوزید هیدرولاز می‌باشد که چهار برابر بیشتر از متوسط این آنزیم‌ها در قارچ‌های بیماریزای گیاهی دیگر می‌باشد که اهمیت تخریب پلی‌ساکارید را جهت نفوذ، توسط این قارچ نشان می‌دهد. انواع پکتین لیازها، پکتین هیدرولازها و پکتین استرازها، قارچ *M. phaseolina* را قادر به تجزیه کامل سد پکتینی دیواره سلولی می‌نمایند. سایر آنزیم‌های تجزیه‌کننده پلی‌ساکاریدها در ژنوم این قارچ، شامل آنزیم‌های تجزیه‌کننده نشاسته، گلیکوژن، همی‌سلولز، کیتین و بتاگلوکان می‌باشد (الاسلام و همکاران، ۲۰۱۲).

۱-۴ روش‌های مبارزه و کنترل پوسیدگی ذغالی

به‌کار بردن بذر سالم به صورت غیرمتراکم، تناوب کشت، استفاده از کودهای شیمیایی در مقادیر مناسب و به‌طور ویژه فسفر، جهت القای رشد سریع گیاه، غرقاب کردن خاک ۳ تا ۴ هفته قبل از کاشت جهت کاهش جمعیت اولیه قارچ، آبیاری بهینه جهت تامین رطوبت خاک، از بین بردن بقایای بوته‌های بیمار و علف‌های هرز پس از برداشت محصول، شناسایی و کشت ارقام مقاوم یا متحمل، از جمله روش‌های کنترل

زراعی این بیماری می‌باشند. تغذیه مناسب سبب کاهش بیماری می‌گردد ولی دادن کود ازته زیاد سبب افزایش بیماری در آفتابگردان و ذرت و نخود می‌گردد. روش‌های شیمیایی مبارزه با این بیماری با استفاده از سموم گروه بنزیمیدازول‌ها شامل (بنومیل، کاربندازیم و تیابندازول) نتیجه بهتری را داشته است، به‌کار-گیری روش‌های شیمیایی علاوه بر هزینه‌های سنگین و خطرات زیست محیطی که به‌دنبال دارد، سبب کاهش میکروفلور مفید خاک می‌شود و در ضمن تأثیر آن بر روی قارچ موقت و ناپایدار می‌باشد و احتمال ایجاد نژادهای مقاوم در برابر سم بسیار زیاد است. مبارزه بیولوژیک (مانند عوامل کنترل بیولوژیک میکروبی) دارای برتری‌های زیادی نسبت به سایر روش‌ها از جمله دامنه و دوام تأثیر بیشتر و کم‌خطر بودن برای محیط زیست می‌باشد (پهلوانی و همکاران، ۱۳۸۶). این روش در عین ارزان و مؤثر بودن، دارای مشکلاتی نیز می‌باشد مثلاً باید از آنتاگونیستی^۷ استفاده شود که با میکروکلیمای^۸ بیمارگر سازگاری کافی داشته باشد نهایتاً ضمن پایداری در خاک قادر باشد به‌طور موثری بیماری را کنترل کند (آهنگر و همکاران، ۲۰۱۱). در ادامه به معرفی انواع و ساختار مواد پکتیکی می‌پردازیم.

۱-۵ مواد پکتیکی

مواد پکتیکی نام عمومی ترکیباتی است که تحت عمل آنزیم‌های پکتینولیتیک قرار می‌گیرند. این ماکرومولکول‌های گلیکوزیدی (پلی‌ساکاریدی) پیچیده اسیدی، دارای وزن مولکولی بالا و بار منفی می‌باشند که در قلمرو گیاهان حضور دارند. این مواد به عنوان ترکیب اصلی تیغه میانی بین سلول‌ها در قالب پکتات کلسیم و پکتات منیزیم می‌باشند. مواد پکتیکی بخش عمده‌ای از تیغه میانی را به خود اختصاص داده‌اند و این موضوع از طریق جذب مقایسه‌ای با استفاده از روش رتینیوم رد^۹ مواد پکتیکی شناخته شده و نیز برآورد میزان پکتین از طریق هیدروکسیل آمین قلیایی تأیید شده است. بر خلاف پروتئین‌ها، لیپیدها و

^۷. Antagonist

^۸. Microclima

^۹. Ruthenium Red

اسیدهای نوکلئیک، در میان پلی ساکاریدها، مواد پکتیکی دارای وزن مولکولی تعریف شده‌ای نمی‌باشند. وزن مولکولی نسبی مواد پکتیکی بین ۲۵ تا ۳۶۰ کیلو دالتون می‌باشد (جدول ۱-۲). به‌طور عمده مواد پکتیکی شامل گالاکتورونان‌ها^{۱۰}، رامنوگالاکتورونان‌ها^{۱۱} (کربن ۶ گالاکتان^{۱۲} به‌صورت گروه کربوکسیل اکسید شده است)، آرابینان‌ها^{۱۳} و آرابینوگالاکتان‌ها^{۱۴} می‌باشند (شکل ۱-۲). این مواد گروهی از مواد پلیمری کلوئیدی پیچیده می‌باشند که بخش عمده‌ی آن را واحدهای آنهیدروگالاکتورونیک اسید^{۱۵} تشکیل می‌دهند (ریدلی و همکاران، ۲۰۰۱). گروه‌های کربوکسیل گالاکتورونیک اسید به‌طور نسبی توسط گروه‌های متیل، استریفه، و به‌طور نسبی و یا کامل توسط یون‌های سدیم، پتاسیم یا آمونیوم خنثی گردیده‌اند. احتمال دارد برخی گروه‌های هیدروکسیل در مکان کربن ۲ (C₂) و کربن ۳ (C₃)، استیله شده باشند. زنجیره اصلی شامل واحدهای آلفا-دی-گالاکتورونات^{۱۶} با اتصالات آلفا-(۴→۱)، همراه با ۴-۲ درصد واحدهای ال-رامنوز^{۱۷} با اتصالات بتا-(۲→۱) متصل به واحدهای گالاکتورونات می‌باشند. رامنو-گالاکتورونان‌ها در pH ≥ ۵ دارای بار الکتریکی منفی می‌باشند. زنجیره‌های جانبی آرابینان، گالاکتان، آرابینوگالاکتان زایلوز یا فوکوز از طریق اتم‌های کربن ۱ (C₁) و کربن ۲ (C₂) خود به زنجیره اصلی متصل می‌شوند. با این وصف تنوع مواد پکتیکی موجود در سلول‌های گیاهی محرز می‌شود که می‌تواند دلیل احتمالی وجود تنوع در آنزیم‌های پکتینولیتیک باشد. انجمن شیمی آمریکا مواد پکتیکی را به ۴ گروه اصلی پروتوپکتین‌ها، اسیدهای پکتیکی، اسیدهای پکتینیک و پکتین طبقه‌بندی نموده است. پروتوپکتین، مواد پکتیکی نامحلول در آب که در بافت‌های سالم حضور دارند. پکتیک اسید، پلیمری از گالاکتورونان‌ها که محلول در آب است و به میزان جزئی حاوی گروه‌های متوکسی می‌باشد. نمک‌های اسیدی یا معمولی

¹⁰. Galacturonan

¹¹. Rhamnogalacturonan

¹². Galactan

¹³. Arabinan

¹⁴. Arabinogalactan

¹⁵. Anhydro-Galacturonic acid

¹⁶. alpha-D-galacturonate

¹⁷. L-Rhamnose

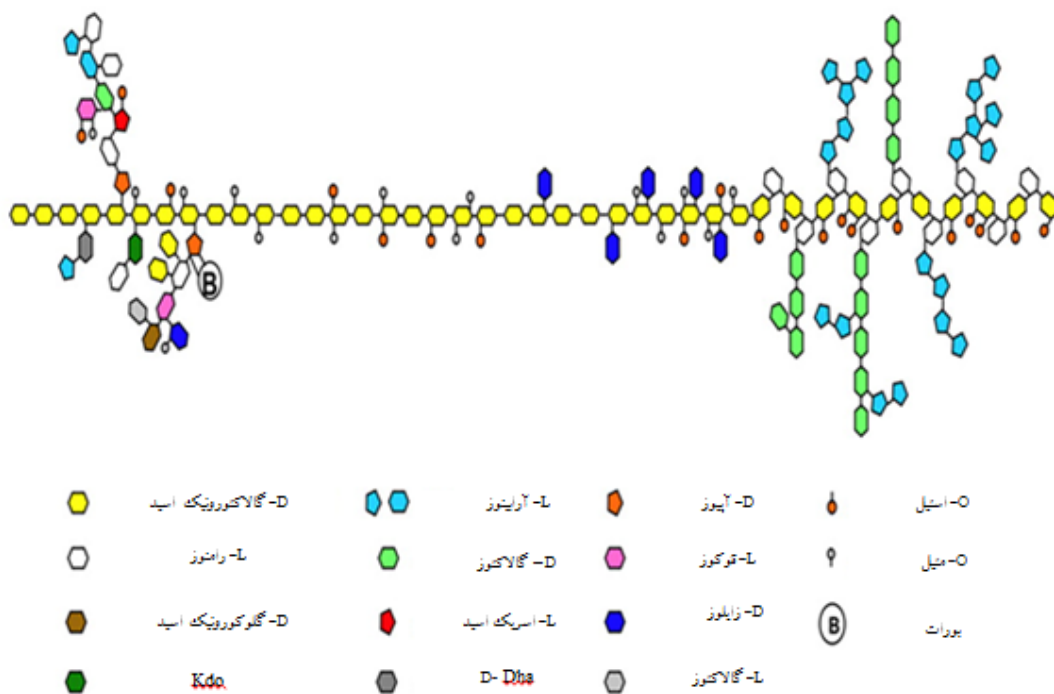
جدول ۱-۲ وزن مولکولی برخی مواد پکتیکی (جایانی و همکاران، ۲۰۰۵).

منبع	وزن مولکولی (کیلودالتون)
سیب و لیمو	۲۰۰-۳۶۰
گلابی و گوجه	۲۵-۳۵
پرتقال	۴۰-۵۰
چغندر قند	۴۰-۵۰

رامنوگالاکتورونان I

هوموگالاکتورونان

رامنوگالاکتورونان II



شکل ۱-۲، ساختار پکتین به طور عمده از سه ناحیه تشکیل شده است، هوموگالاکتورونان که فراوانترین پلی ساکارید پکتیکی و یک هوموپلیمر خطی متشکل از واحدهای آلفا- (۴→۱) D-گالاکتورونیک اسید می باشد، رامنوگالاکتورونان I که بیست تا سی و پنج درصد از حجم پکتین را به خود اختصاص داده است و از واحدهای دی ساکارید رامنوگالاکتورونیک اسید به وجود آمده است، رامنوگالاکتورونان II که دارای انشعابات فراوان است و ده درصد از حجم پکتین را شامل می شود (هارهولت و همکاران، ۲۰۱۰).

از پکتیک اسید، پکتات نامیده می‌شوند. پکتین اسید، زنجیره پلی‌گالاکتورونان که شامل ۰ تا ۷۵ درصد واحدهای گالاکتورونات متیله می‌باشند. نمک‌های اسیدی یا خنثی پکتینیک اسید، پکتینات نامیده می‌شوند. پکتین (پلی‌متیل گالاکتورونات)، مواد پلیمری که حداقل ۷۵ درصد از گروه‌های کربوکسیلی واحدهای گالاکتورونات توسط متانول استریفه شده‌اند. تا زمانیکه در دیواره سلولی به سلولز متصل می‌باشد، موجب سختی دیواره می‌باشد (جایانی و همکاران، ۲۰۰۵).

۱-۵-۱ پکتین

واژه پکتین از لغت یونانی پکتیکوس به معنای لخته یا منعقد شده، مشتق شده است. همان‌طور که از نام آن برمی‌آید، این ماده خاصیت ویسکوز کننده و توانایی انعقاد بالایی دارد (رحمانی و همکاران، ۱۳۹۰). پکتین در نواحی خاصی از دیواره سلولی، همچون اطراف سلول‌های در حال رشد و تقسیم، دیواره‌های سلولی در بخش‌های نرم گیاه و در تیغه‌ی میانی و کناره‌های سلول به وفور یافت می‌شود. پکتین همچنین در نواحی اتصال میان سلول‌هایی با دیواره سلولی ثانویه شامل زایلیم و سلول‌های رشته‌ای موجود در بافت چوبی حضور دارد. دیواره سلولی گیاهان، شبکه‌ای واحد و پیوسته خارج سلولی را تشکیل می‌دهند، این شبکه سلولی از انواع پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها در مقادیر مختلف تشکیل می‌شود که در بستری ژله مانند موسوم به پکتین جای می‌گیرند. به طوری که دیواره سلولی از نظر شیمیایی پایدار و از نظر فیزیکی مستحکم می‌باشد (هارهولت و همکاران، ۲۰۱۰). پکتین مانند سلولز، پلی‌ساکاریدی مهم در ساختار دیواره سلولی گیاهان عالی می‌باشد. یک سوم ماکرومولکول‌های دیواره سلولی اولیه را پکتین تشکیل می‌دهد همچنین این ترکیب به فروانی در تیغه میانی وجود دارد. پکتین نظیر سیمان در اتصال و استحکام سلول‌های مجاور عمل می‌نماید (پالانیویلو، ۲۰۰۶). دیواره سلولی اولیه گیاهان با توجه به ساختار شیمیایی ترکیبات تشکیل دهنده آن و پروسه بیوسنتز آن بر دو نوع دیواره تیپ I و II می‌باشد. سلول‌های گیاهان

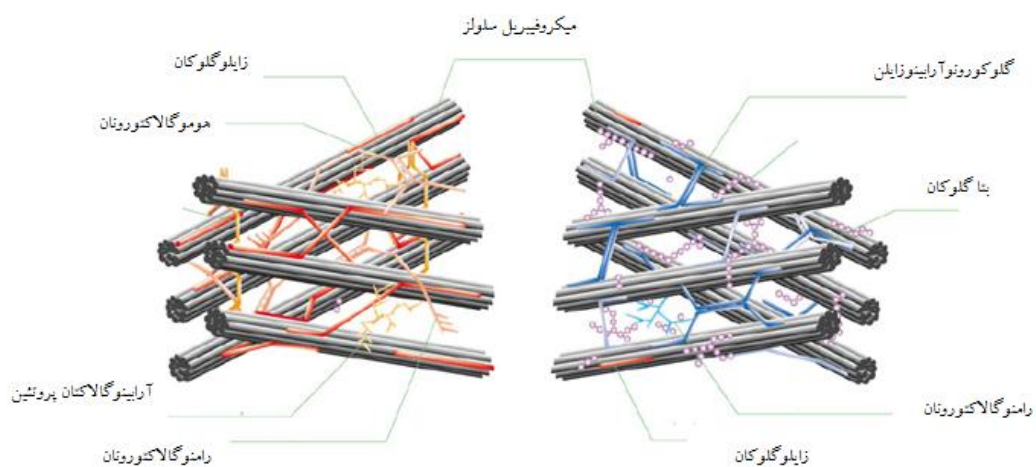
دولپه‌ای و تک‌لپه‌ای غیر کاملینوئید^{۱۸}، دارای دیواره سلولی تیپ I می‌باشند. دیواره سلولی تیپ II تنها در تک‌لپه‌ای‌های کاملینوئید گزارش شده است. دیواره سلولی تیپ II در مقایسه با تیپ I، حاوی مقادیر کمتر پکتین می‌باشد (یوکویاما و نیشیتانی، ۲۰۰۴). در شکل ۱-۳ به مقایسه ساختاری و محتوی پکتینی این دیواره‌ها پرداخته شده است. مواد پکتینی ۴-۵٪ درصد از وزن تر مواد گیاهی را به خود اختصاص می‌دهند (جایانی و همکاران، ۲۰۰۵؛ جدول ۱-۳). در ادامه و پس از شناخت نسبی نسبت به دیواره‌ی سلولی و مواد پکتینی حاضر در آن به معرفی طبقه‌بندی و کاربرد آنزیم‌ها در صنایع گوناگون می‌پردازیم.

۱-۶ آنزیم

آنزیم‌ها کاتالیزورهای بیولوژیکی می‌باشند که بدون آنکه ماهیت آنها تغییر کند، موجب افزایش سرعت واکنش‌های شیمیایی در داخل سلول‌های زنده می‌گردند. آنزیم‌ها در جریان واکنش مصرف نمی‌شوند و ثابت تعادل و تغییرات انرژی آزاد واکنش‌ها را نیز دستخوش تغییر نمی‌کند بلکه زمان رسیدن به حالت تعادل را کوتاه‌تر می‌کنند. آنزیم‌ها به عنوان کاتالیزور دارای نقش بسیار حیاتی در سیستم‌های زیستی می‌باشند. خصوصیات برجسته آنزیم‌ها شامل توانایی بسیار بالا برای کاتالیز و عملکرد اختصاصی فوق‌العاده، آنها را از کاتالیزورهای شیمیایی متمایز می‌سازد. فعالیت آنزیم‌ها تا زمانی که توسط گرما یا سایر فاکتورها دناتوره نگردیده‌اند و سوبسترای کافی و سالم در دسترس آنها باشد، ادامه می‌یابد (سوتن و همکاران، ۲۰۱۰). طبقه‌بندی آنزیم‌ها بر پایه سیستمی است که نخستین بار (۱۹۷۹) توسط اتحادیه بین‌المللی بیوشیمی ارائه شد. شش گروه عمده از آنزیم‌ها وجود دارند که براساس نوع واکنشی که کاتالیز می‌کنند، طبقه‌بندی می‌شوند، اکسیدوردوکتازها^{۱۹}، واکنش‌های اکسیداسیون و احیا را کاتالیز می‌نمایند،

¹⁸. Commelinoid

¹⁹. oxidoreductases



الف دیواره سلولی تیپ I در *Arabidopsis thaliana*

ب دیواره سلولی تیپ II در *Oriza sativa*

شکل ۱-۳، مدل ساختاری شماتیک از دیواره سلولی تیپ I و II در نماینده‌های گیاهان دولپه‌ای و تک‌لپه‌ای، الف) دیواره سلولی تیپ I در گیاه آرابیدوپسیس به عنوان نماینده گیاهان دو لپه‌ای، شامل چارچوبی با نسبت برابر از سلولز-زایلوگلوکان در شبکه‌ای غنی از پکتین (هوموگالاکتورونان، رامنوگالاکتورونان نوع اول و دوم) ب) دیواره سلولی تیپ II در گیاه برنج به عنوان نماینده گیاهان تک‌لپه‌ای، دارای مقادیر برابر سلولز-زایلوگلوکان نمی‌باشد و میکروفیبریل‌های سلولز توسط گلوکوآرابینوزایلین به یکدیگر متصل می‌شوند (یوکویاما و نیشیتانی، ۲۰۰۴).

جدول ۱-۳ میزان پکتین در میوه‌ها و سبزیجات (جایانی و همکاران، ۲۰۰۵)

میوه/سبزی	بافت	درصد مواد پکتیکی
سیب	تازه	۰/۵-۱/۶
موز	تازه	۰/۷-۱/۲
هلو	تازه	۰/۱-۰/۹
توت‌فرنگی	تازه	۰/۶-۰/۷
گیلاس	تازه	۰/۲-۰/۵
گلابی	تازه	۰/۹-۱/۴
هویج	خشک	۶/۹-۱۸/۶
تفاله پرتقال	خشک	۱۲/۴-۲۸/۰
سیب‌زمینی	خشک	۱/۸-۳/۳
گوجه‌فرنگی	خشک	۲/۴-۴/۶
چغندر قند	خشک	۱۰-۳۰

ترانسفرازها^{۲۰}، انتقال یک گروه از یک مولکول به مولکول دیگر را کاتالیز می نمایند، هیدرولازها^{۲۱}، شکستن پیوندها از طریق اضافه کردن مولکول آب را کاتالیز می نمایند. لیاها^{۲۲}، جدا شدن پیوندها به طریقی غیر از هیدرولیز و اکسیداسیون را کاتالیز می نمایند، ایزومرازاها^{۲۳}، آرایش مجدد ساختار مولکولها را کاتالیز می نماید، لیگازها^{۲۴}، تشکیل اتصالات جدید را با شکستن ATP کاتالیز می نمایند (بیلن و همکاران، ۲۰۰۲). آنزیمها دارای کاربردهای گسترده و متفاوت می باشند. به عنوان مثال جهت اهداف پژوهشی، برنامه های پزشکی، تجاری و صنعت (صنایع غذایی، نوشیدنی، داروسازی) مورد استفاده قرار می گیرند. در زمینه پزشکی و دامپزشکی سنجش آنزیمهای پلاسما جهت تشخیص و تأیید بیماری در انسان و حیوانات بسیار کارآمد است. بسیاری از آنزیمها جهت اعمال بیوتکنولوژیکی به کار می روند. در تکنولوژی DNA نو ترکیب (مهندس ژنتیک)، آنزیمهای گوناگونی مانند آنزیمهای محدودالثر (با منبع باکتریایی)، DNA لیگازها (از باکتری یا باکتریوفاژها)، جهت وارد نمودن ژنهای خارجی به سلول میزبان با استفاده از وکتورها مورد بهره وری قرار می گیرند (سوتن و همکاران، ۲۰۱۰). همچنین آنزیمها به عنوان معرف در پزشکی، بیوشیمی و صنعت مورد استفاده قرار می گیرند. سنجش آنزیمی در صنایع غذایی و نوشیدن جهت فرآیندهای آماده سازی و نگهداری مواد غذایی و نوشیدنی بسیار حائز اهمیت می باشد. برخی از آنزیمها در سیستمهای بیوشیمیایی مورد استفاده قرار می گیرند، مانند آنزیم آدنیلات سیکلاز که جهت تولید آدنوزین مونوفسفات حلقوی به کار می رود. همچنین آنزیمها در تشخیص اختلالات متابولیسمی، ایمنی سنجی، منبع سوخته های زیستی، معرف های تحلیلی، معرف در بیوشیمی بالینی مورد استفاده قرار می گیرند. آنزیمها در ترکیب مواد شوینده جهت افزایش توانایی پاکسازی مواد شوینده به کار می روند. همچنین آنزیمها جایگزین بسیار کارآمد سفید کننده کلر جهت از بین بردن لکه های روی پارچه

20. Transferases

21. Hydrolases

22. Lyases

23. Isomerases

24. Ligases

می‌باشند (حسن و همکاران، ۲۰۱۰). آنزیم‌ها دارای کاربرد گسترده در صنایع کشاورزی و مبارزه با عوامل بیماریزا می‌باشند. به‌عنوان مثال استفاده از آنزیم‌های استخراجی از منابع میکروبی جهت تجزیه کوتیکول آفات و یا تخریب کیتین دیواره سلولی پاتوژن‌های قارچی گیاهان استفاده می‌شود (سوئینی و همکاران، ۲۰۱۲). از آن‌جا که در این پژوهش هیدرولازها و به‌طور ویژه پکتینازها (پلی‌گالاکتورونازها) مورد مطالعه قرار می‌گیرند، به شرح این گروه از آنزیم‌ها می‌پردازیم.

۱-۶-۱ پکتینازها

در طبیعت میکروارگانیسم‌ها با پتانسیل‌های مختلف موجود می‌باشند. آنها مجموعه‌ای از آنزیم‌ها را تولید می‌نمایند که در ابعاد تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرند. در میان آنزیم‌ها، پکتینازها بسیار حائز اهمیت و دارای پتانسیل فوق‌العاده جهت ارائه در صنعت می‌باشند. پکتینازها دارای کاربرد گسترده در صنایع گوناگون مانند نساجی، پردازش فیبرهای گیاهی، چای، قهوه، استخراج نفت و خالص سازی ویروس‌ها می‌باشند. آنزیم پلی‌گالاکتوروناز به عنوان یکی از ترکیبات داروهای گیاهی پیشگیری کننده سرطان و بیماری‌های قلبی، کاهش وزن و مسهل گوارش به بازار عرضه شده است. همچنین پلی‌گالاکتورونازها به عنوان جایگزین عملی و اقتصادی فرآیندهای سنتی، جهت کاهش زباله‌های آنیونی و آلودگی‌های پساب صنایع کاغذسازی مورد استفاده قرار می‌گیرند (مایجلا و همکاران، ۲۰۰۸؛ کیرک و همکاران، ۱۹۷۴). فرآیندهای صنایع گیاهی، منجر به ایجاد پساب حاوی مواد پکتینی می‌گردند. کاربرد گسترده پلی‌گالاکتورونازها در صنایع پالایش زیستی فاضلاب‌های حاوی مواد پکتینی نیز گزارش شده است. تقریباً تمام ظرفیت‌های تجاری آنزیم‌های پکتینولیتیک متعلق به منابع قارچی می‌باشند (جایانی و همکاران، ۲۰۰۵). آنزیم‌های پکتینولیتیک (پکتینازها) گروهی از آنزیم‌های مرتبط با هم می‌باشند که عمدتاً در

گیاهان سبب هیدرولیز سوبسترای پکتینی می‌شوند. این آنزیم‌ها به طور گسترده در گیاهان عالی و میکروارگانیسم‌ها موجود می‌باشند. پکتینازها موجب گسترش دیواره سلولی در گیاهان و نرم شدن برخی بافت‌های گیاهی در طول بلوغ، رسیدگی و ذخیره‌سازی می‌گردند (راو و همکاران، ۲۰۱۱؛ کوپر و همکاران، ۱۹۷۸). همچنین بیماری‌زایی در گیاهان و فساد میوه‌ها و سبزیجات از طریق پوسیدن از دیگر تظاهرات عمده آنزیم‌های پکتینولیتیک می‌باشد (جایانی و همکاران، ۲۰۰۵؛ اوسر و همکاران، ۲۰۰۲). تجزیه پکتین توسط آنزیم‌های دپلمیریزه کننده به ویژه پکتینازها سبب سست شدن دیواره سلولی می‌گردد و پیرو آن سایر پلیمرهای دیواره سلولی در دسترس سلولاز و همی سلولاز قرار می‌گیرند (وی و همکاران، ۲۰۱۰). با این وجود گزارش شده است تنها آنزیم‌های پکتینولیتیک، فاکتور بیماری‌زایی قارچ‌های پاتوژن می‌باشند (دی اویدیو و همکاران، ۲۰۰۴). در ادامه به انواع آنزیم‌های پکتینولیتیک، طبقه‌بندی و مکانیسم عمل آن‌ها می‌پردازیم.

۱-۶-۲ طبقه‌بندی آنزیم‌های پکتینولیتیک

آنزیم‌های پکتینولیتیک شامل سه گروه عمده پروتوپکتینازها، استرازها و دپلمیرازها می‌باشند. پروتوپکتینازها، پروتوپکتین نامحلول را تجزیه می‌نماید و منجر به پلیمریزاسیون پکتین قابل حل می‌شود. استرازها، موجب داستریفیکاسیون پکتین، از طریق حذف استرهای متوکسی می‌گردند. دپلمیرازها، برش هیدرولیتیکی پیوندهای آلفا-(۴→۱) گلیکوزیدی در واحدهای دی-گالاکتورونیک اسید مواد پکتیکی را کاتالیز می‌نماید. دپلمیرازها با دو مکانیسم متفاوت بر مواد پکتیکی عمل می‌نمایند، در یک نوع (هیدرولیز)، کاتالیز برش هیدرولیتیکی از طریق اکسیژن مولکول آب (اکسیژن مولکول آب به کربن کربونیل حمله می‌کند) صورت می‌گیرد و در نوع دیگر (ترانس الیمینیشن لیاز)، بدون حضور مولکول آب واکنش صورت می‌گیرد. در یک تقسیم‌بندی دقیق‌تر دپلمیرازها بر اساس ترجیح سوبسترای آنزیم،

مکانیسم برش و شکاف پیوندهای گلیکوزیدی به چهار زیر گروه تقسیم می‌شوند. پلی‌گالاکتورونازها و پلی-متیل‌گالاکتورونازها توسط مکانیسم هیدرولیز به ترتیب بر پکتات‌ها و پکتین‌ها عمل می‌نمایند. البته پلی-گالاکتورونات لیاها از طریق مکانیسم بتا-ایمینیشن منجر به شکسته شدن پکتات و پکتین می‌شوند. این آنزیم‌ها بر اساس الگوی عمل، شامل تصادفی یا انتهایی بودن به ترتیب به انواع آنزیم‌های اندو و اگزو تقسیم می‌شوند (جایانی و همکاران، ۲۰۰۵).

۱-۶-۳ پلی‌گالاکتورونازها

پلی‌گالاکتورونازها، 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 پلی‌گالاکتورونیک اسید را کاتالیز می‌نمایند و بسته به نوع موجود تولید کننده، به شکل مونومر یا دimer وجود دارند. پلی‌گالاکتورونازها با تجزیه پلیمرهای دیواره سلولی، تشکیل کلونی‌های قارچی را روی گیاه میسر می‌سازند (دی اویدو و همکاران، ۲۰۰۴). این آنزیم‌ها در میان خانواده آنزیم‌های پکتینولیتیک بیشترین سهم مطالعات را به خود اختصاص داده‌اند (جایانی و همکاران، ۲۰۰۵) و بر اساس خصوصیات عمل آنزیمی در تجزیه سوبسترا، به دو نوع اندوپلی‌گالاکتوروناز (بطور تصادفی پلیمر را شکسته) و اگزوپلی‌گالاکتوروناز (تجزیه کننده انتهایی) طبقه‌بندی می‌شوند. اندوپلی‌گالاکتورونازها و اگزوپلی‌گالاکتورونازها به عنوان عضوی از خانواده گلیکوزیدهدیرولاز (GH28) طبقه‌بندی شده‌اند (www.afmb.cnrs-mrs.fr/cazy) (۱۳۹۲/۲/۳)). ژن‌های کد کننده پلی‌گالاکتورونازها به خانواده‌ای تعلق دارند که دارای مراتب گسترده پلی‌مورفیسم می‌باشد. اغلب قارچ‌ها ایزوآنزیم‌های گوناگون پلی-گالاکتوروناز را که دارای ویژگی‌ها، وزن مولکولی و تنظیم بیان متفاوت می‌باشند را تولید می‌نمایند. تنوع موجود در پلی‌گالاکتورونازها به لحاظ مکانیسم عمل، فعالیت ویژه، سوبسترای اختصاصی و pH بهینه منجر

به افزایش بیماریزایی قارچ‌های فیتوپاتوژنیک در گیاهان می‌گردد. و به بیان دیگر، چندگانگی پلی-گالاکتورونازها مؤلفه‌ی بسیار کلیدی جهت انعطاف پذیری پاتوژن در شرایط و میزبان‌های گوناگون می‌باشد. تنوع ایزوآنزیم‌های پلی‌گالاکتوروناز در پاتوژن ناشی از تنوع ژن و یا تغییرات پس از ترجمه پروتئین-ها می‌باشد. گلیکوزیلاسیون پلی‌گالاکتورونازهای قارچی منجر به افزایش پایداری در برابر شرایط محیطی و نیز افزایش مقاومت در برابر پروتئازها، و به تبع آن افزایش فعالیت آنزیمی آنها می‌گردد. دیگر ویژگی ساختاری پلی‌گالاکتورونازها که گوناگونی عملکرد این آنزیم‌ها را در پی دارد، حضور یا عدم حضور و نوع ضمامم انتهایی آمینی می‌باشد که به نظر می‌رسد در اختصاصیت سوبسترا و برهم‌کنش با نواحی ویژه در پلیمر پکتین تأثیرگذار می‌باشند. همچنین اندازه خانواده ژنی پلی‌گالاکتورونازها (pg) بر اختصاصیت و تنوع عملکرد آنزیمی و نیز گستره‌ی میزبانی قارچ مؤثر می‌باشد. پاتوژن‌های با میزبانی گسترده دارای خانواده ژنی بزرگ می‌باشند و بر عکس پاتوژن‌های با دایره‌ی میزبانی محدود، دارای شمار اندکی از ژن-های (pg) می‌باشند که البته در تمام گونه‌های پاتوژنی مصداق ندارد (دی اویدیو و همکاران، ۲۰۰۴).

