Original Article

Immobilization of Organophosphorus Hydrolase on the Surface of *Bacillus subtilis* Spores by the Adsorption Method

Soudeh Khanamani Falahati-Pour[1], Abbas Sahebghadam Lotfi[2*], Gholamreza Ahmadian[3], Amin Baghizadeh[4]

1- PhD. Candidate, Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
2- Professor, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
4- Associated Professor, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: Lotfi_ab@modares.ac.ir

Received: 17/Aug/2014, Accepted: 17/Dec/2014

Abstract

Objective: Organophosphorus (OPs) compounds are widely used in many pesticides, insecticides and chemical nerve agents. These compounds are hazardous for humans and the environment. Organophosphate hydrolase (OPH) is a homodimeric protein initially isolated from *Pseudomonas diminuta* MG and Flavobacterium species. This enzyme is able to degrade a broad spectrum of toxic OPs compounds. Using immobilized OPH commonly presents a variety of advantages versus the free form of the enzyme. Advantages include an increase in stability, cost reduction by simple recovery and reutilization of the enzyme, quick and easy separation of the reactant and product in the reaction medium.

Methods: Plasmid pET-26b (+) was used to generate the OPH protein under the control of the T7lac promoter. *E. coli* BL21 (DE3) pLysS was used as the host for expression of the OPH enzyme. Recombinant OPH was secreted into the extracellular medium and the purified enzyme was immobilized on the surface of *Bacillus subtilis* spores by the adsorption method, for the first time.

Results: Approximately 42% to 45% enzymatic activity was determined to be associated with spores. Optimal pH and temperature of the enzyme were not altered by the presence of the spores. Thermo and pH stabilities of the immobilized enzyme was higher than the free form of the enzyme.

Conclusion: *Bacillus subtilis* spores are safe for humans and the environment. Therefore this system can be considered an environmentally friendly biocatalyst for degradation of OPs.

Keywords: Organophosphorus hydrolase, *Bacillus subtilis*, Immobilization, Adsorption, Spore

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 18 (2015-2016), No. 1, Pages: 39-53

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

مقاله اصیل

تثبیت آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز بر سطح اسپور باکتری باسیلوس سوبتیلیس به روش جذب سطحی

سوده خنامانی فلاحتی پور[1]، عباس صاحبقدم لطفی[2*]، غلامرضا احمدیان[3]، امین باقی زاده[4]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
۲- استاد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استادیار، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
۴- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی
Email: Lotfi_ab@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۳/۰۵/۲۶ پذیرش مقاله: ۹۳/۰۹/۲۶

چکیده

هدف: ترکیبات ارگانوفسفره به وفور در آفت‌کش‌ها و عوامل عصبی شیمیایی استفاده شده‌است. آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز یک پروتئین هموداِیمر است که اولین بار از باکتری سودوموناس دیمینوتا و فلاوباکتریوم جدا شده است. این آنزیم قادر به تجزیه گستره وسیعی از ترکیبات ارگانوفسفره سمی است. استفاده از فرم تثبیت شده این آنزیم در مقابل فرم آزاد آن باعث افزایش پایداری آنزیم می‌شود و قیمت آن را به‌واسطه امکان بازیافت و استفاده مجدد از آن کاهش می‌دهد. همچنین با تثبیت آنزیم امکان جداسازی آسان و سریع آن از محیط واکنش نیز فراهم می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ژن کد کننده آنزیم نوترکیب ارگانوفسفر هیدرولاز در ناقل بیانی (+) pET-26b کلون شد و در میزبان اشرشیاکلی(E. coli) BL21 (DE3) pLysS بیان و به داخل محیط کشت باکتری ترشح شد. سپس آنزیم خالص‌سازی و برای اولین بار روی سطح اسپور باکتری باسیلوس سوبتیلیس به روش جذب سطحی تثبیت شد.

نتایج: نتایج این مطالعه نشان داد که تقریباً حدود ٤٢ تا ٤٥ درصد فعالیت آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز در ارتباط با اسپورها مشاهده شد و در pH و دمای بهینه فعالیت آنزیم با جذب روی اسپور تغییری حاصل نشد اما پایداری آنزیم متصل به اسپور در دما و pHهای بالا بیشتر از فرم آزاد آنزیم بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به امنیت اسپور باکتری باسیلوس سوبتیلیس برای انسان و محیط زیست از این سیستم می‌توان به‌عنوان یک تجزیه‌گر زیستی دوستدار محیط زیست برای تجزیه ترکیبات ارگانوفسفره با کارآیی بالا استفاده نمود.

کلیدواژگان: ارگانوفسفر هیدرولاز، باسیلوس سوبتیلیس، تثبیت، جذب سطحی، اسپور

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴، صفحات: ۳۹-۵۳

مقدمه

ترکیبات ارگانوفسفره (Organophosphorus) گروه وسیعی از مواد شیمیایی هستند که جزو سموم اعصاب بوده و در آفت کش های کشاورزی یا عوامل جنگی شیمیایی استفاده می‌شود [۱]. استفاده بی‌رویه از ترکیبات ارگانوفسفره برای دفع آفات کشاورزی موجب نگرانی‌هایی در زمینه تجمع این ترکیبات در اکوسیستم‌های طبیعی مانند خاک و آب شده است.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از این سموم موجب شده تا اقدامات ویژه‌ای در راستای سم‌زدایی و تجزیه سریع این ترکیبات با سمیت بالا به ترکیبات غیر سمی یا با سمیت کمتر انجام پذیرد [۲]. سمیت ترکیبات ارگانوفسفره به‌طور قابل ملاحظه‌ای به‌وسیله هیدرولیز آنزیمی یا شیمیایی کاهش می‌یابد [۱]. از میان آنزیم‌هایی که ارگانوفسفات‌ها را تجزیه می‌کند، آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز (Organophosphate hydrolase: OPH)، توجه ویژه‌ای را به خود جلب کرده است [۳]. ژن کد کننده آنزیم OPH تحت عنوان opd شناخته می‌شود که از پلاسمیدهای غیر مشابه که از دو نژاد باکتریایی مختلف سودوموناس دیمینوتا (*Pseudomonas diminuta* MG) و فلاوباکتریوم (*Flavobacterium* sp ATCC27551)، به‌دست آمده است [٤، ٥]. OPH یک آنزیم هومو دایمر با وزن مولکولی ۷۲ کیلودالتون و شامل دو زیر واحد یکسان حاوی ۳۳٦ اسید آمینه است [٦]. این آنزیم دارای دومین آب گریز و قادر به هیدرولیز تعداد وسیعی از حشره‌کش‌های ارگانوفسفره نظیر پاراُکسون (Paraoxon)، دیازینون (Diazinon)، پاراتیون (Parathion)، متیل پاراتیون (Methylparathion) و ترکیبات شیمیایی جنگی نظیر سارین (Sarin) و سومان (Soman) است [۷-۹]؛ بنابراین می‌توان از آن در ساخت زیست‌حسگرهایی برای تشخیص و هیدرولیز ترکیبات ارگانوفسفره بهره برد [۱۰]. ابتدا برای حذف ترکیبات ارگانوفسفره از سلول‌های اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) نوترکیب که OPH را به‌صورت داخل سلولی بیان می‌کند استفاده می‌شد اما این روش دارای معایبی از جمله قیمت بالای تولید آنزیم خالص و محدودیت انتشار و عبور سوبسترا از میان غشای باکتری است [۱۱]. بنابراین برای رفع این محدودیت‌ها، در مطالعات بعدی محققین سعی کردند تا با نمایش این آنزیم روی سطح سلول‌های مختلفی از جمله موراکسلا (*Moraxella* sp)، ساکارومایسز سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) و سیانوباکترها (*Cyanobacteria*) این معایب را تا حدودی مرتفع سازند. یکی از جدیدترین سطوحی که در چند سال اخیر برای نمایش سطحی توجه زیادی را به خود مبذول داشته اسپور باکتری‌ها است. اسپورهای مهندسی شده برای نمایش پروتئین‌های هترولوگ زیادی استفاده شده‌است [۱۲]. باکتری‌های تشکیل دهنده اسپور، میکروارگانیسم‌های گرم مثبت متعلق به جنس‌های مختلف و شامل بیش از هزار گونه هستند. اسپورها می‌توانند به حالت خفته برای مدت طولانی باقی بمانند و گستره وسیعی از استرس‌های محیطی مانند دماهای بالا، pHهای مختلف، دهیدراته شدن، فقدان مواد غذایی و حضور مواد شیمیایی سمی را تحمل نمایند [۱۲]. این خصوصیت اسپور پایداری بالای سیستم نمایش سطحی را تضمین می‌کند. از آن‌جا که بیان آنزیم‌ها در روی سطح اسپور همراه با تغییرات ژنتیکی در اسپور است و در نهایت منجر به تولید اسپورهای تراریخت می‌شود در نتیجه رهاسازی این اسپورها در محیط همواره از طرف دوستداران محیط زیست با ایراداتی مواجه بوده است [۱۲]. برای رفع این مشکل در چند سال اخیر سعی شده تا از اسپور به‌عنوان یک حامل مناسب، ارزان قیمت و سازگار با محیط زیست برای تثبت ماکرومولکول‌ها از جمله آنزیم‌ها، استفاده شود. در این روش‌ها با استفاده از تکنیک‌های غیر ژنتیکی سعی می‌شود تا آنزیم روی سطح اسپور متصل شود. تاکنون از سطوح مختلفی مانند نایلون، نانوتیوب‌های کربنی [۱۳]، ذرات سیلیکا، کیتوزان (Chitosan) و ... برای تثبیت آنزیم OPH استفاده شده است [١٤]. اما مطالعه‌ای برای اتصال آنزیم OPH به سطح اسپور باکتری باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*) به‌صورت غیر ژنتیکی صورت نگرفته است. در این مطالعه به هدف تولید آنزیم OPH با کارآیی بالا، ارزان قیمت، چند بار مصرف و سازگار با محیط که از اهداف مهم بیوتکنولوژی صنعتی و زیست‌پالایی است، تثبیت آنزیم OPH روی سطح اسپور باکتری باسیلوس سوبتیلیس به روش جذب سطحی انجام و فعالیت و پایداری آنزیم تثبیت شده در مقایسه با فرم آزاد، در برابر دما و pHهای مختلف بررسی شد. به‌نظر می‌رسد آنزیم OPH تثبیت شده روی سطح اسپور باکتری باسیلوس

