

# کلونینگ، بیان ژن، خالص سازی و تعیین خصوصیات آنزیم ACC دآمیناز از باکتری سودوموناس فلورسنس

داود فرج زاده<sup>1\*</sup>، نعمت سخندان-بشیر<sup>2</sup>، ناصر پولادی<sup>3</sup>

1- استادیار گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه شهیدمدنی آذربایجان، تبریز

2- دانشیار گروه ویروس شناسی، دانشگاه تبریز

3- استادیار گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه شهیدمدنی آذربایجان، تبریز

\* تبریز، صندوق پستی 53751-71379

farajzadeh@azaruniv.ac.ir

(دریافت مقاله: 93/2/15 پذیرش مقاله: 94/2/21)

**چکیده-** گروهی از باکتری‌های هم‌زیست با گیاهان، تحت عنوان PGPR (باکتری‌های محرک رشد گیاهان) آنزیمی به نام ACC دآمیناز (EC4.1.99.4) را کد می‌کنند که این آنزیم، تنظیم کننده تولید اتیلن از طریق متابولیزه نمودن ACC (حد واسط بیوستتاز اتیلن) و شکستن آن به آمونیاک و  $\alpha$ -کتوتیترات است. این آنزیم نقش مهمی در تسهیل رشد گیاهان از طریق کاهش میزان اتیلن بخصوص در شرایط سخت محیطی دارد. بنابراین هدف این مطالعه، بیان، تخلیص و تعیین شرایط بهینه فعالیت آنزیم ACC دآمیناز (ACCD) از سویه FY32 باکتری سودوموناس فلورسنس و بررسی خصوصیات سینتیکی این آنزیم می‌باشد. بدین منظور، ژن *acdS* از باکتری سودوموناس فلورسنس بومی جداسازی و در وکتور بیانی pET28 a(+) کلون شد و سپس وکتور نو ترکیب pET28-*acdS* به باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) منتقل گردید. پس از مشاهده بیان، آنزیم ACCD توسط ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل-سفاروز تخلیص و سپس، شرایط بهینه فعالیت این آنزیم و خصوصیات سینتیکی آن مورد بررسی قرار گرفت. مشخص شد که این آنزیم، در pH: 7 و دمای 28 درجه سانتی‌گراد بیشترین فعالیت را دارد. این آنزیم فعالیت بالایی را در حضور  $MgSO_4$  در مقایسه با سایر یون‌های فلزی مورد مطالعه نشان داد. همچنین کاهش فعالیت آنزیم در غلظت 160 ppm نمک NaCl معنی‌دار بود. با توجه به پارامترهای سینتیکی آنزیم یعنی  $K_m$  (9/66 mM) و  $V_{max}$  ( $0/11 \text{ nM } \alpha\text{-ketobutyrate } \text{mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )، مشخص گردید که کارایی این آنزیم در مقایسه با ACCD های شناخته شده قبلی نسبتاً بالاست.

**کلیدواژگان:** ACC دآمیناز، سودوموناس فلورسنس، کلونینگ، کروماتوگرافی تمایلی،  $V_{max}$ ,  $K_m$ .

1- مقدمه  
وابسته به پیریدوکسال 5-فسفات (PLP) می باشد، به ACC تبدیل می‌شود [3]. ACC توسط آنزیم ACC-اکسیداز، اکسیده شده و تبدیل به اتیلن می‌شود [2]. بسیاری از سویه‌های باکتری‌های محرک رشد گیاه

1- آمینوسیکلوپروپان-1-کربوکسیلات (ACC) پیش ماده سنتز اتیلن گیاهی است [2,1]. در گیاهان عالی، S-آدنوزیل متیونین توسط آنزیم ACC سنتاز که یک آنزیم

میکروبی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان تهیه شد و برای کلونینگ از میزبان *E. coli* سویه BL21 (DE3) استفاده گردید.

### 3- روشها

#### 3-1- کلونینگ ژن ACC دامیناز (*acdS*) در باکتری *E. coli*

باکتری سودوموناس فلورسنس به عنوان منبع ژن *acdS* از کلکسیون میکروبی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان تهیه شد. DNA ژنومی باکتری سودوموناس توسط کیت استخراج DNA (Bioneer, Korea) طبق دستورالعمل کیت استخراج گردید. با استفاده از پرایمرهای NdeIcdS F با ترادف:

5'- AGCATATGAATCTGAATCGTTTTGAAC-3'  
و SacIcdS R با ترادف:

5'- GTGAGCTCTCAGCCGTTGCGGAACAG-3'  
و DNA ژنومی باکتری سودوموناس، ژن کدکننده آنزیم ACC دامیناز توسط PCR با برنامه (دنا توره آغازین در 94 درجه به مدت 120 ثانیه، 30 چرخه تکثیر هر یک شامل دنا توره در 94 درجه به مدت 45 ثانیه، جفت شدن پرایمر در 52 درجه به مدت 30 ثانیه، پلی مریزه شدن در 72 درجه به مدت 90 ثانیه و پلی مریزه شدن نهایی در 72 درجه به مدت 10 دقیقه) و با آنزیم DNA polymerase *pfu* تکثیر شد. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات توالی ژن *acdS* در بانک اطلاعات ژن NCBI به شماره دسترسی FJ465155 انجام شد. ژن تکثیر یافته در پلاسمید

pBR322 کلون شد. پس از تأیید کلونینگ توسط PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، قطعه حاوی ژن از حامل کلونینگ توسط آنزیمهای *NdeI* و *SacI* جدا و در حامل بیانی pET28 a(+) (Invitrogen) ساب کلون گردید. برای تأیید کلونینگ در حامل بیانی از آنزیم *SacI* و *NdeI* استفاده شد که به ترتیب هر کدام یک جایگاه برش در ژن مربوطه داشتند. نهایتاً برای ژن مورد نظر یک کلون هم از