۱-۳-۶-۱ مکانیسم کاتالیتیکی آنزیم پلی‌گالاکتوروناز

بر اساس هم‌ردیفی چندگانه در پلی‌گالاکتورونازهای منابع مختلف، چهار ناحیه کاملاً حفاظت شده (NTD, G/QDD, G/SHG, RIK) مشخص شده است. از میان این چهار موتیف، دو قطعه (G/QDD و G/SHG) ناحیه کاتالیتیکی و دو قطعه (RIK و NTD) ناحیه اتصال به سوبسترا می‌باشند. فاصله میان این موتیف‌ها نیز تقریباً یکسان است که اهمیت کاربردی این نواحی را در اتصال سوبسترا و فعالیت کاتالیتیکی آنزیم نشان می‌دهد. به‌طور معمول پلی‌گالاکتورونازها، از دو اسید آمینه آسپارتات و هیستیدین جهت هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی مستعد در سوبسترا بهره می‌جویند. بر اساس مطالعات آنالیز توالی پروتئین‌ها و جهش‌های هدفمند در جایگاه فعال پلی‌گالاکتورونازها، اسید آمینه آسپارتات و هیستیدین به ترتیب به-

عنوان نوکلئوفیل و دهنده پروتون تعیین شده است که مانند یک جفت برش عمل می‌نمایند. آمینو اسید ترئونین از ناحیه حفاظت شده NTD در پلی‌گالاکتورونازها توانایی تشکیل چندین پیوند هیدروژنی با سوبسترا را دارا می‌باشد. آمینواسیدهای آرژنین و لایزین از ناحیه RIK که در شکاف اتصال به سوبسترا جای گرفته است نیز چندین پیوند هیدروژنی با سوبسترا تشکیل می‌دهند. بنابراین این دو ناحیه همانند دو بازوی نگهدارنده سوبسترا تعریف می‌شوند. براساس شواهد و اطلاعات حاصل از مطالعات تغییرات شیمیایی آمینواسیدهای جایگاه فعال، جهش‌های هدفمند، آنالیز توالی پروتئین‌ها و کریستالوگرافی پرتو X، مکانیسم عمل زیر برای پلی‌گالاکتورونازها پیشنهاد شده است: آمینواسیدهای جایگاه فعال بر روی پیوند گلیکوزیدی مستعد قرار می‌گیرند. نواحی حفاظت شده NTD و RIK با سوبسترا از طرفین پیوند گلیکوزیدی مستعد و از طریق ایجاد پیوند هیدروژنی و اعمال فشار لازم بر پیوند گلیکوزیدی، برهمکنش می‌نمایند. آمینواسیدهای آسپاراتات و هیستیدین روی پیوند گلیکوزیدی مستعد قرار می‌گیرند. انتقال پروتون از هیستیدین کاتالیتیکی به پیوند گلیکوزیدی مستعد صورت می‌گیرد. پیوند گلیکوزیدی برش می‌یابد و محصول اول آزاد می‌شود و همزمان پیوند کووالان بین سوبسترا و آسپاراتات نوکلئوفیل در جایگاه فعال تشکیل می‌شود. آمینواسید آسپاراتات دوم در جایگاه فعال یک مولکول آب جهت حمله نوکلئوفیل ارائه می‌دهند. حمله نوکلئوفیل آب منجر به آزاد شدن محصول دوم واکنش می‌شود (پالانیولو و همکاران، ۲۰۰۶). در ادامه به‌طور اجمالی، مروری بر عوامل موثر بر فعالیت آنزیم خواهیم داشت.

۱-۷ عوامل موثر بر فعالیت آنزیم

به‌طور کلی فعالیت آنزیم تحت تاثیر عوامل مختلف نظیر غلظت آنزیم، غلظت سوبسترا و شرایط محیطی از قبیل pH، دما، رطوبت، مقاومت یونی، حضور یا عدم حضور مواد بازدارنده^۴ و کوفاکتورها^۵ و برهم‌کنش

بین این عوامل می‌باشد. سینتیک^۶، یک مسیر سیستماتیک برای آنالیز و سنجش کمی اثر این عوامل بر فعالیت آنزیم را فراهم می‌آورد. هر چند در بسیاری موارد در مدل‌های ریاضی، برای سهولت کار، باید شرایط ایده‌آل واکنش آنزیمی فرض شود (سوتن و همکاران، ۲۰۱۰). در ادامه تاثیر pH، دما و نقش کوفاکتورها بر فعالیت آنزیم به‌طور مختصر شرح داده شده است.

۱-۷-۱ تاثیر اسیدیته بر فعالیت آنزیم

تغییر pH، موجب تغییر ساختار و فعالیت آنزیمی می‌گردد. چنانچه منحنی تغییرات فعالیت آنزیم را در pH های مختلف رسم نماییم، منحنی حاصل دارای یک حداکثر خواهد بود که این حداکثر حدود pH بهینه را برای این آنزیم نشان می‌دهد. تغییرات pH، مراحل یونیزاسیون اسیدی یا بازی آمینواسیدها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. آمینواسیدهای اسیدی دارای گروه عملکردی کربوکسیل و آمینواسیدهای بازی دارای گروه عملکردی آمین در زنجیره‌های جانبی خود می‌باشند. اگر سطح یونیزاسیون آمینواسیدها در یک پروتئین تغییر کند پیوندهای یونی که در شکل‌گیری ساختمان سوم نقش دارند نیز دچار تغییر می‌شوند. تغییر در pH ضمن تأثیر بر ساختار و عملکرد آنزیم، ممکن است شکل و ویژگی‌های باری سوبسترا را به‌گونه‌ای تغییر دهد که سوبسترا توانایی اتصال به جایگاه فعال آنزیم را نداشته باشد و یا در صورت اتصال، کاتالیز واکنش آنزیمی امکان‌پذیر نباشد.

۱-۷-۲ تاثیر دما بر فعالیت آنزیم

دمای بهینه‌ی هر آنزیم، درجه حرارتی است که آنزیم قادر باشد در واحد زمان مقدار بیشتری سوبسترا را به محصول تبدیل کند. کاهش دمای یک سیستم، موجب کاهش انرژی جنبشی و بالعکس، افزایش دمای یک سیستم، با بالا رفتن انرژی جنبشی آن همراه است. افزایش دمای یک سیستم سبب بیشتر شدن برخوردهای انرژی‌تیک در واحد زمان می‌گردد. افزایش دمای یک سیستم، موجب افزایش انرژی داخل

ملکولی آن نیز می‌گردد. انرژی داخل ملکولی شامل انرژی ارتعاشی، انرژی انتقالی و چرخشی می‌باشد. این انرژی در پیوندهای شیمیایی ملکول‌ها و تعاملات غیرپیوندی نقش دارند. افزایش انرژی پتانسیل شیمیایی، موجب شکسته شدن برخی از پیوندهای ضعیف که در شکل‌گیری ساختمان سه بعدی پروتئین نقش دارند و تجزیه حرارتی پروتئین و غیرفعال شدن آن می‌شود (لنینجر، ۲۰۰۴). بنابراین افزایش دما به بیش از دمای بهینه فعالیت آنزیم و فراتر از آستانه پایداری حرارتی آن موجب کاهش سرعت کاتالیز یک واکنش آنزیمی می‌گردد.

۱-۷-۳ کوفاکتورها

آنزیم‌ها به‌لحاظ سیستماتیک به دو شکل آپوآنزیم و هولوآنزیم موجود می‌باشند. آپوآنزیم به پروتئین غیرفعال و فاقد کوفاکتور اطلاق می‌شود. هولوآنزیم‌ها پروتئین خالص نمی‌باشند و علاوه بر پروتئین، شامل یون‌های فلزی و یا مولکول‌های ارگانیک غیر پروتئینی با وزن مولکولی پائین نیز می‌باشند. این ترکیبات گوناگون غیر پروتئینی به‌عنوان کوفاکتور جهت فعالیت آنزیم ضروری می‌باشند. کوفاکتورها شامل یون‌های فلزی و کوآنزیم‌ها (زیر گروه‌های پروستاتیک و کوسوبسترا) می‌باشند. گروه‌های پروستاتیک دارای اتصالات محکم با آنزیم‌ها می‌باشند. این اتصالات با دیالیز و تجزیه آنزیم گسسته نمی‌شوند. کوسوبسترا حداقل در دو واکنش آنزیمی شرکت می‌نماید و موجب انتقال هیدروژن یا گروه‌های کاربردی از آنزیمی به آنزیم دیگر می‌گردد. از این رو با عنوان متابولیت انتقالی یا سوبسترای واسطه شناخته می‌شود. در ادامه، بررسی آنزیم‌ها به‌لحاظ الگوی کینتیک و مباحث زیرمجموعه آن مورد بحث قرار خواهد گرفت.

۱-۸ انواع آنزیم‌ها به لحاظ الگوی کینتیک

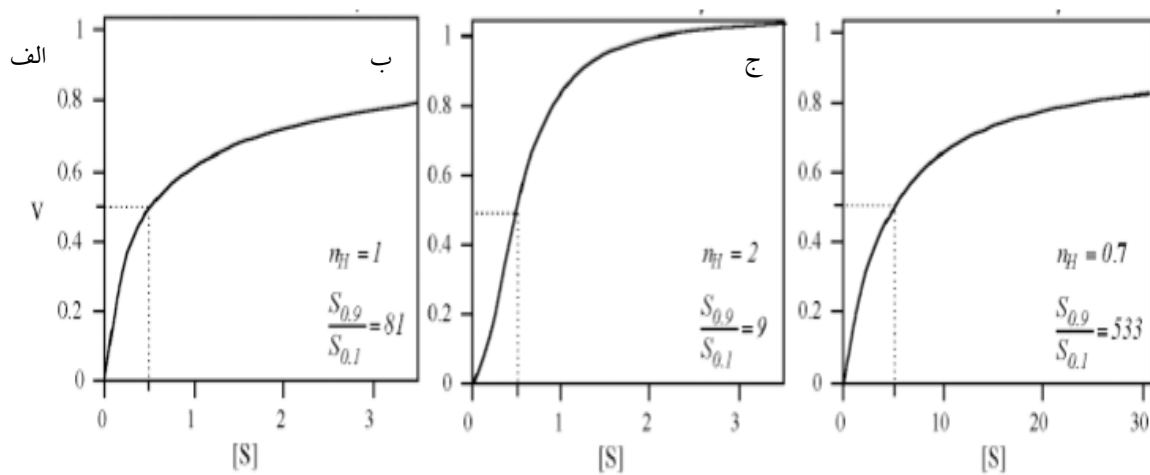
میکائیلیس و منتن در اوایل قرن بیستم، معادله سینتیکی آنزیم‌ها را به صورت معادله‌ی $(V/V_{max} = [s]/(KM+[S]))$ تعریف نمودند. هر چند این معادله ساده و ایده‌آل، کینتیک برخی از آنزیم‌ها به ویژه آنزیم‌های کوچک را توجیه می‌کرد، اما با افزایش مطالعات کینتیکی آنزیم‌های گوناگون، مشاهده شد که آنزیم‌های زیادی از این معادله پیروی نمی‌کنند. در حقیقت، این گونه از آنزیم‌ها به دلیل انحراف از الگوی میکائیلیس- منتن^{۲۵}، رفتار کینتیکی غیر معمولی از خود نشان می‌دهند (میسرا، ۲۰۰۸).

۱-۸-۱ کینتیک هایپربولیک

هنری- میکائیلیس- منتن برای بررسی کمی سینتیک واکنش آنزیمی بر اساس تغییرات غلظت سوبسترا، فرض کردند که اگر غلظت سوبسترا [S] در آغاز واکنش خیلی بالاتر از غلظت آنزیم [E] باشد تعادل سریعی بین مواد واکنش کننده (E+S) و کمپلکس آنزیم و سوبسترا (ES) ایجاد می‌شود و پس از این تعادل سریع است که تبدیل کمپلکس ES به مجموعه محصول و آنزیم (E+P) با سرعت کمتری آغاز می‌شود. منحنی حاصل از معادله میکائیلیس- منتن (نمودار سرعت واکنش علیه غلظت‌های سوبسترا) به صورت هذلولی (هایپربولیک) می‌باشد (شکل ۱-۴)، لذا کینتیک میکائیلیس- منتن، کینتیک هایپربولیک^{۲۶} نامیده می‌شود. اکثر آنزیم‌ها نسبت به سوبسترای خود دارای ثابت تمایل می‌باشند و از الگوی کینتیک هایپربولیک پیروی می‌نمایند. الگوی کینتیکی میکائیلیس- منتن با فرض بر مستقل و یکسان بودن مراکز پیوندی در آنزیم و در نظر گرفتن یک نوع ساختار مولکولی در آنزیم جهت توجیه رفتار سینتیکی آنزیم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. عدم تأثیر برهم‌کنش بخش‌های مختلف مولکول آنزیم بر تمایل مراکز پیوندی آن در اتصال به لیگاند، از دیگر مفروضات الگوی کینتیک هایپربولیک می‌باشد (میسرا، ۲۰۰۸).

²⁵. Henri-Michaelis-Menten

²⁶. Hyperbolic Kinetic



شکل ۴-۱، نمایش انواع الگوی کینتیک در آنزیم‌ها ، الف، چنانچه ضریب هیل (n_H) برابر یک و نسبت غلظت سوستر در زمانیکه سرعت، 0.9 سرعت بیشینه است به غلظت سوستر در 0.1 سرعت بیشینه ($R_s = S_{0.9}/S_{0.1}$)، 81 باشد الگوی کینتیک آنزیم هایپربولیک است، ب، چنانچه ضریب هیل بزرگتر از یک و R_s بسیار کوچکتر از 81 باشد الگوی کینتیک آنزیم، غیرهایپربولیک با تعاون مثبت می‌باشد، ج، چنانچه ضریب هیل کوچکتر از یک و R_s بسیار بزرگتر از 81 باشد الگوی کینتیک آنزیم، غیر هایپربولیک با تعاون منفی است.

۱-۸-۲ کینتیک غیر هایپربولیک

کینتیک آنزیمی‌هایی که از معادله‌ی میکائیلیس- منتن انحراف نشان می‌دهند، دارای منحنی غیر اشباع (سرعت علیه غلظت سوبسترا) و غیر هایپربولیک (شکل ۱-۴) می‌باشند و به آن‌ها کینتیک غیر هایپربولیک^{۲۷} اطلاق می‌شود. همان طور که اشاره شد، اساس مدل میکائیلیس- منتن بر برهم‌کنش مستقل بین سوبسترا و آنزیم استوار است. بنابراین انتظار می‌رود آنزیم، رفتار هایپربولیک داشته باشد. چنانچه استقلال برهم‌کنش بین جایگاه‌های اتصال آنزیم و لیگاند، به هر دلیلی از بین برود، رفتار سینتیکی آنزیم تغییر و به صورت غیر هایپربولیک پدیدار می‌شود. بروز رفتار آلوستریک (غیر هایپربولیک)، به دلیل عوامل گوناگونی است که در میان آن‌ها پدیده تعاونی^{۲۸} از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این پدیده به صورت مثبت یا منفی منجر به انحراف رفتار آنزیم از معادله میکائیلیس- منتن می‌گردد (میسرا، ۲۰۰۸).

۱-۸-۳ عوامل مؤثر در ایجاد کینتیک غیر هایپربولیک

رابطه میکائیلیس- منتن بیانی ساده از رفتار سینتیکی آنزیمی است که به طور عمده مبتنی بر، برهم-کنش مستقل بین سوبسترا و جایگاه اتصال و نیز ثبات ساختار مولکولی آنزیم است. عوامل متعددی منجر به انحراف رفتار آنزیمی از رابطه میکائیلیس- منتن می‌شود. به طور کلی عوامل مؤثر در ایجاد رفتار غیر هایپربولیک شامل سه دسته عوامل فیزیکی، شیمیایی و ساختاری می‌باشند.

عوامل فیزیکی به ماهیت مولکولی آنزیم و کیفیت برهم‌کنش آنزیمی ارتباطی ندارند و تأثیر سینتیکی آنها فقط به واسطه وجود ناخالصی‌ها و ناهمگونی مولکولی در نمونه آنزیمی ظاهر می‌شود. چنانچه به‌طور

²⁷. Non-Hyperbolic Kinetic

²⁸. Cooperativity

همزمان مولکول‌های مختلف یا ساختارهای گوناگونی از یک آنزیم، در نمونه آنزیمی وجود داشته باشد، موجب انحراف آنزیم از رفتار میکائیلیس- منتن می‌گردد. ناهمگونی ساختمانی (هتروژنیسیته)، مانند ناهمگونی ساختمان چهارم آنزیم، یعنی وجود زیر واحدهای گوناگون در یک مولکول آنزیم، یا وجود همزمان ایزومری‌های مختلف از دیگر عوامل فیزیکی می‌باشند که منجر به رفتار غیر هایپربولیک می‌گردند. می‌توان با حذف عوامل فیزیکی مانند ایزومری و ایزوآنزیم‌ها با استفاده از روش‌های مختلف، میزان انحراف از رابطه میکائیلیس- منتن را حذف و یا کاهش داد.

عواملی نظیر نوع سوبسترا، مهار کنندگی، تبدیل ساختار (حدواسط)، به ویژه پدیده هیسترسیس^{۲۹}، عوامل شیمیایی ایجاد الگوی کینتیک غیر هایپربولیک می‌باشند. تبدیل ساختمانی (حد وسط) که در حین برهم‌کنش سوبسترا و آنزیم صورت می‌گیرد از عوامل مؤثر و مهم در ایجاد رفتار غیر هایپربولیک محسوب می‌شود. این پدیده در حالت خاص خود یعنی هیسترسیس، تأثیر بیشتری از خود نشان می‌دهد. پدیده هیسترسیس تبدیلی برگشت‌ناپذیر میان دو ساختار مولکول آنزیم است که به واسطه حضور لیگاند یا سوبسترا به وجود می‌آید. در این حالت آنزیم به یک ساختار مولکولی دیگر تبدیل می‌شود که این ساختار دارای تمایل به سوبسترای متفاوت نسبت به ساختار اصلی می‌باشد. عوامل ساختاری، به واسطه ماهیت و قابلیت‌های مولکولی آنزیم ظاهر می‌شوند و بروز این پدیده به‌ویژه در حضور سوبسترا و در حین واکنش آنزیمی تشدید می‌شود (والکر و همکاران، ۱۹۸۵). عوامل ساختاری از عوامل مهم بروز کینتیک غیرهایپربولیک می‌باشند و بازه وسیعی از آنزیم‌های غیرهایپربولیک را در بر می‌گیرند. آنزیم‌های پلیمری (دارای زیر واحدهای متعدد)، آلوستریک (آنزیم‌هایی که دارای مراکز فعال دیگری غیر از مرکز فعال اصلی هستند و پیوند ایجاد شده بین سوبسترا یا لیگاند با این مراکز، تأثیر به‌سزایی بر پیوند اصلی سوبسترا با مرکز فعال می‌گذارد) و الیگومری (مولکول‌های مجتمع شده دی‌مر، تریمر و تترامر) مهمترین آنزیم‌های

²⁹. Hysteresis

غیرهائپرولیک می‌باشند. عامل مشترک و مهم این گروه از آنزیم‌ها پدیده تعاونی است. این پدیده به صورت تعاونی مثبت یا تعاونی منفی و یا به صورت اختلاط تعاونی‌ها از عوامل مهم در انحراف از رابطه میکائیلیس- منتن و ایجاد رفتار غیرهائپرولیک محسوب می‌شود (قرنفلی و همکاران، ۱۳۸۲). در ادامه برای روشن‌تر شدن اهمیت تغییرات ساختاری به بیان ویژگی‌ها و روند تکامل آنزیم‌های آلوستریک می‌پردازیم و انواع مدل‌ها جهت آنالیز کینتیک این آنزیم‌ها را بررسی می‌نمائیم.

۱-۹ آنزیم‌های آلوستریک

آنزیم‌های آلوستریک (Allosteric Enzymes) معمولاً دارای چند زیر واحد می‌باشند. اتصال غیرکووالانسی ترکیبات تنظیم کننده، موجب کاهش و یا افزایش میزان فعالیت این آنزیم‌ها می‌گردد. این ترکیبات که در اکثر موارد متابولیت‌های کوچکی هستند، دارای جایگاه اتصال در ساختمان آنزیم می‌باشند. ترکیباتی که پس از اتصال موجب افزایش فعالیت آنزیم می‌شوند، افکتور مثبت و ترکیباتی که موجب کاهش فعالیت آنزیم می‌گردند، افکتور منفی نامیده می‌شوند. کینتیک آنزیم‌های آلوستریک از معادله میکائیلیس- منتن پیروی نمی‌کند و منحنی فعالیت آنها نسبت به تغییرات غلظت سوبسترا، غیرهائپرولیک (سیگموئیدی) می‌باشد. آلوستری مکانیسم اصلی، سریع و کارآمدی جهت تنظیم عملکرد سلول در پاسخ به تغییر در غلظت مولکول‌های کوچک می‌باشد. از آنجا که افکتورها به راحتی قابل شناسایی نمی‌باشند و نیز به دلیل الیگومر بودن آنزیم‌های آلوستریک، آلوستری به اندازه سایر مکانیسم‌های تنظیمی (مانند رونویسی و ترجمه) شناخته شده نمی‌باشد (لیندزلی و همکاران، ۲۰۰۶). در آنزیم‌های آلوستریک اتصال سوبسترا به جایگاه فعال یکی از زیر واحدها موجب تغییراتی در شکل فضایی زیر واحدهای دیگر و تسهیل اتصال سوبسترا به جایگاه‌های دیگر می‌گردد. این اثر تعاونی ناشی از برهمکنش بین زیر واحدها در ساختار چهارم آنزیم می‌باشد. آنزیم‌های آلوستریک دارای دو شکل فضایی متمایز (Relax) R و (Tense) T می‌-

باشند که در شکل R آنزیم بسیار فعالتر از شکل T است. اتصال افکتورهای مثبت در آنزیم موجب القای شکل R می‌گردد و افکتورهای منفی باعث می‌شوند که آنزیم به شکل T در آید (میسرا، ۲۰۰۸). در آنزیم-های آلوستریکی که هر زیر واحد آن یک جایگاه فعال دارد و اتصال سوبسترا به یکی از این جایگاه‌ها سبب تقویت اتصال به زیر واحدهای دیگر می‌شود، به علت آنکه سوبسترای خود آنزیم، محرک فعالیت آنزیم است، دارای اثرات هوموتروپیک می‌باشند، ولی اثرات تنظیم‌کننده‌هایی را که سوبسترای آنزیم نیستند، اثرات هتروتروپیک می‌گویند. به عبارت دیگر در آلوستری هتروتروپیک اتصال یک لیگاند یا سوبسترا در یک جایگاه فعال از آنزیم، متأثر از اتصال مولکول افکتور (غیر از سوبسترا) در جایگاه‌های مختلف می‌باشد. در سال‌های اخیر استفاده از افکتورهای آلوستریک هتروتروپیک در صنایع داروسازی گسترش یافته است (لیانگ و همکاران، ۲۰۰۷؛ کیم و همکاران، ۲۰۰۶).

۱-۹-۱ تکامل آنزیم‌های آلوستریک

به نظر می‌رسد آنزیم‌های آلوستریک نسبت به آنزیم‌های غیر آلوستریکی که همان واکنش را کاتالیز می‌نمایند تکامل یافته‌تر می‌باشند. آنزیم‌هایی که دارای عملکرد چندگانه و به تبع آن چندین دومین کاتالیتیکی می‌باشند از ترکیب آنزیم‌های والدینی با عملکرد منفرد و مستقل پدید آمده‌اند، که این فرآیند توسط همجوشی ژن‌ها تسهیل می‌گردد (متونت و همکاران، ۲۰۰۶). همچنین ممکن است در پروتئینی آلوستریک با جایگزینی دومین‌های کاتالیتیکی با دومین‌های اتصال به افکتور، آنزیم آلوستریک جدیدی به وجود آید که این پدیده به طور آزمایشگاهی نیز ثابت شده است (متونت و همکاران، ۲۰۰۶؛ کیم و همکاران، ۲۰۰۶). آنزیم‌های والدینی دارای ویژگی تمایل به افکتور و سیگنالینگ آلوستری نمی‌باشند، به نظر می‌رسد در اثر وقوع یک جهش نقطه‌ای در آنزیم‌های الیگومر غیر آلوستریک، آنزیم‌های آلوستریک به وجود آمده‌اند. مسئله تمایل به افکتور در آنزیم‌های آلوستریک هوموتروپیک مطرح نمی‌باشد زیرا افکتور

همان مولکول سوبسترا می‌باشد. در مورد آنزیم‌های هتروترئوپیک آلوستریک، تمایل به افکتور و سیگنالینگ آلوستری در جایگاه فعال آنزیم هم‌زمان رخ می‌دهند (متونت و همکاران، ۲۰۰۶). توانایی تولید آنزیم‌های طبیعی و مهندسی با رفتار آلوستریکی هتروترئوپیک، از پتانسیل‌های کاربردی علوم بیولوژی و بیوشیمی می‌باشد. مطالعه اینگونه از آنزیم‌های آلوستریک، مطالعه مکانیسم طبیعی تکامل آلوستری را ممکن می‌سازد. یو و کاشلند (۲۰۰۱) پیشنهاد نمودند، تکامل آنزیم‌های آلوستریک، در جهت انتخاب یک حالت و جایگاه مناسب اتصال افکتور بوده است که در راستای آن ساختار آنزیم متحول گردیده است. در سیستم‌های بیولوژیکی اتصال و آلوستری به یکدیگر مرتبط می‌باشند. از آنجائیکه جایگاه آلوستریک موجب جفت شدن عملکرد آنزیمی و تأثیر افکتور از طریق مرتبط نمودن جایگاه اتصال به افکتور و جایگاه فعال می‌گردد، به نظر می‌رسد تکامل جایگاه آلوستریک در مقایسه با جایگاه فعال و اتصال به لیگاند در آنزیم‌های غیر آلوستریک به مراتب پیچیده‌تر باشد (متونت و همکاران، ۲۰۰۶).

۱-۹-۲ انواع مدل‌ها جهت آنالیز کینتیک آنزیم‌های آلوستریک

اکثر آنزیم‌ها نسبت به سوبسترای خود دارای ثابت تمایل می‌باشند. لذا همواره دارای نمودار کینتیک هایپربولیک می‌باشند. برخی از آنزیم‌های آلوستریک توسط تغییر در میزان تمایل به سوبسترا تنظیم می‌گردند و دارای دو الگوی کینتیکی شامل تعاون مثبت و تعاون منفی می‌باشند، هر دو الگوی تعاونی در آنزیم‌های آلوستریک در نتیجه تغییر در میزان تمایل آنزیم از طریق تغییر در غلظت سوبسترا می‌باشند. اولین مدل موفق جهت آنالیز کینتیک آنزیم‌های دارای تعاون مثبت در سال ۱۹۶۵ توسط موناو، وایمن، چینجوکس (MWC) ارائه شد. این مدل با فاصله زمانی بسیار کم توسط کاشلند، نم‌تی و فیلمر (KNF) کامل شد. مدل KNF قادر به پیش‌بینی و محاسبه فاکتورهای تعاون منفی می‌باشد که این ویژگی موجب تمایز آن از مدل MWC می‌گردد (لیندزلی و همکاران، ۲۰۰۶).

۱-۱۰ بازدارنده‌های آنزیمی

ترکیبی را که بتواند فعالیت آنزیمی را کاهش دهد و یا کاملاً متوقف کند، مهار کننده یا بازدارنده آن آنزیم می‌باشد. مهار کننده‌ها نقش مهمی در تنظیم متابولیسم سلولی ایفا می‌نمایند. با استفاده از مهارکننده‌های اختصاصی، مکانیسم عمل و جایگاه فعال بسیاری از آنزیم‌ها تعیین شده است. در برخی موارد نیز پس از مشخص شدن مکانیسم عمل و جایگاه فعال آنزیم مهارکننده‌های اختصاصی آن تعیین شده است. در کنترل مسیرهای متابولیکی مهار آنزیم توسط محصول خودش یا محصول نهایی مسیری بسیار متداول است. مهار شدن آنزیم ممکن است به صورت برگشت‌پذیر یا برگشت‌ناپذیر باشد. آنزیم‌ها ممکن است با اتصال غیرکووالانسی مهارکننده‌ها به طور برگشت‌پذیر مهار شوند. چهار نوع مهارکنندگی برگشت‌پذیر وجود دارد. مهار رقابتی^{۳۰}، اگر مهارکننده (I)، با سوبسترای آنزیم (S) شباهت ساختمانی داشته باشد و در اتصال به جایگاه فعال آنزیم با سوبسترا رقابت کند، این نوع مهار یا بازدارندگی را رقابتی می‌گویند. سوبسترا و مهارکننده همزمان نمی‌توانند به آنزیم متصل شوند و فقط کمپلکس آنزیم با مهارکننده (EI) یا آنزیم با سوبسترا (ES) تشکیل می‌گردد. از کمپلکس ES، محصول (P) تولید می‌شود ولی از کمپلکس EI محصولی بدست نمی‌آید یعنی جمعیتی از مولکول‌های آنزیم که به I متصلند فعال نیستند و به این دلیل سرعت واکنش آنزیمی کاهش می‌یابد. ولی نباید از نظر دور داشت که هر چه غلظت سوبسترا را افزایش دهیم تعداد کمپلکس‌های EI کاهش یافته و اثر مهارکننده نیز کمتر می‌شود. مهار غیر رقابتی^{۳۱}، اگر محل اتصال مهارکننده غیر از محل اتصال سوبسترا به آنزیم باشد و مهارکننده بتواند هم به آنزیم آزاد و هم به کمپلکس آنزیم-سوبسترا متصل گردد، این نوع مهارکننده را غیر رقابتی می‌گویند. با افزایش غلظت سوبسترا اثر مهارکننده غیر رقابتی از بین نمی‌رود. سوبسترا نیز می‌تواند به آنزیم آزاد و یا به کمپلکس EI

³⁰. Competitive Inhibition

³¹. Noncompetitive Inhibition

متصل شود. در حضور این نوع مهار کننده‌ها احتمال تشکیل سه نوع کمپلکس وجود دارد (ESI, ES, EI) که تنها کمپلکس‌های ES فعالیت کاتالیزوری دارند و محصول تولید می‌کنند. مهار نارقابتی^{۳۲}، این نوع مهار کننده‌ها زمانی می‌تواند به آنزیم متصل شود که قبل از آن سوبسترا به آنزیم متصل شده باشد. به عبارتی دیگر، مهار کننده نارقابتی فقط به کمپلکس ES متصل می‌شود و کمپلکس سه جزئی (ESI) غیر فعال تشکیل می‌گردد. در حضور این نوع مهار کننده احتمال تشکیل دو نوع کمپلکس وجود دارد (ES, ESI) و کمپلکس EI تشکیل نمی‌گردد. مهار مخلوط^{۳۳}، مهار کننده‌هایی هستند که می‌توانند در جایگاهی غیر از محل اتصال سوبسترا، به آنزیم آزاد و کمپلکس آنزیم – سوبسترا متصل شوند ولی ثابت تفکیک I از EI (K_i) ممکن است از ثابت تفکیک I از ESI (K_i) کوچکتر یا بزرگتر باشد. مهار غیر رقابتی را می‌توان حالت خاصی از مهار مخلوط محسوب کرد که در آن $K_I = K_I'$ است. مهار کننده‌های نوع مخلوط V_{max} (سرعت بیشینه) و K_m (میزان غلظت سوبسترا زمانی که سرعت، نصف سرعت بیشینه است) را توأمأ تحت تأثیر قرار می‌دهند. افزایش غلظت سوبسترا ممکن است درجه بازدارندگی را افزایش یا کاهش دهد ولی نه به اندازه‌ای که به ترتیب در مورد مهار نارقابتی و رقابتی مشاهده می‌گردد (کورنیش و همکاران، ۱۹۷۴). مهار کننده‌های برگشت‌ناپذیر، مهار کننده‌هایی هستند که با اتصال محکم (در اکثر موارد با پیوند کووالانت) به جایگاه فعال آنزیم و یا به ریشه جانبی اسید آمینه‌ای که در فعالیت آنزیم نقش اساسی دارد، مولکول آنزیم را برای همیشه از فعالیت باز می‌دارند. برخی از این مهار کننده‌ها به طور اختصاصی به یک گروه شیمیایی در ریشه جانبی اسید آمینه جایگاه فعال آنزیم متصل می‌شود.