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

سوبتیلیس، پتانسیل استفاده در زیست‌پالایی برای حذف سموم ارگانوفسفره از اکوسیستم‌هایی آبی و خاکی را دارد و همچنین با توجه به ایمنی تأیید شده اسپور این باکتری [۱۵]، می‌توان از آن در مصارف پزشکی، صنایع داروسازیی و ... نیز بهره برد.

مواد و روش‌ها

در تمامی دست‌ورزی‌های DNA از سوش‌های DH5α و BL21 (DE3) PlysS باکتری اشریشیا کلی استفاده شد. آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (Ampicillin)، کلرامفنیکل (Chloramphenicol) و سوبسترای ارگانوفسفره پاراأکسون از شرکت Sigma (آمریکا) و آنزیم‌های محدود کننده *Nde*I و *Xho*I، *Taq* DNA پلیمراز و T4 DNA لیگاز از شرکت Fermentas (آلمان) خریداری شد. برای کشت سوش‌های باکتری اشریشیاکلی و باکتری باسیلوس سوبتیلیس از محیط کشت LB (Luria Bertani) که شامل ۰/۵ درصد عصاره مخمر، ۱ درصد تریپتون (Triptone) و ۰/۵ درصد کلرید سدیم است استفاده شد. برای تولید اسپور از باکتری باسیلوس سوبتیلیس سویه Trpc2 استفاده شد. محیط کشت DSM (Difco Sporulation Medium) (۰/۸گرم Nutrient broth، ۱ میلی‌لیتر KCl ۱۰ درصد و ۱ میلی‌لیتر $MgSO_4.7H_2O$ ۱/۲ درصد، ۲۵۰ میکرولیتر $MnCl_2$ (۰/۰۱ مولار)، ۲۵۰ میکرولیتر $Ca(NO3)_2$ (۱ مولار)، ۲۵۰ میکرولیتر $FeSO_4$ (۱ میلی‌مولار) در حجم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر) برای تولید اسپور استفاده شد.

بیان آنزیم OPH در باکتری *Escherichia coli* BL21(DE3) PlysS

توالی ژن opd مربوط به باکتری *Flavobacterium* sp MTCC 2495 از سایت NCBI گرفته شد و بعد از انجام بررسی‌های بیوانفورماتیکی با نرم‌افزارهای GenScript's OptimumGeneTM codon optimization tool، *E. coli* Codon Usage Analyzer 2.1 و Gene Script's Rare Codon Analysis Tool برای بیان در میزبان اشریشیا کلی بهینه‌سازی شد. سپس ژن *opd* توسط شرکت GENEWIZ آمریکا ساخته و در ناقل پلاسمیدی PUC57 بین جایگاه‌های برشی *Nde*I و *Xho*I قرار داده شد. از باکتری اشریشیا کلی سویه DH5α به‌منظور کلون پلاسمید نوترکیب PUC57 استفاده شد. سپس ژن opd در پلاسمید بیانی pET-26b(+) در همان جایگاه‌های برشی تحت کنترل پروموتر T7lac کلون شد. به علت کلون ژن opd در جایگاه برشی XhoI در پلاسمید بیانی pET-26b(+) به انتهای C- ترمینال آنزیم OPH، برچسب پلی هیستیدن (٦ اسید آمینه هیستیدین) متصل شد که از این ویژگی آنزیم برای خالص‌سازی آن با روش کروماتوگرافی تمایلی توسط ستون نیکل با کمک کیت Ni-NTA Magnetic Agarose Beads از شرکت کیاژن استفاده شد. بررسی با SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) و وسترن بلات (Western blotting) برای تأیید بیان و ترشح آنزیم OPH انجام شد.

خالص‌سازی اسپور

برای تهیه اسپور از باکتری باسیلوس سوبتیلیس سویه Trpc2 استفاده شد. ابتدا باکتری در ۲ میلی‌لیتر محیط LB مایع کشت و به‌مدت ١٦ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از محیط LB مایع با ۱۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه تلقیح و به‌مدت ۵ الی ٦ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای تولید اسپور، ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت DSM با ۲۵۰ میکرولیتر از کشت مرحله قبل تلقیح و به‌مدت ٢٤ الی ۳۰ ساعت برای تولید اسپور، در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. اسپورها سپس با آنزیم‌های لیزوزیم با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و DNase با غلظت یک واحد آنزیمی بر میکرولیتر و نمک $MgSO_4$ با غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار شدند تا سلول‌های رویشی باکتری حذف شود. بعد از غیر فعال‌سازی

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

آنزیم‌ها، با قرار دادن اسپورها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، اسپورها، سه مرتبه با آب دیونیزه سرد شسته و در ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه سرد حل و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۱٦، ۱۷].

اتصال آنزیم OPH به سطح اسپور باکتری باسیلوس سوبتیلیس

تعداد 1×10^{10} اسپور خالص شده باکتری باسیلوس سوبتیلیس که شمارش آن‌ها با لام نئوبار انجام شده بود به‌مدت ۲ ساعت در بافر سیترات سدیم با pHهای ٤، ٥، ۷ و ۱۰ در دمای اتاق روی یک شیکر (Shaker) در دور آهسته قرار گرفت. سپس اسپورها در ۱۰۰۰۰×g به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و بافر سیترات سدیم حذف شد و مقدار ۳۰۰ میکرولیتر آنزیم OPH با غلظت ۳۰۰ واحد آنزیمی بر میلی‌لیتر روی اسپورها ریخته و به‌مدت دو ساعت در دمای اتاق روی یک شیکر در دور آهسته قرار داده شد. مخلوط اسپور و آنزیم به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰×g سانتریفوژ و فعالیت آنزیمی محلول رویی و اسپور به‌صورت جداگانه به‌منظور دستیابی به بهترین pH برای اتصال آنزیم به سطح اسپور سنجش شد.

درصد اتصال آنزیم به سطح اسپور = (مقدار آنزیم تثبیت شده بر روی سطح اسپور/ مقدار آنزیم وارد شده در واکنش اتصال) × ۱۰۰

به‌منظور بررسی میزان ظرفیت اسپور برای جذب آنزیم OPH واکنش تثبیت آنزیم به سطح اسپور با غلظت‌های مختلف آنزیم از ۱۰ تا ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر روی مقدار ثابتی از اسپور (1×10^{10}) انجام گرفت. برای بررسی قابلیت استفاده مجدد از آنزیم تثبیت شده میزان فعالیت این فرم آنزیمی بعد از استفاده از آن در ۱ تا ۱۰ چرخه واکنش متوالی سنجش و درصد فعالیت باقی مانده آنزیم نسبت به میزان فعالیت آن در اولین چرخه واکنش محاسبه شد. همچنین میزان پایداری دو فرم آزاد و تثبیت شده آنزیم بعد از نگهداری به‌مدت ۱ تا ٦۰ روز در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، سنجش شد. میزان فعالیت دو فرم آنزیمی در روز اول ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و باقی مانده فعالیت در روزهای بعدی به‌صورت درصد فعالیت باقی مانده آنزیمی نسبت به روز اول محاسبه شد. کلیه آزمایش‌های این مطالعه به‌صورت ۳ آزمون مستقل با ۳ تکرار انجام شد.