(PGPRs) حاوی آنزیم ACC دامیناز هستند. این آنزیم ترکیب ACC را به  $\alpha$ -کتوتیرات و آمونیوم تبدیل می کند [4]. ACC دامینازها از تعدادی از سویه های سودوموناس، مخمر *Hansenula saturnus* و قارچ *Penicillium citrinum* جداسازی شده است [5]. یافته های قبلی نشان داد که باکتری سودوموناس فلورسنس FY32 حاوی آنزیم ACC دامیناز بوده و مقاومت گیاه را تحت شرایط تنش خشکی و شوری افزایش می دهد [6]. Hontzeas و همکاران  $K_m=3.4\pm 0.2$  mM را در pH: 8 و دمای 22 °C برای آنزیم ACC دامیناز از باکتری *Pseudomonas putida* گزارش کردند [7]. Fedorov و همکاران  $K_m$  برای آنزیم ACC دامیناز باکتری *Methylobacterium radiotolerans* JCM2831 و *nodulans* ORS2060 به ترتیب  $0/8\pm 0/04$  و  $1/8\pm 0/3$  mM بدست آوردند [8]. بطور کلی با وجود مطالعات بیولوژیکی روی اثرات باکتری های محرک رشد گیاه، به ویژگی های بیوشیمیایی ACC دامینازی آنها توجه کمتری شده است. بنابراین در این مطالعه، اقدام به کلون، بیان، تخلیص آنزیم ACC دامیناز از سویه FY32 باکتری سودوموناس فلورسنس بومی نموده و سپس شرایط بهینه فعالیت این آنزیم و نیز خصوصیات سینتیکی آن مطالعه شد. نتایج اطلاعات جدیدی را در مورد ویژگی های این آنزیم نشان داد که می تواند در مطالعات بهینه سازی ویژگی های این آنزیم برای کاربردهای بعدی و نیز در مقایسه با یافته های قبلی دیگران مورد استفاده قرار گیرد.

### 2- مواد

آنزیم های *NdeI* و *SacI* برای هضم قطعات نوکلئوتیدی و آنزیم DNA ligase T<sub>4</sub> برای اتصال قطعات نوکلئوتیدی از شرکت فرمتاس و پلاسمید pET28 a(+) برای کلونینگ و بیان ژن مورد نظر از شرکت Invitrogen تهیه شدند. باکتری سودوموناس فلورسنس سویه FY32 از کلکسیون

### 3-3- تخلیص پروتئین با استفاده از ستون کروماتوگرافی IMAC:

به منظور خالص‌سازی پروتئین نوترکیب، از کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از ستون نیکل آگارز (IMAC) مطابق با دستورالعمل کیت (Qiagen, USA) استفاده شد. نمونه پروتئینی روی ستون کروماتوگرافی IMAC حاوی رزین‌های مخصوص His-tag که توسط بافر شستشو (300mM NaCl و 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) به تعادل رسیده بود، بارگذاری شد و پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای 4 °C روی روتور چرخان، چندین بار با بافر شستشو، شسته شدند. در نهایت برای جداسازی پروتئین اتصالی از ستون، از بافر حاوی 4mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> و 300mM NaCl و 250 mM Imidazole استفاده گردید.

### 3-4- سنجش فعالیت ACC deaminase:

در ابتدا 200 ماکرولیتر از سوسپانسیون لیز شده و 20 ماکرولیتر از 0/5 مولار ACC، به یک میکروسانتریفیوژ 1/5 میلی‌لیتری منتقل شد. سپس ورتکس کوتاهی بر روی آن انجام گرفته و به مدت 15 دقیقه در دمای 30 °C انکوبه گردید. پس از گذشت این زمان، 1 میلی‌لیتر از 0/56 مولار HCl، به نمونه‌ها اضافه و بعد از ورتکس به مدت 5 دقیقه در دور 12000g در دمای اتاق انکوبه گردید. به 1 میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، میزان ماکرولیتر از HCl اضافه و ورتکس شد و بعد از آن میزان 300 ماکرولیتر از معرف 2 و 4 دی نیترو فنیل هیدرازین به نمونه اضافه و پس از آن نمونه‌ها در دمای 30 °C به مدت 30 دقیقه انکوبه شدند. با افزودن 2 میلی‌لیتر از NaOH 2N و مخلوط نمودن آن‌ها، جذب هر کدام از تیوب‌ها در طول موج 540 نانومتر اندازه‌گیری گردید [4]. میزان مولاریته  $\alpha$ -کتوتوبرات تولید شده توسط آنزیم، با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده با غلظت‌هایی از  $\alpha$ -

لحاظ اندازه قطعه کلون شده و هم از لحاظ جهت آن تأیید شد. انتقال پلاسمید نوترکیب به میزبان *E. coli* سویه BL21 (DE3) مطابق دستورالعمل سازنده کیت (اینویترژن) انجام شد. پلیت‌ها 24 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند تا کلونی‌های باکتری نوترکیب تشکیل شدند. کلنی‌های نوترکیب حاوی ژن مقاومت به کانامایسین بوده و در محیط حداقل حاوی کانامایسین  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  می‌توانند رشد کنند [9].