³². Uncompetitive Inhibition

³³. Mixed Inhibition

۱-۱۰-۱ انواع مکانیسم بازدارندگی در آنزیم‌های آلوستریک

آنزیم‌های آلوستریک جهت کنترل مسیرهای بیولوژیک و بر اساس نحوه پاسخ به اتصال افکتورهای فیزیولوژیک به دو صورت آنزیم‌های نوع K^{34} و آنزیم‌های نوع V^{35} تکامل یافته‌اند. آنزیم‌های نوع K ، در پاسخ به اتصال یک افکتور فیزیولوژیک، دچار تغییرات در کانفورماسیون خود و به تبع آن تغییر در تمایل به سوبسترا و در نهایت تغییر در میزان K_m می‌شوند. اغلب آنزیم‌های نوع K ، دارای تعاون مثبت می‌باشند و به ندرت برخی دارای تعاون منفی می‌باشند. آنزیم‌های نوع V در پاسخ به اتصال یک افکتور، در تمایل خود نسبت به سوبسترا تغییر ایجاد نمی‌نمایند، این آنزیم‌ها از طریق ایجاد تغییر در کانفورماسیون، فعالیت خود را کنترل می‌نمایند و به طور مستقیم موجب تغییر در میزان V_{max} می‌گردند. به این ترتیب اگر یک افکتور منفی موجب کاهش K_m شود، بازدارنده آلوستریک نوع K و چنانچه موجب کاهش V_{max} گردد، بازدارنده آلوستریک نوع V می‌باشد (آنتونی و همکاران، ۲۰۰۱). در ادامه و به اختصار، به معرفی روش‌های خالص‌سازی پروتئین‌ها می‌پردازیم.

۱-۱۱ خالص‌سازی پروتئین‌ها

روش‌های متعارف خالص‌سازی پروتئین‌ها بر اساس سه مشخصه بار الکتریکی (کروماتوگرافی تعویض یونی^{۳۶})، هیدروفوبیسیته (کروماتوگرافی هیدروفوب اینتراکشن^{۳۷}) و اندازه (ژل فیلتریشن^{۳۸}) این ماکرومولکول‌ها تعریف شده‌اند. امکان جداسازی پروتئین‌های طبیعی، تکرار پذیری، اتوماتیک شدن و

³⁴. K-type

³⁵. V-type

³⁶. Ion Exchange Chromatography

³⁷. Hydrophobic Interaction Chromatography

³⁸. Gel-Filtration Chromatography

حفظ فعالیت پروتئین یا آنزیم از مزیت‌های این روش‌ها می‌باشد. به طور کلی محلول پروتئین طی چهار مرحله خالص‌سازی می‌شود، مرحله‌ای که غلظت و قدرت یونی و اسیدیته محلول پروتئین تنظیم می‌شود (Clarification)، مرحله جداسازی پروتئین موردنظر و پروتئین‌های مشابه آن از پروتئین‌های غیر مشابه (Capture)، مرحله حذف آلاینده‌ها که موجب افزایش فعالیت آنزیمی می‌گردد (Intermediate Purification) و در نهایت مرحله خالص‌سازی نهایی پروتئین (Polishing). البته خالص‌سازی همه پروتئین‌ها الزاماً شامل هر چهار مرحله نمی‌شود. تعداد مراحل خالص‌سازی به نوع پروتئین و کاربرد آن بستگی دارد. مرحله جداسازی (Capture)، خود شامل دو مرحله اتصال به رزین (Binding) و جداسازی (Elution) است و با توجه به نحوه تغلیظ محلول پروتئین در مرحله اول، سطح هیدروفوبیسیته و اسیدیته، از دو روش کروماتوگرافی تعویض یونی یا هیدروفوب اینتراکشن استفاده می‌شود. چنانچه پس از این مرحله پروتئین کاملاً خالص نشده باشد از روش ژل فیلتریشن برای جداکردن پروتئین مورد نظر از پروتئین‌های مشابه آن استفاده می‌شود. در ادامه به بیان روش‌های سنجش فعالیت آنزیمی می‌پردازیم و مروری اجمالی بر روش‌های سنجش فعالیت پلی‌گالاکتورونازها خواهیم داشت.

۱-۱۲ روش‌های سنجش فعالیت آنزیمی

اندازه‌گیری سرعت واکنش آنزیمی بر اساس مصرف سوبسترا یا تولید محصول صورت می‌گیرد. یکی از روش‌های مهم و متداول برای اندازه‌گیری سرعت واکنش آنزیمی روش اسپکتروفتومتری می‌باشد که به دو طریق کینتیک (Kinetic) و اندپونیت (Endpoint) صورت می‌گیرد. چنانچه در یک واکنش آنزیمی، سوبسترا یا محصول دارای خاصیت جذب باشند از روش کینتیک استفاده می‌شود. این روش از دقت و تکرارپذیری بالایی برخوردار است در این روش تغییرات جذب در واحد زمان اندازه‌گیری می‌شود. چنانچه

سوبسترا دارای جذب باشد واکنش جذب، کاهشی و اگر محصول دارای جذب باشد واکنش جذب، افزایشی خواهد بود. سه نوع روش کاینیتیک تعریف شده است، روش مستقیم که خود محصول یا سوبسترا دارای جذب می‌باشند، روش غیر مستقیم که هیچ کدام از محصول یا سوبسترا دارای خاصیت جذب نمی‌باشند و یک ماده یا ترکیب با واکنش جفت می‌شود که جذب دارد و روش سنجش کوپل (couple assay) که واکنش آنزیمی با یک واکنش دیگر که اجزای آن دارای جذب می‌باشند جفت می‌شود. چنانچه هیچ پارامتری برای مشخص نمودن میزان سوبسترای مصرف شده یا محصول تولید شده وجود نداشته باشد از روش اندپونیت استفاده می‌شود. در این روش پس از متوقف نمودن واکنش آنزیمی، از یک معرف رنگی و نمودار استاندارد جهت تعیین میزان محصول تولید شده استفاده می‌شود. روش غیر مستقیم کاینیتیک جهت سنجش فعالیت آنزیمی با استفاده از سوبستراهای کروموژن (chromogen) سنتتیک، در واقع در جهت تبدیل روش اندپونیت به کاینیتیک می‌باشد. به عنوان مثال پارا نیترو فنیل پالمیتات^{۳۹}، سوبسترای لپاز می‌باشد که عملکرد این آنزیم بر آن، موجب آزاد شدن پارانیتر و فنیل می‌گردد که این ترکیب در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارای جذب می‌باشد (کوک و کلیلند، ۲۰۰۷).

۱-۱۲-۱ روش‌های سنجش فعالیت پلی‌گالاکتورونازها

فعالیت پلی‌گالاکتورونازها بر اساس اندازه‌گیری سرعت افزایش تعداد گروه‌های احیا و یا کاهش غلظت سوبسترا، در طول واکنش تعیین می‌گردد. میزان قندهای احیا با استفاده از روش‌های رنگ‌سنجی مانند روش معرف ۵و۳ دی‌نیترو و سالیسیلات و روش معرف آرسنومولیبیدات-مس، اندازه‌گیری می‌شود. یک واحد فعالیت آنزیمی، میزان آنزیمی است که مقدار ۱ میکرومول بر لیتر در دقیقه، گالاکتورونیک اسید را تحت شرایط استاندارد سنجش، آزاد می‌نماید. به‌طور معمول، جهت تعیین فعالیت پلی‌گالاکتورونازها از

³⁹. Para-nitrophenyl palmitate

روش اندازه‌گیری کاهش غلظت سوپسترا استفاده می‌شود. این واحد فعالیت آنزیمی عمدتاً با عنوان مقدار آنزیم مورد نیاز جهت حصول کاهش معینی از ویسکوزیته در هر واحد زمان تعریف می‌شود. این روش با موفقیت‌های محدود همراه بوده است. هیچ ارتباط مستقیمی میان کاهش غلظت و تعداد باندهای گلیکوزیدی هیدرولیز شده وجود ندارد. میزان فعالیت پلی‌گالاکتورونازها را می‌توان توسط روش کاپ-پلیت^{۴۰} اندازه‌گیری نمود. کاپ‌ها میزان کاهش (خوردگی) در پلیت آگار جامد حاوی سوپسترا که پر شده از محلول آنزیم می‌باشد، پس از گذشت مدت زمان معین، مناطقی که سوپسترا تجزیه شده است، رنگ آمیزی و سپس اندازه‌گیری می‌شود (جایانی و همکاران، ۲۰۰۵). با مقایسه سرعت واکنش با روش ویسکوزیمتری^{۴۱} و سنجش گروه‌های احیا، مکانیسم عمل اندو و اگزوکاتالیتیکی در پلی‌گالاکتورونازها تعیین می‌گردد (خان و همکاران، ۲۰۰۷).

۱-۱۳ ارتباط ساختار با عملکرد و پایداری آنزیم

ساختمان فضایی پروتئین‌ها اغلب واجد پایداری و استحکام زیادی نیست و با از بین رفتن برهم‌کنش‌های ضعیف فیزیکی پایدار کننده، دناتوره می‌شود. فرآیند تشکیل ساختار سوم پروتئین‌ها (تاخوردگی) و دناتوراسیون تعاونی می‌باشند و هر برهم‌کنشی که طی فرآیند تاخوردگی و دناتوراسیون در پروتئین ایجاد می‌شود موجب چندین برهم‌کنش جدید می‌شود. فرآیند تاخوردگی در ارتباط بسیار نزدیک با مفهوم پایداری پروتئین می‌باشد. مراحل مختلف تاخوردگی، با تشکیل ساختارهای حد واسط گوناگون همراه است که به لحاظ پایداری متفاوت می‌باشند. با پیشرفت فرآیند تاخوردگی، تنوع آرایش این ساختارهای حد واسط کاهش و پایداری آنها افزایش می‌یابد. تشکیل جایگاه فعال آنزیم‌ها در مسیر تاخوردگی پروتئین‌ها از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. پایدارترین ساختار آنزیم (فشرده‌ترین شکل ساختاری) الزاماً

⁴⁰. Cup-Plate

⁴¹. Viscosimetry

بهترین عملکرد را نخواهد داشت. بررسی ارتباط ساختار با عملکرد و پایداری پروتئین‌ها بسیار مهم می‌باشد. تکنیک‌هایی که قادر به آنالیز حالت‌های ساختاری حد واسط در مسیر تاخوردگی تا دناتوراسیون پروتئین می‌باشند جهت سنجش و برآورد میزان پایداری پروتئین به کار می‌روند. این تکنیک‌ها شامل مطالعات فلورسانس، جذبی و دو رنگ نمائی دورانی می‌باشد (نیچر و همکاران، ۲۰۰۱). مطالعات فلورسانس جهت بررسی حد واسط‌های ساختاری و آنالیز پایداری پروتئین بسیار متداول می‌باشد که در ادامه، به اختصار توضیحاتی در این رابطه ارائه می‌گردد.

۱-۱۳-۱ فلورسانس

جذب اولیه یک فوتون توسط مولکول سبب می‌شود یک حالت الکترونی تحریک شده ایجاد شود. مولکول تحریک شده ممکن است در اثر برخورد با مولکول‌های اطرافش انرژی را از دست بدهد که این انتقال از طریق قرار گرفتن در یک سطح ارتعاشی پائین‌تر انجام می‌گیرد. اگر مولکول‌های اطراف قادر به پذیرش مقدار زیاد انرژی نباشند، انتقال سبب تابش می‌شود که این عمل نشر خود به خودی نامیده می‌شود. بنابراین در نشر فوتون، طول موج فوتون نشر یافته نسبت به فوتون جذب شده بیشتر است. طیف نشری، طیف فلورسانس نامیده می‌شود. بخشی از مولکول که در اثر تحریک قادر به نشر پرتو است فلوروفور نامیده می‌شود. در مولکول‌های پروتئین، فلورسانس تریپتوفان متداول است. به‌طور کلی فلوروفورهای مناسب دارای حلقه آروماتیک به شدت سخت^{۴۲} می‌باشند. مواد سنتزی که در مطالعات فلورسانس به کار می‌روند بسیار متنوع می‌باشند. شدت فلورسانس و طول موج ماکزیمم نشر نسبت به محیط حساس می‌باشند. ترکیباتی نظیر ۱-انیلو-۸-نفتالین سولفونات (ANS)، ۱-دی متیل-آمینو نفتالین-۵-سولفونات (DNS) و مشتقات کلردار آن مثل دانسیل کلراید، فلوروفورهای خوبی هستند که در محیط آبی شدت

⁴². Fairly rigid

فلورسانس ضعیفی دارند اما زمانی که در محیط غیر قطبی قرار می‌گیرند فلورسانس آنها افزایش و طیف آنها به سمت طول موج کوتاه‌تر جابه‌جا می‌شود. اثر محیط مولکول که سبب کاهش میزان فلورسانس می‌گردد به کوانچینگ معروف است که به علل مختلف رخ می‌دهد، در اثر برخوردهای مولکولی انرژی برانگیختگی به صورت تبادل انرژی بین مولکول‌ها از بین می‌رود. واکنش‌های شیمیایی نیز سبب از دست رفتن انرژی تحریک می‌شوند.

۱-۱۴ اهداف پژوهش

پلی‌گالاکتوروناز قارچ *Macrophomina phaseolina* (عامل بیماری پوسیدگی ذغالی در طیف وسیعی از گیاهان)، از عوامل مهم بیماریزایی قارچی جهت نفوذ به سلول میزبان گیاهی می‌باشد. در این فصل اهمیت مهار این آنزیم، جهت ایجاد اختلال در فرایند بیماریزایی پاتوژن مطرح گردید. همچنین کاربرد گسترده پلی‌گالاکتورونازها در صنایع گوناگون شرح داده شد. در این پژوهش به منظور بررسی خصوصیات و افکتورهای پلی‌گالاکتوروناز ترش‌حی از قارچ *M. phaseolina* جهت کاربرد در مطالعات مدیریت بیمارگر و صنعت، قارچ عامل بیماری در محیط تولید آنزیم کشت شد. عصاره قارچی جدا و پلی‌گالاکتوروناز با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی خالص سازی گردید. ویژگی‌های کینتیکی، کاتالیتیکی، ساختاری، پایداری دمایی و اسیدیته و افکتورهای آن بررسی شد. در فصل دوم به مرور منابع بررسی خصوصیات بیوشیمیایی و کینتیک آنزیم‌های پلی‌گالاکتوروناز منابع مختلف قارچی و باکتریایی پرداخته شده است. فصل سوم شامل مواد و روش تولید، خالص سازی و بررسی الگوی کینتیک آنزیم پلی‌گالاکتوروناز قارچ *M phaseolina* و نحوه مطالعه خصوصیات بیوشیمیایی و محاسبه پارامترهای کینتیکی و ترمودینامیکی این آنزیم می‌باشد. همچنین به افکتورها و بازدارنده‌های این آنزیم و مکانیسم فعال سازی و بازدارندگی آنها اشاره شده است. فصل چهارم و پنجم به ترتیب در بر دارنده نتایج و بحث مطالعه بیوشیمیایی پلی-

گالاکتورونازی که از قارچ *M. phaseolin* خالص سازی شده است و نیز معرفی فعال کننده‌ها و بازدارنده‌های این آنزیم و شرح مکانیسم فعال سازی و بازدارندگی آنها می‌باشد. مطالعات تکمیلی و تخصصی کریستالوگرافی، مولکولار داکینگ، QSAR و زیست‌سنجی گام موثری در حذف خسارت این فیتوپاتوژن از مزارع خواهد بود. در این راستا نتایج حاصل از این پژوهش امکان ارائه الگویی پایدار را در این مطالعات فراهم می‌سازد.

فصل دوم

مرور منابع

در فصل اول، ضمن معرفی پلی‌گالاکتورونازها به عنوان فاکتور اصلی در آسیب به میزبان‌های گیاهی در بسیاری از قارچ‌های بیماریزا از جمله قارچ *M. phaseolina* و عامل ایجاد پوسیدگی نرم توسط قارچ‌ها، پس از برداشت میوه‌ها، اهمیت مهار این آنزیم‌ها جهت ایجاد اختلال در فرایند بیماریزایی پاتوژن مطرح گردید. همچنین کاربرد گسترده پلی‌گالاکتورونازها در صنایع گوناگونی چون، غذایی، داروسازی، نساجی، پردازش فیبرهای گیاهی، چای، قهوه، استخراج نفت، صنایع پالایش فاضلاب‌های حاوی مواد پکتیکی، صنایع کاغذسازی و خالص سازی ویروس‌ها، شرح داده شد. همان‌طور که اشاره شد روش‌های تولید و خالص سازی پلی‌گالاکتورونازها جهت مطالعه ویژگی‌های سینتیکی و مهار کننده‌های این آنزیم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. همچنین بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی این آنزیم‌ها جهت شناسایی و معرفی مهار کننده‌های مؤثر آنها در راستای کنترل عامل بیماریزا و کنترل رسیدگی و نرمی میوه‌ها ضروری می‌باشد. در این فصل به مرور منابع بررسی خصوصیات بیوشیمیایی، ساختاری و بازدارنده‌های آنزیم‌های پلی‌گالاکتوروناز منابع مختلف قارچی و باکتریایی پرداخته شده است.

۲-۱ مروری بر مطالعات بررسی ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی پلی‌گالاکتورونازها

پلی‌گالاکتورونازهای منابع مختلف قارچی با توجه به ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی و زیست‌شناسی و نیز مکانیسم عمل، از یکدیگر متمایز می‌شوند (جایانی و همکاران، ۲۰۰۵). مطالعات انجام گرفته بر روی ساختار مولکولی 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. به‌نظر می‌رسد تفاوت در نوع اسید آمینه موجود در نواحی حفاظت شده سبب بروز خصوصیات فیزیکی و شیمیایی متفاوت ایزوآنزیم‌های مختلف این آنزیم در بین منابع مختلف می‌باشد و این عامل سبب بروز خصوصیات فیزیکی شیمیایی متفاوت ایزوآنزیم‌های مختلف پلی‌گالاکتورونازها در بین سویه‌های مختلف

جدول ۱-۲ خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی پلی گالاکتورونازهای منابع مختلف قارچی و باکتریایی.

منبع پلی گالاکتوروناز	وزن مولکولی (کیلودالتون)	pI	فعالیت ویژه (Umg ⁻¹)	K _m	دمای بهینه (°C)	pH بهینه	دفرانس
<i>Aspergillus japonicus</i>	۳۸	۵/۶	-	-	۳۰	۴-۵/۵	آل نچادا و همکاران، ۲۰۱۲
<i>Aspergillus japonicus</i>	۶۵	۳/۳	-	-	۳۰	۴-۵/۵	آل نچادا و همکاران، ۲۰۱۲
<i>Aspergillus niger</i>	۷۹	۲/۷	-	-	۴۰	۴/۵	کرس و همکاران، ۲۰۰۵
<i>Aspergillus tubingensis</i>	-	-	۱۹۸۲۳	۷	۴۰-۶۰	۴/۵	جایانی و همکاران، ۲۰۰۵
<i>Aureobasidium pullulans</i>	۳۱	۹/۴	۹۸۲	-	۵۰	۴/۶	تاری و همکاران، ۲۰۰۸
<i>Aureobasidium pullulans</i>	۵۴	-	۳۷۵۰	-	۶۰	۵/۴	استراتیلوا و همکاران، ۲۰۰۴
<i>Botrytis cinerea</i>	۲۳	-	-	۹/۱	-	۴/۵	کبن و همکاران، ۲۰۰۲
<i>Aspergillus awamori</i>	۴۱	۶/۱	۴۸۷	-	۴۰	۵	نکیران و همکاران، ۲۰۱۰
<i>Sclerotinia borealis</i>	۴۰	۷/۵	۲۰۸۸	-	۴۰-۵۰	۵	اشنیتزوفر و همکاران، ۲۰۰۶
<i>Fusarium oxysporum</i>	۳۸	-	۲۰۹	-	۶۹	۱۱	نیچر و همکاران، ۲۰۰۴

قارچی و حتی در درون یک سویه، خصوصاً از نظر وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک آن‌ها شده است (ال نجادا و همکاران، ۲۰۱۲). میزان نقطه ایزوالکتریک پلی‌گالاکتورونازهای باکتریایی ۶/۵ تا ۹/۵ و در پلی-گالاکتورونازهای قارچی ۴/۲ تا ۸/۹ می‌باشد، بنابراین می‌توان از روش کروماتوگرافی تعویض کاتیون جهت خالص‌سازی اغلب پلی‌گالاکتورونازهای باکتریایی استفاده نمود. ایزوآنزیم‌های پلی‌گالاکتورونازهای قارچی نیز غالباً توسط کروماتوگرافی تبادل یونی جداسازی می‌گردند. تنوع پلی‌گالاکتورونازها با ویژگی‌های سینتیکی مشابه، پاتوژن را قادر به تجزیه طیف وسیعی از انواع پکتین‌ها و نهایتاً افزایش گستره میزبانی می‌گرداند (تالارزیک و هنیگ، ۲۰۰۱). جدول ۱-۲، خلاصه‌ای از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و بیوشیمیایی پلی‌گالاکتورونازهای منابع مختلف را نشان می‌دهد. پلی‌گالاکتورونازهای منابع میکروبی مختلف، دارای pH بهینه میان ۳/۵-۵/۵ و دمای بهینه میان ۳۰-۳۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشند. پلی‌گالاکتورونازهایی که توسط قارچ‌ها تولید می‌شوند عمدتاً اسیدی و دارای حداکثر دمای بهینه فعالیت ۵۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشند. اما برخی پلی‌گالاکتورونازهای قلیایی نیز در برخی منابع قارچی مانند *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* با pH بهینه ۱۱ گزارش شده‌اند (جایانی و همکاران، ۲۰۰۵). پلی‌گالاکتورونازهای قلیایی غالباً متعلق به منابع باکتریایی می‌باشد. به‌طور کلی پلی‌گالاکتورونازها آنزیم‌هایی پایدار، با نیمه عمر بالا و مقاوم در برابر حرارت می‌باشند. مشخص شده است که pH مطلوب فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز می‌تواند به نوع سوبسترا نیز بستگی داشته باشد، به‌طوری‌که آنزیم پلی‌گالاکتوروناز خالص‌سازی شده از قارچ فوزاریوم اگریسپوروم در محیط حاوی پکتین در pH برابر ۵ و در محیط حاوی پلی‌گالاکتورونیک اسید در pH برابر ۷ حداکثر فعالیت را از خود نشان می‌دهد (دینو و همکاران، ۲۰۰۷).

۲-۲ مروری بر مطالعات بررسی بازدارنده‌های پلی‌گالاکتورونازها

بسیاری از ترکیبات مهارکننده پلی‌گالاکتورونازها شناسایی شده‌اند. این ترکیبات به‌صورت طبیعی، شیمیایی و یا سنتتیک تولید و با مکانیسم‌های بازدارندگی گوناگون منجر به مهار فعالیت این آنزیم‌ها می‌-

گردند. آنزیم‌های پلی‌گالاکتوروناز دارای میل ترکیبی بالایی با زنجیره‌های بلندتر گالاکتورونیک اسید در انتهای غیر احیا می‌باشند. مهار پلی‌گالاکتوروناز خالص‌سازی شده از *Aspergillus niger* به‌وسیله محصول واکنش (گالاکتورونیک اسید) از نوع رقابتی و $K_I = 13/3 \text{ g/lit}$ می‌باشد (بلافی بکو و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین پکتین با مهار رقابتی و $K_I = 13/3 \text{ g/lit}$ پلی‌گالاکتوروناز خالص‌سازی شده از *Fusarium moniliforme* را مهار می‌کند (نیچر و همکاران، ۲۰۰۸). جوان و همکاران (۲۰۱۲) برای بررسی فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز خالص‌سازی شده از *Aspergillus niger* در حضور و عدم حضور گلوکز، از ذرت به عنوان سوبسترای واکنش استفاده نمودند و نشان دادند گلوکز موجب مهار پلی-گالاکتوروناز از نوع رقابتی می‌شود. در ادامه به مرور مطالعات انجام شده پیرامون بازدارنده‌های طبیعی، شیمیایی و اختصاصی پلی‌گالاکتورونازها می‌پردازیم.

۲-۲-۱ بازدارنده‌های طبیعی پلی‌گالاکتوروناز

گیاهان، حاوی پپتیدها، پروتئین‌ها و متابولیت‌های ثانویه ضد قارچی می‌باشند. بر اساس مطالعات زیست-سنجی درون شیشه‌ای، دهیدروکوئرستین باز دارنده بسیار قوی رشد فوزاریوم و نیز مانع از تشکیل ماکروسپوره‌های آن می‌گردد (لاتانیزو و همکاران، ۲۰۰۶). همچنین مانع از فعالیت اندوپلی‌گالاکتورونازها درکنیدی در حال جوانه‌زنی *Botryti cinerea* می‌گردد (کارز و همکاران، ۲۰۰۵). به‌نظر می‌رسد دهیدروکوئرستین بازدارنده آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در پاتوژن‌های قارچی گیاهان می‌باشد. سالیسیلیک اسید به‌واسطه مهار پلی‌گالاکتورونازها، رشد میسلیموم *Eutypa lata* را مهار می‌نماید. گزارش شده است ترشح تانین و ترکیبات فنولی توسط گیاهان آسیب دیده که مورد هجوم قارچ‌های پاتوژن قرار گرفته‌اند، موجب مهار آنزیم‌های خارج سلولی هیدرولازی قارچی (سلولاز، پکتیناز، زایلناز) و به تبع آن عدم گسترش قارچ در گیاه می‌گردند. لیگنان‌ها نیز تیپ دیگری از ترکیبات فنولی می‌باشند که فعالیت ضد قارچی آنها

از طریق مهار آنزیم‌های خارج سلولی قارچ شامل سلولاز، پلی‌گالاکتوروناز و گلیکوزیدازها مشخص شده است (لاتانیزو و همکاران، ۲۰۰۶).

۲-۲-۲ مهار اختصاصی پلی‌گالاکتورونازها

واکنش‌های آنزیمی از طریق تشکیل و انتقال ساختار ناپایدار حالت گذار^{۴۳} صورت می‌گیرد. ترکیبات شیمیایی آنالوگ حالت گذار از طریق مصرف بخشی از انرژی پیوند، به شدت به آنزیم در حالت گذار متصل می‌شوند و تحت عنوان مهارکننده‌های حالت گذار معرفی می‌گردند. برخی کلاس‌های تیوالیگوساکاریدها به‌عنوان مهارکننده‌های میکرومولار بتا-گلیکوزید هیدرولازها معرفی گردیده‌اند. این ترکیبات، غیر قابل هیدرولیز و دارای یک مرکز آلفا-دی آنومر در بتا-دی-الیگوساکاریدها می‌باشند. به-طوریکه متیل-دی تیو-آلفا-سلوبیوزیل- (۴-۱)- بتا سلوبیوزید به‌عنوان مهارکننده رقابتی کلاس‌های متفاوتی از گلیکوزید هیدرولازها معرفی شده است. این نوع از مهارکننده‌ها از انرژی پیوند زیر سایت‌های موجود در دو طرف مرکز کاتالیتیکی آنزیم استفاده می‌نمایند و در میان پارامترهای ترمودینامیکی، نسبت به آنتالپی وابسته می‌باشند (فورت و همکاران، ۲۰۰۱). به‌نظر می‌رسد این ترکیبات علی‌رغم عدم اتصال به جایگاه فعال آنزیم، از جایگیری سوبسترا در این جایگاه ممانعت می‌نمایند (گلاستر و همکاران، ۲۰۰۷). در حقیقت این مهارکننده‌ها به‌طور مصنوعی جایگاه فعال گلیکوزید هیدرولازها را در وضعیتی مشابه با وضعیت حالت گذار قرار می‌دهند. با توجه به تمایل بالای این ترکیبات نسبت به گلیکوزید هیدرولازها، جهت اتصال حالت گذار، چارچوب جدیدی جهت طراحی مهارکننده‌های بسیار قدرتمند فعالیت پلی-گالاکتورونازها در راستای کنترل بیولوژیکی قارچ‌های فیتوپاتوژنیک تعریف می‌گردد.