سنجش فعالیت آنزیمی

به‌منظور سنجش فعالیت کلی (Total Activity) آنزیم OPH آزاد و متصل به اسپور، در یک واکنش آنزیمی از ۱۵ میکرولیتر سوبسترای پاراکسون ٤۰ میلی‌مولار، ٥۸٥ میکرولیتر بافر تریس ٥۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷/٤، ۱/٥ میکرولیتر کلرید کبالت ۱۰۰ میلی‌مولار و ۱٥۰ میکرولیتر محلول آنزیمی یا آنزیم متصل به اسپور استفاده شد. واکنش به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. محصول واکنش فوق پارانیتروفنول است که میزان تولید آن با دستگاه اسپکتوفتومتر ۲۱۰۰ (UNICO، چین) در طول موج ٤۱۰ نانومتر خوانده شد و فعالیت آنزیم محاسبه شد. یک واحد آنزیمی (Unit) برابر است با مقدار آنزیمی که می‌تواند یک میکرومول پارانیتروفنول را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان یک دقیقه آزاد کند [۱۸] که از قانون بیر-لامبرت (Beer-Lambert) و بر طبق معادله زیر محاسبه شد.

$$A=\varepsilon C L$$

A: جذب نوری

ε: ضریب خاموشی پارانیتروفنول برابر ۱۷۱۰۰ لیتر/مول بر سانتی‌متر

C: غلظت بر حسب میکرومول بر دقیقه

L: طول مسیر تابش که برابر با عدد ۱ است

غلظت آنزیم OPH بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر با روش برادفورد (Bradford) و با استفاده از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان استاندارد محاسبه شد [۱۹].

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

تجزیه و تحلیل اسپورها با دستگاه فلوسیتومتری و میکروسکوپ فلورسنت

اسپورهایی که آنزیم OPH به روش جذب سطحی به آن‌ها متصل شده بود، با آنتی‌بادی اولیه (Monoclonal anti-His Tag Antibody) که علیه برچسب پلی هیستیدین انتهای C ترمینال آنزیم OPH است و همچنین آنتی‌بادی ثانویه (Secondary rat anti-mouse IgG-FITC Antibody) با رقت‌های ۱ به ۵۰۰ تیمار شدند و برای بررسی اتصال آنزیم به سطح اسپور، با دستگاه فلوسیتومتری و میکروسکوپ فلورسنت Olympus مدل BX51 تحت فیلتر FITC (Fluorescein Isothiocyanate) بررسی شدند.

بررسی pH و دمای بهینه برای فعالیت آنزیم OPH آزاد و متصل به اسپور

برای بررسی pH بهینه برای فعالیت آنزیم OPH آزاد و متصل به اسپور، فعالیت دو فرم آنزیمی، در pHهای مختلف بافر تریس (۳، ٤، ٥، ۷، ۱۰، ۱۱ و ۱۳) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه سنجش شد.

برای سنجش دمای بهینه برای فعالیت آنزیم OPH آزاد و متصل به اسپور، واکنش‌های آنزیمی در pH برابر ۸/۸ بافر تریس به‌مدت ۱۰ دقیقه در دماهای (٤، ۲٥، ۳۷، ٥٥، ٦٥، ۷٥، ۹۰ درجه سانتی‌گراد) انجام و فعالیت آنزیمی محاسبه شد. میزان فعالیت آنزیمی فرم آزاد و متصل به اسپور با استفاده از ضریب خاموشی پارانیتروفنول و به‌ترتیب بر حسب واحد آنزیمی/میلی‌لیتر/دقیقه (U/ml/min) و واحد آنزیمی/$۱۰^{۱۰}$ اسپور/دقیقه ($U/10^{10}$ spore/min) سنجش شد.

بررسی میزان پایداری آنزیم OPH آزاد و متصل به اسپور در pH و دماهای مختلف

برای بررسی میزان پایداری آنزیم آزاد و متصل به اسپور نسبت به pHهای مختلف، هر دو فرم آنزیم به‌مدت ٦۰ دقیقه در pHهای (۳، ٤، ٥، ۷، ۱۰، ۱۱ و ۱۳) بافر تریس و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس فعالیت آنزیمی باقی مانده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد محاسبه شد.

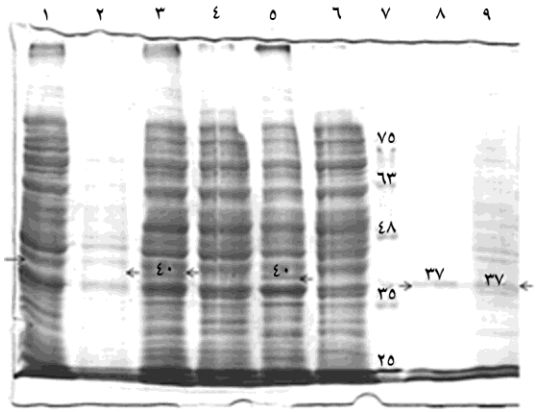
برای بررسی میزان پایداری آنزیم آزاد و متصل به اسپور نسبت به دماهای مختلف، دو فرم آنزیم به‌مدت ۱ ساعت در دماهای (٤، ۲٥، ۳۷، ٥٥، ٦٥، ۷٥، ۹۰ درجه سانتی‌گراد) نگهداری و سپس درصد فعالیت آنزیمی باقی مانده در بافر تریس با pH برابر ۸/۸ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد محاسبه شد.

نتایج

ژن *opd* به‌طور موفقیت‌آمیزی در پلاسمید بیانی (+) pET-26b کلون و به باکتری *E. coli* BL21 (DE3) pLysS منتقل شد. بیان آنزیم OPH در باکتری‌های حامل ژن opd با استفاده از غلظت یک میلی‌مولار IPTG (β-D-1-thiogalactopyranoside Isopropyl) انجام شد. به سبب استفاده از پپتید نشانه ترشحی، این آنزیم به فضای خارج سلولی باکتری ترشح شد، تجزیه و تحلیل SDS-PAGE روی نمونه‌های محیط کشت و رسوب باکتری انجام شد و بیان آنزیم در سیتوپلاسم و همچنین ترشح آن به فضای خارج سلولی باکتری تأیید شد (شکل ۱). نتایج نشان داد که در آنزیم ترشح شده به محیط کشت باکتری، ۲۹ اسیدآمینه ابتدایی آنزیم OPH که مربوط به پپتید نشانه (Signal Peptide) آنزیم است به‌طور موفقیت‌آمیزی از ابتدای آنزیم حذف شد و آنزیم بدون پپتید نشانه (آنزیم OPH بالغ) با وزن مولکولی ۳۷ کیلودالتون به فضای خارج سلولی باکتری ترشح شده است (شکل ۱ ستون ۹). در نتایج SDS-PAGE نمونه‌های رسوب باکتری که بیان سیتوپلاسمی آنزیم را نشان می‌دهد، باند ٤۰ و ۳۷ کیلودالتونی مشاهده شد که به‌ترتیب نشان دهنده آنزیم OPH نابالغ دارای پپتید نشانه و آنزیم OPH بالغ است که پپتید نشانه آن حذف شد و آماده ترشح به فضای خارج سلولی باکتری است. آنالیز وسترن بلات با آنتی‌بادی (anti Poly-histidine antibody

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

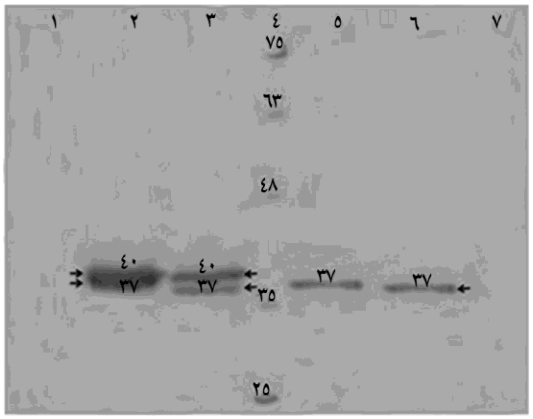
conjugated with HRP) کـه علیـه دنبالـه پلـی هیسـتیدینی انتهای C ترمینال آنزیم OPH است و به آنزیم پراکسیداز ترب کوهی (Horseradish Peroxidase) متصل است، انجام شد و