### 3-2- بررسی بیان پروتئین

ابتدا تک کلنی از باکتری حاوی وکتور نوترکیب مورد نظر، در حجم کم در محیط کشت LB حاوی کانامایسین  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  به مدت یک شب کشت داده شد. سپس به نسبت 1:100 در 50 mL محیط کشت جدید رقیق شده و در انکوباتور در دمای 37 °C با دور 140 rpm منتقل شد و بعد از رسیدن به OD برابر 0/8 از ایزوپروپیل D - تیوگالاکتوزید (IPTG) با غلظت نهایی 0/5 میلی‌مولار به عنوان القاکننده استفاده شد. بمنظور تعیین زمان مناسب برای بیان پروتئین نوترکیب مقدار 2 mL از محیط کشت در حال رشد در زمان‌های مختلف 0، 3، 6 و 24 ساعت پس از القا نمونه‌برداری شدند. نمونه‌ها با دور 8000 g در دمای 4 °C به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ و رسوب حاصل با بافر نمک فسفات با pH 7.4 مخلوط و پس از سه بار انجماد و ذوب با ازت مایع سلول‌ها لیز شدند. برای جداسازی پروتئین‌های بخش محلول و رسوب، نمونه‌ها با دور 10000 g در دمای 4 °C به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سپس همه نمونه‌ها به همراه بافر نمونه در دمای 100 °C به مدت 5 دقیقه حرارت داده شدند. برای آنالیز بیان پروتئین نوترکیب نمونه‌ها بر روی ژل 12 درصد SDS-PAGE بارگذاری شدند و با بریلیانت-بلو G250 رنگ‌آمیزی گردیدند [10].

**3-5-5- اثر غلظت های مختلف نمک NaCl**

برای تعیین اثر غلظت های مختلف نمک بر فعالیت آنزیم ACC دامیناز، از غلظت های مختلف نمک NaCl بین 20 تا 180 ppm استفاده شد و فعالیت آنزیم در هر یک از این غلظت ها اندازه گیری گردید.

**3-6- آنالیز داده ها**

تمام آزمایش ها با سه تکرار انجام شد. تجزیه های آماری و رسم نمودارها به کمک برنامه های آماری SPSS و Excel انجام گرفت. برای مقایسه میانگین ها از آزمون چند دامنه ای دانکن با سطح احتمال 1 درصد استفاده شد.

**4- نتایج****4-1- بررسی بیان پروتئین ACC دامیناز**

برای بررسی بیان ژن و ارزیابی مقدار پروتئین تولید شده توسط وکتور pET28acds، باکتری BL21(DE3) حاوی وکتور نوترکیب، توسط 1 mM IPTG القا شد. با توجه به اینکه در زمان های مختلف میزان بیان یکسان بود و در زمان 24 ساعت بیان پروتئین بیشترین میزان بود، لذا 24 ساعت بعد از القا، نمونه برداری انجام شد و بعد از لیز سلولی نمونه، رسوب و محلول رویی در چاهک های ژل SDS-PAGE لود شدند. همان طور که شکل 1 نشان می دهد باند مربوط به پروتئین مورد نظر در هر دو چاهک های A و C دیده می شود که بیانگر بیان پروتئین و حضور آن در هر دو فاز محلول و رسوب است. با مشاهده باند تشکیل شده در محدوده وزن پروتئینی 36/5 کیلو دالتونی، می توان نتیجه گرفت که این پروتئین، نسبتاً به خوبی بیان شده است.

**4-2- فعالیت آنزیمی بعد از کروماتوگرافی تمایلی**

شکل 2 نشان دهنده فعالیت آنزیم ACC دامیناز در فرکشن های مختلف خالص سازی از ستون IMAC sepharose6flow column fast می باشد.

کتیوتیرات در محدوده ی بین 0/1 تا 1 نانومول و اندازه گیری جذب در طول موج 540 نانومتر محاسبه گردید. همچنین برای اندازه گیری میزان پروتئین کل نمونه ها از روش برادفورد استفاده شد. میزان پروتئین با مقایسه جذب نوری با منحنی استاندارد تهیه شده با پروتئین خالص آلبومین در طول موج 595 نانومتر به دست می آید [11].

**3-5- بهینه سازی فعالیت آنزیم در شرایط مختلف****3-5-1- اثر غلظت ACC بر روی سرعت واکنش**

فعالیت آنزیمی در محدوده غلظت ACC بین 0 تا 2/5 میلی مولار، تحت شرایط pH و درجه حرارت مناسب انجام شد. حجم نهایی واکنش با افزودن آب مقطر دیونیزه به 1 میلی لیتر تنظیم گردید. میزان  $K_m$  و  $V_{max}$  آنزیم با رسم منحنی  $\frac{1}{v}$  در مقابل  $\frac{1}{[S]}$  محاسبه گردید [12].