⁴³. Transition State

۲-۲-۳ بازدارنده آلوستریگ پلی گالاکتورونازها

پروتئین‌های مهارکننده آنزیم پلی گالاکتوروناز (Polygalacturonase-inhibiting proteins /PGIP)، موجب به تأخیر انداختن پیشرفت هیف قارچی، کاهش پوسیدگی بافت میزبان، تحریک دیگر پاسخ‌های دفاعی گیاه و در نهایت توقف کلونیزاسیون قارچی نقش دارند (متئو و همکاران، ۲۰۰۳). این مهارکننده‌ها مولکول‌های گلیکو پروتئین با وزن مولکولی ۴۰-۵۵ کیلو دالتون می‌باشند که با پیوندهای یونی به ماتریکس خارج سلولی گیاه متصل می‌شوند (دینو و همکاران، ۲۰۰۵). مشخص شده است این مولکول پروتئینی با مکانیسم غیر رقابتی موجب مهار اغلب پلی گالاکتورونازها می‌شود نتایج حاصل از مطالعات جهش‌زایی هدفمند، عدم توانایی این مولکول را در اتصال به جایگاه فعال آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *Fusarium moniliforme* نشان داده است (کلاگر و همکاران، ۱۳۸۶). الگوی کینتیک اندوپلی-گالاکتورونازی که از *Verticillium dahliae* خالص‌سازی شده است در واکنش با سوبسترای پلی-گالاکتورونیک اسید و مهار کننده PGIP (استخراج شده از گیاه کتان) از نمودار میکائیلیس-منتن پیروی نمی‌نماید، شکل سیگموئیدی نمودار تغییرات سرعت در برابر غلظت، الگوی کینتیک آلوستریگ مثبت را در بر هم‌کنش پلی گالاکتوروناز با پلی گالاکتورونیک اسید و PGIP نشان داده است. همچنین آن‌ها مشخص نمودند پلی گالاکتوروناز مورد بررسی آنزیم نوع K می‌باشد و PGIP به صورت آلوستریگ موجب مهار این آنزیم می‌گردد (جاسیندا و همکاران، ۲۰۰۰).

۲-۳ مروری بر مطالعات ساختاری پلی‌گالاکتوروناز

مطالعات تغییرات شیمیایی و نتایج حاصل از اسپکتروسکوپی و جهش‌زایی هدفمند نشان می‌دهد که اسیدهای آمینه تریپتوفان و هیستیدین در جایگاه فعال پلی‌گالاکتوروناز قرار دارند. همچنین مشخص شده است علاوه بر اسید آمینه تریپتوفان و هیستیدین، اسید آمینه آرژنین در نزدیک جایگاه، فعال پلی-گالاکتوروناز قرار دارند. همچنین بر اساس مطالعات اسپکتروفلوریمتریک، یک رزیدوی تریپتوفان در این آنزیم در یک محیط الکتروپوزیتیو قرار دارد و در اتصال نقش دارد. مطالعات کینتیک و فلورسانس بر اندو-پلی‌گالاکتوروناز تولید شده توسط *Fusarium moiliforme* نشان می‌دهد اسید آمینه تریپتوفان در جایگاه اتصال قرار دارد و رزیدوی آرژنین در نزدیک جایگاه فعال موجب گسترش اتصال سوبسترا می‌گردد (نیچر و همکاران، ۲۰۰۱).

فصل سوم

مواد و روش‌ها

قارچ *Macrophomiona phaseolina* عامل پوسیدگی ذغالی در گیاهان، دارای دامنه میزبانی گسترده و پراکندگی جغرافیایی بالایی می‌باشد. اهمیت مهار پلی‌گالاکتوروناز ترش‌حی از قارچ‌های فیتوپاتوزن، جهت مدیریت این قارچ‌های بیمارگر مطرح گردید. کاربرد گسترده پلی‌گالاکتوروناز در صنایع گوناگون نیز به-تفصیل شرح داده شد. در این پژوهش تولید و خالص‌سازی پلی‌گالاکتوروناز ترش‌حی از قارچ *M. phaseolina* جهت مطالعه ویژگی‌های سینتیکی و افکتورهای فعال‌کننده و بازدارنده آن، به‌منظور مدیریت بیمارگر و البته کاربرد این آنزیم در صنعت مورد توجه قرار گرفته است. جهت بررسی پایداری و حدواسط-های فولدینگ، آنزیم خالص به لحاظ برخی ویژگی‌های ساختاری نیز مورد بررسی قرار گرفت. در این بخش، مراحل، مواد و روش تولید و خالص‌سازی پلی‌گالاکتوروناز قارچ *M. phaseolina* و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی، خصوصیات ساختاری، الگوی کینتیک و فاکتورهای مؤثر بر فعالیت و مهار این آنزیم شرح داده می‌شود.

۳- مواد شیمیایی مورد استفاده

پلی‌گالاکترونیک‌اسید، $D-\alpha$ -گالاکترونیک‌اسید، ۳،۵-دی‌نیتروسالیسیلیک‌اسید (DNS)، ۱-انیلو-۸ نفتالین سولفونات (^{44}ANS)، کیسه دیالیز و کاغذ صافی از شرکت Sigma (Steinheim, USA) تهیه گردید. رنگ کوماسی‌بلو، آلبومین‌سرم‌گاو، سدیم-پتاسیم‌تارتارات، آکریلامید، بیس آکریلامید، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، پپتون، گلوکز، سوکروز، نشاسته، آمونیوم کلرید، کلسیم نترات، تریس بیس، آمونیوم هیدروژن فسفات، سدیم فسفات، سدیم کلراید، اسید استیک، اسید کلریدریک، فرمالدهید، نترات نقره، هیدروکسید سدیم بی‌سولفات، هیدروکسید سدیم، سولفات آمونیوم، فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم،

⁴⁴. 1-Anilinonaphthalene -8- Sulfonic Acid

سولفات منیزیم، بورات سدیم، مولیبدات آمونیوم، سولفات آهن، سولفات مس، سولفات منگنز، ⁴⁵PMSF، تترامتیل اتیلن دیامین (TEMED)، Na₂S₂O₃، Na₂CO₃، سولفات روی، پرسولفات، بتامرکاپتواتانول، گلایسین، آگار، رزین DEAE-Sepharose از شرکت Merck (Darmstadt, Germany) خریداری شد. همچنین قارچ *Macrophomiona phaseolina* از موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور تهیه شد.

۲-۳ محیط‌های کشت

جهت تکثیر قارچ *Macrophomiona phaseolina* از محیط مایع Potato Dextrose Broth (PDB) استفاده شد. جهت نگهداری قارچ، از محیط جامد Potato Dextrose Agar (PDA) استفاده شد. به منظور القای تولید آنزیم پلی گالاکتوروناز توسط قارچ *Macrophomiona phaseolina* از محیط تولید بهینه تغییر یافته اباذری و همکاران (۲۰) (۵ گرم در لیتر پلی گالاکترونیک اسید، ۳ گرم در لیتر سولفات آمونیوم، ۱۰ گرم در لیتر فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم، ۲ گرم در لیتر سولفات منیزیم، ۰/۷ میلی‌گرم در لیتر بورات سدیم، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر مولیبدات آمونیوم، ۱۰ میلی‌گرم فرسولفات آهن، ۰/۳ میلی‌گرم سولفات مس، ۰/۱۱ میلی‌گرم سولفات منگنز، ۱۷/۶ میلی‌گرم سولفات روی) استفاده شد. محیط‌های فوق، جهت استریل شدن در دمای ۱۲۱ °C به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. برای هر دو محیط pH = ۴ تنظیم گردید.

۳-۳ القای تولید آنزیم پلی گالاکتوروناز توسط قارچ *Macrophomiona phaseolina*

قارچ *Macrophomina phaseolina* پس از تکثیر در محیط مایع PDB، جهت نگهداری در محیط جامد PDA کشت شد. جهت القای تولید آنزیم پلی گالاکتوروناز، قارچ *M. phaseolina* در شرایط استریل از

⁴⁵. Phenylmethanesulfonyl fluoride

محیط PDA به محیط بهینه تولید پلی گالاکتوروناز منتقل گردید (قطعات ۱ سانتی متر مکعبی به ازای ۲۰۰ میلی لیتر محیط تولید آنزیم) و به مدت ۷۲ ساعت در شیکر انکوباتور (۳۵ درجه سانتی گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه) قرار گرفت.

۳-۴ خالص سازی نسبی آنزیم پلی گالاکتوروناز

محیط کشت حاوی قارچ تکثیر یافته، از کاغذ صافی عبور داده شد. به عصاره حاصل از صاف نمودن محیط کشت، محلول PMSF⁴⁶ (با غلظت نهایی ۱ میلی مولارد در محیط) اضافه گردید. مقدار ۱۰ میلی لیتر از عصاره جهت سنجش فعالیت آنزیمی و تعیین غلظت پروتئین در فالكون ۱۵ میلی لیتری ریخته و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس به منظور تغلیظ و کاهش حجم ۹۰۰ میلی لیتر محلول پروتئینی باقی مانده، ۵۴۷ گرم سولفات آمونیوم، در دمای ۴ درجه سانتی گراد به تدریج به محلول در حال هم زدن افزوده شد تا به ۸۰ درصد درجه اشباع برسد. میزان سولفات آمونیوم مورد نیاز برای این میزان درصد اشباع بر اساس محاسبه گردید. محلول حاوی سولفات آمونیوم به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد و سرعت $8000 \times g$ به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید، مایع رویی دور ریخته شد و رسوب بدست آمده، در حداقل حجم بافری (بافر استات ۲۰mM، pH = ۴/۰) حل شد. رسوب حاصل از افزودن سولفات آمونیوم دارای غلظت بالایی از نمک سولفات آمونیوم می باشد، قبل از اینکه رسوب پروتئینی، در مراحل بعد، روی ستون کروماتوگرافی برده شود، باید نمک اضافی را از آن جدا نمود که برای این منظور از کیسه دیالیز استفاده شد. محلول به مدت ۴۸ ساعت در اتاق سرد و بر روی دستگاه استیرر با سه بار تعویض بافر، دیالیز گردید. عصاره قبل از رسوب

⁴⁶. Phenylmethanesulfonyl fluoride

سولفات آمونیوم و محلول پروتئینی پس از دیالیز، مورد سنجش فعالیت پلی گالاکتورونازی و تعیین غلظت پروتئین قرار گرفتند. کروماتوگرافی تعویض یونی برای تخلیص آنزیم مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۵ سنجش فعالیت پلی گالاکتورونازی

میزان فعالیت پلی گالاکتورونازی محلول واکنش با استفاده از روش اسپکترومتری اندپوینت (end-point) تخمین زده شد. در این روش، محلول واکنش برای مدت زمان مشخصی انکوبه می گردد، سپس به وسیله حرارت یا معرف رنگی حاوی سود، واکنش را متوقف می نمایند و میزان فعالیت آنزیمی بر اساس میزان محصول تولیدی و یا سوبسترای مصرفی محاسبه می شود. فعالیت پلی گالاکتورونازی با اندازه گیری میزان واحدهای D-گالاکترونیک اسید آزاد شده (میزان محصولی که تولید شده است) به عنوان گروه های احیایی سنجیده می شود. محلول های مورد نیاز جهت سنجش فعالیت پلی گالاکتورونازی، شامل، محلول سوبسترای پلی گالاکترونیک اسید یک درصد وزنی/ حجمی در بافر استات ۲۰ میلی مولار (pH = ۴) و محلول رنگی ۳و۵-دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) می باشد. جهت تهیه محلول ۱ درصد وزنی حجمی پلی گالاکترونیک اسید (محلول سوبسترا)، ۰/۵ گرم پودر پلی گالاکترونیک اسید به ۵۰ میلی لیتر بافر استات سدیم ۲۰mM با pH = ۴ که در آستانه جوشیدن و در حال هم زدن بود افزوده شد و پس از سرد شدن در دمای محیط مورد استفاده قرار گرفت. جهت تهیه محلول رنگی ۳و۵-دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS)، مقدار ۱ گرم DNS را به ۵۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه و پس از هم زدن به تدریج ۳۰ گرم سدیم-پتاسیم تارتارات به آن افزوده شد. سپس ۲۰ میلی لیتر محلول هیدروکسید سدیم ۲ نرمال به آن اضافه گردید و با آب مقطر به حجم نهایی ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. این معرف تا دو هفته در دمای ۴ درجه سانتی گراد قابل استفاده است. جهت سنجش فعالیت پلی گالاکتورونازی، ۲۰۰ میکرولیتر محلول پروتئینی به ۲۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا افزوده شد. غلظت سوبسترا در محلول واکنش نباید عامل

محدود کننده سرعت باشد. در مورد نمونه شاهد ۲۰۰ میکرولیتر بافر به ۲۰۰ میکرولیتر محلول سوپسترا اضافه شد. ویال محتوی محلول واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری دمای °C ۵۰ قرار داده شدند. 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 $8000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و جذب مایع روئی در ۵۳۰ نانومتر خوانده شد. DNS قادر به شناسایی انتهای احیاکننده گروه هیدروکسیل (-OH) کربن شماره یک کربوهیدرات می-باشد و با آن تشکیل کمپلکسی می‌دهد که دارای جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر می‌باشد. نواحی احیای D-گالاکتورونیک اسید تولیدشده (در اثر فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز بر سوپسترای 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 پلی‌گالاکتورونازی بیشتر می‌باشد.

عصاره قبل از رسوب سولفات آمونیوم و محلول پروتئینی پس از دیالیز، مورد سنجش و مقایسه فعالیت پلی‌گالاکتورونازی قرار گرفتند.

۳-۶ به دست آوردن فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز بر حسب واحد آنزیمی

به منظور به دست آوردن فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیمی^{۴۷} منحنی استاندارد^{۴۸} رسم شد. غلظت-های متفاوت و متوالی ۰ تا ۲/۵ میلی‌مولار D-گالاکتورونیک اسید در بافر استات ۲۰ میلی‌مولار با $pH = 4$ تهیه گردید (۱۰ غلظت متفاوت). سپس به ۴۰۰ میکرولیتر از محلول‌های فوق، ۴۰۰ میکرولیتر محلول رنگی ۳ و ۵ دی نیترو سالیسیک اسید (DNS) افزوده شد. ویال‌ها به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار

⁴⁷. Enzyme activity unit

⁴⁸. Standard curve

داده شد. پس از خنک شدن در دمای اتاق در $g \times 8000$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ گردید و جذب مایع روئی در ۵۳۰ نانومتر خوانده شد. پس از ثبت جذب محلول‌های استاندارد D-گالاکتورونیک اسید و نمونه‌های آنزیمی، منحنی استاندارد (جذب در برابر غلظت‌های مختلف D-گالاکتورونیک اسید) رسم شد، به کمک این نمودار و با استفاده از فرمول زیر واحد آنزیمی محاسبه گردید:

واحد آنزیمی = D-گالاکتورونیک اسید آزاد شده (میکرومول)/ زمان سنجش (۳۰ دقیقه)

بر حسب تعریف یک واحد پلی‌گالاکتوروناز مقداری از آنزیم می‌باشد که یک میکرومولار قند احیایی را در یک دقیقه (دمای $50^{\circ}C$ و $pH = 4$) آزاد می‌کند زمانی که D-گالاکتورونیک اسید به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار می‌گیرد (میلر و همکاران، ۱۹۵۹). تعیین مدت زمان سنجش فعالیت آنزیمی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. برای این منظور، محلول واکنش که در آن غلظت سوبسترا محدود کننده سرعت فعالیت آنزیمی نباشد در زمان‌های متفاوت ۱ تا ۴۰ دقیقه مورد سنجش قرار گرفت و میزان جذب آن‌ها در ۵۳۰ نانومتر خوانده شد. نمودار میزان جذب در زمان‌های مختلف سنجش فعالیت آنزیمی ترسیم شد. مدت زمان تعیین شده باید در بازه میانه روبه بالای قسمت خطی نمودار قرار گیرد.

۳-۷ تعیین غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد

به منظور تعیین غلظت پروتئین، از روش برادفورد (۱۹۷۶) استفاده گردید. در این روش، غلظت پروتئین در نمونه با استفاده از رنگ کوماسی برلیانت بلو G-250 تعیین می‌شود. اتصال رنگ کوماسی به پروتئین، موجب تغییر رنگ محلول از قرمز به آبی می‌گردد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر، که مربوط به رنگ آبی است، اندازه‌گیری می‌شود. با مقایسه جذب نمونه‌های مجهول با منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های معلوم پروتئین آلبومین سرم گاوی، مقدار پروتئین نمونه‌های مجهول بدست می‌آید. جهت

تهیه معرف برادفورد ابتدا ۱۰۰ میلی گرم کوماسی برلیانت بلو G250⁴⁹ در ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد حجمی حجمی حل و سپس مقدار ۱۰۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد حجمی حجمی به آن افزوده شد، و در نهایت حجم نهایی با آب مقطر به ۱ لیتر رسانده شد. این محلول تا یک ماه در تاریکی و در دمای ۴ درجه سانتی گراد قابل استفاده است. برای رسم منحنی استاندارد، محلول استاندارد پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA⁵⁰)، با غلظت ۱ mg/ml تهیه شد. سپس به ترتیب مقادیر ۱، ۲، ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱، ۱۵ میکرولیتر از این محلول را در ۸ میکروتیوب ریخته و حجم نهایی آنها را با آب مقطر به ۱۰۰ میکرولیتر می رسانیم. از یک ویال حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر بدون آلبومین نیز، بعنوان شاهد استفاده گردید. ۱ میلی لیتر معرف برادفورد به آنها افزوده و محتویات لوله ها به خوبی مخلوط شد و پس از گذشت مدت زمان ۱۵ دقیقه، جذب نمونه ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. پس از ثبت جذب محلول های استاندارد آلبومین سرم گاوی، منحنی استاندارد (جذب در برابر غلظت های مختلف آلبومین سرم گاوی) رسم شد. به منظور سنجش غلظت محلول پروتئینی در مراحل مختلف خالص سازی پلی گالاکتورناز، به ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه آزمایشی، ۱ میلی لیتر محلول برادفورد افزوده شد. از یک ویال حاوی ۱۰۰ میکرولیتر بافر نیز، بعنوان شاهد استفاده گردید. جذب نمونه های مجهول در ۵۹۵ نانومتر خوانده شده و با استفاده از منحنی استاندارد مقدار پروتئین موجود در نمونه های مجهول، محاسبه گردید.

۳-۸ کروماتوگرافی تعویض یونی

کروماتوگرافی تعویض یونی (IEC)⁵¹، پروتئین ها را بر اساس تفاوت در بار سطحی جدا می کند. در این کروماتوگرافی، فاز ثابت از بستر سلولزی، پلی اکریل آمید با اتصالات عرضی یا پلی دکستران تشکیل شده است که این بستر به گروه های با بار مثبت یا منفی متصل می شود و برهمکنش ذرات با این فاز ماهیت

⁴⁹. Coomassie Brilliant Blue G-250

⁵⁰. Bovine serum albumin

⁵¹. Ion Exchange Chromatography

الکترواستاتیکی دارد. کروماتوگرافی تعویض آنیونی^{۵۲} دارای بستر کاتیونی مانند دی اتیل آمینو اتیل^{۵۳} (DEAE) و نوع تعویض کاتیونی^{۵۴} واجد بستر آنیونی مانند کربوکسی متیل^{۵۵} (CM) می باشد. قدرت اتصال پروتئین به فاز ثابت کروماتوگرافی تعویض یونی به pH و قدرت یونی محیط وابسته است و زمانی- که محلول پروتئینی به ستون تعویض یونی منتقل می شود^{۵۶}، قدرت برهمکنش هر پروتئین با ستون به بار خالص پروتئین در pH مورد استفاده بستگی دارد. بار خالص پروتئین ها بر اساس pH محیط، متغیر است. معمولا، زمانی که pH محیط، بالاتر از نقطه ایزوالکتریک (pI) پروتئین باشد، پروتئین مورد نظر به یک تعویض کننده آنیونی متصل می گردد. و زمانی که pH محیط، پایین تر از نقطه ایزوالکتریک (pI) پروتئین باشد، پروتئین مورد نظر به یک تعویض کننده کاتیونی متصل می گردد. به منظور جداسازی پروتئین ها از ستون، اغلب از شیب غلظت پیوسته یا ناپیوسته محلول نمکی نظیر NaCl استفاده می شود^{۵۷}. پروتئین هایی که برهمکنش ضعیف تری با بستر باردار ستون کروماتوگرافی دارند در غلظت نمک کمتر (قدرت یونی پایین تر) و آن هایی که برهمکنش قوی تری با این بستر دارند در غلظت نمک بالاتر (قدرت یونی بالاتر) از ستون خارج می شوند. به منظور خالص سازی پلی گالاکتوروناز قارچ *M. phaseolina* از کروماتوگرافی تعویض آنیونی استفاده شد. در این روش از رزین DEAE – سفارز استفاده گردید. قبل از بارگزاری نمونه بر روی ستون، ابتدا رزین مورد نظر آماده گردید.

۳-۸-۱ آماده سازی ستون کروماتوگرافی

جهت خالص سازی پروتئین مورد نظر، ستون کروماتوگرافی بر روی دستگاه کروماتوگرافی در دمای ۴

^{۵۲}. Anion exchange

^{۵۳}. Di Ethyl-Amino Ethyl

^{۵۴}. Cation exchange

^{۵۵}. Carboxymethyl

۶. در کروماتوگرافی تعویض یونی پروتئین ها در محیطی با قدرت یونی پایین وارد ستون می شوند و با قدرت یونی بالا از ستون خارج می شوند.

۱. برای ایجاد شیب پیوسته ی خطی غلظت نمک از دستگاه گرادیان ساز (Gradient maker) استفاده می شود.

درجه سانتی‌گراد نصب شد. سپس محلول اتانول ۲۰ درصد حجمی/حجمی روی رزین DEAE-Sepharose تخلیه شد و رزین به آرامی به ستون اضافه شد تا حدود ۷۰ درصد از حجم ستون، حاوی رزین گردید. رزین‌ها در بستر اتانول نگهداری شده‌اند، بنابراین به منظور خارج‌سازی اتانول از رزین، باقی‌مانده حجم ستون توسط بافر ۲۰ میلی‌مولار تریس باز (pH = ۸/۵) پر شد. پمپ دستگاه با سرعت ۱ دور در دقیقه، به مدت ۲۴ ساعت روشن شد تا اتانول کاملاً شسته شود و جای آن بافر تریس کاملاً در روزنه‌های بستر (رزین) قرار گیرد و بستر درون لوله ته نشین گردد. از دو بافر A (تریس-باز ۲۰ میلی‌مولار، (pH=۸/۴)) و B (تریس-باز ۲۰ میلی‌مولار حاوی ۶۰ میلی‌مولار نمک طعام، (pH=۸/۴)) جهت انجام تکنیک کروماتوگرافی تعویض یونی استفاده شد.

۳-۸-۲ تخلیص آنزیم پلی‌گالاکتوروناز

بعد از اینکه دستگاه کروماتوگرافی آماده گردید و برنامه لازم جهت خالص‌سازی به آن داده شد، ۱ میلی‌لیتر از محلول پروتئینی رسوب آمونیوم سولفات، به ستون کروماتوگرافی تزریق گردید. در پایان کروماتوگرافی، ۵۵ فراکشن با حجم ۲ میلی‌لیتر جمع‌آوری گردید، که جهت بررسی حضور پروتئین، جذب فرکشن‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده‌شد و کروماتوگرام آن‌ها با استفاده از برنامه Excel ترسیم گردید. فرکشن‌های حاوی پروتئین (راس پیک‌ها) مورد سنجش فعالیت پلی‌گالاکتورونازی قرار گرفتند. فرکشن‌هایی که دارای فعالیت پلی‌گالاکتورونازی بودند جهت اثبات وجود آنزیم بر روی ژل SDS-PAGE برده شدند.

۳-۹ الکتروفورز در ژل پلی‌اکریلامید در حضور سدیم دودسیل سولفات

تکنیک SDS-PAGE روشی کم‌هزینه، سریع و تکرارپذیر در مطالعه پروتئین‌ها است. این روش به طور معمول جهت بررسی مراحل خالص‌سازی، محاسبه مقدار نسبی و تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها و

پپتیدها به کار می‌رود. قابلیت تفکیک پروتئین‌ها در SDS-PAGE، ناشی از وجود سدیم دودسیل سولفات (SDS) و ویژگی مناسب پلی‌اکریلامید در غربال پروتئین‌های با اندازه مولکولی متفاوت می‌باشد. قطر منافذ ژل پلی‌اکریلامید، متأثر از غلظت دو جزئی سازنده آن است و دامنه وزنی قابل تفکیک در SDS-PAGE را تعیین می‌نماید.

جهت انجام الکتروفورز به روش SDS-PAGE، به دو ژل با درصدهای متفاوت نیاز می‌باشد. ژل جداکننده^{۵۸} برای جداسازی باندهای پروتئینی استفاده می‌شود و یک ژل تغلیظ کننده^{۵۹} که برای تغلیظ نمونه‌ها به کار می‌رود. نحوه تهیه و ترکیبات این دو ژل به این صورت می‌باشد، محلول استوک آکریلامید (۳۰/۸)، ۳۰ گرم آکریلامید و ۰/۸ گرم بیس آکریلامید در زیر هود وزن و به ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و حل گردید و در نهایت حجم نهایی با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. این محلول تا یک ماه در تاریکی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قابل استفاده است. بافر ژل پایین، بافر ۱۸/۲ درصد وزنی حجمی تریس باز، حاوی ۰/۴ درصد وزنی حجمی SDS، (pH = ۸/۸). بافر ژل بالا، بافر ۶/۱ درصد وزنی حجمی تریس باز، حاوی ۰/۴ درصد وزنی حجمی SDS، (pH = ۶/۸). بافر الکتروود (بافر مخازن)، بافر ۳ درصد وزنی حجمی تریس باز، ۱۴/۴ درصد وزنی حجمی گلیسین و ۱ درصد وزنی حجمی SDS، (۸/۳) (pH = ۸). بافر نمونه، حاوی ۱۰ میلی‌لیتر بافر ژل بالا، ۲۵ درصد حجمی گلیسرول، ۵ درصد وزنی حجمی SDS، ۲/۵ درصد وزنی حجمی محلول برموفنل بلو (۰/۱ درصد حجمی در اتانول) و ۵ درصد حجمی حجمی ۲-مرکاپتواتانول. پر سولفات آمونیوم ۱۰ درصد وزنی حجمی. تترامتیل‌اتیلن‌دیامین (TEMED) ۱۰ درصد حجمی حجمی. محلول رنگ‌آمیزی، ۱۲۵ میلی‌لیتر محلول ۲/۵ درصد وزنی حجمی کوماسی بلو R-۲۵۰ در متانول، ۲۵ میلی‌لیتر اسید استیک و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب. این محلول به عنوان محلول ثبوت (فیکس کننده) پروتئین‌ها عمل می‌کند. محلول رنگ‌بر، ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول، ۱۰۰

⁵⁸ Resolving gel

⁵⁹ Stacking gel

میلی لیتر اسیداستیک و ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر با یکدیگر مخلوط شدند. به منظور تهیه ژل SDS-PAGE ابتدا صفحات شیشه‌ای کاملاً تمیز شدند. سپس فاصله اندازه‌ها در بین صفحات شیشه‌ای قرار داده شد. و با چند گیره آن را محکم و به صورت عمودی روی سطحی صاف قرار داده شد. جهت جلوگیری از نشست محلول در حد فاصل شیشه‌ها و فاصله‌اندازه‌ها، از آگارز داغ (۰/۵ درصد) استفاده شد. محلول ژل پایین (ژل جداکننده) ۱۲/۵ درصد تهیه شد. اجزای ژل پایین غیر از TEMED در ظرفی مناسب مخلوط شد. TEMED اضافه و پس از هم زدن به سرعت و دقت در قالب شیشه‌ای تا ارتفاع مناسب ریخته شد، به طوری که حدود ۳ سانتی متر فضا برای ژل بالا باقی ماند. حدود ۰/۵ میلی لیتر ایزوپروپانول با سرنگ یا پاستور پیپیت به آرامی از کناره شیشه روی سطح ژل ریخته شد، به نحوی که با ژل مخلوط نگردد. انعقاد ژل پایین معمولاً ۴۵-۱۵ دقیقه طول می‌کشد. بعد از پلیمریزاسیون ژل پایین، محلول ژل بالا (ژل متراکم کننده) آماده شد. غلظت این ژل ۵ درصد بود. اجزای ژل بالا غیر از TEMED در ظرف مناسبی مخلوط گردید. ایزوپروپانول روی ژل پایین را کاملاً تخلیه شد و با آب مقطر نیز شسته شد. به بقیه محلول ژل بالا TEMED اضافه شد و پس از هم زدن سریعاً تا ارتفاع مناسب روی ژل پایین ریخته شد و شانه جهت آماده‌سازی چاهک تزریق نمونه بر روی آن قرار گرفت. به طوری که دندان‌های آن ۱/۵ سانتی‌متر از سطح ژل پایین فاصله داشت. ژل بالا معمولاً در کمتر از ۱۵ دقیقه پلیمریزه می‌شود. سپس شانه و فاصله‌انداز و آگارز پایین و از حد فاصل شیشه‌ها خارج شد. قالب شیشه‌ای را با چند گیره به تانک الکتروفورز متصل و مخازن تا ارتفاع مناسب با بافر الکتروود پر شد. هر گونه حباب هوا در انتهای ژل با تزریق بافر توسط سرنگ خارج نموده شد. ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های پروتئینی به ۸۰ میکرولیتر بافر نمونه اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد. سپس با سمپلر مناسب ۲۵ میکرولیتر از هر نمونه به دقت در چاهک‌ها ریخته شد. مقدار پروتئین لازم در هر چاهک بستگی به میزان خلوص نمونه و روش رنگ‌آمیزی دارد. الکتروفورز ژل در بافر تانک با ولتاژ ۱۰۰ ولت، به مدت ۴ ساعت انجام گرفت. بعد از ۴ ساعت جریان قطع و قالب

شیشه‌ای از تانک الکتروفورز جدا گردید. با قرار دادن یک قاشق فلزی نازک در حد فاصل شیشه‌ها و چرخاندن آرام آن، شیشه بالا جدا شد. سپس ژل توسط آب مقطر به آرامی به‌درون ظرف رنگ آمیزی هدایت شد.

۳-۹-۱ رنگ آمیزی ژل با کوماسی بلو R-۲۵۰

ژل در ظرف فلزی قرار داده شد. مقدار کافی از محلول رنگ آمیزی اضافه شد. درب ظرف را بسته و به مدت ۱ ساعت روی شیکر با حرکت آرام قرار داده شد. محلول رنگ تخلیه، ژل با آب مقطر شسته و سپس محلول رنگ بر اضافه شد. درب ظرف را بسته، آن را روی شیکر قرار داده و پس از تیره شدن ظرف محلول رنگ، آن را با محلول تازه تعویض شد. این عمل چندین بار تکرار شد تا زمینه ژل شفاف شد و باندهای پروتئینی به وضوح دیده شدند. ژل را در محلول ۷ درصد اسید استیک قرار داده و درب ظرف بسته شد. ژل در این حالت برای مدت طولانی قابل نگهداری است.