شکل ۱ نتایج SDS-PAGE و آشکارسازی آنزیم نوترکیب OPH؛ (ستون ۱) رسوب باکتری اشریشیاکلی دارای پلاسمید (+)pET-26b و دارای قطعه مربوط به ژن opd در زمان قبل از القا با IPTG (عدم بیان آنزیم)، (ستون ۲) محیط کشت باکتری در زمان قبل از القا با IPTG (عدم بیان آنزیم)، (ستون ۳) رسوب باکتری که آنزیم OPH در سیتوپلاسم آن بیان شده است در ۷ ساعت بعد از القا باIPTG، (ستون ٤) رسوب باکتری اشریشیاکلی دارای پلاسمید (+)pET-26b بدون قطعه مربوط به ژن opd در ۷ ساعت بعد از القا با IPTG (کنترل منفی)، (ستون ٥) رسوب باکتری که آنزیم OPH در سیتوپلاسم آن بیان شده است در ۲٤ ساعت بعد از القا با IPTG، (ستون ٦) رسوب باکتری اشریشیا کلی دارای پلاسمید (+)pET-26b بدون قطعه مربوط به ژن *opd* در ۲٤ ساعت بعد از القا با IPTG (کنترل منفی)، (ستون ۷) استاندارد وزن مولکولی بر حسب کیلودالتون، (ستون ۸) آنزیم OPH خالص شده از محیط کشت باکتری، (ستون ۹) محیط کشت باکتری حاوی آنزیم OPH ترشح شده به داخل آن در ۲٤ ساعت بعد از القا با IPTG

اسپورهای باکتری باسیلوس سـوبتیلیس سـویه Trpc2 در محیط کشت DSM تولید و بعد از خالص‌سازی با لام نئوبـار شمارش شدند. تعداد اسپورها در یک میلی‌لیتر تقریبـاً حـدود ۵×۱۰^{۱۰} بـود کـه بـرای تثبیـت بـه روش جـذب سـطحی از ۳۰۰ واحد بر میلی‌لیتر آنـزیم OPH و ۱×۱۰^{۱۰} اسـپور اسـتفاده شد. واکنش جذب سطحی آنزیم OPH روی اسـپور در بـافر سیترات با pHهای ٤، ٥، ۷، و ۱۰ انجـام شـد و بعـد از اتمـام مرحله انکوباسیون، سوسپانسون اسپور و آنزیم سانتریفوژ شد و محلول رویی که حاوی مولکول‌های آنزیمی است که به اسپور اتصال پیدا نکرده‌است و همچنین اسپورهایی که رسوب کـرده

نتایج این آزمـایش نیـز بیـان ایـن آنـزیم را در سیتوپلاسـم و همچنین ترشح آن را به فضای خارج سلولی باکتری تأیید نمود (شکل ۲).

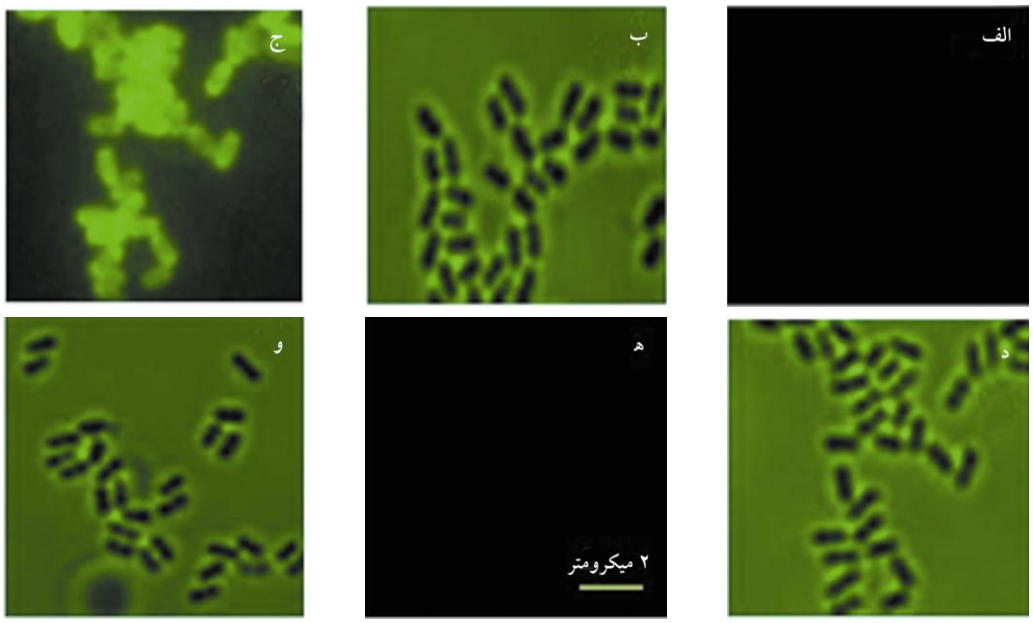


شکل ۲ نتایج وسترن بلات و آشکارسازی آنـزیم نوترکیـب OPH؛ (سـتون ۱) رسـوب بـاکتری اشریشـیاکلی دارای پلاسـمید (+)pET-26b و دارای قطعه مربوط به ژن *opd* در زمان قبل از القا با IPTG (عـدم بیـان آنـزیم)، (ستون ۲) رسوب باکتری که آنزیم OPH در سیتوپلاسم آن بیان شده اسـت در ۲٤ ساعت بعد از القا با IPTG، (سـتون ۳) رسـوب بـاکتری کـه آنـزیم OPH در سیتوپلاسم آن بیان شده است در ۷ ساعت بعد از القـا بـا IPTG، (ستون ٤) استاندارد وزن مولکولی بر حسب کیلودالتـون، (سـتون ٥) محـیط کشت باکتری حاوی آنزیم OPH ترشح شـده بـه داخـل آن در ۲٤ سـاعت بعد از القا با IPTG، (ستون ٦) آنزیم OPH خالص شـده از محـیط کشـت باکتری، (ستون ۷) رسوب باکتری اشریشـیاکلی دارای پلاسـمید (+)pET-26b بدون قطعه مربـوط بـه ژن opd در ۷ سـاعت بعـد از القـا بـا IPTG (کنترل منفی)

بودند به‌طور جداگانه از نظر میزان فعالیت آنزیم OPH ارزیابی شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که در بـین pHهـای مـورد مطالعـه، در pH حـدود ٥ کـه زیـر pH ایزوالکتریـک آنـزیم OPH (۷/۷) است، بیشـترین فعالیـت آنزیمـی، تقریبـاً حـدود ٤۲ درصد، در ارتباط با اسپورها دیده شد. از آن‌جا کـه سـطح اسپور دارای بار منفی است و عمده این بـار منفـی بـه سـبب وجود گروه کربوکسیل قابل یونیزه شدن روی قشر (Cortex) و پوشش سطحی اسپور (Coat) اسـت و از طـرف دیگـر در محیط‌های آب‌دار، در pH پایین‌تر از pH ایزوالکتریک، آنـزیم OPH به شدت پروتونه و دارای بـار مثبـت اسـت، در نتیجـه

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

آنزیم در pH حدود ۵ که زیر pH ایزوالکتریک آنزیم است به‌عنوان یک کاتیون عمل می‌کند و به سطح‌دارای بار منفی اسپور جذب می‌شود و احتمالاً به همین دلیل بهترین میزان جذب آنزیم به اسپور، در این pH دیده شد. جذب آنزیم OPH به سطح اسپور باکتری باسیلوس سوبتیلیس توسط میکروسکوپ فلورسنت (شکل ۳ ج) و فلوسیتومتری (شکل ٤ د) نیز تأیید شد. نتایج فلوسیتومتری نشان داد که بیشترین جذب آنزیم به سطح اسپور در pH حدود ۵ بود که شدت فلورسنت در این اسپورها حدود ٤۲ تا ٤۵ درصد بیشتر از نمونه‌های کنترل منفی است (شکل ٤ د) که با نتایج به‌دست آمده از سنجش فعالیت آنزیمی نیز مطابقت می‌نماید. در این مطالعه از سه کنترل منفی استفاده شد. کنترل منفی اول اسپورهای بدون آنزیم OPH بودند که با هر دو آنتی‌بادی اولیه (آنتی‌بادی علیه دنباله هیستیدین) و آنتی‌بادی ثانویه (آنتی‌بادی دارای FITC) تیمار شدند (شکل ۳ الف و شکل ٤ الف). کنترل منفی دوم، اسپورهای بدون آنزیم OPH بودند که تنها با آنتی‌بادی ثانویه تیمار شدند (شکل ٤ ب) و کنترل منفی سوم مربوط به اسپورهایی بود که آنزیم OPH روی سطح آن‌ها جذب شده بود اما تنها با آنتی‌بادی ثانویه دارای FITC تیمار شدند (شکل ۳ هـ و شکل ٤ ج).