**3-5-2- اثر pH**

برای تعیین اثر pH، محدوده pH را بین 1 تا 10 انتخاب کرده و در نهایت pHی که در آن، آنزیم بیشترین فعالیت را دارا باشد، pH بهینه در نظر گرفته شد.

**3-5-3- اثر درجه حرارت**

برای تعیین بهترین درجه حرارت برای عملکرد بهینه آنزیم، درجه حرارت بین 5 تا 60°C انتخاب شد. در درجه حرارت مورد نظر، سوبسترای آنزیم به آن اضافه و پس از انکوباسیون به مدت 30 دقیقه فعالیت آنزیمی بررسی گردید تا مناسب ترین درجه حرارت انتخاب شود.

**3-5-4- اثر یون های فلزی**

اثر یون های فلزی مختلف بر روی فعالیت آنزیم ACC- دامیناز از طریق انکوبه کردن آنزیم تخلیص شده به مدت 60 دقیقه در دمای اتاق تعیین گردید.

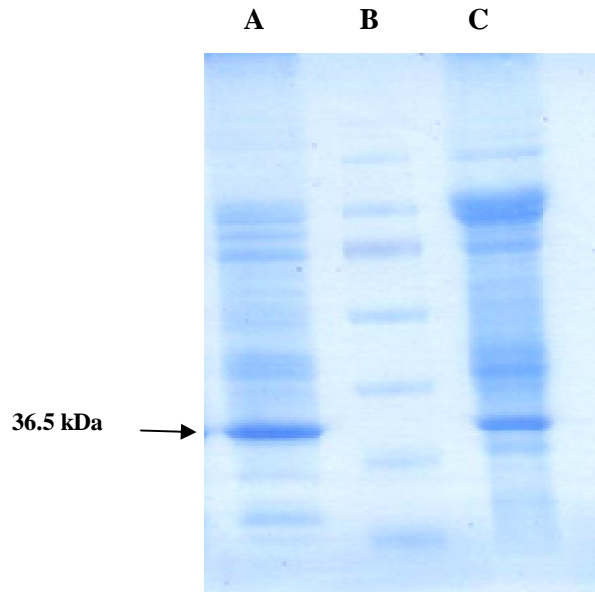
آنزیم در فرکشن دوازدهم و برابر  $2.9 \text{ nM } \alpha\text{-ketobutyrate}$   $\text{mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$  است.

### 3-4- بهینه‌سازی فعالیت آنزیم در شرایط محیطی مختلف

#### 3-4-1- pH و درجه حرارت بهینه

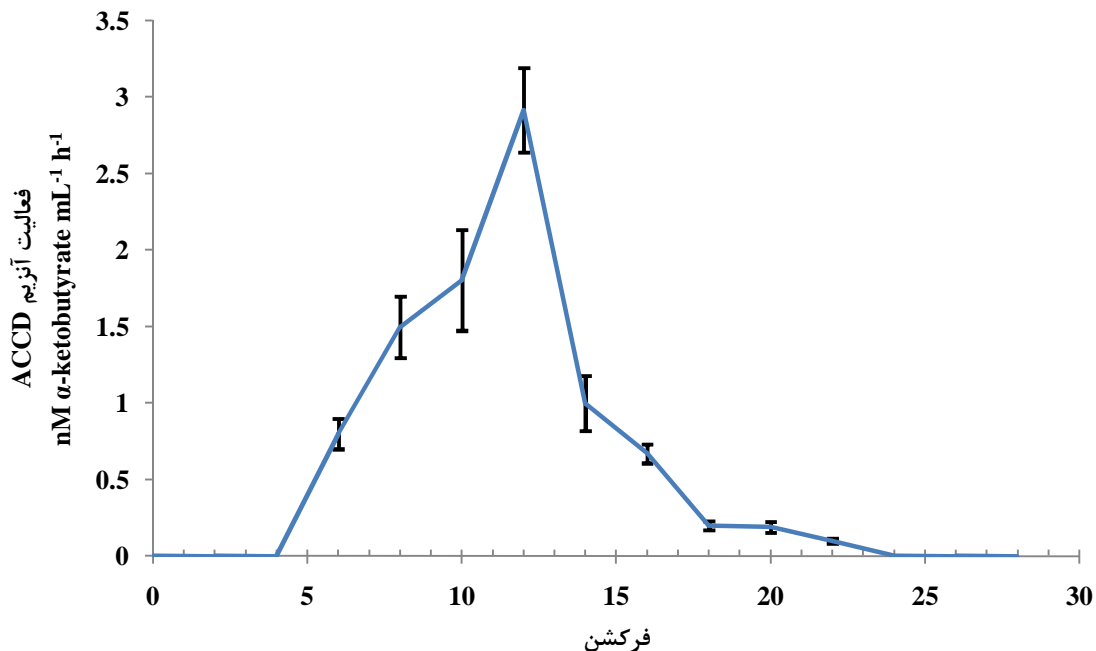
نتایج آزمایش‌های pH بر روی ACCD تخلیص شده نشان می‌دهد که این آنزیم، در محدوده pH خاصی فعالیت می‌کند. همان‌طور که در شکل 3 مشاهده می‌شود بیشترین فعالیت آنزیم ACCD تخلیص شده در pH: 7 و برابر  $680 \text{ nM mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  است.