۳-۹-۲ رنگ آمیزی ژل با نیترات نقره

ابتدا ژل به مدت ۳۰ دقیقه در محلول حاوی ۲/۵ میلی‌لیتر اتانول، ۵ میلی‌لیتر لیتراسدستیک که توسط آب دیونیزه به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد، قرار داده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۱۰ درصد حجمی / حجمی اتانول قرار داده شد. ژل ۳ مرتبه با آب دیونیزه و هر بار به مدت ۱ دقیقه شستشو گردید. ژل به مدت ۲ دقیقه در محلول ۴ درصد $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ قرار داده شد. سپس ژل در محلولی حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم نیترات نقره که با آب دیونیزه به حجم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد، به مدت ۲۵ دقیقه و در تاریکی قرار داده شد. شستشوی ژل برای ۳ بار و هر بار ۱ دقیقه انجام شد. محلول حاوی، ۳ گرم Na_2CO_3 ، ۵۰ میکرولیتر فرم‌آلدهید و ۲ میلی‌لیتر $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ تهیه و ژل در این محلول قرار گرفت و

شیک گردید. به محض مشاهده باندهای پروتئینی، ژل به محلول متوقف کننده (محلول ۱۰ درصد اسید استیک) منتقل شد.

۳-۱۰ بررسی تأثیر pH بر روی فعالیت آنزیم و بدست آوردن pH بهینه (pH Profile)

جهت بررسی تأثیر pH بر روی فعالیت آنزیم، ابتدا محلول سوبسترای پلی گالاکتورونیک اسید در بافر مخلوط ۵۰ میلی مولار حاوی فسفات سدیم، استات سدیم و گلیسین در pH های ۲ تا ۱۲ تهیه گردید. محلول آنزیمی به سوبسترای آماده شده در pH های مختلف افزوده شد. pH نهایی مخلوط سوبسترا و آنزیم با کاغذ pH متر چک شد. ویال های حاوی مخلوط واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری دمای ۵۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس از طریق سنجش فعالیت آنزیمی، جذب هر کدام از نمونه ها در ۵۳۰ نانومتر خوانده شد.

۳-۱۱ بررسی تاثیر دما بر فعالیت آنزیم و بدست آوردن دمای بهینه (Temperature Profile)

جهت بررسی تاثیر دما بر فعالیت آنزیم، ابتدا محلول سوبسترای پلی گالاکتورونیک اسید در بافر استات سدیم ۲۰ میلی مولار با pH بهینه فعالیت آنزیم تهیه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا و ۲۰۰ میکرولیتر آنزیم، به طور جداگانه در دمای مورد نظر به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد (به منظور ایجاد تعادل دمایی). سپس سوبسترا و آنزیم، مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دماهای ۱۰ تا ۹۰ درجه سانتی-گراد قرار گرفت. در این آزمون شاهد شامل بافر و سوبسترا تعیین شد. 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 نمونه ها در ۵۳۰ نانومتر خوانده شد.

۳-۱۲ تعیین پارامترهای کینتیکی

هنری- میکائیلیس- منتن^{۶۰} جهت بررسی کمی کینتیک واکنش آنزیمی بر اساس تغییرات غلظت سوبسترا، فرض نمودند که اگر غلظت سوبسترا [S] در آغاز واکنش خیلی بالاتر از غلظت آنزیم [E] باشد تعادل سریعی بین مواد واکنش کننده (E+S) و کمپلکس آنزیم و سوبسترا (ES) ایجاد می‌شود و پس از این تعادل سریع است که تبدیل کمپلکس ES به مجموعه محصول و آنزیم (E+P) با سرعت کمتری آغاز می‌شود. در این رابطه، آن‌ها معادله کینتیکی آنزیم‌ها را به صورت معادله‌ی $V/V_{max}=[S]/(K_m+[S])$ تعریف نمودند. منحنی حاصل از معادله میکائیلیس- منتن (نمودار سرعت واکنش علیه غلظت سوبسترا) به صورت هذلولی (هایپربولیک) می‌باشد (شکل ۳-۱)، لذا کینتیک میکائیلیس-منتن، کینتیک هایپربولیک^{۶۱} نامیده می‌شود. کینتیک آنزیم‌هایی که از معادله‌ی میکائیلیس- منتن انحراف نشان می‌دهند، دارای منحنی غیر اشباع (سرعت علیه غلظت سوبسترا) و غیر هایپربولیک (شکل ۳-۱) می‌باشد و به آن کینتیک غیر هایپربولیک^{۶۲} اطلاق می‌شود.

محاسبه پارامترهای کینتیکی (V_{max} و $K_{0.5}$) پلی‌گالاکتوروناز، با استفاده از غلظت‌های مختلف سوبسترای آنزیم (پلی‌گالاکتورونیک اسید) و از رسم و بررسی نمودار تغییرات سرعت در غلظت‌های مختلف سوبسترا صورت گرفت. بدین منظور فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف پلی‌گالاکتورونیک اسید در شرایط دما و pH بهینه بر حسب میکرومول بر دقیقه ($\mu\text{mol}/\text{min}$) اندازه‌گیری شد.

میزان K_{cat} (turn over number) با استفاده از رابطه (۱) محاسبه می‌شود:

$$K_{cat} = V_{max}/[E] \quad (1)$$

⁶⁰. Henri-Michaelis-Menten

⁶¹. Hyperbolic Kinetic

⁶². Non Hyperbolic Kinetic

میزان V_{max} سرعت بیشینه بر حسب میکرومول بر دقیقه و میزان K_{cat} بیانگر این است که چند میکرومول محصول در یک واحد زمانی از یک میکرو مول آنزیم بدست می‌آید. هر چه آنزیم سریعتر باشد K_{cat} بالاتری دارد. میزان K_{cat} وابسته به غلظت آنزیم نمی‌باشد.

میزان فعالیت ویژه آنزیم با استفاده از رابطه (۲) محاسبه می‌شود:

$$\text{Specific Activity} = \text{Activity} / [\text{protein}]_{(mg)} \quad (2)$$

هر چه نمونه خالص‌تر باشد، دارای فعالیت ویژه بیشتری می‌باشد.

میزان کارایی کاتالیتیکی (Catalytic efficiency) با استفاده از رابطه (۳) محاسبه می‌شود:

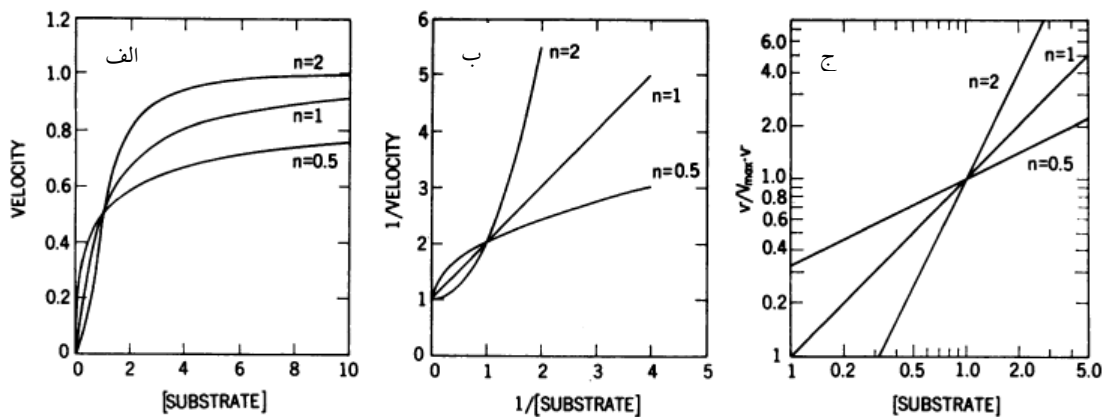
$$\text{Catalytic efficiency} = K_{cat} / K_{0.5} \quad (3)$$

$K_{0.5}$ میزان غلظت سوبسترا در زمانی است که سرعت واکنش نصف سرعت بیشینه (V_{max}) می‌باشد و بیانگر میزان تمایل آنزیم به سوبسترا می‌باشد. هر چه میزان این پارامتر برای یک آنزیم بزرگ‌تر باشد تمایل آنزیم به سوبسترا کم‌تر می‌باشد.

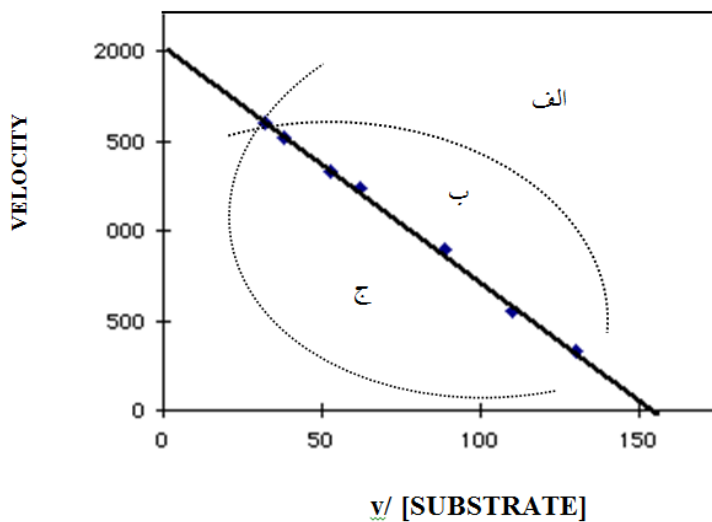
به منظور تعیین میزان حساسیت واکنش آنزیمی (response sensitivity) به تغییرات غلظت سوبسترا از رابطه (۴) استفاده می‌شود:

$$R_s = [S]_{0.9} / [S]_{0.1} \quad (4)$$

$[S]_{0.1}$ و $[S]_{0.9}$ به ترتیب، میزان غلظت سوبسترا در زمانی است که سرعت واکنش $0.1/$ و $0.9/$ سرعت بیشینه می‌باشد. هر چه میزان R_s کمتر باشد آنزیم نسبت به تغییرات غلظت سوبسترا از حساسیت بیشتری برخوردار می‌باشد.



شکل ۱-۳ نمودار الف) سرعت آنزیم در برابر غلظت‌های مختلف سوبسترا (میکائیلیس-منتون) ب) معکوس دوطرفه سرعت آنزیم در برابر غلظت‌های مختلف سوبسترا (لاین ویوربورک) ج) تغییرات $v/V_{max} - v$ در برابر غلظت‌های مختلف سوبسترا (هیل)، به ازای مقادیر مختلف ضریب هیل (n). این نمودارها در شرایط V_{Max} و K برابر با یک و به ازای ۲ و ۱ و $n = 0.5$ رسم شده‌است (یوکاوا و همکاران، ۱۹۹۳).



شکل ۲-۳ نمودار ادی-هافستی پروتئینی با n جایگاه اتصال، الف) حالتی را نشان می‌دهد که بین جایگاه‌ها، پدیده تعاونی مثبت وجود دارد، ب) معرف حالتی است که جایگاه‌های اتصال مستقل از یکدیگر هستند، ج) حالتی را نشان می‌دهد که بین جایگاه‌ها پدیده تعاونی منفی وجود دارد.

۳-۱۳ تعیین الگوی کینتیک آنزیم و وضعیت تعاون اتصال

جهت بررسی الگوی کینتیک و وضعیت تعاون اتصال در آنزیم، نمودار هیل^{۶۳} و نمودارهای لینویور – بورک^{۶۴} و ادی – هافستی^{۶۵} رسم شد. نمودار هیل از طریق بررسی تغییرات $v/V_{max}-v$ در غلظت‌های مختلف سوبسترا و در مقیاس لگاریتمی رسم شد. در این رابطه v سرعت واکنش آنزیمی در غلظت مشخصی از سوبسترا و V_{max} سرعت بیشینه می‌باشد. شیب این نمودار معادل ضریب هیل^{۶۶} (n_H) می‌باشد. براساس این ضریب، میزان و وضعیت تعاون اتصال سوبسترا توصیف می‌گردد (گوتل و همکاران، ۲۰۰۸). به‌طور معمول ضریب هیل معادل تعداد جایگاه اتصال در آنزیم نمی‌باشد. تنها در صورتی که آنزیم دارای تعاون بسیار بالا باشد، ضریب هیل معادل تعداد جایگاه اتصال سوبسترا در آنزیم خواهد بود. میزان حساسیت واکنش آنزیمی نسبت به تغییرات غلظت سوبسترا ($R_s = [S]_{0.9}/[S]_{0.1}$)، در ارتباط با ضریب هیل، الگوی تعاون را توصیف می‌نماید. چنانچه $n_H = 1$ ، آنزیم هایپربولیک و دارای ثابت تمایل به سوبسترا می‌باشد و نسبت به تغییرات غلظت سوبسترا، از حساسیت و واکنش نرمال برخوردار است. آنزیم‌های غیرهایپربولیک با الگوی تعاون مثبت، از حساسیت فوق‌العاده نسبت به تغییرات غلظت سوبسترا برخوردار می‌باشند؛ در این راستا به‌ازای $n_H > 1$ و n جایگاه اتصال سوبسترا در آنزیم، تغییرات بسیار کم در غلظت سوبسترا، موجب افزایش فوق‌العاده فعالیت آنزیم می‌گردد. در آنزیم‌های غیرهایپربولیک با الگوی تعاون منفی، $n_H < 1$ می‌باشد، در این حالت تغییرات بسیار زیاد غلظت سوبسترا، حتی تا ۱۰۰۰ برابر غلظت اولیه، قادر به افزایش فعالیت آنزیمی تا ۰/۹ سرعت بیشینه نخواهد بود (شکل ۳-۱).

جهت محاسبه تعداد جایگاه اتصال سوبسترا در آنزیم (n) از رابطه (۵) استفاده می‌شود:

$$n = \log 81 / \log [S]_{0.9} / [S]_{0.1} \quad (۵)$$

63. Hill Plot

64. Lineweaver – Burk Plot

65. Eadie – Hofstee Plot

66. Hill coefficient

میزان تمایل آنزیم به سوبسترا به‌زای یک جایگاه اتصال با استفاده از رابطه (۶) محاسبه می‌شود:

$$K' = ([S]_{0.5})^n \quad (۶)$$

ثابت آلوستریک ($L = [E_T] / [E_R]$) و دو پارامتر ضروری جهت توصیف میزان تعاون در آنزیم‌های آلوستریک می‌باشند. در این رابطه $[E_T]$ ، میزان کانفورماسیون غیرفعال (T) آنزیم و $[E_R]$ میزان کانفورماسیون فعال (R) آنزیم می‌باشد. مقادیر بالاتر ثابت آلوستریک (L) نشان می‌دهد، آنزیم بیشتر به صورت کانفورماسیون T است و به عبارت دیگر میزان فعالیت آنزیم در غلظت‌های پایین سوبسترا بسیار کم می‌باشد. میزان K_R معرف ثابت اتصال، در زمان اتصال قوی در کانفورماسیون R و میزان K_T بیانگر ثابت اتصال، در زمان اتصال ضعیف در کانفورماسیون T می‌باشد. زمانی که کانفورماسیون T تمایلی به سوبسترا نداشته باشد، میزان c برابر با صفر می‌شود.

جهت خطی نمودن نمودار میکائیلیس-منتن، از معادله لینیویر-بورک استفاده می‌شود. متغیرها در این معادله خطی و درجه اول، $1/V_0$ و $1/[S]$ می‌باشند. چنانچه نمودار لینیویر-بورک آنزیمی، خطی نباشد، معادله میکائیلیس-منتن در مورد آن آنزیم صدق نمی‌نماید. در این راستا چنانچه نمودار به صورت خطی با تقعر به سمت بالا یا پائین باشد به ترتیب دارای الگوی تعاون مثبت و یا منفی می‌باشد (شکل ۱-۳). علاوه بر معادله درجه اول لینیویر-بورک، معادله درجه اول دیگری موسوم به معادله ادی-هافستی از معادله میکائیلیس-منتن به دست می‌آید که انحراف از خط راست را به شکل موثرتری نشان می‌دهد. متغیرها در این معادله خطی و درجه اول، $V_0/[S]$ و V_0 می‌باشند. هرگاه آنزیم از معادله میکائیلیس-منتن پیروی نکند و بین جایگاه‌های اتصال، برهمکنش تعاونی مثبت باشد، این نمودار به صورت قله و در صورتی که بین جایگاه‌ها برهم‌کنش تعاونی منفی باشد، نمودار ادی-هافستی به صورت دره دیده می‌شود (شکل ۲-۳).

۳-۱۴ بررسی اثر یون‌ها، شلات‌کننده‌ها و ترکیبات شیمیایی بر فعالیت آنزیم

غلظت‌های مورد نظر از یون‌ها و ترکیبات، در بافر ۲۰ mM استات سدیم با (pH = ۴) تهیه و فعالیت نسبی آنزیم در حضور این ترکیبات مورد سنجش قرار گرفت. ضمناً فعالیت آنزیم در شرایط مختلف نسبت به فعالیت آن در بافر بدون هیچ افزودنی به دست آمد. در تهیه محلول‌های فوق باید به این نکته توجه شود که پس از اضافه نمودن ترکیب مورد نظر pH بافر در صورت تغییر تنظیم شود.

نمودار مقایسه کینتیک اشباع آنزیم در غلظت‌های گوناگون افکتورها رسم شد. نمودار Dose-Response نیز جهت تعیین IC_{50} افکتورهای منفی رسم شد. همچنین نمودار هیل افکتورهای گوناگون آنزیم جهت بررسی الگوی تعاونی اتصال آن‌ها به آنزیم رسم شد. نمودار کینتیک اشباع سوبسترای پلی‌گالاکتوروناز در حضور برخی از افکتورها رسم شد. جهت رسم این نمودار میزان فعالیت آنزیم در غلظت‌های گوناگون سوبسترا و در حضور انواع افکتورها بررسی گردید. افکتورهای منفی و مثبت به لحاظ الگوی بازدارندگی و فعال‌سازی (نوع V یا نوع K) ارزیابی شدند. در این راستا تغییرات در میزان V_{max} ، $K_{0.5}$ ، K_{cat} و ضریب هیل، ثابت آلوستریک و میزان c در پلی‌گالاکتوروناز مورد بررسی با سوبسترای پلی-گالاکتورونیک اسید در حضور برخی از افکتورها بررسی گردید. همچنین نمودار دیکسون^{۶۷} برخی از موثرترین افکتورها جهت تعیین میزان K_i و مکانیسم بازدارندگی ترسیم گردید. در ادامه به بررسی نحوه رسم نمودارها و محاسبه پارامترهایی که عنوان گردید، می‌پردازیم.

۳-۱۴-۱ رسم نمودار Dose-Response جهت تعیین میزان IC_{50} افکتورها

نمودار Dose-Response جهت تعیین تعادل پروتئین - لیگاند به کار می‌رود. همچنین این نمودار جهت بررسی تاثیر یک بازدارنده بر سرعت اولیه یک کوکتل آنزیمی در غلظت مشخصی از سوبسترا و نیز مقایسه

⁶⁷. Dixon Plot

قدرت بازدارندگی ترکیبات مختلف بر همان آنزیم استفاده می‌شود. در این نمودار میزان تغییرات کسر فعالیت^{۶۸} (V_i/V_0) در غلظت‌های گوناگون بازدارنده (در مقیاس لگاریتمی) بررسی می‌شود. غلظتی از بازدارنده که در آن میزان فعالیت آنزیم به نصف فعالیت اولیه کاهش می‌یابد را IC_{50} گویند. به عبارت دیگر IC_{50} ، غلظتی از بازدارنده می‌باشد که در آن $V_i/V_0 = 0.5$ است. هنگام تعیین میزان IC_{50} ، باید مسائل گوناگون مانند شرایط محلول واکنش کنترل شود.

۳-۱۴-۲ تعیین الگوی کینتیک اشباع آنزیم در غلظت‌های گوناگون افکتور

کینتیک اشباع تاثیر افکتورها بر فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز، تحت شرایط بهینه سنجش فعالیت آنزیمی و در غلظت اشباع سوبسترا به صورت تغییرات فعالیت آنزیم بر حسب میکرومول بر دقیقه ($\mu\text{mol}/\text{min}$) در غلظت‌های گوناگون افکتور بیان گردید. این نمودار جهت نشان دادن غلظت اشباع از افکتور برای آنزیم مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۳-۱۴-۳ تعیین وضعیت تعاونی اتصال افکتور به آنزیم

جهت بررسی وضعیت تعاون اتصال افکتورها به آنزیم، نمودار هیل رسم شد. این نمودار از طریق بررسی تغییرات fractional inhibition/1-fractional inhibition در غلظت‌های مختلف افکتور منفی و در مقیاس لگاریتمی رسم شد. در این رابطه fractional inhibition، کسر مهار می‌باشد و با استفاده از رابطه زیر محاسبه می‌شود:

$$\text{fractional inhibition} = V_i/V_0$$

در رابطه بالا V_i و V_0 به ترتیب، سرعت آنزیم در شرایط حضور و بدون حضور مهارکننده می‌باشد.

⁶⁸. Fractional activity

در مورد افکتورهای مثبت، این نمودار از طریق بررسی تغییرات $\log V_0 + \log (1/V + 1/V_0)$ در غلظت-های مختلف فعال کننده و در مقیاس لگاریتمی رسم شد. در این رابطه نیز V_0 و V به ترتیب، سرعت آنزیم در شرایط حضور و بدون حضور فعال کننده می باشد.

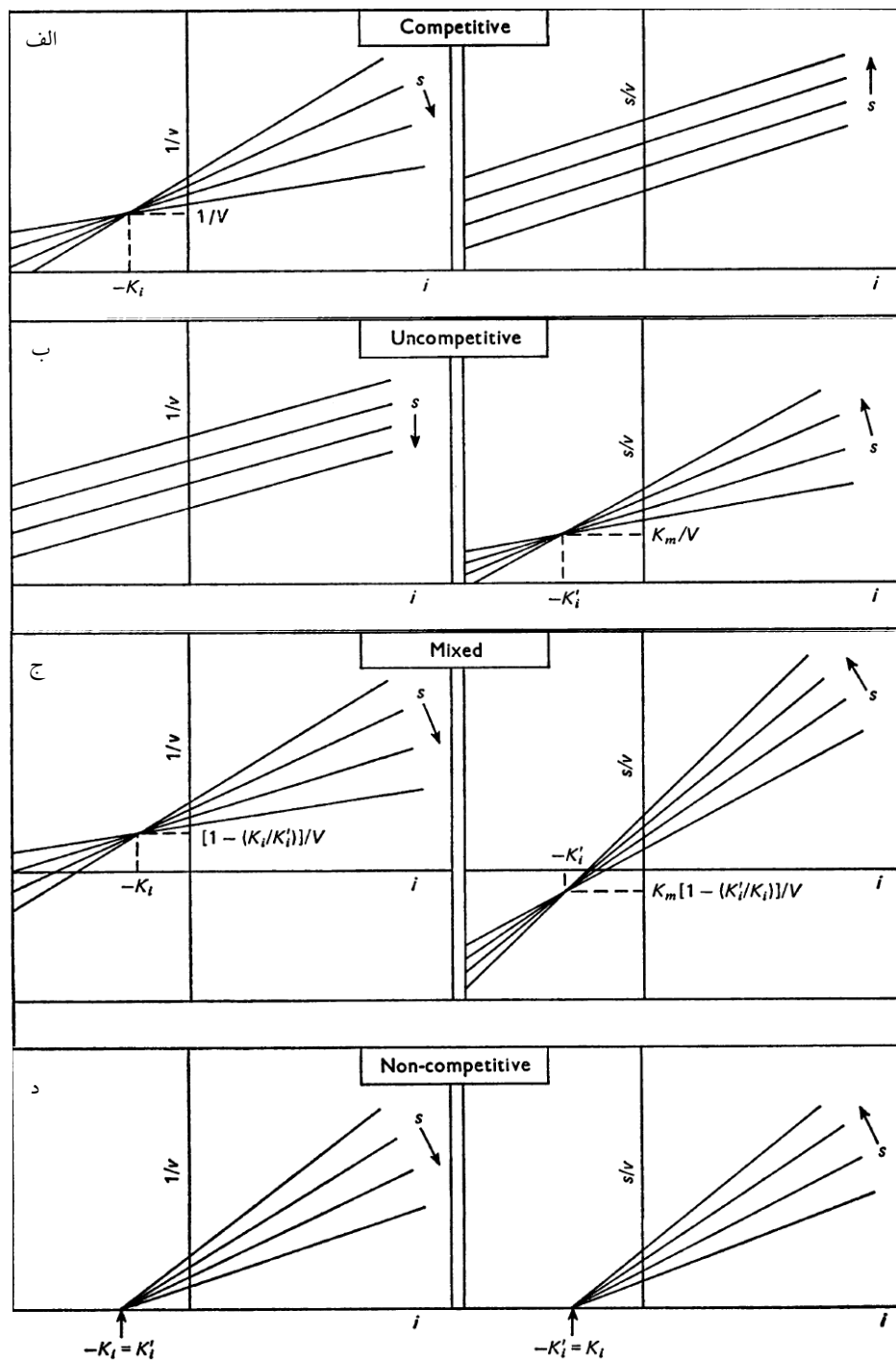
۳-۱۴-۴ رسم نمودار دیکسون جهت تعیین میزان K_i

روش بسیار مناسب جهت تعیین میزان K_i (تمایل آنزیم به بازدارنده)، K_i' (تمایل کمپلکس آنزیم و سوبسترا به بازدارنده) و مکانیسم بازدارندگی برای انواع مهارکننده‌ها، توسط دیکسون (۱۹۵۳) پیشنهاد شد. در این روش سرعت اولیه و فعالیت آنزیمی به عنوان تابعی از غلظت‌های گوناگون بازدارنده در دو یا چند غلظت مختلف سوبسترا بیان می شود. سرعت آنزیمی تغییر یافته، به صورت $1/V$ (محور عمودی) در برابر غلظت‌های گوناگون بازدارنده $[I]$ (محور افقی) و برای هر یک از غلظت‌های گوناگون سوبسترا رسم می شود. از امتداد محل تقاطع این خطوط با محور افقی، میزان $K_i -$ محاسبه می شود. همچنین توسط نمودار s/v در برابر i و از امتداد محل تقاطع خطوط، $K_i' -$ محاسبه می شود (شکل ۳-۳).

۳-۱۵ بررسی پایداری آنزیم

ساختمان فضایی پروتئین‌ها اغلب واجد پایداری و استحکام زیادی نیست و با از بین رفتن برهمکنش‌های ضعیف فیزیکی پایدارکننده، دناتوره^{۶۹} می شوند. تغییرات pH و گرما از جمله عوامل دناتوره کننده ساختمان پروتئین است. بررسی تاثیر این عوامل بر میزان پایداری پروتئین‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است. در ادامه به بیان نحوه بررسی تاثیر تغییرات pH و گرما بر میزان پایداری

⁶⁹ Denaturation



شکل ۳-۳: نمودارهای خطی دیکسون ($1/v$ در برابر i) و s/v در برابر s جهت توصیف انواع مکانیسم بازدارندگی آنزیمی، الف) مهار رقابتی، ب) مهار غیر رقابتی، ج) مهار مخلوط، د) مهار نارقابتی، با استفاده از نمودار دیکسون، ($1/v$ در برابر i) و از امتداد محل تقاطع خطوط با محور افقی، میزان K_i محاسبه می‌شود. همچنین توسط نمودار s/v در برابر s و از امتداد محل تقاطع خطوط K_i' محاسبه می‌شود.

پلی‌گالاکتوروناز خالص‌سازی شده از قارچ *M. phaseolina* و محاسبه پارامترهای ترمودینامیکی غیر فعال‌سازی این آنزیم می‌پردازیم.

۳-۱۵-۱ بررسی پایداری آنزیم در pHهای مختلف (pH Stability)

جهت بررسی پایداری آنزیم در pHهای مختلف، ابتدا بافر مخلوط ۵ میلی‌مولار از فسفات سدیم، استات سدیم و گلابسین در pHهای ۳ تا ۱۲ تهیه شد. محلول‌های آنزیمی به هر یک از بافرهای مخلوط (pH-های ۳ تا ۱۲) افزوده شد و pH نهایی هر یک از بافرها با کاغذ pH متر کنترل شد و این محلول‌های آنزیمی در pHهای مختلف به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از گذشت این زمان، محلول سوبسترای پلی‌گالاکتورونیک اسید که در بافر استات سدیم ۲۰ میلی‌مولار و در pH بهینه فعالیت آنزیم تهیه شده بود به نمونه‌ها افزوده شد و ویال‌های محتوی محلول واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در بن-ماری و در دمای بهینه فعالیت آنزیم قرار گرفت. سپس از طریق سنجش فعالیت آنزیمی، جذب هر کدام از نمونه‌ها در ۵۳۰ نانومتر خوانده شد.

۳-۱۵-۲ بررسی پایداری آنزیم نسبت به pHهای ۳، ۷، ۱۲ در زمان‌های مختلف

جهت بررسی پایداری آنزیم در pHهای ۳، ۷ و ۱۲ در زمان‌های مختلف، ابتدا بافر مخلوط ۵ میلی‌مولار از فسفات سدیم، استات سدیم و گلابسین در pHهای ۳، ۷ و ۱۲ تهیه شد. محلول‌های آنزیمی به هر یک از بافرهای مخلوط (pHهای ۳، ۷ و ۱۲) افزوده شد و pH نهایی هر یک از بافرها با کاغذ pH متر کنترل شد و این محلول‌های آنزیمی در pHهای مختلف در زمان‌های صفر تا ۱۸۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از گذشت این زمان، محلول سوبسترای پلی‌گالاکتورونیک اسید که در بافر استات سدیم ۲۰ میلی‌مولار و در pH بهینه فعالیت آنزیم تهیه شده بود به نمونه‌ها افزوده شد و ویال‌های محتوی محلول

واکنش به مدت 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 خوانده شد.

۳-۱۵-۳ بررسی غیرفعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم در درجه حرارت‌های مختلف

ابتدا ویال‌های حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محلول آنزیمی در دماهای ۱۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه شدند. بعد از گذشت این زمان، ۲۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترای پلی‌گالاکتورونیک اسید که در بافر استات سدیم ۲۰ میلی‌مولار و در pH بهینه فعالیت آنزیم تهیه شده بود به نمونه‌ها افزوده شد و ویال‌های محتوی محلول واکنش به مدت 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 خوانده شد.

۳-۱۵-۴ بررسی غیر فعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم در زمان‌های مختلف و در درجه

حرارت‌های ۵۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد

ابتدا ویال‌های حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محلول آنزیمی در دماهای ۵۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد (افت دمایی در آزمون قبل از دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد شروع شد) در زمان‌های صفر تا ۱۸۰ دقیقه انکوبه شدند. نمونه‌ها در فواصل دمایی مشخص برداشته و بلافاصله به یخ منتقل شدند. پس از جمع‌آوری همه نمونه‌ها، ۲۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترای پلی‌گالاکتورونیک اسید که در بافر استات سدیم ۲۰ میلی‌مولار و در pH بهینه فعالیت آنزیم تهیه شده بود به نمونه‌ها افزوده شد و ویال‌های محتوی محلول واکنش به مدت 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 خوانده شد.