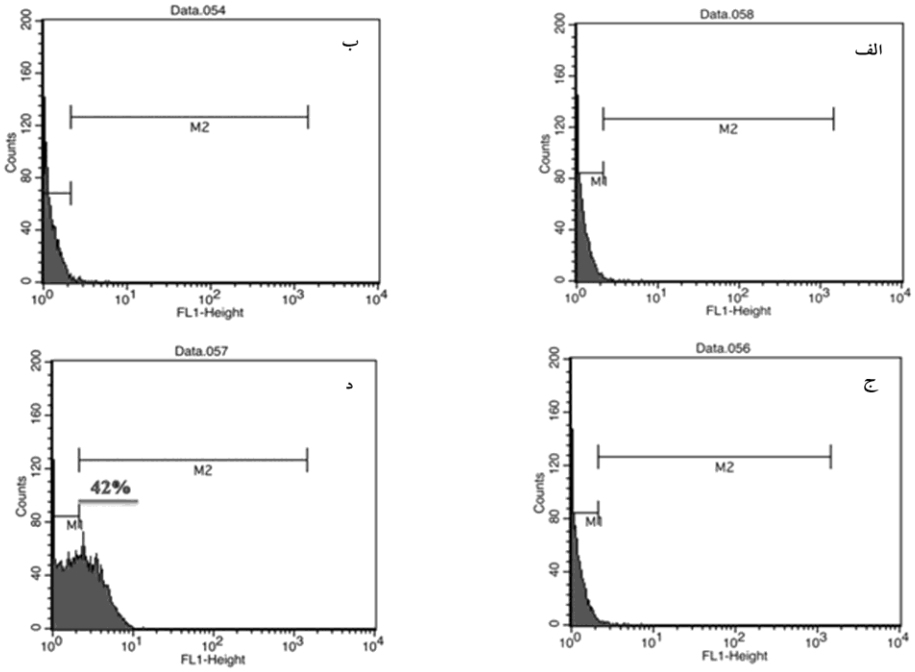
شکل ۳ تأیید اتصال آنزیم به سطح اسپور با میکروسکوپ فلورسنت Olympus مدل BX51 (عکسبرداری با فیلتر FITC)؛ (الف) اسپورهای فاقد آنزیم OPH که با آنتی‌بادی اولیه (آنتی‌بادی بر علیه دنباله پلی هیستیدین) و آنتی‌بادی ثانویه دارای FITC رنگ‌آمیزی شده (کنترل منفی) و با نور ماورای بنفش تحت فیلتر FITC میکروسکوپ فلورسنت عکس‌برداری شده‌اند. (ب) همان اسپورهای عکس (الف) هستند که از آن‌ها در زمان خاموش کردن نور ماورای بنفش تحت فیلتر FITC میکروسکوپ فلورسنت با نور معمولی عکسبرداری شده است. (ج) اسپورهایی که آنزیم OPH بروی سطح آن جذب شده و با آنتی‌بادی اولیه (آنتی‌بادی بر علیه دنباله پلی هیستیدین) و آنتی‌بادی ثانویه دارای FITC رنگ‌آمیزی شده (کنترل مثبت) که با نور ماورای بنفش تحت فیلتر FITC میکروسکوپ فلورسنت عکسبرداری شده‌اند. (د) همان اسپورهای عکس (ج) هستند که در زمان خاموش کردن نور ماورای بنفش تحت فیلتر FITC میکروسکوپ فلورسنت با نور معمولی عکسبرداری شده‌اند. (هـ) اسپورهای دارای آنزیم OPH که تنها با آنتی‌بادی ثانویه دارای FITC رنگ‌آمیزی (کنترل منفی) و با نور ماورای بنفش تحت فیلتر FITC میکروسکوپ فلورسنت عکس‌برداری شده‌اند. (و) همان اسپورهای عکس (هـ) هستند که از آن‌ها در زمان خاموش کردن نور ماورای بنفش و تحت فیلتر FITC میکروسکوپ فلورسنت با نور معمولی عکسبرداری شده است.

بررسی فعالیت و پایداری آنزیم OPH آزاد و متصل به اسپور در pHهای مختلف

الگوی فعالیت آنزیم آزاد و متصل به اسپور در گستره pH ۳ تا ۱۳ مطالعه شد. نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم آزاد و متصل به اسپور در pH حدود ۱۱ بود و با اتصال آنزیم به سطح اسپور در pH بهینه برای فعالیت آنزیم تغییری ایجاد

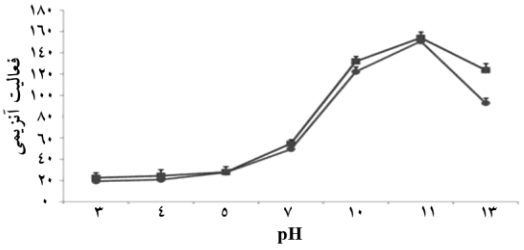
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

نشده است (شکل ۵). سنجش فعالیت آنزیمی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است فعالیت آنزیمی در pHهای اسیدی برای هر دو فرم آنزیمی پایین است و به‌تدریج با افزایش pH فعالیت آنزیمی نیز به‌صورت صعودی افزایش می‌یابد. به‌عبارت دیگر؛ آنزیم OPH یک آنزیم قلیا دوست است که با افزایش pH در واکنش آنزیمی فعالیت آن نیز افزایش می‌یابد و در pH حدود ۱۱ به بالاترین مقدار خود می‌رسد اما با بالا رفتن pH از ۱۱ به ۱۳، فعالیت آنزیمی در دو فرم آنزیم تا حدودی کاهش می‌یابد. برای بررسی پایداری آنزیم آزاد و متصل به اسپور در pHهای مختلف ابتدا دو فرم آنزیمی به‌مدت یک ساعت در pHهای مختلف و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، سپس باقی مانده فعالیت آنزیمی هر دو فرم آنزیمی تیمار شده در pHهای مختلف، اندازه‌گیری شد و درصد فعالیت آنزیمی باقی مانده در فرم‌های آنزیمی تیمار شده در pHهای مختلف نسبت به فرم‌های آنزیمی مشابه بدون تیمار محاسبه شد. نتایج نشان داده که فرم آزاد آنزیم بعد از تیمار یک ساعته در pHهای ۳، ٤ و ۵ به‌ترتیب ٤٢/٣، ٤٨/٩ و ٥١/٢ درصد از فعالیت خود را در مقایسه با فرم آزاد آنزیم بدون تیمار در pHهای اشاره شده حفظ نمود؛ در حالی که آنزیم جذب شده روی سطح اسپور در این pHها به‌ترتیب ٦٦، ٧١/٩ و ٧٤/٦ درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ نمود (شکل ٦). در pHهای قلیایی ۱۰، ۱۱ و ۱۳ فرم آزاد آنزیم ٧٣/١، ٥١/٩ و ٤٨/٩ درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ نمود در حالی که آنزیم جذب شده روی اسپور در این pHها به‌ترتیب ٨٠/٢، ٦١/٤ و ٧٠/٤ درصد از فعالیت اولیه خود را نشان داد. بنابراین فرم آنزیمی جذب شده روی سطح اسپور در مقایسه با فرم آزاد آنزیم پایداری بیشتری را در pHهای اسیدی و قلیایی از خود نشان داد (شکل ٦).

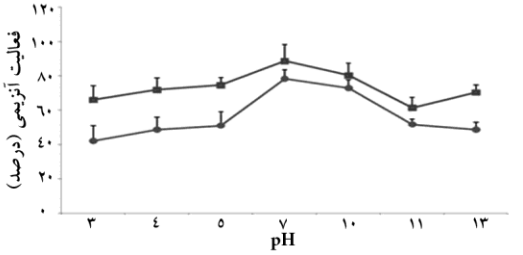


شکل ٤ تأیید اتصال آنزیم به سطح اسپور با فلوسیتومتری؛ (الف) اسپورهای بدون آنزیم OPH که با هر دو آنتی‌بادی اولیه (آنتی‌بادی بر علیه دنباله پلی هیستیدین) و آنتی‌بادی ثانویه دارای FITC رنگ‌آمیزی شدند (کنترل منفی). (ب) اسپورهای بدون آنزیم OPH که تنها با آنتی‌بادی ثانویه رنگ‌آمیزی شدند (کنترل منفی). (ج) اسپورهایی که آنزیم OPH روی سطح آن‌ها جذب شده است و تنها با آنتی‌بادی ثانویه دارای FITC رنگ‌آمیزی شدند (کنترل منفی). (د) اسپورهایی که آنزیم OPH روی سطح آن‌ها جذب شده است و با هر دو آنتی‌بادی اولیه (آنتی‌بادی بر علیه دنباله پلی هیستیدین) و آنتی‌بادی ثانویه دارای FITC رنگ‌آمیزی شدند (کنترل مثبت).