از سوی دیگر شکل 4 نشان می‌دهد که در شروع فعالیت آنزیم، هرچه میزان دما بیشتر می‌شود، فعالیت آنزیم نیز افزایش می‌یابد. فعالیت آنزیم تا زمانی که درجه حرارت به  $28^\circ\text{C}$  می‌رسد افزایش یافته و پس از آن تا رسیدن به دمای  $60^\circ\text{C}$  شروع به کاهش می‌کند.

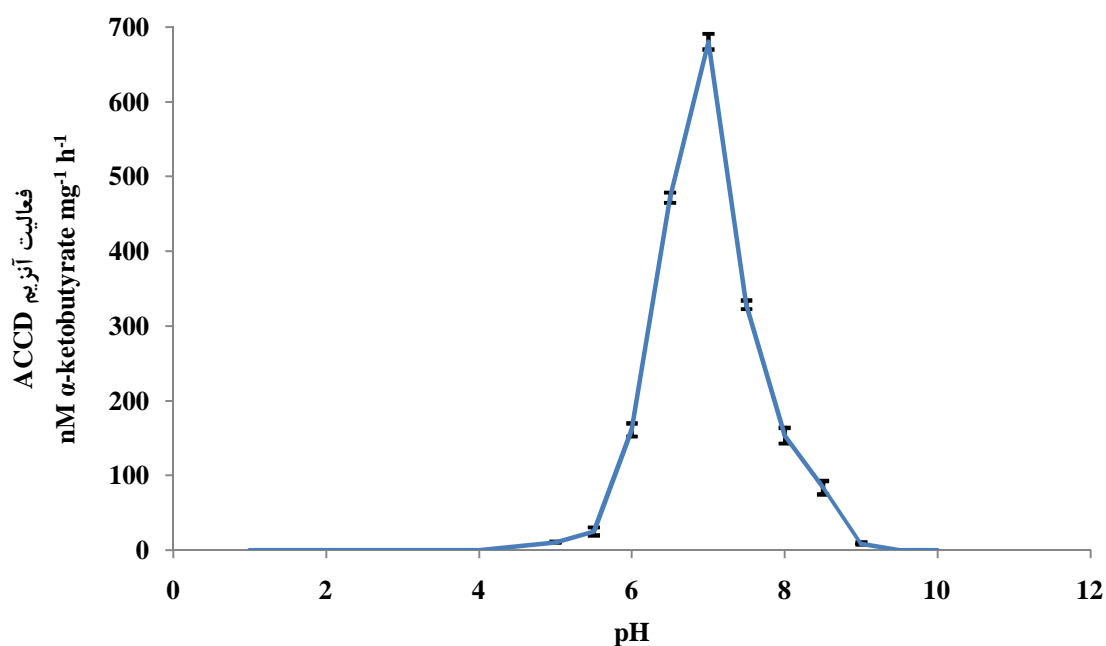


شکل 1 آنالیز بیان پروتئین ACCD (چاهک‌های A و C بترتیب شامل محلول رویی و رسوب عصاره سلولی بوده و چاهک B نشانگر وزن مولکولی پروتئینی THERMO 26619 می‌باشد)

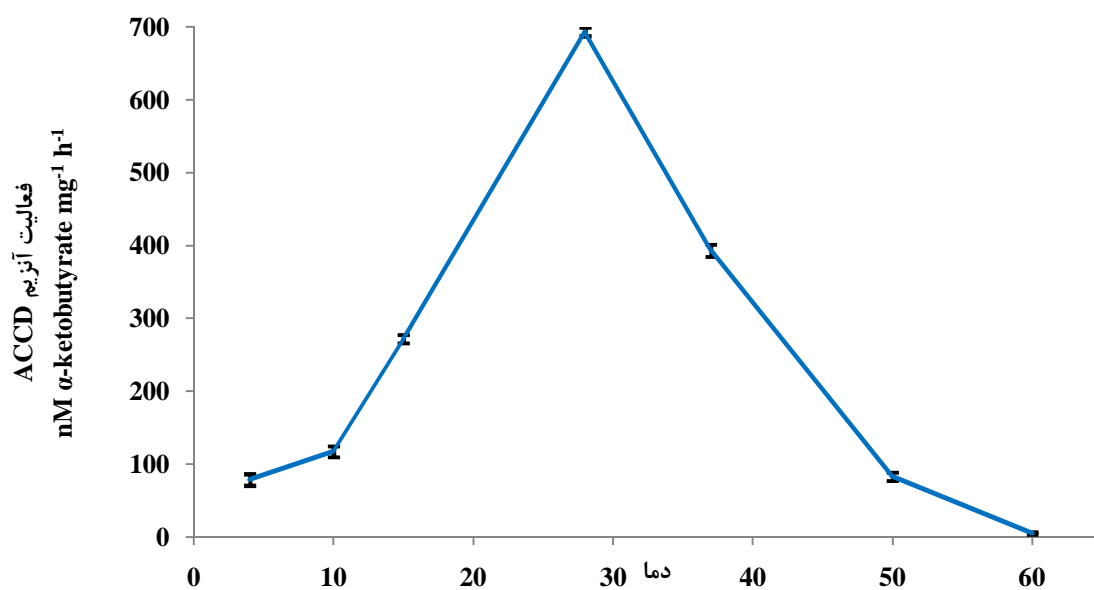
همان‌طوری که در شکل دیده می‌شود بیشترین فعالیت



