

جداسازی و تخلیص آنزیم گلوکز اکسیداز از قارچ های خاک منطقه شهر صدرا

فاطمه کرمی مختاری

کارشناسی ارشد زیست شناسی-بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات فارس،

Faezeh.mok66@yahoo.com

مقدمه:

سابقه استفاده از فرایندهای مبتنی بر آنزیم ها به زمان های بسیار دور و تمدن های باستانی بر می گردد. امروزه نزدیک به ۴۰۰۰ آنزیم شناخته شده است و از این میان در حدود ۲۰۰ مورد دارای استفاده های تجاری می باشند. بیشتر آنزیم های صنعتی از منابع میکروبی به دست می آیند. تا اوایل دهه ۶۰ میلادی میزان کل فروش سالانه آنزیم ها در جهان، حدود تنها چند میلیون دلار بود، اما از آن زمان تاکنون بازار فروش پیشرفت خیره کننده ای را داشته است (Wilke., 1999) ; (Godfrey and West., 1996). امروزه به علت افزایش درک و شناخت از بیوشیمی تولید آنزیم ها، فرایندهای تخمیر و روش های بازیابی، تولید تعداد رو به افزونی از آنزیم ها امکان پذیر شده است. از طرف دیگر پیشرفت در روش های استفاده از آنزیم ها نیاز به استخراج، خالص سازی و استفاده از آنزیم ها را افزایش داده است (Sharma et al., 2001).

آنزیم گلوکز اکسیداز (β -D-glucose: oxygen 1-oxidoreductase)، (EC 1.1.3.4) مسئول کاتالیز اکسیداسیون بتا- دی- گلوکز به گلوکورونیک اسید است. (Hatzinikolaou and Macris, 1995). این واکنش یک واکنش اکسید و احیا است که به دو مرحله احیایی (رداکتیو) و اکسیداتیو تقسیم می شود. در نیم واکنش احیا، گلوکز اکسیداز واکنش اکسیداسیون بتا- دی- گلوکز به دی- گلوکو- دلتا- نولاکتون را کاتالیز می کند، که گلوکونولاکتون متعاقباً به صورت غیر آنزیمی به گلوکورونات مبدل می شود. در ادامه، حلقه فلاوین آدنین دی نوکلئوتید (FAD) آنزیم به FADH2 احیا می شود. در نیم واکنش اکسید، گلوکز اکسیداز احیا شده مجدداً به واسطه اکسیژن اکسید شده و تولید H2O2 می کند. پر اکسید هیدروژن با کمک آنزیم کاتالاز شکسته شده و تولید آب و اکسیژن می کند (Witt et al., 2000).

خاک، مواد زاید آلی و مواد سلولی گیاهی، محیط هایی هستند که انواع متنوعی از قارچ ها را در خود رشد می دهند. قارچ ها تنوع وسیعی از آنزیم ها را تولید می کنند که آن ها را قادر به

چکیده:

مقدمه: گلوکز اکسیداز به طور وسیعی در صنایع شیمیایی و همچنین پزشکی مورد استفاده قرار می گیرد. به واسطه کاربردهای گسترده این آنزیم، بهبود شرایط تولید و تخلیص آن ضروری به نظر می رسد. هدف از انجام این مطالعه بررسی جداسازی و تخلیص آنزیم گلوکز اکسیداز از قارچ های خاک منطقه شهر صدرا بود.

روش کار: نمونه خاک از ۱۱ منطقه جغرافیایی شهر صدرا جمع آوری شده، سوسپانسیون هایی با غلظت ۱/۱۰ تا ۱/۱۰۰۰۰ از آن تهیه گردید. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به محیط کشت PDA انتقال داده شد و پس از رشد قارچ ها و کشت مجدد در فلاسک محیط کشت PDA به مدت ۱۵ روز، خالص سازی قارچها انکوبه گردید. با اندازه گیری فعالیت ویژه ی آنزیم گلوکز اکسیداز ترشح شده توسط هر نمونه ی قارچی، بهترین قارچ تولید کننده، اسپرژیلوس نایجر، تشخیص داده شد. با استفاده از رسوب دادن آنزیم در محیط ۸۰ در صد اشباع شده با آمونیوم سولفات و دیالیز با غشای استات سلولز و در نهایت تخلیص با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی با DEAE-Cellulose، اندازه گیری فعالیت آنزیم، به روش گلوکز اکسیداز و پروتئین تام به روش بیوره انجام پذیرفت. همه مراحل با سه بار تکرار انجام شد. داده ها با نرم افزار spss۱۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مرتبه ی تخلیص (fold of purification) و درصد آنزیم فعال باقیمانده (yield)، محاسبه گردید.

نتیجه گیری: مرتبه ی خالص سازی پس از طی مراحل چهار گانه ی شیرابه، اشباع با آمونیوم سولفات، بعد از دیالیز و کروماتوگرافی ستونی آنیونی، به ۵۲/۸۸ رسید و ۵۴/۷ درصد از آنزیم در نمونه ی خالص شده (yield)، به صورت فعال، باقی ماند.

واژگان کلیدی: آنزیم گلوکز اکسیداز، کروماتوگرافی تعویض

یونی، فعالیت ویژه، مرتبه ی تخلیص، پیلد