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]



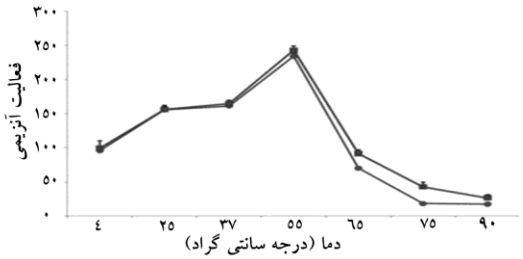
شکل ۵ بررسی pH بهینه برای فعالیت آنزیم OPH در دو فرم آزاد (●) بر حسب (واحد آنزیمی/میلی‌لیتر/دقیقه) و جذب شده روی اسپور (■) بر حسب (واحد آنزیمی/10^{10} اسپور/دقیقه)



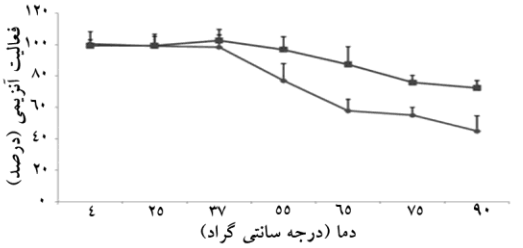
شکل ٦ سنجش فعالیت آنزیمی (درصد) دو فرم آزاد (●) و جذب شده روی سطح اسپور (■) آنزیم OPH به‌منظور بررسی پایداری آن‌ها در pHهای مختلف

بررسی فعالیت و پایداری آنزیم آزاد و متصل به اسپور در دماهای مختلف

الگوی دمایی فعالیت آنزیم آزاد و متصل به اسپور در طیف ٤ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد مطالعه شد. نتایج نشان داد که در هر دو فرم آنزیمی با افزایش دما به تدریج فعالیت آن‌ها نیز افزایش یافت و به بیشترین حد خود در ۵۵ درجه سانتی‌گراد (دمای بهینه) رسید (شکل ۷). در دماهای بالاتر از ۵۵ درجه سانتی‌گراد و بین ٦۵ تا ۹۰ درجه، فعالیت آنزیمی با شیب تندی کاهش یافت. بنابراین با اتصال آنزیم به سطح اسپور هیچ‌گونه تغییری در دمای بهینه برای فعالیت آنزیم ایجاد نشد و دمای بهینه برای فعالیت هر دو فرم آنزیمی حدود ۵۵ درجه سانتی‌گراد بود. پایداری دمایی دو فرم آنزیم نیز در طیف ٤ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. بدین منظور هر دو فرم آنزیمی به‌مدت یک ساعت در دماهای مذکور قرار گرفت و سپس باقی مانده فعالیت آنزیمی آن‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه اندازه‌گیری شد و سپس درصد فعالیت آنزیمی باقی مانده دو فرم‌های تیمار شده آنزیم در مقایسه با فرم‌های آنزیم بدون تیمار دمایی محاسبه شد (شکل ۸). نتایج نشان داد که هر دو فرم آنزیمی که مدت یک ساعت در دماهای ٤ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته بودند، تقریباً ۱۰۰ درصد فعالیت خود را حفظ نمودند اما آنزیم آزاد در دماهای ٦۵، ۷۵ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب ۵۸، ۵۵/۲ و ٤۵/۱ درصد از فعالیت خود را حفظ نمود در حالی که فرم آنزیمی جذب شده روی سطح اسپور در این دماها به‌ترتیب ۸۷/٤، ۷۵/۸ و ۷۲/٤ درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ کرد. بدین ترتیب در دماهای بالا فرم آنزیمی جذب شده روی سطح اسپور در مقایسه با فرم آزاد آنزیمی پایداری بیشتری را نشان داد.



شکل ۷ بررسی دمای بهینه برای فعالیت آنزیم OPH در دو فرم آزاد (●) بر حسب (واحد آنزیمی/میلی‌لیتر/دقیقه) و جذب شده روی اسپور (■) بر حسب (واحد آنزیمی/10^{10} اسپور/دقیقه)

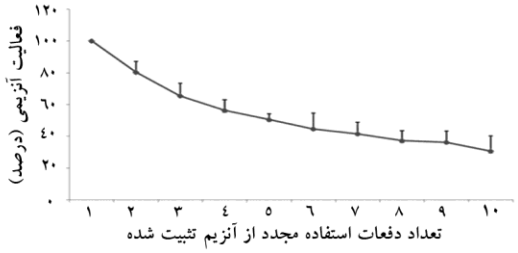


شکل ۸ سنجش فعالیت آنزیمی (درصد) دو فرم آزاد (●) و جذب شده روی اسپور (■) آنزیم OPH به‌منظور بررسی پایداری آن‌ها در دماهای مختلف

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

بررسی قابلیت استفاده مجـدد از آنـزیم OPH تثبیت شده در واکنش‌های متعدد آنزیمی

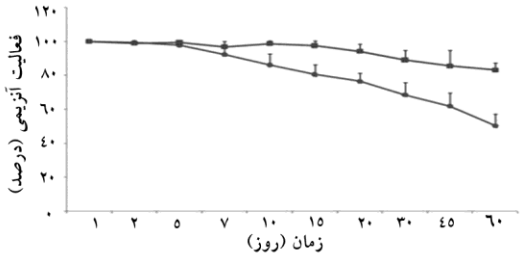
یکی از اهداف مهم تثبیت آنزیم OPH روی اسپور باکتری باسیلوس سوبتیلیس امکان استفاده مجدد از آن در واکنش‌های آنزیمی متعدد است. از آن‌جا که آنزیم بعد از انجام یک واکنش شیمیایی بدون تغییـر در محلـول واکـنش بـاقی مـی‌مانـد، در صورتی که امکان بازیافت آنزیم از محلول واکنش وجود داشته باشد می‌توان از آن برای انجام واکنش دیگری اسـتفاده نمـود. آنزیم OPH در فرم محلول، بعد از انجام واکـنش در محلـول واکنش باقی می‌مانـد و جداسـازی آن از محلـول واکـنش بـا روش‌های ساده امکان پذیر نیست؛ اما بـا تثبیـت آنـزیم روی سطح اسپور باکتری باسیلوس سوبتیلیس می‌توان بعد از انجـام واکنش، مخلوط واکنش را سانتریفوژ نمود و اسپورها و به تبع آنـزیم متصـل شـده روی آن‌هـا را بـه‌راحتـی بازیافـت و در واکنش‌های بعدی استفاده کرد. همان‌طور که در شکل ۹ نشان داده شده است، آنزیم OPH تثبیت شده روی سطح اسـپور بـه روش جذب سطحی، ۵۰/۵ درصـد از فعالیـت اولیـه خـود را ضمن استفاده در ۵ واکنش آنزیمی مختلف حفظ نمود. علـت اصلی کاهش فعالیت آنزیم طی استفاده در واکنش‌های آنزیمی متعدد، جدا شدن آنزیم از سطح اسپور است.



شکل ۹ سنجش باقی مانده فعالیت آنزیمی (درصد) فرم تثبیت شده آنزیم OPH روی سطح اسپور (■) طی استفاده در ۱۰ چرخه واکنش آنزیمی متوالی

بررسی قابلیت نگهداری فرم محلول و تثبیـت شده آنزیم OPH

با تثبیت آنزیم بر سطح اسپور، پایـداری آنـزیم و قابلیـت نگهداری آن افزایش یافت. به‌منظور سنجش و مقایسه پایداری آنزیم در فرم‌های محلول و تثبیـت شـده در دمـای ٤ درجـه سانتی‌گراد، فعالیت هر دو فرم آنزیمی در فاصله زمانی ۱ تا ٦۰ روز سنجش و مقایسه شد. همان‌طور که در شـکل ۱۰ نشـان داده شده است آنزیم محلول بعد از این که به‌مدت ۱۵ روز در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، حـدود ۸۰ درصـد از فعالیت اولیه خود را حفظ نمود در حالی که آنزیم تثبیت شده بعد از گذشت این زمان حدود ۹۷ درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ کرد. بعد از گذشت ٦۰ روز، فـرم محلـول آنـزیم ۵۰ درصد و فرم تثبیت شده آنزیم ۸۳ درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ نمود؛ بنابراین با تثبیت آنزیم روی سطح اسپور باکتری، پایداری آن در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در مقایسـه بـا فـرم محلول آنزیم افزایش یافت.