شکل 2 فعالیت آنزیم ACCD پس از تخلیص با ستون کروماتوگرافی IMAC



شکل 3 اثر pH بر روی فعالیت ACCD

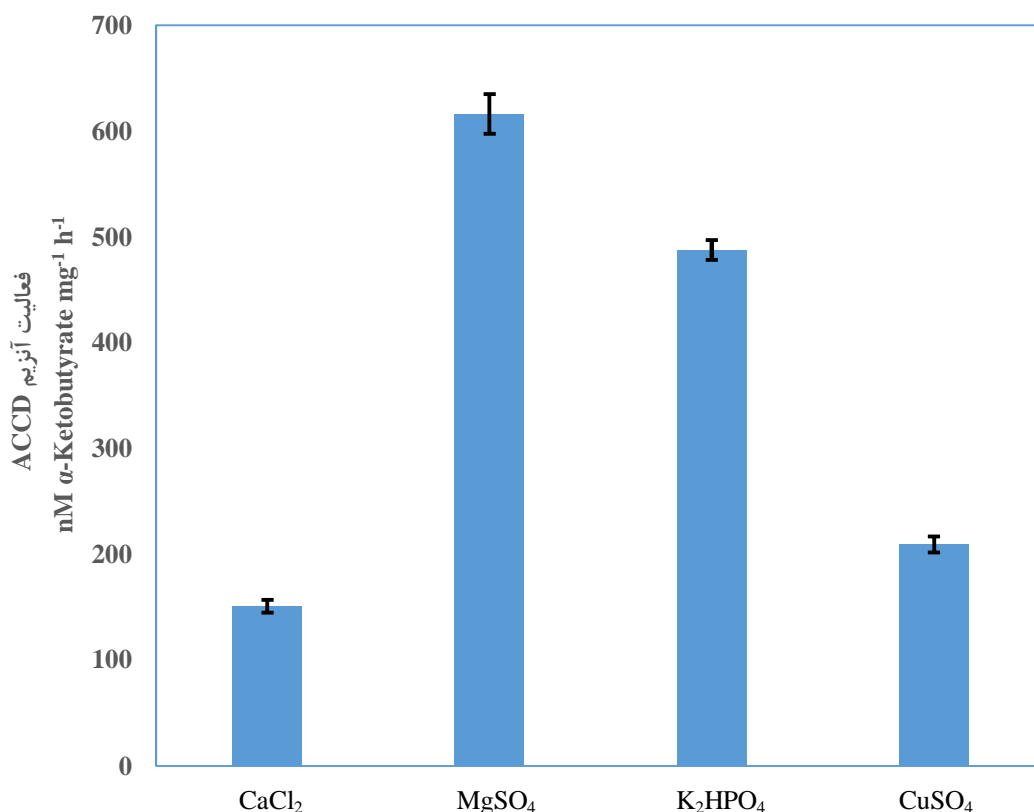


شکل 4 اثر دما بر فعالیت آنزیم ACCD

میزان فعالیت آنزیم را در حضور این فلزات نشان می دهد. این آنزیم بیشترین فعالیت را در حضور  $MgSO_4$  دارد که برابر  $630 \text{ nM mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  است.

#### 4-3-2- اثر یون های فلزی روی فعالیت آنزیم ACCD:

برای تعیین اثر یون های فلزی مختلف بر فعالیت آنزیم، از یون های فلزی مختلف همانند  $K_2HPO_4$ ،  $MgSO_4$ ،  $CaCl_2$  و  $CuSO_4$  با غلظت 30 میلی مولار استفاده شدند. شکل 5



شکل 5 اثریون های فلزی بر روی فعالیت آنزیم ACCD

## 5- بحث

جداسازی آنزیم ACCD برای اولین بار از *Pseudomonas fluorescens* به دلیل تاثیرات مثبتی که در رشد گیاهان داشت، صورت گرفت. این مسأله بر اهمیت انجام مطالعات، بر روی ریزوسفرها که محل جداسازی گونه‌های باکتریایی با عملکردهای بیوتکنولوژیکی هستند، تأکید دارد. مطالعات نشان می‌دهد سویه‌های PGPR دارای آنزیم ACCD آمینازی دسته‌ای از میکروارگانیسم‌ها هستند که بسیاری از اثرات نامطلوب زنده و غیرزنده استرس‌زا را برای گیاهان کم می‌کنند [13]. آنزیم ACCD جدا شده از این گروه از میکروارگانیسم‌ها مورد مناسبی برای مطالعه بر روی گیاهان زراعی است. آنزیم ACCD-دآمیناز تولید شده توسط باکتری *Pseudomonas fluorescens* و مکانیسم ذاتی آن جهت رشد در گیاهان، این باکتری را تبدیل به یک باکتری مفید در زمینه