باقیمانده فعالیت آنزیمی از طریق رابطه (۷) محاسبه می‌شود:

$$\text{Residual PG activity \%} = 100(A_t/A_o) \quad (7)$$

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 (۸) نشان داده می‌شود:

$$\ln(A_t/A_0) = -kt$$

در این رابطه A_t میزان فعالیت^(۸) آنزیم در زمان t و A_0 میزان فعالیت اولیه آنزیم، t زمان تیمار آنزیم و k ثابت سرعت غیر فعال شدن می‌باشد.

۳-۱۶ مطالعه پارامترهای ترمودینامیکی

وابستگی حرارتی غیر فعال شدن برگشت ناپذیر آنزیم، با استفاده از منحنی آرنیوس مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرد. انرژی فعال سازی ($\Delta E^\#$) غیرفعال سازی آنزیم از روی شیب منحنی آرنیوس (لگاریتم ثابت سرعت غیر فعال سازی در برابر معکوس دمای واقعی) به دست می‌آید. آنتالپی فعال سازی ($\Delta H^\#$) برای هر دمایی با توجه به رابطه (۹) محاسبه می‌گردد:

$$\Delta H^\# = \Delta E^\# - RT \quad (9)$$

که R ثابت جهانی گازها، T دمای مطلق می‌باشد. مقادیر انرژی آزاد غیر فعال سازی ($\Delta G^\#$) در دماهای متفاوت با استفاده از رابطه (۱۰) محاسبه می‌گردد:

$$\Delta G^\# = -RT \ln(kh/K_B T) \quad (10)$$

که h ($6.62 \times 10^{-34} \text{J}_S$) ثابت پلانک و K_B ($1.3806 \times 10^{-23} \text{JK}^{-1}$) ثابت بولتزمن می‌باشد. با استفاده از دو معادله قبلی، آنتروپی فعال سازی (ΔS^\ddagger) برای غیر فعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم پلی‌گالاکتوروناز مورد بررسی، از طریق رابطه (۱۱) محاسبه می‌گردد:

$$\Delta S^\ddagger = (\Delta H^\ddagger - \Delta G^\ddagger) / T \quad (11)$$

همچنین از طریق بررسی رابطه بین مقدار $(\ln k/T)$ نسبت به معکوس دمای مطلق برای غیر فعال سازی آنزیم پلی‌گالاکتوروناز، میزان تغییرات آنتروپی بررسی می‌گردد. شیب این نمودار معادل ΔG و عرض از مبدا آن معادل تغییرات آنتروپی می‌باشد.

جهت محاسبه میزان نیمه عمر آنزیم، از رابطه (۱۲) استفاده می‌شود:

$$T_{1/2} = \ln(2) / k \text{ (min}^{-1}\text{)} \quad (12)$$

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.

۳-۱۷ بررسی مطالعات ساختاری آنزیم پلی‌گالاکتوروناز

مطالعات ساختاری آنزیم در جهت مشخص نمودن ارتباط ساختار با عملکرد و پایداری آنزیم صورت گرفت. این مطالعات شامل بررسی فلورسانس ذاتی و خارجی آنزیم و نیز مطالعه کینتیک آنزیم در ارتباط با جایگاه فعال پس از اعمال تغییرات شیمیایی می‌باشد که در ادامه روش و مراحل انجام آن شرح داده می‌شود.

۳-۱۷-۱ فلورسانس

اساس کار فلورسانس مبتنی بر برانگیخته شدن الکترون‌های سطوح پایه فلوروفور و انتقال آن‌ها به سطوح برانگیخته می‌باشد. این الکترون‌های برانگیخته در برگشت به حالت پایه خود، انرژی خود را به صورت طول موجی بزرگ‌تر آزاد می‌کنند.

۳-۱۷-۱-۱ مطالعات فلورسانس ذاتی

در مطالعات فلورسانس ذاتی از اسیدآمینه تریپتوفان به عنوان فلوروفور استفاده می‌شود. این اسیدآمینه در طول موج ۲۸۰ نانومتر دارای جذب است و در اثر تحریک، قادر به نشر پرتو در طیف ۳۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر می‌باشد.

به منظور مطالعه فلورسانس ذاتی آنزیم پلی‌گالاکتوروناز، محلول آنزیمی با غلظت نهایی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بافر مخلوط و pH های ۱ تا ۱۲ تهیه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. نمونه‌ها با طول موج ۲۸۰ نانومتر برانگیخته و نشر آن‌ها بین طول موج‌های ۳۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر ثبت شد. پهنای باند جذبی و نشری هر دو، ۱۰ نانومتر تنظیم گردید و در نهایت با استفاده از نرم-افزار Excel نمودار فلورسانس ذاتی رسم گردید.

۳-۱۷-۲ مطالعات فلورسانس خارجی

۱- آنیلو- ۸ نفتالین سولفونات (ANS)، فلوروفور بسیار مناسب است که در محیط آبی بدون اتصال به پروتئین، فلورسانس بسیار ضعیفی دارد. زمانیکه این ترکیب در محیط غیرقطبی قرار می‌گیرد فلورسانس آن افزایش می‌یابد و طیف آن به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر جابه‌جا می‌شود. افزایش فلورسانس پروتئین در حضور ANS نشانگر هیدروفوب شدن سطح پروتئین می‌باشد.

به منظور مطالعه فلورسانس خارجی آنزیم پلی گالاکتوروناز، محلول آنزیمی با غلظت نهایی ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر در بافر مخلوط و pH های ۱ تا ۱۲ تهیه گردید. سپس ANS با غلظت نهایی ۴۰ میکرومولار به محلول آنزیمی اضافه و محلولها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. نمونهها با طول موج ۳۶۰ نانومتر برانگیخته و نشر آنها بین طول موجهای ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر ثبت شد. پهنای باند جذبی و نشری هر دو، ۱۰ نانومتر تنظیم گردید و در نهایت با استفاده از نرم افزار Excel نمودار فلورسانس خارجی آنزیم رسم گردید.

۳-۱۷-۲ مطالعات جایگاه فعال از طریق اعمال تغییرات شیمیایی

برخی از ترکیبات مانند PMSF، یدو استامید و یدو استیک موجب اعمال تغییرات شیمیایی در اسیدهای آمینه می گردند. چنانچه این اسیدهای آمینه در جایگاه فعال آنزیم قرار گرفته باشند، فعالیت آنزیم به طور نسبی یا کامل مهار می شود.

پلی گالاکتوروناز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در بافر استات و غلظت ۵ میلی مولار از این ترکیبات انکوبه گردید و فعالیت باقیمانده پلی گالاکتوروناز در شرایط دما و pH بهینه اندازه گیری گردید. سپس نمودار میانگین فعالیت آنزیم، با استفاده از نرم افزار Excel رسم شد.

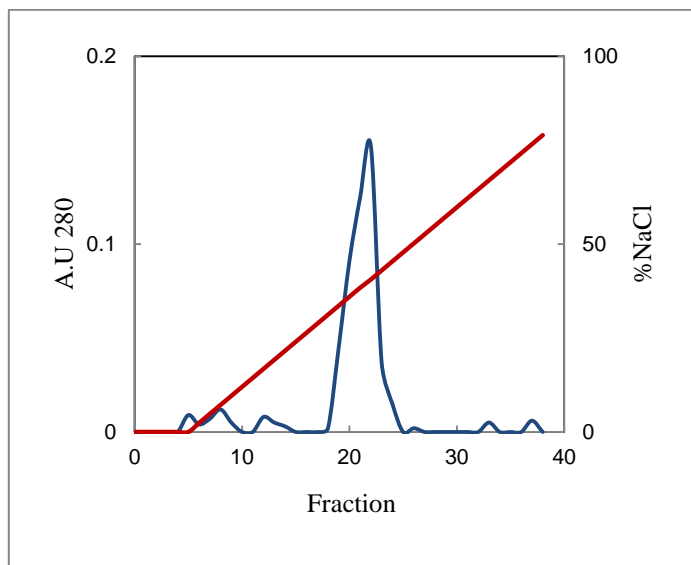
فصل چہارم

نتائج

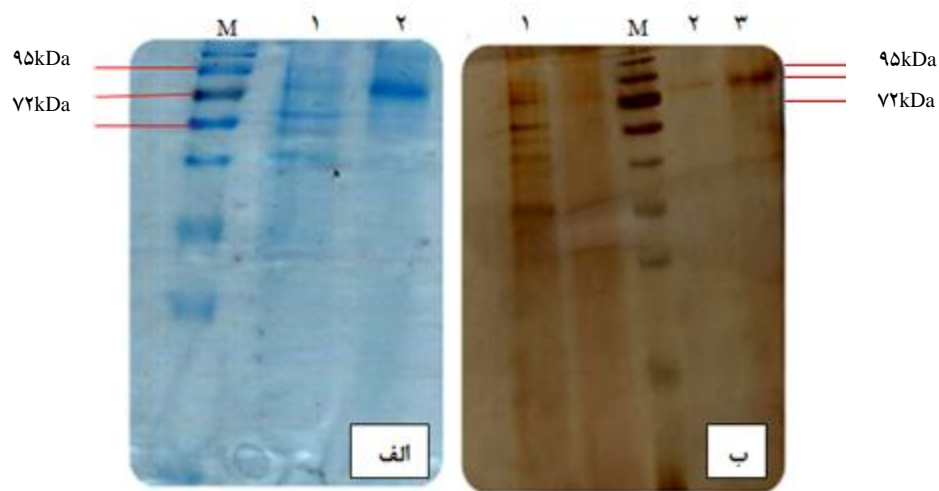
در این فصل نتایج مربوط به مراحل تولید و خالص‌سازی پلی‌گالاکتوروناز قارچ *M. phaseolina* ارائه شده است. با توجه به اهمیت و نقش کلیدی این آنزیم در بیماریزایی پاتوژن مورد بحث و همچنین کاربرد گسترده آن در صنعت، به بررسی خصوصیات بیوشیمیایی، الگوی کینتیک و محاسبه پارامترهای کینتیکی و ترمودینامیکی این آنزیم پرداخته و نتایج مربوط به آن شرح داده شده است. همچنین افکتورهای مثبت و منفی این آنزیم و مکانیسم فعال سازی و بازدارندگی مهم این افکتورها مورد بررسی قرار گرفته است.

۴-۱ تولید و خالص‌سازی پلی‌گالاکتوروناز قارچ *M. phaseolina*

جهت القای تولید آنزیم پلی‌گالاکتوروناز، قارچ *M. phaseolina* در شرایط استریل از محیط PDA به محیط بهینه تولید پلی‌گالاکتوروناز منتقل گردید. پس از سپری شدن ۷۲ ساعت از کشت قارچ در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و شیک ۱۸۰ دور در دقیقه، محیط کشت حاوی قارچ تکثیر یافته، از کاغذ صافی عبور داده شد. به منظور تغلیظ و کاهش حجم، آمونیوم سولفات به محلول پروتئینی اضافه شد. به منظور خالص‌سازی آنزیم پلی‌گالاکتوروناز، محلول پروتئینی رسوب آمونیوم سولفات پس از دیالیز با بافر استات سدیم (۲۰ mM)، بر روی ستون تعویض آنیونی (DEAE) برده شد. طبق برنامه داده شده به دستگاه و با اعمال شیب خطی ۱-۰ مولار کلرید سدیم، ستون شستشو شد. پس از جمع‌آوری فرکشن‌ها از ستون، جذب پروتئینی آن‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شد (شکل ۴-۱). نمونه‌های پروتئینی در راس پیک‌ها مورد سنجش فعالیت پلی‌گالاکتورونازی قرار گرفتند. فرکشن‌هایی که دارای فعالیت پلی-گالاکتورونازی بودند جهت اثبات وجود آنزیم بر روی ژل SDS-PAGE برده شدند. در شکل ۴-۲ مراحل خالص‌سازی نتایج آن، روی SDS-PAGE نشان داده شده است. وزن مولکولی ظاهری آنزیم پلی-گالاکتوروناز که خالص‌سازی گردیده است، حدود ۸۰ کیلو دالتون تخمین زده شد. در تمامی مراحل خالص‌سازی آنزیم، غلظت پروتئین، میزان فعالیت ویژه محاسبه گردید (جدول ۴-۱).



شکل ۴-۱ کروماتوگرام مربوط به جذب ۲۸۰ نانومتر فرکشن‌های جمع‌آوری شده از ستون کروماتوگرافی DEAE، پیک مربوط به فرکشن ۲۰ و ۲۱ با شیب نمکی ۰/۳ مولار کلرید سدیم، دارای فعالیت پلی‌گالاکتورونازی و وزن مولکولی حدود ۸۰ کیلو دالتون، خالص می‌باشد.



شکل ۴-۲ ژل SDS-PAGE مراحل گوناگون خالص‌سازی پلی‌گالاکتوروناز جهت تعیین وزن مولکولی و تایید خلوص آنزیم، الف رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی بلو، چاهک ۱ عصاره محلول پروتئینی، چاهک ۲ پلی‌گالاکتوروناز خالص فرکشن ۲۱ ستون DEAE، ب رنگ‌آمیزی ژل با نیترات نقره، چاهک ۱ عصاره محلول پروتئینی، چاهک ۲ پلی‌گالاکتوروناز خالص فرکشن ۲۰، چاهک ۳ پلی‌گالاکتوروناز خالص فرکشن ۲۱ ستون DEAE، چاهک M، نشانگر وزن مولکولی

پروتئین.

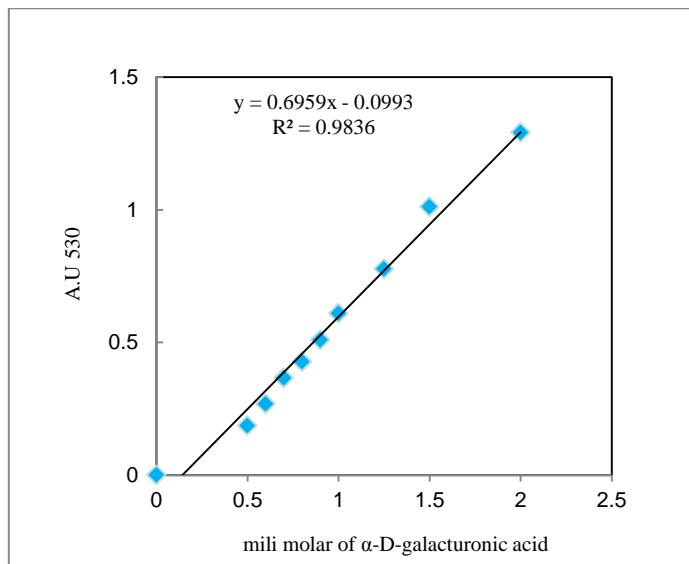
در ادامه، نتایج بررسی خصوصیات کینتیکی و کاتالیتیکی آنزیم شرح داده می‌شود.

۴-۲ تعیین خصوصیات کینتیکی

به منظور به دست آوردن فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیمی، از دی‌گالاکتورونیک اسید جهت رسم منحنی استاندارد (جذب در برابر غلظت‌های مختلف D-گالاکتورونیک اسید) استفاده شد (شکل ۴-۳). محاسبه پارامترهای کینتیکی پلی‌گالاکتوروناز، با استفاده از غلظت‌های مختلف سوبسترای آنزیم (پلی-گالاکتورونیک اسید) و از رسم و بررسی نمودار تغییرات سرعت در غلظت‌های مختلف سوبسترا، صورت گرفت. میزان $K_{0.5}$ محاسبه شده برای این آنزیم 3 mg/ml و V_{\max} آن $0.008 \text{ } \mu\text{mol/min}$ می‌باشد. نمودار فعالیت آنزیم در برابر تغییرات غلظت سوبسترا، سیگموئیدی می‌باشد (شکل ۴-۴). بنابراین زمانیکه از پلی‌گالاکتورونیک اسید به عنوان سوبسترا استفاده می‌شود، پلی‌گالاکتوروناز خالص‌سازی شده، از الگوی کینتیک میکائیلیس-منتن پیروی نمی‌نماید و دارای الگوی کینتیک غیرهایپربولیک می‌باشد. پارامترهای کینتیکی پلی‌گالاکتوروناز خالص به‌طور خلاصه در جدول ۴-۲ آورده شده است. جهت بررسی دقیق الگوی کینتیک و وضعیت تعاون اتصال در آنزیم، نمودار هیل و نمودارهای لینیور-بورک و ادی-هافستی (شکل ۴-۵) رسم شد. همان‌طور که اشاره شد چنانچه نمودار لینیور-بورک یک آنزیم، خطی نباشد، معادله میکائیلیس-منتن در مورد آن آنزیم صدق نمی‌نماید. در این رابطه نمودار لینیور-بورک پلی-گالاکتوروناز خالص‌سازی شده خطی نمی‌باشد و دارای تقعر رو به بالاست و الگوی تعاون مثبت را نشان می‌دهد (شکل ۴-۵ ب). نمودار ادی-هافستی انحراف از خط راست را به‌شکل موثرتری نشان می‌دهد و برای آنزیم مورد نظر در غلظت‌های بسیار پایین سوبسترا به‌صورت دره مشاهده گردید که حاکی از رفتار تعاونی منفی آنزیم و پایین بودن میزان تمایل آنزیم به سوبسترا در این غلظت‌ها می‌باشد (شکل ۴-۵ ج).

جدول ۱-۴ تعیین ویژگی‌های پلی‌گالاکتوروناز خالص

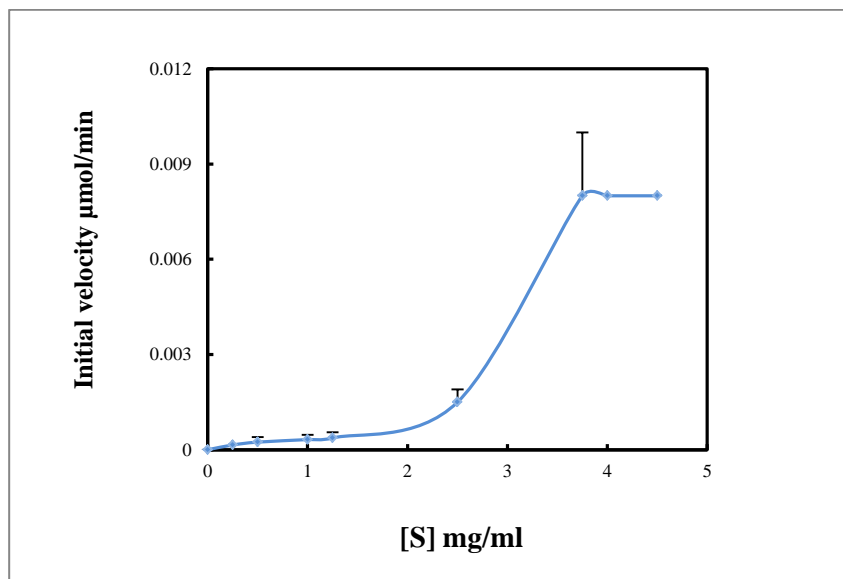
غلظت پروتئین	فعالیت ویژه	فعالیت (Unit)	مراحل
(mg.ml ⁻¹)	(u.mg ⁻¹)	(μmol/min)	
۰/۰۱	۰/۸	۰/۰۰۸	آنزیم خالص ستون DEAE



شکل ۳-۴ نمودار استاندارد جذب غلظت‌های متفاوت و متوالی ۰ تا ۲/۵ میلی مولار

دی‌گالاکتورونیک اسید با معادله خط $(y = 0.6959x - 0.0993)$ ، جهت تعیین واحد

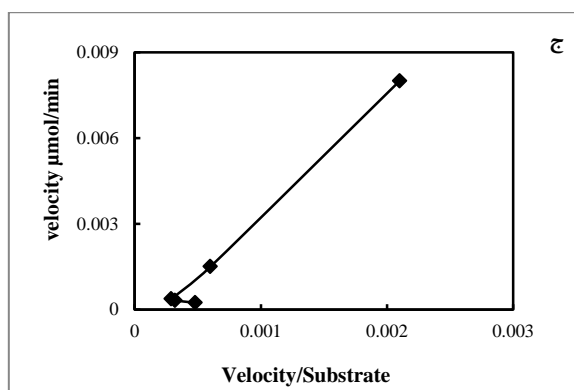
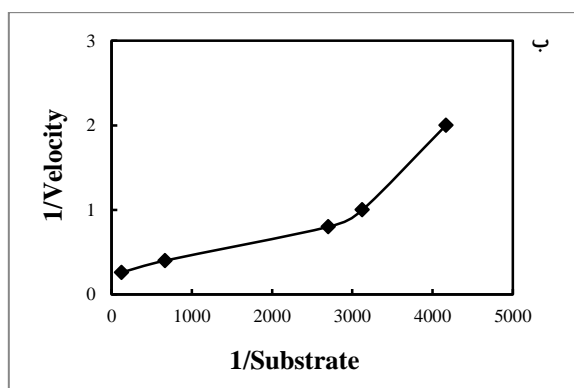
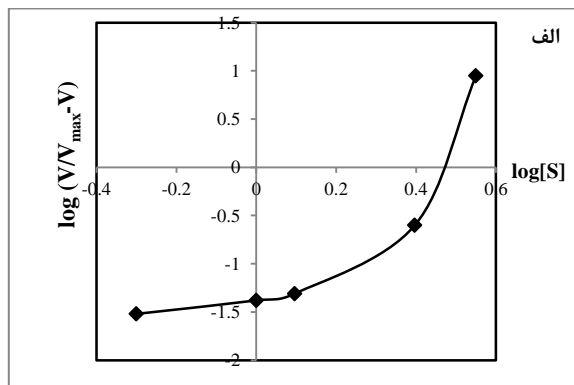
فعالیت آنزیمی.



شکل ۴-۴ نمودار سیگموئیدی تغییرات فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف (۰ تا ۳/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) سوسترای پلی‌گالاکتورونیک اسید، در شرایط بهینه سنجش فعالیت آنزیمی، سیگموئیدی می‌باشد، میزان $K_{0.5}$ محاسبه شده برای این آنزیم ۳ mg/ml و V_{max} آن $0.008 \mu\text{mol}/\text{min}$ می‌باشد.

جدول ۴-۲ پارامترهای کینتیکی پلی‌گالاکتوروناز.

سوستر	Catalytic efficiency (mg/min.ml)	K_{cat} (l/min)	$K_{0.5}$ (mg/ml)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
پلی‌گالاکتورونیک اسید	۲۱/۳	۶۴	۳	۰/۰۰۸



شکل ۴-۵ بررسی الگوی کینتیک و وضعیت تعاون اتصال در پلی-گالاکتوروناز، نمودارهای الف، هیل، $n_H = 10$ ، ب، لینیور-بورک غیر خطی با تقعر رو به بالا، ج، ادی-هافستی به صورت غیر خطی، کینتیک غیر هایپرولیک و الگوی تعاون مثبت را نشان می‌دهند.

با افزایش بسیار ناچیز غلظت سوبسترا، نمودار ادی - هافستی از حالت دره به قله تغییر شکل یافت که این نشان می‌رهد آنزیم دارای میزان ثابت تمایل به سوبسترا نمی‌باشد و با تغییر در غلظت سوبسترا، میزان تمایل آنزیم به سوبسترا نیز تغییر می‌نماید؛ این نتایج به نحو موثری براساس نمودار هیل پلی‌گالاکتوروناز موردنظر در حضور سوبسترای پلی‌گالاکتورونیک اسید تایید شد؛ نمودار هیل (شکل ۴-۵ الف)، غیرخطی است و از آنجا که با تغییر بسیار کم در غلظت سوبسترا شیب نمودار دچار نوسان گردید به نظر می‌رسد میزان تمایل آنزیم به سوبسترا با تغییر غلظت سوبسترا تغییر می‌نماید. میزان لگاریتم غلظت‌های سوبسترا در ناحیه‌ای از نمودار که محور افقی را قطع می‌کند خطی مستقیم است که شیب آن معادل $1/10$ تخمین زده شد و بیشترین مقدار شیب نمودار نیز در همین ناحیه می‌باشد که این شیب معادل ضریب هیل در نظر گرفته شد. با توجه به این نتایج مشخص گردید، این آنزیم آلوستریک می‌باشد و دارای حداقل دو جایگاه کاتالیتیک است و بین جایگاه‌های اتصال، برهمکنش تعاونی مثبت وجود دارد. میزان حساسیت واکنش آنزیمی ($R_s = [S]^{0.9}/[S]^{0.1}$) برابر $1/7$ برآورد گردید که در ارتباط با ضریب هیل و تعداد جایگاه اتصال لیگاند در آنزیم، الگوی تعاون را به نحو موثری توصیف می‌نماید. از آنجا که آنزیم دارای ثابت تمایل به سوبسترا نمی‌باشد، میزان تمایل آنزیم به سوبسترا به‌ازای یک جایگاه اتصال با استفاده از اطلاعات موجود، قابل محاسبه نمی‌باشد.

۳-۴ بررسی خصوصیات کاتالیتیکی آنزیم

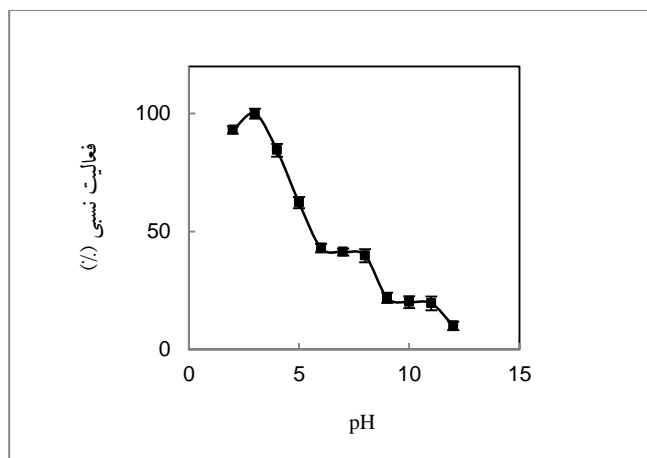
در این بخش نتایج مربوط به بررسی خصوصیات پلی‌گالاکتوروناز قارچ *M. phaseolina*، از قبیل میزان فعالیت آنزیم در شرایط دما و pH گوناگون، تاثیر تغییرات pH و گرما بر میزان پایداری پلی‌گالاکتوروناز و محاسبه پارامترهای ترمودینامیکی غیر فعال‌سازی این آنزیم به شرح ذیل ارائه شده است.

۱-۳-۴ بررسی تأثیر pH بر روی فعالیت آنزیم و بدست آوردن pH بهینه (pH Profile)

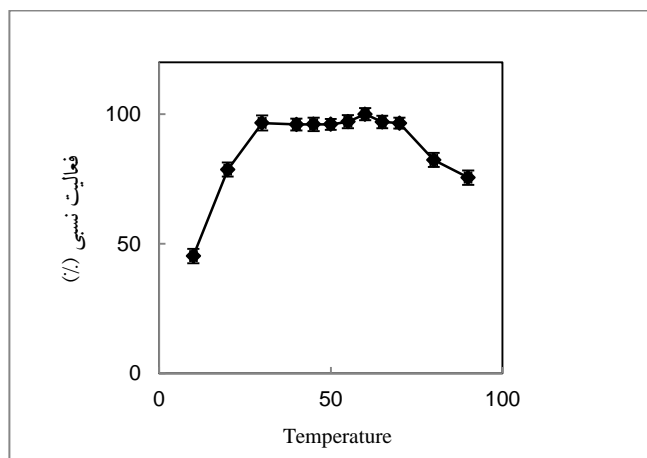
تأثیر pH های ۲ تا ۱۲ بر میزان فعالیت پلی گالاکتوروناز و در حضور سوبسترای پلی گالاکتورونیک اسید بررسی شد ، نمودار میانگین فعالیت پلی گالاکتوروناز در pH های مختلف رسم و pH profile تهیه گردید (شکل ۴-۶). نتایج بررسی تأثیر pH بر میزان فعالیت پلی گالاکتوروناز نشان می دهد این آنزیم در pH ۳ = دارای بیشینه فعالیت می باشد و در pH بسیار اسیدی ۲ نیز دارای ۹۰ درصد فعالیت حداکثر می باشد. آنزیم در pH های ۴ و ۵ نیز به ترتیب دارای ۸۰ و ۶۰ درصد فعالیت بیشینه می باشد. میزان فعالیت آنزیم در pH های ۶ تا ۸ به کمتر از ۵۰ درصد تقلیل می یابد و در pH های بسیار بازی به حداقل میزان خود می رسد.

۲-۳-۴ بررسی تأثیر دما بر فعالیت آنزیم و بدست آوردن دمای بهینه (Temperature Profile)

تأثیر دماهای ۲۰ تا ۹۰ درجه سانتی گراد بر میزان فعالیت پلی گالاکتوروناز و در حضور سوبسترای پلی گالاکتورونیک اسید بررسی ، نمودار میانگین فعالیت پلی گالاکتوروناز در دماهای مختلف رسم و Temperature Profile تهیه گردید (شکل ۴-۷). نتایج بررسی تأثیر دما بر میزان فعالیت پلی گالاکتوروناز نشان می دهد این آنزیم در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد دارای بیشترین میزان فعالیت است. همچنین مشخص گردید آنزیم مورد بررسی در دماهای ۳۰ تا ۷۰ درجه سانتی گراد دارای بیش از ۹۰ درصد فعالیت حداکثر می باشد. این آنزیم در دماهای ۲۰ و ۸۰ و ۹۰ درجه سانتی گراد دارای بیش از ۷۰ درصد فعالیت بیشینه می باشد و در دمای بسیار پایین ۱۰ درجه سانتی گراد نیز حدود ۵۰ درصد فعالیت حداکثر را دارا می باشد.



شکل ۴-۶ بررسی تاثیر pH بر میزان فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز در حضور سوسترای پلی گالاکتورونیک اسید و دمای ۵۰ درجه سانتیگراد، آنزیم در pH = ۳ دارای فعالیت بیشینه می باشد.



شکل ۴-۷ بررسی تاثیر دما بر میزان فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز در حضور سوسترای پلی گالاکتورونیک اسید و pH = ۳، آنزیم در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد دارای فعالیت بیشینه می باشد.

۳-۳-۴ بررسی پایداری آنزیم در pHهای مختلف (pH Stability)

پلی‌گالاکتوروناز خالص به مدت ۹۰ دقیقه در pHهای ۲ تا ۱۰ و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد تیمار گردید و فعالیت باقیمانده آن در حضور سوبسترای پلی‌گالاکتورونیک اسید و در دما و pH بهینه مورد سنجش قرار گرفت. نمودار میانگین فعالیت پلی‌گالاکتوروناز در این pHها رسم شد. بررسی پایداری آنزیم در pHهای مختلف نشان می‌دهد این آنزیم در طیف وسیعی از pHهای اسیدی و بازی از پایداری قابل توجهی برخوردار است.

۴-۳-۴ بررسی پایداری آنزیم در pHهای ۲، ۷ و ۱۲ در زمان‌های مختلف

آنزیم خالص در pHهای ۲، ۷ و ۱۲ و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد تیمار گردید و فعالیت باقیمانده آن از زمانهای صفر تا ۱۸۰ دقیقه محاسبه گردید. نمودار میانگین فعالیت پلی‌گالاکتوروناز در این PHها و در زمان‌های گوناگون رسم گردید (شکل ۴-۸). نتایج نشان می‌دهد این آنزیم از پایداری بالایی در pHهای اسیدی و بازی برخوردار است. به‌طوریکه در pHهای ۳ و ۱۲ پس از ۶۰ دقیقه، ۱۰۰ درصد فعالیت آنزیم حفظ می‌شود.