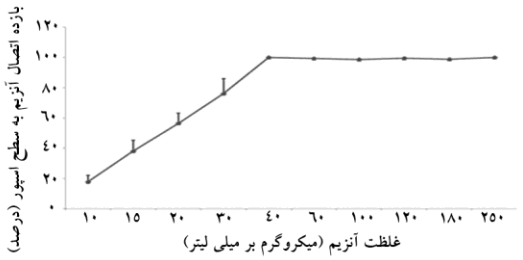
شکل ۱۰ سنجش فعالیت آنزیمی (درصد) دو فـرم آزاد (●) و جـذب شـده روی سطح اسپور (■) آنزیم OPH به‌منظور بررسی پایداری آن‌ها طـی ۱ تـا ٦۰ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد

بررسی ظرفیت جذب آنزیم OPH روی سطح اسپورهای باکتری باسیلوس سوبتیلیس

به‌منظور بررسی میزان ظرفیت اسپور بـرای جـذب آنـزیم OPH، واکنش تثبیت آنزیم به اسپور با مقادیر مختلف از آنزیم (۱۰ تا ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) روی یک مقدار مشخصـی از اسپور (1×10^{10}) انجام گرفت. نتایج نشان داد که در ابتدا با افزایش غلظت آنزیم مورد استفاده در واکـنش تثبیـت، درصـد اتصال آنزیم به سطح اسپور (بازده تثبیت) بـه‌صـورت خطـی افزایش یافت تا در غلظت ٤۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنزیم، بـه

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

بالاترین حد خود رسید و بعد از این، هر چه غلظت آنزیم در واکنش تثبیت بیشتر شد، در بازده تثبیت افزایشی رخ نداد. بنابراین تقریباً استفاده از ٤٠ میکروگرم آنزیم OPH برای 1×10^{10} اسپور، باعث ایجاد حداکثر میزان جذب آنزیم به سطح اسپور شد و افزایش بیش از این مقدار آنزیم در واکنش اتصال، تأثیری در جذب بیشتر آنزیم به سطح اسپور نداشت (شکل ١١).



شکل ١١ بررسی ظرفیت اتصال آنزیم OPH به سطح اسپورهای باکتری باسیلوس سوبتیلیس

بحث

آنزیم OPH گستره وسیعی از ترکیبات ارگانوفسفره را شناسایی و هیدرولیز می‌کند و کاربرد زیادی در ساخت حسگرهای زیستی برای تشخیص و هیدرولیز این ترکیبات در اکوسیستم‌های آبی و خاکی دارد [١٠]. استفاده از آنزیم خالص OPH در صنعت به‌واسطه چندین عامل محدود شده است. عمده‌ترین محدودیت آنزیم، گران قیمت بودن و ناپایداری آن است. همچنین بازیافت آنزیم از سیال خروجی راکتورها در انتهای واکنش، مشکل و هزینه بر است و در نتیجه آنزیم به‌صورت یک بار مصرف استفاده می‌شود [٢٠]. در چند دهه اخیر تحقیقات گسترده‌ای انجام شده است تا از این آنزیم به‌صورت مقرون به صرفه برای حذف ترکیبات ارگانوفسفره در صنعت و محیط زیست استفاده شود که از میان روش‌های مختلف، تکنولوژی تثبیت، توجه بیشتری را به خود جلب نموده است [٢١]. در این روش آنزیم از نظر فیزیکی در یک ناحیه مشخصی از فضا محدود شده، با حفظ فعالیت کاتالیتیکی خود می‌تواند به‌طور مداوم و مکرر استفاده شود [٢٢]. در مطالعه‌ای آنزیم OPH با پیوند کووالان روی صفحات ژلاتینی متصل شد، نتایج نشان داد که آنزیم تثبیت شده فعالیت خود را حفظ نمود و در خصوصیات کاتالیتیکی و میزان تأثیر آن بر حشره کش متیل پاراتیون و عامل جنگی سومان در مقایسه با فرم آزاد آنزیم تغییری ایجاد نشد [٢٣]. از پلیمرهای سنتزی پوشیده از لیگاندهای فلزی دو ظرفیتی [٢٤]، انواع سطوح صنعتی مانند شیشه، نایلون، کیتوزان، سلولاز، کیتین و آگارز برای تثبیت آنزیم OPH استفاده شده است. بسیاری از این حاملین تجاری و در دسترس، گران‌قیمت است و با محیط زیست سازگاری ندارد [٢٥]. بنابراین لزوم استفاده از یک حامل ارزان‌تر و سازگار با محیط زیست برای تثبیت آنزیم OPH یک مشکل عمده برای تثبیت این آنزیم محسوب می‌شود [٢٥]. برای حل این مشکل در این مطالعه برای اولین بار از اسپور باکتری باسیلوس سوبتیلیس سویه Trpc2 به‌عنوان حامل برای تثبیت آنزیم OPH استفاده شد. اسپورهای باکتریایی مقاومت بالایی به شرایط سخت دارند و تولید آن‌ها آسان و مقرون به‌صرفه است بنابراین ابزاری با کارآیی بالا برای کاربرد در بیوتکنولوژی هستند [٢٦]. از اسپورهای مهندسی شده به‌عنوان تجزیه‌گرهای زیستی یا ابزارهایی در زیست‌پالایی نیز استفاده شده است [٢٧، ٢٨]. از آن‌جایی که در بیشتر کاربردهای بیوتکنولوژی نیاز به آنزیمی داریم که بتواند در دماهای بالا پایدار باقی بماند و عملکرد خود را در غلظت‌های بالا یا پایین نمک و PHهای مختلف حفظ نماید، اسپور می‌تواند ناقل مناسبی برای نمایش سطحی این آنزیم به‌شمار آید [١٤]. تاکنون مطالعات زیادی به‌منظور نمایش آنزیم‌ها بر سطح اسپورهای باکتریایی به روش‌های ژنتیکی صورت گرفته است اما از آن‌جا که این روش‌ها با تغییر در ساختار ژنتیکی اسپور همراه است و منجر به ایجاد یک موجود تراریخت می‌شود، از طرف دوستداران محیط زیست با استقبال زیادی مواجه نشده است [٢٩، ٣٠]. اخیراً در یک تکنولوژی جدید، از اسپور باکتری‌ها برای تثبیت آنزیم‌ها به روش غیر ژنتیکی

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

استفاده شده است. در این روش آنزیم با استفاده از پیوندهای فیزیکی و شیمیایی به سطح اسپور متصل شده بدون این‌که تغییری در ساختار ژنتیکی اسپور داده شود؛ برای مثال در مطالعه‌ای آنزیم بتا گالاکتوزیداز روی اسپور یک سویه وحشی باسیلوس سوبتیلیس به روش جذب سطحی تثبیت شد. نتایج این مطالعه نشان داد که آنزیم ۵۰ درصد فعالیت کاتالیتیک خود را حفظ کرد و تغییری در pH و دمای بهینه برای فعالیت آنزیم، به‌واسطه حضور روی سطح اسپور ایجاد نشد [۱۲]. تاکنون در دنیا مطالعه‌ای درباره بیان آنزیم OPH به‌صورت ژنتیکی و غیر ژنتیکی روی اسپور باکتری‌ها از جمله باکتری باسیلوس سوبتیلیس صورت نگرفته است. در این مطالعه آنزیم OPH در سیستم اشریشیا کلی بیان و سپس روی سطح اسپور باکتری باسیلوس سوبتیلیس به روش جذب سطحی تثبیت شد. جذب سطحی یکی از ساده‌ترین روش‌های تثبیت آنزیم‌ها است که اغلب بر پایه جذب فیزیکی یا پیوند یونی استوار است. در جذب فیزیکی آنزیم‌ها از طریق پیوندهای هیدروژنی، بر همکنش‌های آب گریز یا واندروالس به سطح ناقل متصل می‌شود [۳۱]. در تثبیت به روش جذب، مولکول‌های زیستی با یک حامل که قابلیت جذب آن‌ها را دارد، تحت شرایط pH و قدرت یونی مناسب برای مدت زمانی معین انکوبه می‌شود. سپس شستشوهای شدید برای حذف مولکول‌های زیستی متصل نشده به ناقل انجام می‌شود [۱۲]. از مزایای تثبیت به روش جذب سطحی می‌توان به برگشت‌پذیری این روش اشاره کرد که نه تنها خالص‌سازی آنزیم‌ها را ممکن می‌سازد بلکه امکان استفاده مجدد از حامل را نیز امکان‌پذیر می‌نماید. از مزایای دیگر این روش ساده بودن، امکان حفظ صد درصد فعالیت کاتالیتیکی آنزیم، عدم ایجاد تغییر شیمیایی روی حامل و آنزیم، ارزانی و سرعت روش است [۳۲]. اولین آنزیم تثبیت شده به این روش که در صنعت استفاده شد، آنزیم آمینواسید آسیلاز (Amino acid acylase) است که روی سلولاز تثبیت شد [۳۱]. در مطالعه حاضر آنزیم OPH به‌طور موفقیت‌آمیزی بر سطح اسپور به روش جذب سطحی تثبیت شد که بازده این روش حدود ۵۰ درصد بود. به‌عبارت دیگر؛ ۵۰ درصد مولکول‌های آنزیم موجود در واکنش روی سطح اسپور جذب شدند. آنزیم ضمن حفظ فعالیت کاتالیتیکی خود، توانست نسبت به فرم آزاد آنزیم پایداری بیشتری را در دما و pHهای بالا از خود نشان دهد. از این اسپورها می‌توان به‌منظور حذف سموم ارگانوفسفره در اکوسیستم‌های آبی و خاکی که احتمال در معرض قرارگیری آنزیم با شرایط سخت مانند دما و pHهای بالا وجود دارد، با کارآیی قابل قبولی استفاده نمود. همچنین با توجه به امنیت تأیید شده اسپور باکتری [۱۵]، می‌توان از آن در مصارف پزشکی برای رفع مسمومیت ناشی از سموم ارگانوفسفره نیز بهره برد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران که کلیه هزینه‌های این پژوهش را تأمین نموده است تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