## 4-3-3- اثر غلظت‌های مختلف نمک NaCl بر روی فعالیت

### آنزیم ACCD

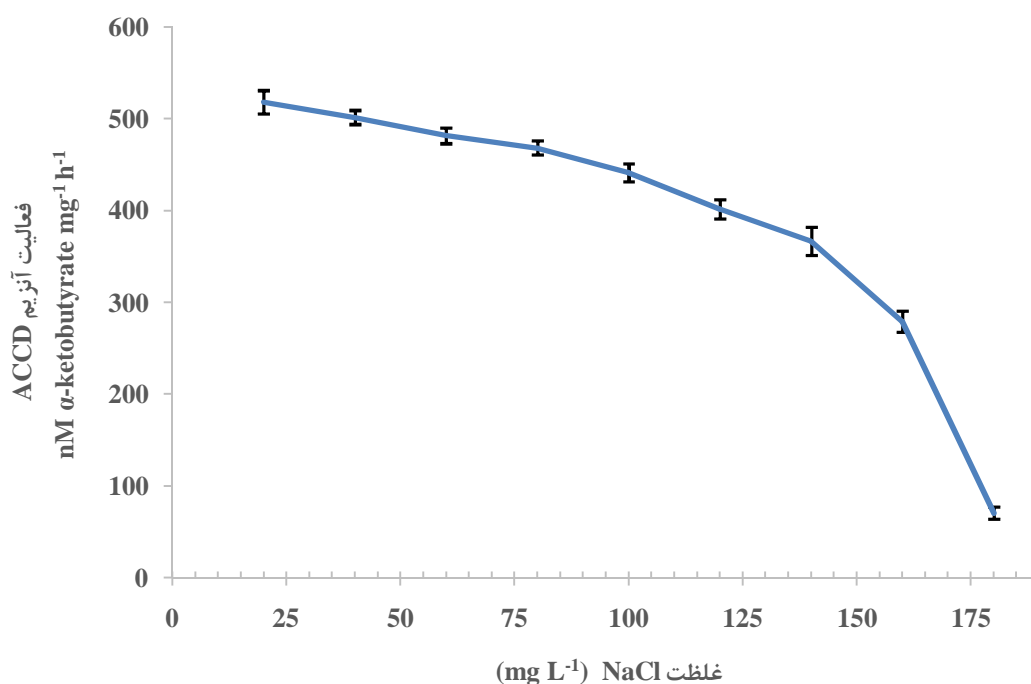
با توجه به شکل 6، فعالیت آنزیم از غلظت 20 تا 160 ppm از نمک NaCl به طور ملایمی کاهش یافت که این کاهش از غلظت 160 به 180 ppm معنی‌دار بود، بطوری که فعالیت آنزیم از 290 به 75 nM α-ketobutyrate mg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> کاهش نشان داد.

## 4-3-4- اثر غلظت سوپسترا بر فعالیت ACCD

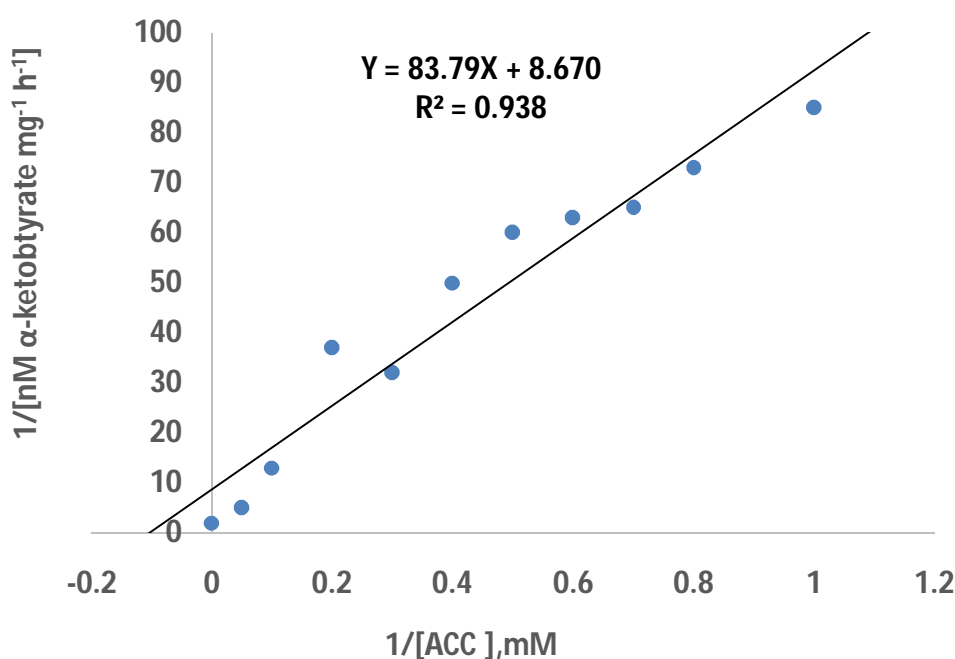
برای مشاهده اثر غلظت سوپسترا بر فعالیت آنزیم، نمودار  $\frac{1}{v}$  درمقابل  $\frac{1}{[S]}$  برای تعیین  $K_m$  و  $V_m$  آنزیم رسم گردید (شکل 7). بر اساس شکل 7، مقادیر  $K_m$  و  $V_{max}$  برای این آنزیم بترتیب 9/66 mM و 0/11 nM α-ketobutyrate mg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> تعیین شد.

گیاهی میانکنش مناسبی داده که باعث افزایش مقاومت گیاه در شرایط سخت می شود [14].