۵-۳-۴ بررسی پایداری حرارتی آنزیم در دماهای مختلف

فعالیت باقیمانده آنزیم پلی‌گالاکتوروناز پس از ۹۰ دقیقه تیمار در درجه حرارت‌های ۱۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد در شرایط بهینه فعالیت آنزیمی مورد سنجش قرار گرفت. نمودار میانگین فعالیت پلی‌گالاکتوروناز در دماهای مختلف رسم شد (شکل ۴-۹). نتایج نشان داد، آنزیم پایداری حرارتی بسیار بالایی دارد.

۴-۳-۶ بررسی غیر فعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم در زمان‌های مختلف و در دماهای ۵۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد

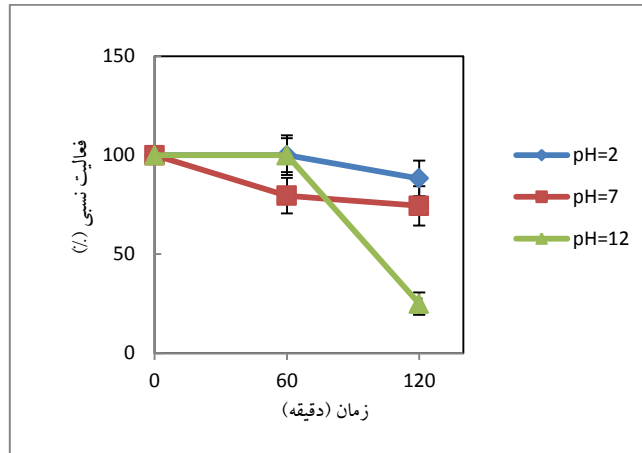
پایداری آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در دماهای ۵۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد در بازه زمانی صفر تا ۹۰ دقیقه بررسی و نمودار میانگین فعالیت پلی‌گالاکتوروناز در این دماها و در زمان‌های گوناگون رسم شد (شکل ۴-۱۰). این آنزیم پس از ۹۰ دقیقه تیمار در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد، ۷۰ درصد از فعالیت خود را حفظ نمود. با استفاده از نتایج به‌دست آمده، غیر فعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم نیز مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴-۱۱).

۴-۳-۷ محاسبه نیمه عمر حرارتی آنزیم

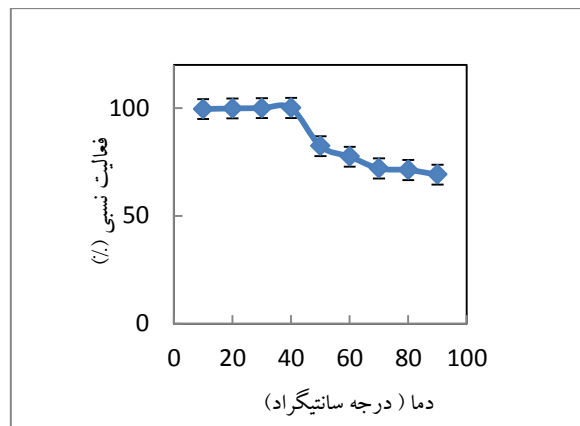
محاسبه نیمه عمر حرارتی آنزیم با استفاده از ثابت سرعت غیر فعال‌سازی حرارتی آنزیم صورت گرفت. این ثابت معادل شیب خطوط نمودار غیر فعال‌سازی حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم (شکل ۴-۱۱) در دماهای مختلف می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد آنزیم پلی‌گالاکتوروناز خالص در دماهای ۵۰، ۷۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب دارای نیمه عمر ۳۰۰، ۲۰۳ و ۱۷۷ دقیقه می‌باشد.

۴-۳-۸ محاسبه انرژی فعال‌سازی غیر فعال شدن برگشت‌ناپذیر حرارتی آنزیم

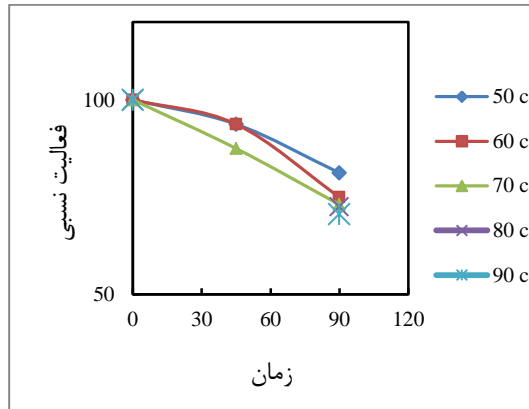
انرژی فعال‌سازی غیر فعال شدن برگشت‌ناپذیر حرارتی پلی‌گالاکتوروناز، از طریق شیب منحنی آرنیوس (شکل ۴-۱۲) قابل محاسبه است. انرژی فعال‌سازی محاسبه شده معادل $15/26 \text{ KJ/mol}$ می‌باشد.



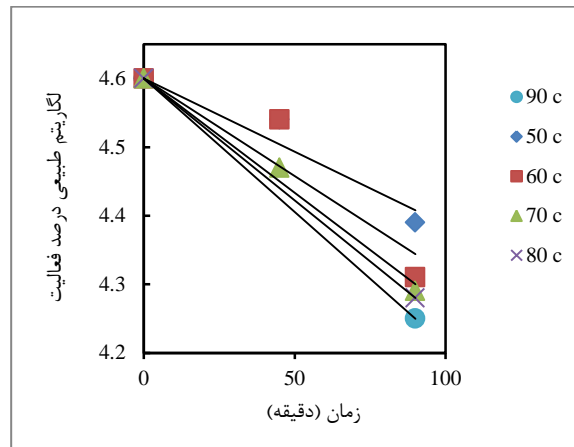
شکل ۴-۸ بررسی پایداری پلی گالاکتوروناز در pH های مختلف و در زمان- های ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه، آنزیم در pH های ۳ و ۱۲ پس از ۶۰ دقیقه ۱۰۰ درصد فعالیت آنزیم حفظ می شود.



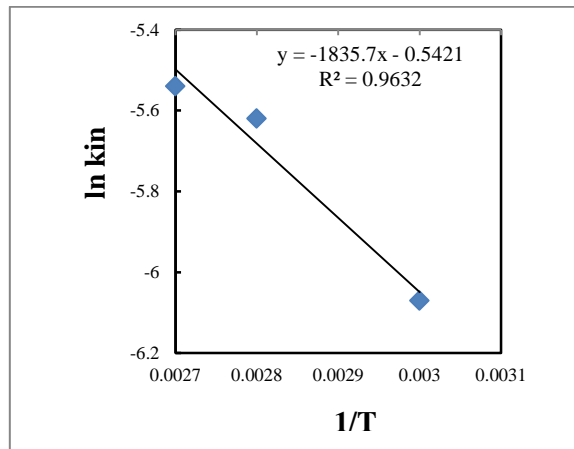
شکل ۴-۹ بررسی پایداری حرارتی آنزیم در دماهای مختلف، آنزیم از پایداری بالایی در دماهای مختلف برخوردار است.



شکل ۴-۱۰ نمودار بررسی پایداری حرارتی آنزیم در زمان‌های مختلف و در دماهای ۵۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد، این آنزیم پس از ۹۰ دقیقه تیمار در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد، ۷۰ درصد از فعالیت خود را حفظ نمود.



شکل ۴-۱۱ نمودار بررسی غیرفعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم در زمان‌های مختلف و در دماهای ۵۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد، شیب خطوط معادل ضریب سرعت غیرفعال‌سازی آنزیم در دماهای مختلف می‌باشد.



شکل ۴-۱۲ نمودار آرنیوس برای غیر فعال شدن حرارتی آنزیم، محور عمودی ln ثابت سرعت غیر فعال سازی حرارتی آنزیم و محور افقی معکوس دمای مطلق می باشد انرژی اکتیواسیون غیر فعال سازی حرارتی آنزیم ۱۵/۲۶ KJ/mol بود.

جدول ۴-۳ پارامترهای ترمودینامیکی غیر فعال سازی حرارتی پلی گالاکتوروناز.

ΔE (KJ/mol)	ΔG (KJ/mol)	ΔS (KJ/mol.K)	ΔH (KJ/mol)	درجه حرارت (°C)
۱۵/۲۶	۱۱۲	-۰/۲۹	۱۲/۴۱	۷۰

۴-۳-۹ محاسبه پارامترهای ترمودینامیکی غیر فعال شدن برگشت ناپذیر حرارتی آنزیم

وابستگی حرارتی غیر فعال شدن برگشت ناپذیر آنزیم، با استفاده از منحنی آرنیوس و ثابت سرعت غیر فعال سازی حرارتی آنزیم، مورد تجزیه و تحلیل قرار می گیرد. همچنین از طریق بررسی رابطه بین مقدار $(\ln k/T)$ نسبت به معکوس دمای مطلق برای غیر فعال سازی آنزیم پلی گالاکتوروناز نیز می توان میزان تغییرات آنتروپی را بررسی نمود. شیب این نمودار معادل ΔG و عرض از مبدا آن معادل تغییرات آنتروپی می باشد. پارامترهای ترمودینامیکی غیر فعال سازی حرارتی آنزیم پلی گالاکتوروناز در جدول ۴-۳ آورده شده است.

۴-۴ بررسی افکتورهای آنزیم پلی گالاکتوروناز

همان طور که اشاره شد آنزیم پلی گالاکتورونازی که خالص سازی گردید، دارای الگوی کینتیک آلوستریک می باشد و دارای نقش کلیدی و احتمالاً تنظیمی در فرآیند بیماریزایی قارچ پاتوژن مورد نظر می باشد. بنابراین شناسایی و بررسی ترکیبات فعال کننده و بازدارنده آن در جهت ایجاد اختلال در فرآیند بیماریزایی بسیار ضروری می باشد. نتایج حاصل از بررسی افکتورهای مثبت و منفی فعالیت آنزیم در مطالعات تخصصی 70 SAR) structure activity relationship)، شامل شناسایی فارماکوفور^{۷۱} (Pharmacophore) و طراحی لید کامپوند^{۷۲} (Lead compound) مناسب برای آنزیم، کاربرد دارند. در ادامه به بیان نتایج بررسی تاثیر یون ها، شلات کننده ها و ترکیبات شیمیایی بر فعالیت آنزیم پلی-گالاکتوروناز می پردازیم.

۱ فرآیند ایجاد تغییرات در ساختار یک لیگاند و بررسی تاثیر این تغییرات در میزان فعالیت آنزیم.

۲ حداقل ساختاری که لیگاند برای خاصیت مهارکنندگی نیاز دارد.

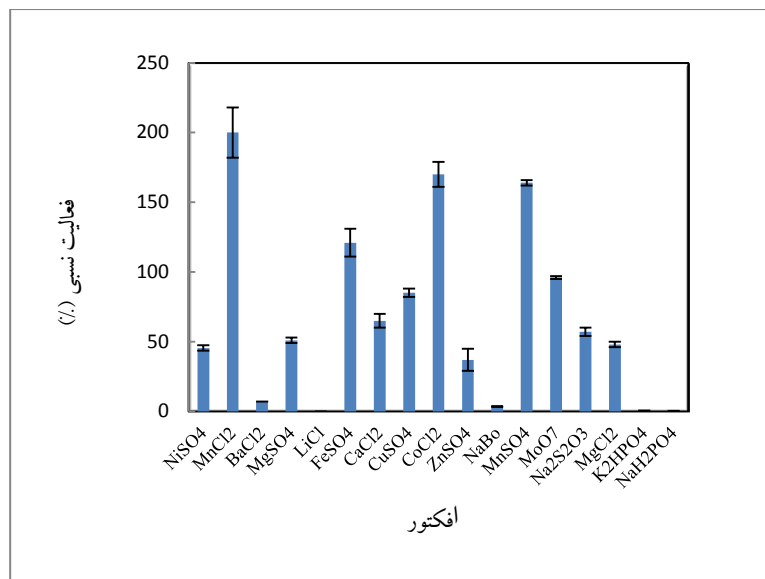
۳ لیگاند اولیه ای که به عنوان مهارکننده در نظر گرفته می شود.

۴-۴-۱ مطالعه فعالیت پلی گالاکتوروناز در حضور یون‌های فلزی

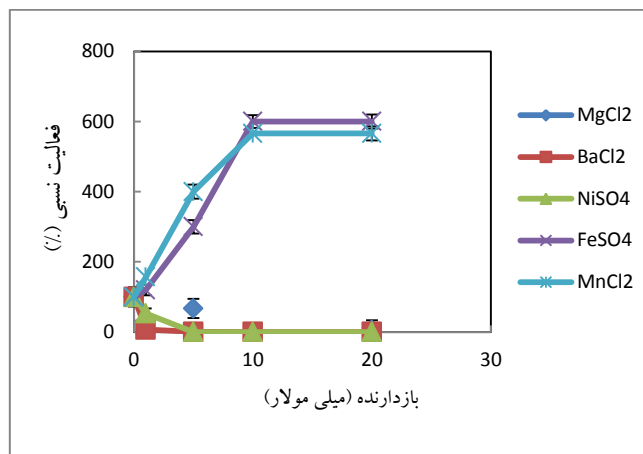
فعالیت باقیمانده پلی گالاکتوروناز در حضور غلظت‌های ۰ تا ۲۰ mM یون‌های فلزی در شرایط دما و pH بهینه اندازه‌گیری گردید. سپس نمودار میانگین فعالیت آنزیم، در غلظت ۱ میلی‌مولار این یون‌ها رسم شد (شکل ۴-۱۳). نتایج بررسی تاثیر حضور یون‌ها بر فعالیت آنزیم نشان داد که نمک‌های MnCl_2 ، FeSO_4 ، MnSO_4 و CoCl_2 موجب افزایش فعالیت آنزیم می‌گردند. نمک‌های MgCl_2 ، NiSO_4 ، BaCl_2 و CuSO_4 و LiCl به‌طور موثر موجب مهار فعالیت آنزیم می‌گردند و تمامی نمک‌های فسفات در غلظت یک میلی‌مولار موجب بلوکه شدن فعالیت آنزیم می‌گردند. سولفات روی در غلظت ۱ میلی‌مولار باعث کاهش و در غلظت ۵ میلی‌مولار موجب افزایش فعالیت آنزیم به میزان ۲ برابر می‌گردد. نمودار کینتیک اشباع این یون‌ها برای آنزیم، در غلظت یک درصد سوبسترا، ترسیم گردید (شکل ۴-۱۴). جهت بررسی الگوی تعاون اتصال افکتورهای منفی به آنزیم، نمودار هیل (شکل ۴-۱۵) ترسیم گردید.

۴-۴-۲ بررسی تاثیر دترجنت‌ها بر فعالیت پلی گالاکتوروناز

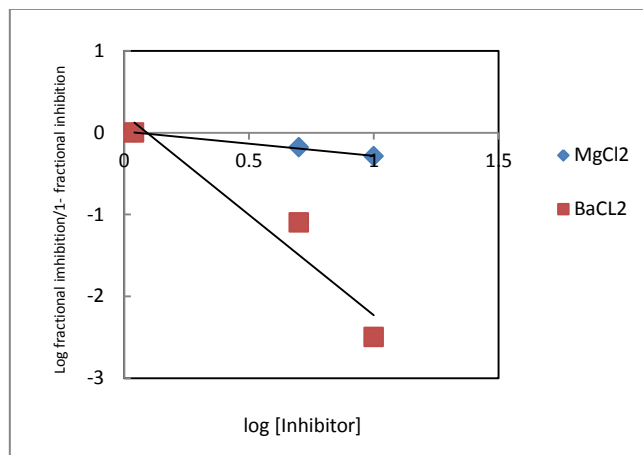
فعالیت باقیمانده پلی گالاکتوروناز، در حضور دترجنت‌ها (غلظت ۵ درصد) در شرایط دما و pH بهینه اندازه‌گیری گردید (شکل ۴-۱۶). نتایج نشان داد توپین ۲۰ و ۸۰ به ترتیب موجب کاهش فعالیت آنزیم به ۴۴ و ۶۷ درصد فعالیت بیشینه و تراپتون X-100 موجب افزایش فعالیت آنزیم به ۲۳۳ درصد فعالیت بیشینه می‌گردد.



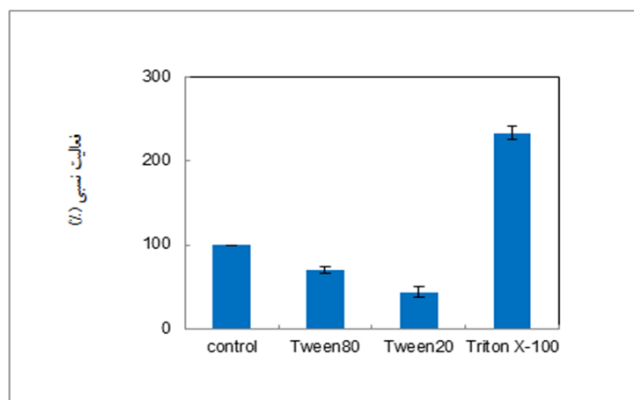
شکل ۴-۱۳ نمودار بررسی فعالیت آنزیم در حضور غلظت ۱ میلی مولار یون-های فلزی، نمک‌های MnCl_2 ، FeSO_4 ، MnSO_4 و CoCl_2 موجب افزایش و نمک‌های MgCl_2 ، NiSO_4 ، BaCl_2 و CuSO_4 و LiCl موجب مهار فعالیت آنزیم و تمامی نمک‌های فسفات موجب بلوکه شدن فعالیت آنزیم می‌گردند.



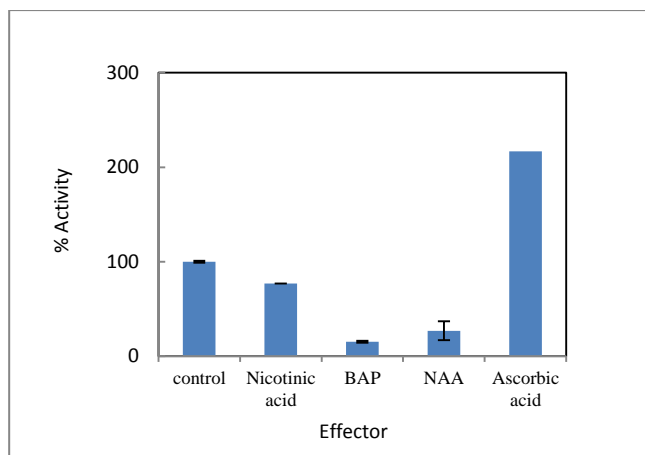
شکل ۴-۱۴ نمودار کینتیک اشباع یون‌های فلزی افکتور آنزیم پلی-گالاکتورناز، نمک‌های FeSO_4 و MnCl_2 در غلظت ۱۰ میلی مولار موجب حداکثر فعالیت آنزیمی می‌گردند. نمک‌های BaCl_2 ، NiSO_4 و MgCl_2 به ترتیب در غلظت‌های ۱، ۵ و ۵ میلی مولار موجب حداقل فعالیت آنزیمی می‌گردند.



شکل ۴-۱۵ نمودار هیل کلرید منیزیم و باریم برای پلی‌گالاکتورناز، میزان ضریب هیل برای اتصال MgCl_2 و BaCl_2 به آنزیم به ترتیب -0.29 و -2.4 می‌باشد. این ترکیبات با الگوی تعاونی منفی اتصال خود، موجب کاهش فعالیت آنزیم می‌گردند.



شکل ۴-۱۶ نمودار بررسی تاثیر دترجنت‌ها بر فعالیت آنزیم.



شکل ۴-۱۷ نمودار مطالعه تاثیر غلظت ۲۰ میلی‌مولار هورمون‌ها و آسکوربیک اسید بر فعالیت پلی‌گالاکتوروناز، اسید آسکوربیک موجب افزایش ۱۲۷ درصدی و هورمون‌ها موجب کاهش فعالیت آنزیم گردیدند.

۳-۴-۴ مطالعه تاثیر هورمون‌ها و حلال‌های آلی و آسکوربیک اسید بر فعالیت پلی‌گالاکتوروناز

فعالیت باقیمانده پلی‌گالاکتوروناز، در حضور هورمون‌های نیکوتینیک اسید^{۷۳}، نفتالین استیک اسید^{۷۴} و بنزیل آمینو پورین^{۷۵} (۲۰ mM) و گلیسرول (۰ تا ۵ درصد) و اسید آسکوربیک (۲۰ Mm) در شرایط دما و pH بهینه اندازه‌گیری گردید (شکل ۴-۱۷). نتایج نشان داد نیکوتینیک اسید و نفتالین استیک اسید و بنزیل آمینو پورین، به ترتیب موجب کاهش فعالیت آنزیم به ۷۷، ۲۷ و ۱۵/۳ درصد فعالیت بیشینه می‌گردد. فعالیت آنزیم در حضور گلیسرول در غلظت‌های ۱ و ۵ درصد به ترتیب ۱۲۸ و ۲۰ درصد فعالیت بیشینه می‌باشد. اسید آسکوربیک موجب افزایش فعالیت آنزیم به ۲۱۷ درصد فعالیت بیشینه می‌گردد.

۵-۴ بررسی مطالعات ساختاری آنزیم پلی‌گالاکتوروناز

مطالعات ساختاری آنزیم به منظور مشخص نمودن حدواسط‌های فولدینگ و ارتباط ساختار با عملکرد و پایداری آنزیم صورت گرفت. این مطالعات شامل بررسی فلورسانس ذاتی و خارجی آنزیم و نیز مطالعه کینتیک آنزیم در ارتباط با جایگاه فعال پس از اعمال تغییرات شیمیایی می‌باشد که در ادامه نتایج این بررسی‌ها شرح داده می‌شود.

۱-۵-۴ بررسی طیف فلورسانس ذاتی آنزیم در pHهای ۱ تا ۱۲

مطالعه طیف فلورسانس ذاتی آنزیم در pHهای ۱ تا ۱۲ صورت گرفت (شکل ۴-۱۸). حداکثر نشر آنزیم در pHهای ۲ تا ۱۰ و در طول موج حدود ۳۵۰ نانومتر و حداقل نشر در pH = ۱ می‌باشد. در pHهای ۱۱ و ۱۲ نیز از شدت فلورسانس کاسته شد.

⁷³ Nicotinic acid

⁷⁴ Naphthalene acetic acid

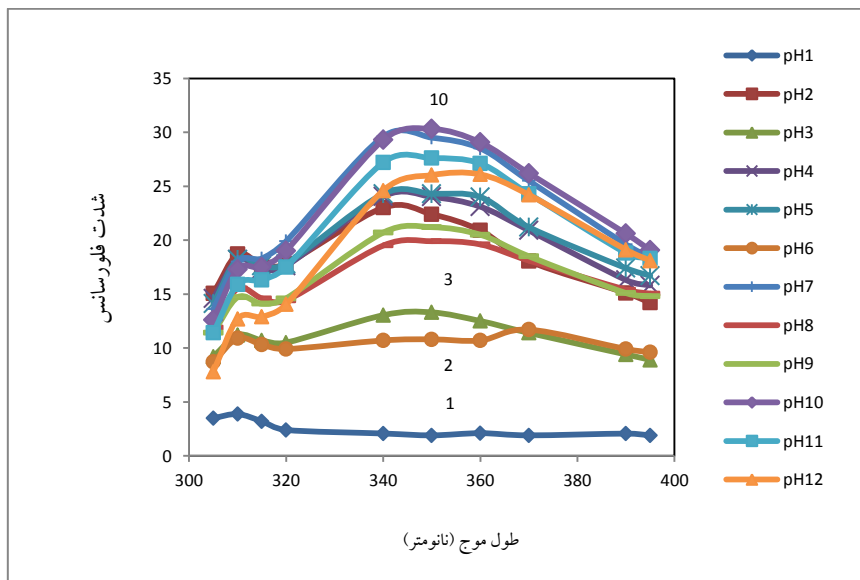
⁷⁵ 6-Benzylaminopurin

۴-۵-۲ بررسی طیف فلورسانس خارجی آنزیم در pHهای ۱ تا ۱۲ با استفاده از ANS

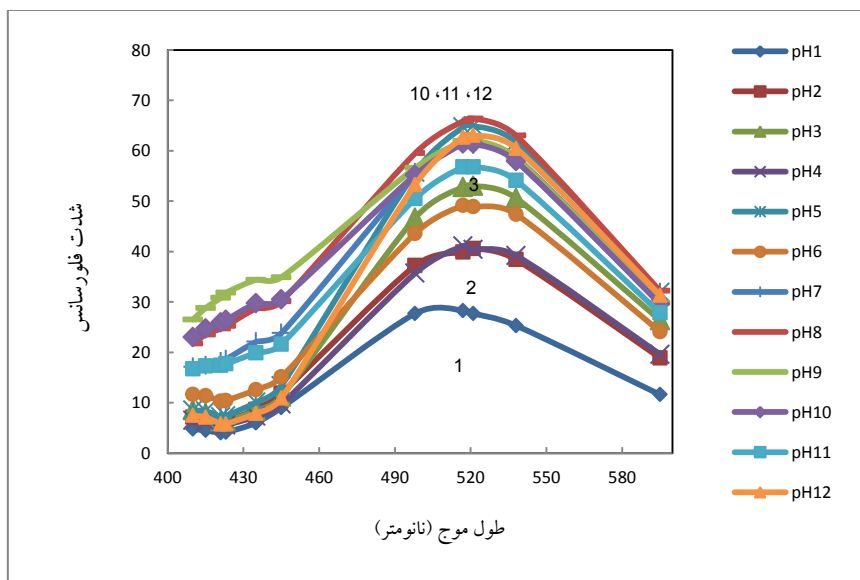
مطالعه طیف فلورسانس خارجی آنزیم در pHهای ۲ تا ۱۲ و در حضور ANS صورت گرفت (شکل ۴-۱۹). اتصال ANS به نواحی هیدروفوب موجب افزایش شدت فلورسانس می‌شود. در این بررسی حداکثر نشر در pHهای ۵ تا ۱۲ با سیر صعودی و در طول موج ۵۲۰ نانومتر، و حداقل نشر در pHهای ۱ و ۲ می‌باشد. در pH برابر ۳ نسبت به pH برابر ۲ اندکی افزایش در شدت فلورسانس مشاهده می‌شود.

۴-۵-۳ مطالعات جایگاه فعال از طریق اعمال تغییرات شیمیایی

فعالیت باقیمانده پلی‌گالاکتوروناز، در حضور مهارکننده‌ها (غلظت ۵ میلی مولار) در شرایط دما و pH بهینه اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد PMSF موجب کاهش فعالیت آنزیم به ۶۷ درصد فعالیت بیشینه گردید. اوره در غلظت ۱ میلی مولار تاثیری بر فعالیت آنزیم نداشت و در غلظت ۵ میلی مولار موجب افزایش فعالیت آنزیم به ۱۲۰ درصد فعالیت بیشینه و در غلظت ۱۰ میلی مولار موجب کاهش فعالیت آنزیم به ۳۰ درصد فعالیت حداکثر می‌گردد. یدواستامید و یدواستیک اسید تاثیری بر فعالیت آنزیم نداشتند.



شکل ۴-۱۸ فلورسانس ذاتی آنزیم در pHهای ۱ تا ۱۲، حداقل نشر pH ۱ و حداکثر نشر pH ۲ تا ۱۰.



شکل ۴-۱۹ طیف فلورسانس خارجی پلی‌گالاکتوروناز در حضور ANS و در pHهای ۱ تا ۱۲، حداقل نشر در pH ۱ و حداکثر نشر pH ۱۲ بود.

فصل پنجم

بحث

پلی‌گالاکتورونازها، گروهی از آنزیم‌ها با عملکرد پکتینولیتیک می‌باشند که عمدتاً در گیاهان سبب هیدرولیز سوبسترای پکتینی می‌شوند. این آنزیم‌ها به طور گسترده در گیاهان عالی و میکروارگانیسم‌ها موجود می‌باشند. نقش پلی‌گالاکتورونازها به عنوان فاکتور اصلی در آسیب به میزبان‌های گیاهی در بسیاری از پاتوژن‌های قارچی و باکتریایی گزارش شده است (مترنز و همکاران، ۲۰۰۸). در این رابطه، احتمال نقش تنظیمی این آنزیم‌ها در بیماری‌زایی پاتوژن‌های گیاهی و نیز در کنترل و تنظیم فرآیند رسیدگی و پیری در گیاهان مطرح می‌باشد. اخیراً شناسایی و معرفی مهارکننده‌های پلی‌گالاکتورونازها برای کنترل قارچ‌های فیتوپاتوژنیک مورد توجه قرار گرفته است. کاربرد پلی‌گالاکتورونازها در صنایع گوناگون مانند نساجی، پردازش فیبرهای گیاهی، چای، قهوه، استخراج نفت، صنایع پالایش فاضلاب‌های حاوی مواد پکتیکی، صنایع کاغذ سازی و خالص سازی ویروس‌ها گزارش شده است (جایانی و همکاران، ۲۰۰۵، نیچر و همکاران، ۲۰۰۸). انتخاب منبع میکروبی مناسب جهت تولید پلی‌گالاکتورونازها به فاکتورهای مختلف از قبیل ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی، شامل pH و پایداری حرارتی آنزیم‌ها، بستگی دارد. مطالعه روش‌های تولید و خالص سازی پلی‌گالاکتورونازها جهت مطالعه ویژگی‌های سینتیکی و مهارکننده‌های این آنزیم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد.

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، کاهش خطر آلودگی میکروبی که عمدتاً از منبع استخراج آنزیم ناشی می‌شود و کاهش ویسکوزیته مخلوط واکنش که موجب کاهش هزینه پمپ، فیلتراسیون و سانتریفیوژ می‌گردد، از مزایای مهم استفاده از دمای بالا در این صنایع می‌باشند. اکثر پلی‌گالاکتورونازها در محدوده‌ی دمایی ۳۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت می‌نمایند اما معدودی از آنها مانند پلی‌گالاکتورونازهای جدا شده از *Bacillus licheniformis* و *Fusarium oxysporum*، ترموفیل می‌باشند و دارای اپتیمم فعالیت در محدوده‌ی دمایی ۵۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد

می‌باشند (جایانی و همکاران، ۲۰۰۵). در این مطالعه پلی‌گالاکتوروناز خالص در دمای ۶۰ درجه سانتی-گراد دارای بیشترین میزان فعالیت بود. همچنین مشخص گردید آنزیم مورد بررسی در دماهای ۳۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد دارای بیش از ۹۰ درصد فعالیت حداکثر می‌باشد. این آنزیم در دماهای ۲۰ و ۸۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد دارای بیش از ۷۰ درصد فعالیت بیشینه می‌باشد. 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 هیدروفوبیک و در سطح پروتئین قرار گرفتن اسیدهای آمینه هیدروفیل می‌باشد.