[1] Di Sioudi BD, Miller CE, Lai K, Grimsley JK, Wild JR. Rational design of organophosphorus hydrolase for altered substrate specificities. Chem Biol Interact 1999; 119-120: 211-23.

[2] Kang DG, Lim GB, Cha HJ. Functional periplasmic secretion of organophosphorous hydrolase using the twin-arginine translocation pathway in Escherichia coli. J Biotechnol 2005; 118(4): 379-85.

[3] Ely F, Hadler KS, Gahan LR, Guddat LW, Ollis DL, Schenk G. The organophosphate-degrading enzyme from Agrobacterium radiobacter displays mechanistic flexibility for catalysis. Biochem J 2010; 432(3): 565-73.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

[4] Lai K, Dave KI, Wild JR. Bimetallic binding motifs in organophosphorus hydrolase are important for catalysis and structural organization. J Biol Chem 1994; 269(24): 16579-84.

[5] Laothanachareon T, Champreda V, Sritongkham P, Somasundrum M, Surareungchai W. Cross-linked enzyme crystals of organophosphate hydrolase for electrochemical detection of organophosphorus compounds. World J Microbiol Biotechnol 2008; 24(12): 3049-55.

[6] Benning MM, Hong SB, Raushel FM, Holden HM. The binding of substrate analogs to phosphotriesterase. J Biol Chem 2000; 275(39): 30556-60.

[7] Ghanem E, Raushel FM. Detoxification of organophosphate nerve agents by bacterial phosphotriesterase. Toxicol Appl Pharmacol 2005; 207(2 Suppl): 459-70.

[8] Mulchandani P, Chen W, Mulchandani A, Wang J, Chen L. Amperometric microbial biosensor for direct determination of organophosphate pesticides using recombinant microorganism with surface expressed organophosphorus hydrolase. Biosens Bioelectron 2001; 16(7-8): 433-7.

[9] Viveros L, Paliwal S, McCraec D, Wildb J, Simonian A. A fluorescence-based biosensor for the detection of organophosphate pesticides and chemical warfare agents. Sensors and Actuators B: Chemical 2006; 115(1): 150-7.

[10] Lee JH, Park JY, Min K, Cha HJ, Choi SS, Yoo YJ. A novel organophosphorus hydrolase-based biosensor using mesoporous carbons and carbon black for the detection of organophosphate nerve agents. Biosens Bioelectron 2010; 25(7): 1566-70.

[11] Takayama K, Suye S, Tanaka Y, Mulchandani A, Kuroda K, Ueda M. Estimation of Enzyme Kinetic Parameters of Cell Surface-displayed Organophosphorus Hydrolase and Construction of a Biosensing System for Organophosphorus Compounds. Anal Sci 2011; 27(8): 823-6.

[12] Sirec T, Strazzulli A, Isticato R, De Felice M, Moracci M, Ricca E. Adsorption of β-galactosidase of Alicyclobacillus acidocaldarius on wild type and mutants spores of Bacillus subtilis. Microb Cell Fact 2012; 11: 100.

[13] Pedrosa VA1, Paliwal S, Balasubramanian S, Nepal D, Davis V, Wild J, Ramanculov E, Simonian A. Enhanced stability of enzyme organophosphate hydrolase interfaced on the carbon nanotubes. Colloids Surf B Biointerfaces 2010; 77(1): 69-74.

[14] Theriot CM, Grunden AM. Hydrolysis of organophosphorus compounds by microbial enzymes. Appl Microbiol Biotechnol 2011; 89(1): 35-43.

[15] Hong HA, Duc le H, Cutting SM. The use of bacterial spore formers as probiotics. FEMS Microbiol Rev 2005; 29(4): 813-35.

[16] Huang JM, Hong HA, Van Tong H, Hoang TH, Brisson A, Cutting SM. Mucosal delivery of antigens using adsorption to bacterial spores. Vaccine 2010; 28(4): 1021-30.

[17] Nicholson WL, Setlow P. Sporulation, germination and outgrowth. In: Harwood CR, Cutting SM (Eds.) Molecular biological methods for Bacillus. UK: John Wiley and Sons Chichester, 1990, p. 391-450.

[18] Wu N, Deng M, Shi X, Liang G, Yao B, Fan

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

Y. Isolation, purification and characterization of a new organphosphorus hydrolase OPHC2. Chinese Science Bulletin 2004; 49(3): 268-72.

[19] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.

[20] Doaa MAR, Helmy WA. Potential Application of Immobilization Technology in Enzyme and Biomass Production (Review Article). J Appl Sci Res 2009; 5(12): 2466-76.

[21] Khan AA, Alzohairy MA. Recent Advances and Applications of Immobilized Enzyme Technologies: A Review. Res J Biol Sci 2010; 5(8): 565-75.

[22] Katchalski-Katzir E. Immobilized enzymes--learning from past successes and failures. Trends Biotechnol 1993; 11(11): 471-8.

[23] Kanugula AK, Repalle ER, Pandey JP, Sripad G, Mitra CK, Dubey DK, Siddavattam D. Immobilization of organophosphate hydrolase on biocompatible gelatin pads and its use in removal of organophosphate compounds and nerve agents. Indian J Biochem Biophys 2011; 48(1): 29-34.

[24] Efremenko EN, Lyagin IV, Plieva FM, Galaev IY, Mattiasson B. Dried-reswollen immobilized biocatalysts for detoxification of organophosphorous compounds in the flow systems. Appl Biochem Biotechnol 2009; 159(1): 251-60.

[25] Elnashar MMM, Yassin MA. Covalent immobilization of β-galactosidase on carrageenan coated with chitosan. J Appl Polym Sci 2009; 114: 17-24.

[26] Tavassoli S, Hinc K, Iwanicki A, Obuchowski M, Ahmadian G. Investigation of spore coat display of Bacillus subtilis β-galactosidase for developing of whole cell biocatalyst. Arch Microbiol 2013; 195(3): 197-202.

[27] Hinc K, Ghandili S, Karbalaee G, Shali A, Noghabi KA, Ricca E, Ahmadian G. Efficient binding of nickel ions to recombinant Bacillus subtilis spores. Res Microbiol 2010; 161(9): 757-64.

[28] Knecht LD, Pasini P, Daunert S. Bacterial spores as platforms for bioanalytical and biomedical applications. Anal Bioanal Chem 2011; 400(4): 977-89.

[29] Shao X, Ni H, Lu T, Jiang M, Li H, Huang X, Li L. An improved system for the surface immobilisation of proteins on Bacillus thuringiensis vegetative cells and spores through a new spore cortex-lytic enzyme anchor. N Biotechnol 2012; 29(3): 302-10.

[30] Wang N, Chang C, Yao Q, Li G, Qin L, Chen L, Chen K. Display of Bombyx mori alcohol dehydrogenases on the Bacillus subtilis spore surface to enhance enzymatic activity under adverse conditions. PLoS One 2011; 6(6): e21454.

[31] Brena B, Gonzalez-Pombo P, Batista-Viera F. Immobilization of enzymes: a literature survey, Methods Mol Biol 2013; 1051: 15-31.

[32] Elnashar MMM. Review Article: Immobilized Molecules Using Biomaterials and Nanobiotechnology. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology (JBNB) 2010; 1: 61-77.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]