بیوتکنولوژی زیست محیطی و کشاورزی نموده است. در کنار فعالیت این آنزیم در کاهش سطوح اتیلن در شرایط استرس، اکولوژی باکتری و فیزیولوژی گیاه با سیستم



شکل 6 اثر غلظت های مختلف NaCl بر روی فعالیت آنزیم ACCD



شکل 7 اثر غلظت های مختلف ACC بر روی فعالیت آنزیم



نشان داده که در محدوده 1/5 تا 17/4 mM قرار می‌گیرد که نشان دهنده تمایل کم این آنزیم به ACC است. برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی برای افزایش کارایی آنزیم  $(\frac{K_{cat}}{K_m})$ ، بایستی یا  $k_{cat}$  آنزیم را افزایش داد و یا  $K_m$  آن را کاهش داد که از طریق موتاسیون‌های ژنی هدفدار یا تصادفی می‌توان باعث افزایش کارایی آنزیم شد که این زمینه نیاز به مطالعه و تحقیقات بیشتری دارد.

### 6- تقدیر و تشکر

این مقاله مستخرج از نتایج طرح تحقیقاتی اجرا شده به شماره 217/ص/462 از محل اعتبار پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان می‌باشد.

### 7- منابع

- [1] Adams DO, Yang SF (1979) Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (1):170-174
- [2] Wang KL, Li H, Ecker JR (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* 14 Suppl:S131-151
- [3] Li JF, Qu LH, Li N (2005) Tyr152 plays a central role in the catalysis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *J Exp Bot* 56 (418):2203-2210.
- [4] Penrose DM, Glick BR (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol Plant* 118 (1):10-15.
- [5] Varma A, Abbott LK, Werner D, Hampp R (2004) *Plant Surface Microbiology*. 2004.
- [6] Farajzadeh D, Aliasgharzad N, Sokhandan Bashir N, Yakhchali B (2010) Cloning and characterization of a plasmid encoded ACC deaminase from an indigenous *Pseudomonas fluorescens* FY32. *Curr Microbiol* 61 (1):37-43.
- [7] Hontzeas N, Zoidakis J, Glick BR, Abu-Omar MM (2004) Expression and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the rhizobacterium *Pseudomonas putida* UW4: a key enzyme in bacterial plant growth promotion. *Biochim Biophys Acta* 1703 (1):11-19.

به هر حال مکانیسم‌های خاصی در ریزوباکترهای همزیست با گیاه رخ می‌دهد که موجب کاهش آسیب به گیاهان در شرایط سخت محیطی می‌شود. به همین دلیل حضور این دسته از میکروارگانیسم‌ها در شرایط سخت محیطی نقطه عطفی در صنعت کشاورزی و زیست محیطی محسوب می‌شود. ریزوباکترهای تولید کننده آنزیم ACCD دارای ویژگی‌های تولید سایر آنزیم‌ها همانند آنزیم‌های سلولاز، کیتیناز و  $\beta$ -1 و 3-گلوکوناز و تولید موادی مانند هیدروسیانیک اسید (HCN) هستند که موجب مقاومت گیاهان به پاتوژن‌های قارچی می‌شود. دستاوردهای ترانس ژنیک، همانند انتقال افقی ژن مربوط به آنزیم ACCD و سپس فعالیت این آنزیم بر روی رشد گیاهان در یک طیف وسیع مطالعه شد که تأخیر در رسیدگی میوه‌ها، افزایش مقاومت گیاهان به فلزات سنگین و کاهش حساسیت به شرایط نامساعد محیطی از تاثیرات این آنزیم مهم است. با افزایش مطالعات در مورد اثرات مثبت ACC دامیناز تولید شده توسط باکتری‌های ریزوسفری و اثرات مثبت آن بر گیاهان با تغییرات مولکولی و ژنتیکی بر روی آن، می‌توان موجبات افزایش کاربردهای اقتصادی آنها را فراهم آورد.

مطالعات مختلف نقش کلیدی ACC دامیناز را در باکتری‌های آزادزی محرک رشد گیاهان اثبات کرده‌اند. همچنین ACC دامیناز بخاطر اینکه بازکردن حلقه سیکلوپروپان را با مکانیسم متفاوتی انجام می‌دهد توجه زیادی را طی سال‌های اخیر بخود جلب کرده است. در اینجا آنزیم ACC دامیناز از باکتری *Sودوموناس فلورسنس* سویه FY32 جداسازی و شناسایی شد. در این مطالعه به ترتیب مقادیر  $K_m$  و  $V_{max}$  برابر 9.66 mM و  $0.11 \text{ nM } \alpha$ -ketobutyrate  $\text{mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  برای آنزیم ACCD جداسازی شده نشان داده شد. نکته مهم این که تمامی ACC- دامینازها تمایل کمی برای ACC دارند.  $K_m$  این آنزیم در میکروارگانیسم‌های مختلف در شرایط دمایی و pH

- [11] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- [12] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) *Biochemistry*. 5 edn. W H Freeman, New York
- [13] Saleem M, Arshad M, Hussain S, Bhatti AS (2007) Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) (containing ACC deaminase in stress agriculture. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34 (10):635-648.
- [14] Maheshwari DK (2011) *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Microbiology Monographs, 1 edn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg,
- [8] Fedorov DN, Ekimova Ga Fau - Doronina NV, Doronina Nv Fau - Trotsenko YA, Trotsenko YA 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminases from *Methylobacterium radiotolerans* and *Methylobacterium nodulans* with higher specificity for ACC. 1574-6968.
- [9] Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3 edn. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York
- [10] Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-685