پایداری آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در دماهای ۵۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد در بازه زمانی صفر تا ۹۰ دقیقه بررسی گردید. این آنزیم پس از ۹۰ دقیقه تیمار در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد، ۷۰ درصد از فعالیت خود را حفظ نمود. در هیچ یک از مطالعاتی که تاکنون در مورد پایداری حرارتی پلی‌گالاکتورونازهای منابع گوناگون صورت گرفته این میزان از پایداری حرارتی آنزیم گزارش نشده است به‌طوریکه مارتینز و همکاران (۲۰۱۳) دمای اپتیمم فعالیت آنزیم را ۶۰ درجه سانتی‌گراد گزارش نمودند، با این حال آن‌ها اعلام نمودند این آنزیم نسبتاً ترموفیل، پس از ۶۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۹۰ درصد فعالیت خود را از دست می‌دهد. انجام بررسی غیر فعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم نشان داد آنزیم پلی‌گالاکتوروناز خالص در دماهای ۵۰، ۷۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب دارای نیمه عمر حرارتی ۳۰۰، ۲۰۳ و ۱۷۷ دقیقه می‌باشد. براساس نتایج حاصل از نمودار آرنیوس، انرژی اکتیواسیون غیر فعال-سازی حرارتی آنزیم $15/26 \text{ KJ/mol}$ بود که بسیار کمتر از مقدار گزارش شده برای این آنزیم در منابع دیگر می‌باشد که حاکی از پایین بودن سرعت واکنش دنا تورا سیون حرارتی پلی‌گالاکتوروناز مورد بررسی است. میزان تغییرات آنتالپی غیر فعال‌سازی حرارتی آنزیم $12/41 \text{ KJ/mol}$ می‌باشد که بسیار کمتر از انرژی لازم جهت باز شدن ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها می‌باشد (مهماندوست و همکاران، ۱۳۹۰). مقدار

تغییرات انرژی آزاد غیر فعال سازی حرارتی آنزیم در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد، حدود ۱۱۲ کیلو ژول بر مول بود. میزان بالای این پارامتر حاکی از ثبات قابل ملاحظه ساختمان شیمیایی و سه بعدی آنزیم و مقاومت آن نسبت به حرارت می باشد. بنابراین مشخص گردید، آنزیم قادر به حفظ فعالیت خود در درجه حرارت بسیار بالا در مدت زمان طولانی می باشد.

کاربرد گسترده پلی گالاکتورونازهای پایدار در شرایط بازی و اسیدی در صنایع گوناگون از جمله پالایش زیستی فاضلاب های حاوی مواد پکتینی گزارش شده است. پلی گالاکتورونازهای با قابلیت فعالیت و پایداری در شرایط بازی، به عنوان جایگزین عملی و اقتصادی فرآیندهای سنتی، جهت کاهش زباله های آنیونی و آلودگی های پساب صنایع کاغذسازی مورد استفاده قرار می گیرند (تورس و همکاران، ۲۰۰۶). نتایج بررسی تأثیر pH بر میزان فعالیت پلی گالاکتوروناز نشان داد این آنزیم در $\text{pH} = 3$ دارای بیشینه فعالیت بود و در $\text{pH} 2$ نیز دارای ۹۰ درصد فعالیت حداکثری می باشد. آنزیم در pH های ۴ و ۵ نیز به ترتیب دارای ۸۰ و ۶۰ درصد فعالیت بیشینه می باشد. بررسی پایداری آنزیم در pH های مختلف نشان می دهد این آنزیم در طیف وسیعی از pH های اسیدی و بازی از پایداری قابل توجهی برخوردار است. به طوریکه در pH های ۳ و ۱۲ پس از ۶۰ دقیقه ۱۰۰ درصد فعالیت آنزیم حفظ می شود.

نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت و پایداری حرارتی و اسیدیته پلی گالاکتورونازی که از قارچ *Macrophomina phaseolina* تولید و خالص سازی گردید، حاکی از ثبات بسیار بالای ساختار شیمیایی و مولکولی این آنزیم و مقاومت بسیار بالای آن نسبت به حرارت و شرایط اسیدیته گوناگون می باشد. بنابراین قارچ به عنوان منبع مناسب جهت تولید آنزیم پلی گالاکتوروناز به منظور استفاده در صنعت، پیشنهاد می گردد.

نمودار فعالیت آنزیم در برابر تغییرات غلظت سوبسترا، سیگموئیدی بود و از الگوی کینتیک میکائیلیس-منتن پیروی ننمود. در این رابطه نمودار لاین ویور بورک (تقعر رو به بالا) و ادی هافستی نیز خطی نمی-

باشند. ضریب هیل ۱۰/۱ و میزان حساسیت واکنش آنزیمی (R_s) برابر ۱/۷ برآورد گردید. میزان حساسیت واکنش آنزیمی در ارتباط با تعداد جایگاه اتصال و ضریب هیل الگوی تعاون را توصیف می‌نماید. بنابراین آنزیم دارای واکنش فوق حساسیت نسبت به تغییرات غلظت سوبسترا می‌باشد. با توجه به این نتایج مشخص گردید، این آنزیم آلوستریک است و حداقل دو جایگاه کاتالیتیک دارد و بین جایگاه‌های اتصال، برهمکنش تعاونی مثبت وجود دارد. مکانیسم تنظیم فیزیولوژیکی این آنزیم ناشناخته است. جاسیندا و همکاران (۲۰۰۰)، گزارش نمودند پلی‌گالاکتوروناز خالص‌سازی شده از *Verticillum dahliae* از الگوی میکائیلیس پیروی نمی‌نماید، ولی گزارشی از بررسی الگوی کینتیک آنزیم ارائه ننموده‌اند.

در این مطالعه به بررسی الگوی کینتیکی اتصال تعاونی آنزیم نیز پرداخته شد. در این رابطه نوسان شیب نمودار هیل در غلظت‌های متفاوت سوبسترا، حاکی از تفاوت در میزان تمایل آنزیم به سوبسترا در غلظت‌های گوناگون سوبسترا می‌باشد. میزان شیب نمودار در غلظت‌های پایین سوبسترا تقریباً ۰/۵ می‌باشد و با افزایش ناچیز میزان غلظت سوبسترا، تفاوت چشمگیری در میزان شیب نمودار مشاهده شد (بالتر از ۱) و این سیر صعودی جهشی با افزایش بسیار ناچیز غلظت سوبسترا، دوباره تکرار شد؛ در واقع آنزیم در دو غلظت متفاوت متوالی، دو بار افزایش فعالیت با شیب تند دارد که سیر افزایشی دوم، با شیب به مراتب بالاتری رخ می‌دهد. به نظر می‌رسد میزان ثابت تمایل آنزیم به سوبسترا در زمان اتصال اولین مولکول پلی‌گالاکتورونیک اسید به پلی‌گالاکتوروناز، بسیار بالاتر از این میزان در زمان اتصال آخرین مولکول سوبسترا به آنزیم باشد.

لان (۱۹۸۷) گزارش نمود حلال‌های آلی اثرات فیزیکی و شیمیایی متفاوتی بر فعالیت آنزیم‌ها دارند. در این مطالعه فعالیت آنزیم در حضور گلیسرول در غلظت‌های ۱ و ۵ درصد به ترتیب ۱۲۸ و ۲۰ درصد فعالیت بیشینه می‌باشد. نتایج نشان داد توپین ۲۰ و ۸۰ به ترتیب موجب کاهش فعالیت آنزیم به ۴۴ و ۶۷ درصد فعالیت بیشینه و ترایتون X-100 موجب افزایش فعالیت آنزیم به ۲۳۳ درصد فعالیت بیشینه

می‌گردد. توپین ۸۰ دارای زنجیره‌ی اسید چرب ۱۸ کربنی است و احتمالاً در رقابت با سوبسترا موجب مهار آنزیم گردیده است. به نظر می‌رسد ترایتون X-100 با تغییر ساختار آنزیم به عنوان یک افکتور آلوستریک آنزیم عمل می‌نماید به‌طوری‌که با افزایش تمایل آنزیم به سوبسترا، فعالیت آنزیمی را به‌طور آلوستریک افزایش می‌دهد. یوکاوا و همکاران (۱۹۹۳) چنین تاثیری از تریتون را بر

اسیدآمینه سرین واقع در جایگاه فعال، توسط PMSF مهار می‌گردد. PMSF موجب کاهش فعالیت آنزیم به ۶۷ درصد فعالیت پیشینه گردید که ممکن است حاکی از وجود اسید آمینه سرین در جایگاه فعال آنزیم باشد. یدواستامید و یدو استیک اسید موجب بلوکه شدن اسید آمینه سیستئین می‌گردند. این دو ترکیب شیمیایی تاثیری بر فعالیت آنزیم نداشتند و در نتیجه احتمالاً سیستئین اسید آمینه کاتالیتیکی آنزیم نمی‌باشد.

یون‌های فلزی نقش بسیار مهمی را در ساختار و عملکرد آنزیم‌ها ایفا می‌نمایند. اثر غلظت یک میلی‌مولار یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم بررسی گردید. در این رابطه مشخص گردیده است که نمک‌های $MnCl_2$ ، $FeSO_4$ ، $MnSO_4$ و $CoCl_2$ موجب افزایش فعالیت آنزیم می‌گردند. نمک‌های $MgCl_2$ ، $NiSO_4$ ، $BaCl_2$ ، $liCl$ و $CuSO_4$ به‌طور موثر موجب مهار فعالیت آنزیم می‌گردند و تمامی نمک‌های فسفات در غلظت یک میلی‌مولار موجب بلوکه شدن فعالیت آنزیم می‌گردند. مارتینز و همکاران (۲۰۱۳) گزارش متفاوتی از میزان فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز قارچ *Teramoascus aurantiacus* در حضور یون‌های فلزی ارائه نمودند.

میزان ضریب هیل برای اتصال $MgCl_2$ و $BaCl_2$ به آنزیم به ترتیب ۲/۴- و ۰/۲۹- می‌باشد. این نشان می‌دهد این ترکیبات با الگوی تعاونی منفی اتصال خود، موجب کاهش فعالیت آنزیم می‌گردند. با توجه به نتایج حاصل از بررسی مکانیسم بازدارندگی برخی از افکتورها، احتمالاً پلی‌گالاکتوروناز مورد بررسی علاوه

بر اتصال تعاونی سوبسترا نسبت به برخی افکتورها مانند نمک $MgCl_2$ و نمک K_2HPO_4 دارای تنظیم آلوستری از طریق اثرات هتروتروپیک است.

به نظر می‌رسد زمانیکه شرایط شیمیایی خارج سلولی قارچ در جهت بهینه‌سازی برهم‌کنش‌های آلوستریک پلی‌گالاکتوروناز با سوبسترا و افکتورهای مثبت فراهم گردد، تنظیم بیماری‌زایی قارچ در مسیر پایداری انجام می‌گیرد. بنابراین با ایجاد اختلال در این شرایط بهینه، می‌توان بیماری‌زایی قارچ را بلوکه نمود.

مطالعات ساختاری آنزیم در جهت مشخص نمودن ارتباط ساختار با عملکرد و پایداری آنزیم صورت گرفت. بررسی نمودار فلورسانس ذاتی و خارجی آنزیم نشان می‌دهد ساختار آنزیم در pH های ۲ تا ۱۲ از پایداری قابل توجهی برخوردار می‌باشد. مطالعه فلورسانس ذاتی آنزیم نشان می‌دهد، آنزیم در pH بهینه ۳ دارای نشر کمتری نسبت به pH ۲ است احتمالاً تغییر ساختار آنزیم در pH بهینه به‌گونه‌ای است که تریپتوفان در معرض حلال قطبی قرار می‌گیرد.

مطالعه فلورسانس خارجی آنزیم نشان می‌دهد، آنزیم در pH بهینه ۳ دارای فلورسانس بیشتری نسبت به pH ۲ است. به نظر می‌رسد آنزیم جهت داشتن حداکثر فعالیت در pH بهینه تا حدی از حالت فولدینگ خارج و همچنین احتمالاً شکل تاخوردگی کامل آنزیم در pH ۲ مشاهده می‌گردد. فلورسانس آنزیم در pH ۱ کاهش یافته است، احتمالاً در این pH پروتئین تجزیه شده است و به سمت خطی شدن پیش رفته است. میزان فلورسانس در pH های ۵ تا ۱۲ افزایش یافته است به نظر می‌رسد بررسی حدواسط‌های آنزیمی در این pH ها امکان‌پذیر باشد.

در این پژوهش الگوی کینتیک پلی‌گالاکتوروناز قارچ *Macrophomina phaseolina* و برهم‌کنش‌های آن با افکتورهای مثبت و منفی مشخص گردید. پایداری و ترجیح آنزیم در شرایط مختلف اسیدیته و دمایی بررسی شد. مطالعات تکمیلی و تخصصی QSAR و زیست‌سنجی گام موثری در حذف خسارت این

فیتوپاتوزن از مزارع خواهد بود. در این راستا نتایج حاصل از این پژوهش امکان ارائه الگویی پایدار را در این مطالعات فراهم می‌سازد.

پیشنهادات

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، پیشنهادات زیر در راستای مطالعات تکمیلی در زمینه‌ی مبارزه با فیتوپاتوزن ارائه می‌گردد:

تعیین ساختار سه‌بعدی آنزیم از طریق کریستالوگرافی اشعه ایکس.

انجام مطالعات ساختاری و بیوانفورماتیکی گسترده‌تر، جهت تعیین خصوصیات و وضعیت اتصال افکتورها به آنزیم (مولکولار داکینگ).

مطالعات تخصصی structure activity relationship (SAR) و در نهایت زیست‌سنجی.

همچنین به‌دلیل ظرفیت بالای آنزیم پلی‌گالاکتوروناز خالص‌سازی شده، جهت کاربرد در صنعت، بهینه‌سازی تولید و خالص‌سازی آنزیم به لحاظ کمی و کاهش هزینه‌های

منابع

مهماندوست ن، کدخدایی ر و موسویان م، (۱۳۹۰) "بررسی تأثیر هم‌زمان امواج فراصوت و حرارت بر غیر فعال‌سازی آنزیم پکتین متیل استراز آب پرتقال" فصلنامه علوم و صنایع غذایی. شماره ۲۹، دوره ۸، ص ۱۰۱

رعیت پناه س، علوی و و عرب غ، (۱۳۸۶) "واکنش تعدادی از لاین‌های پیشرفته سویا نسبت به بیماری پوسیدگی ذغالی *Macrophomina phaseolina*(Tassi) Gold در شرق مازندران. نشریه نهال وبذر. شماره ۲، جلد ۲۳، ص ۱۸۱.

رحمانی ع، یاراحمدی م، شعیبی‌زاده ف (۱۳۹۰). "شناخت پکتین و تأثیرات آن در صنعت قند" پنجمین همایش ملی فن‌آوران نیشکر ایران. ص ۴۲۹.

پهلوانی م و رضوی ا. (۱۳۸۶). "تعیین ژنوتیپ گلرنگ در مقابل عامل بیماری پوسیدگی ذغالی" مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. شماره دوم، جلد چهاردهم.

قرنفلی م، موسوی موحدی ع و خان چمنی ج. (۱۳۸۲). "سینتیک آنزیم‌های غیر هایپربولیک" فصلنامه علمی-پژوهشی دانشکده پیراپزشکی. شماره ۲. ص ۵۹.

Ahangar, M.A., Dar, G.H., Bhat, Z.A., Sofi, N.R (2011) Fungi associated with root rot of *Pinus walichiana* seedlings in Kashmir. *Plant Pathology Journal*.

Almeida, A. M Abdelnoor, R. V. Arias, C. A. Valdemar Carvalho, P. Filho, D. S. Marin, S. R. Benato, L. C. Pinto, M. C. and Carvalho, J. P. Genotypic Diversity among Brazilian Isolates of *Macrophomina phaseolina* Revealed by RAPD. 2003. *Fitopatol. bras.* 28(3).279-285.

Beilen, J.B., Li, Z (2002) Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*. 13:338-344

Sweeney, M.D., Xu, F (2012) Biomass Converting Enzymes as Industrial Biocatalysts for Fuels and Chemicals: Recent Developments. *Catalysts* . 2: 244-263.

Bradford, M.M., 1976, *A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Cabanne, C. and B. Donèche, *Purification and characterization of two isozymes of polygalacturonase from Botrytis cinerea. Effect of calcium ions on polygalacturonase activity*. *Microbiological research*, 2002. 157(3): p. 183-189.

Chemat, F. and M.K. Khan, *Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction*. *Ultrasonics sonochemistry*, 2011. 18(4): p. 813-835.

- Chiacchierini, E., D. Restuccia, and G. Vinci, *Bioremediation of food industry effluents: recent applications of free and immobilised polyphenoloxidases*. Food science and technology international, 2004. 10(6): p. 373-382.
- Cook, P.F. and W.W. Cleland, *Enzyme kinetics and mechanism* 2007: Garland Science New York.
- Cooper, R.M., B. Rankin, and R. Wood, *Cell wall-degrading enzymes of vascular wilt fungi. II. Properties and modes of action of polysaccharidases of Verticillium albo-atrum and Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. Physiological Plant Pathology, 1978. 13(1): p. 101-134.
- Cornish-Bowden, A., *A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors*. Biochemical Journal, 1974. 137(1): p. 143.
- Couri, S., et al., *Influence of metal ions on pellet morphology and polygalacturonase synthesis by Aspergillus niger 3T5B8*. Brazilian Journal of Microbiology : (1) 34 . 2003 , p. 16-21.
- DeMooy, C. and D. Burke, *External infection mechanism of hypocotyls and cotyledons of cowpea seedlings by Macrophomina phaseolina*. Plant Disease, 1990. 74(9).
- Dinu, D., et al., *Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by Aspergillus niger MIUG 16*. Journal of biotechnology, 2007. 131(2): p. 128-137.
- Dong, Z. and Z. Wang, *Isolation and characterization of an exopolygalacturonase from Fusarium oxysporum f. sp. cubense race 1 and race 4*. BMC biochemistry , : (1) 12 . 2011 p. 51.
- D'Ovidio, R., et al., *Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2004. 1696(2): p. 237-244.
- Edraki, V. and Z. Banihashemi, *Phenotypic diversity among isolates of Macrophomina phaseolina and its relation to pathogenicity*. Iranian Journal of Plant Pathology, 2011. 46(4): p. Pe319, En93-En100.
- Nakkeeran, E. Subramanian, R and Umesh-Kumar S Purification of polygalacturonase from solid-state cultures of Aspergillus carbonarius. Journal of Bioscience and Bioengineering 2010. 109(2): 101–106.
- Favela-Torres, E., T. Volke-Sepúlveda, and G. Viniegra-González, *Production of hydrolytic depolymerising pectinases*. Food Technology and Biotechnology . 2006 , : (2) 44 p. 221.
- FIELDING, A.H., *Natural inhibitors of fungal polygalacturonases in infected fruit tissues*. Journal of General Microbiology, 1981. 123(2): p. 377-381.
- Fontes, R., J. Meireles Ribeiro, and A. Sillero, *Inhibition and activation of enzymes. The effect of a modifier on the reaction rate and on kinetic parameters*. 2000.
- Fort, S., et al., *Mixed-Linkage Cellooligosaccharides: A New Class of Glycoside Hydrolase Inhibitors*. ChemBioChem, 2001. 2(5): p. 319-325.
- Gloster, T.M., et al., *Glycosidase inhibition: an assessment of the binding of 18 putative transition-state mimics*. Journal of the American Chemical Society, 2007. 129(8): p. 2345-2354.

- Islam Md. Sh. Haque M. S. Islam M. M. Emdad E. M. Halim, A. Quazi Md, M. H. Hossain, M. Z. Ahmed, B. Sifatur, R. Md Sharifur, R. Md Monjurul, A. Shaobin, H. Xuehua, W. Saito J. A. and Alam, M. Tools to kill: Genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. BMC Genomics. 2012, 13(493): pp1-16.
- Jayani, R.S., S. Saxena, and R. Gupta, *Microbial pectinolytic enzymes: a review*. Process Biochemistry, 2005. 40(9): p. 2931-2944.
- Jurick, W.M., et al., *Purification and Biochemical Characterization of Polygalacturonase Produced by Penicillium expansum During Postharvest Decay of Anjou Pear*. Phytopathology, 2010. 100(1): p. 42-48.
- Juwon, A.D., F. Akinyosoye, and O.A. Kayode, *Purification, Characterization and Application of Polygalacturonase from Aspergillus niger CSTRF*. Malaysian Journal of Microbiology, 2012. 8(3): p. 175-183.
- Kars, I., et al., *Necrotizing activity of five Botrytis cinerea endopolygalacturonases produced in Pichia pastoris*. The Plant Journal, 2005. 43(2): p. 213-225.
- Kaur, S., et al., *Carbohydrate degrading enzyme production by plant pathogenic mycelia and microsclerotia isolates of Macrophomina phaseolinathrough koji fermentation*. Industrial Crops and Products, 2012. 36(1): p. 140-148.
- Khan, S.N., *Macrophomina phaseolina as causal agent for charcoal rot of sunflower*. Mycopath, 2007. 5(2): p. 111-118.
- Khandelwal, H.B., et al., *Eco-friendly enzymatic dehairing of skins and hides by C. brefeldianus protease*. Clean Technologies and Environmental Policy: p. 1-13.
- Kim, J.R. and M. Ostermeier, *Modulation of effector affinity by hinge region mutations also modulates switching activity in an engineered allosteric TEM1 β -lactamase switch*. Archives of biochemistry and biophysics, 2006. 446(1): p. 44-51.
- Kim, Y.S., et al., *Effects of sucrose on conformational equilibria and fluctuations within the native-state ensemble of proteins*. Protein Science, 2003. 12(6): p. 1252-1261.
- Kimura, H., Uchino, F., Mizushima, S (1972) Properties of a Polygalacturonase Produced by *Acrocyndrium*. Journal of General Microbiology. **74**: 127-137
- Kirk, T.K. and T.W. Jeffries. *Roles for microbial enzymes in pulp and paper processing*. in ACS Symposium Series. 1996. Washington, DC: American Chemical Society, [1974.-]
- Lagaert, S., T. Beliën, and G. Volckaert. *Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes*. in Seminars in cell & developmental biology. 2009. Elsevier.
- Lattanzio, V., V.M. Lattanzio, and A. Cardinali, *Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects*. Phytochemistry: Advances in research, 2006. 661: p. 23-67.
- Leone, G., E. Schoffelmeer, and J.V.d. Heuvel, *Purification and characterization of a constitutive polygalacturonase associated with the infection process of French bean leaves by Botrytis cinerea*. Canadian journal of Botany, 1990. 68(9): p. 1921-1930.
- M. JurickII, W., Vico, I., L. Gaskins, V., M. Garrett, W., D. Whitaker, B., J. Janisiewics, W., S. Conwey., W (2009) Purification and Biochemical

Characterization of Polygalacturonase Produced by *Penicillium expansum* During Postharvest Decay of ‘Anjou’ Pear. *Biochemistry and Cell Biology*. **100**: 42-48

Leninger AL, Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2004) *Leninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman and Company. New York.

Liang, J. Kim, J. R. Boock, J. B. Mansell, T. J. and Ostermeier, M. Ligand binding and allostery can emerge simultaneously. *Protein Science* 2007, 16:929–937.

Lindsley, J. E. and Rutter, J. Whence cometh the allosterome? *PNAS*. 2006, 103 (28) **10533–10535**.

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

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

Mathonet, P. Barrios, H. Soumillion, P. and Fastrez, J. Selection of allosteric β -lactamase mutants featuring an activity regulation by transition metal ions. *Protein Science* 2006, 15:2335–2343.

Matteo, A. Di. Federici, L. Mattei, B. Salvi, G. Johnson, K. A. Savino, C. Lorenzo, G. D. Tsernoglou, D. and Cervone, F. The crystal structure of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein involved in plant defense. *PNAS*. 2003. 100(17). pp **10124–10128**.

Mengistu, A., et al., *Propagule densities of *Macrophomina phaseolina* in soybean tissue and soil as affected by tillage, cover crop, and herbicide*. *Plant Health Progress*. Online publication. doi, 2009. 10.

Mertens, J.A., R.C. Burdick, and A.P. Rooney, *Identification, biochemical characterization, and evolution of the *Rhizopus oryzae* 99–880 polygalacturonase gene family*. *Fungal Genetics and Biology*, 2008. 45(12): p. 1624–1636.

Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem* 31: 426-428

Misra, P., *Enzyme kinetics*. 2008.

Mohamed, S.A., et al., *Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum** *Journal of biotechnology*, 2006. 127(1): p. 54-64.

Motallebi, M., H.A. Azad, and M. Zamani, *Polygalacturonase production by *Sclerotinia sclerotiorum*, causal agent of canola stem rot: parameter optimization using Taguchi approach*. *World Applied Sciences Journal*, 2008. 3(1): p. 96-101.

Nakkeeran, E., R. Subramanian, and S. Umesh-Kumar, *Purification of polygalacturonase from solid-state cultures of *Aspergillus carbonarius**. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2010. 109(2): p. 101-106.

Nasuno, S., P. Starr, M (1966) Polygalacturonase of *Erwinia Carotovora*. *The Journal of Biological Chemistry*. **25**: 5298-5306

Niture, S.K., et al., *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*, 2008. 163(1): p. 51-62.

- Niture, S.K. and A. Pant, *Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of Fusarium moniliforme*. Microbiological research, 2004. 159(3): p. 305-314.
- Oeser, B., et al., *Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the Claviceps purpurea/rye interaction*. Fungal Genetics and Biology, 2002. 36(3): p. 176-186.
- Palanivelu, P., *Polygalacturonases: Active site analyses and mechanism of action*. Indian Journal of Biotechnology, 2006. 5(2): p. 148.
- Panda, T., S.R. Nair, and M.P. Kumar, *Regulation of synthesis of the pectolytic enzymes of Aspergillus niger*. Enzyme and microbial technology, 2004. 34(5): p. 466-473.
- Premamalini, T. Ambujavalli, B. T. Vijayakumar, R.Rajyoganandh, S. V., Kalpana, S., Kindo, A. J. Fungal keratitis caused by Macrophomina phaseolina – Acasereport. Medical Mycology Case Reports 1 (2012) 123–126.
- Rao, T., N.B. Gol, and K.K. Shah, *Effect of postharvest treatments and storage temperatures on the quality and shelf life of sweet pepper (Capsicum annum L.)*. Scientia Horticulturae, 2011. 132: p. 18-26.
- Ridley, B.L., M.A. O'Neill, and D. Mohnen, *Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling*. Phytochemistry, 2001. 57(6): p. 929-967.
- Sansone, G., et al., *Inhibitors of polygalacturonase and laccase of Botrytis cinerea and their application to the control of this fungus*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2011. 65(1): p. 243-247.
- Schafer, W., *Molecular mechanisms of fungal pathogenicity to plants*. Annual review of phytopathology, 1994. 32(1): p. 461-477.
- Schnitzhofer, W., et al., *Purification and mechanistic characterisation of two polygalacturonases from Sclerotium rolfsii*. Enzyme and microbial technology, 2007. 40(7): p. 1739-1747.
- Schwartz, H.F., et al., *Compendium of bean diseases*. St. Paul: APS, 2005.
- Semenova, M., et al., *Isolation and properties of pectinases from the fungus Aspergillus japonicus*. Biochemistry (Moscow), 2003. 68(5): p. 559-569
- Soetan, K., O. Aiyelaagbe, and C. Olaiya, *A review of the biochemical, biotechnological and other applications of enzymes*. African Journal of Biotechnology, 2010. 9(4).
- Talarczyk, A. and Hennig, J. Early defence responses in plants infected with pathogenic organisms. Cellular and Molecular Biology Letters 2001. 6: pp 955- 970.
- Tari, C., N. Dogan, and N. Gogus, *Biochemical and thermal characterization of crude exo-polygalacturonase produced by Aspergillus sojae*. Food Chemistry, 2008. 111(4): p. 824-829.
- Torres, S., et al., *A colorimetric method to quantify endo-polygalacturonase activity*. Enzyme and microbial technology, 2011. 48(2): p. 123-128.
- Walker EJ, Ralston GB, Darvey IG. An allosteric model for ribonuclease. Biochem J. 1975; 147: 425-433
- Wei, J., et al., *Changes and postharvest regulation of activity and gene expression of enzymes related to cell wall degradation in ripening apple fruit*. Postharvest Biology and Technology, 2010. 56(2): p. 147-154.

- Wu, Y., Y. Deng, and Y. Li, *Changes in enzyme activities in abscission zone and berry drop of 'Kyoho' grapes under high O₂ or CO₂ atmospheric storage*. LWT-Food Science and Technology, 2008. 41(1): p. 175-179.
- Yang, B., et al., *Isolation, expression and characterization of two single-chain variable fragment antibodies against an endo-polygalacturonase secreted by Sclerotinia sclerotiorum*. Protein expression and purification, 2009. 64(2): p. 237-243.
- Yokoyama, R. and K. Nishitani, *Genomic basis for cell-wall diversity in plants. A comparative approach to gene families in rice and Arabidopsis*. Plant and cell physiology, 2004. 45(9): p. 1111-1121.
- Yu, E.W. and Koshland Jr., D.E. 2001. Propagating conformational changes over long (and short) distances in proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 9517–9520
- Yukawa, M., et al., *Purification and characterization of endogenous protein activator of human platelet proteasome*. Journal of biochemistry, 1993. 114(3): p. 317-323.

Abstract

The polygalacturonase of *Macrophomina phaseolina*, causal agent of charcoal rot disease in wide range of plants, seems to be involved in penetration into the host plant cell wall. Ion exchange chromatography was used to isolate the enzyme. The enzyme had a relative molecular mass of 80 kDa. Its optimum activity was at pH = 3 and 60 °C, being stable at wide ranges of pH and temperature ($t_{1/2}$ of 177 min at 90°C), making it useful for industrial applications. The activation energy and activation enthalpy for heat inactivation was 15.26 kJ/mol, and 12.41 kJ/mol, respectively. Kinetics of enzyme analysis ($n_H = 10.1$, $R_s = 1.7$) revealed a non-typical Michaelis–Menten pattern, illustrating a sigmoidal curve with $V_{max} = 0.008 \mu\text{mol/min}$ and $K_{0.5} = 3 \text{ mg/ml}$. The data was indicative of the presence of at least two catalytic sites with positive allosteric interaction between polygalacturonase and the substrate (Polygalacturonic acid). Triton X-100, MnCl_2 , FeSO_4 , MnSO_4 and CoCl_2 stimulated polygalacturonase activity, whereas Tween-20, Tween-80, PMSF, NiSO_4 , BaCl_2 , CuSO_4 , LiCl and phosphate salts inhibited the enzyme activity. Iodoacetamide and iodoacetic acid did not inhibit enzyme activity, suggesting that cysteine residues are not part of the catalytic site of polygalacturonase.

Key words: *Macrophomina phaseolina*, charcoal rot, polygalacturonase, allosteric, inhibitor.



University of shahrood

Faculty of agriculture

Production, purification and evaluation of inhibitors of polygalacturonase
from *M. phaseolina*

Elnaz Fahimi

Supervisors:

Dr Naser Farrokhi

Dr Saeed Aminzadeh

August 2014