

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

Soudeh Khanamani Falahati-Pour<sup>1</sup>, Abbas Sahebghadam Lotfi<sup>2\*</sup>,  
Gholamreza Ahmadian<sup>3</sup>, Amin Baghizadeh<sup>4</sup>

- 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

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

سوده خانامانی فلاحتی پور<sup>۱</sup>، عباس صاحبقدم لطفی<sup>۲\*</sup>، غلامرضا احمدیان<sup>۳</sup>، امین باقی زاده<sup>۴</sup>

- 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

پذیرش مقاله: ۹۳/۰۹/۲۶

دریافت مقاله: ۹۳/۰۵/۲۶

## چکیده

**هدف:** ترکیبات ارگانوفسفره به وفور در آفت‌کش‌ها و عوامل عصبی شیمیایی استفاده شده‌است. آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز یک پروتئین همودایمر 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 به واسطه 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 کدکننده آنزیم نو ترکیب ارگانوفسفر هیدرولاز در ناقل بیانی (+) pET-26b کلون شد و در میزبان اشرشیاکلی BL21 (DE3) pLysS (E. coli) بیان و به داخل محیط کشت باکتری ترشح شد. سپس آنزیم خالص سازی 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 ۴۲ تا ۴۵ 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 کارایی 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

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.

ترکیبات ارگانوفسفره (Organophosphorus) گروه وسیعی از مواد شیمیایی هستند که جزو سموم اعصاب بوده و در آفت کش‌های کشاورزی یا عوامل جنگی شیمیایی استفاده

## تثبیت آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز بر روی سطح اسپور باکتری باسیلوس سوبتیلیس

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 دوستان محیط زیست با ایراداتی مواجه بوده است [۱۲]. برای رفع این مشکل در چند سال اخیر سعی شده تا از اسپور به عنوان یک حامل مناسب، ارزان قیمت و سازگار با محیط زیست برای تثبیت 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 [۱۴]. اما مطالعه‌ای برای اتصال آنزیم OPH به سطح اسپور باکتری باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*) به صورت غیر ژنتیکی صورت نگرفته است. در این مطالعه به هدف تولید آنزیم OPH با کارایی 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. به نظر می‌رسد آنزیم OPH تثبیت شده روی سطح اسپور باکتری باسیلوس

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 به طور قابل ملاحظه‌ای به وسیله 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 پلاسמידهای غیر مشابه که از دو نژاد باکتریایی مختلف سودوموناس دیمینوتا (*Pseudomonas diminuta* MG) و فلاوباکتریوم (*Flavobacterium* sp ATCC27551)، به دست آمده است [۴، ۵]. OPH یک آنزیم هومو دایمر با وزن مولکولی ۷۲ کیلو دالتون و شامل دو زیر واحد یکسان حاوی ۳۳۶ اسید آمینه است [۶]. این آنزیم دارای دومین آب گریز و قادر به هیدرولیز تعداد وسیعی از حشره‌کش‌های ارگانوفسفره نظیر پاراکسون (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*) نو ترکیب که OPH را به صورت داخل سلولی بیان می‌کند استفاده می‌شد اما این روش دارای معایبی از جمله قیمت بالای تولید آنزیم خالص و محدودیت انتشار و عبور سوپسترا 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

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 *XhoI* و *NdeI* قرار داده شد. از باکتری اشریشیا کلی سویه DH5 $\alpha$  به منظور کلون پلاسمید نو ترکیب PUC57 استفاده شد. سپس ژن *opd* در پلاسمید بیانی pET-26b(+) در همان جایگاه‌های برشی تحت کنترل پرموتور 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 هیستیدین (۶ 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) و وسترن بلات (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 به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از محیط LB مایع با ۱۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه تلقیح و به مدت ۵ الی ۶ 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 به مدت ۲۴ 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

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 داروسازی و ... نیز بهره برد.

### مواد و روش‌ها

در تمامی دست‌ورزی‌های DNA از سوش‌های DH5 $\alpha$  و BL21 (DE3) PlyS باکتری اشریشیا کلی استفاده شد. آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (Ampicillin)، کلرامفنیکل (Chloramphenicol) و سویسترای ارگانوفسفره پاراآکسون از شرکت Sigma (آمریکا) و آنزیم‌های محدود کننده *NdeI* و *XhoI* 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 (Tryptone) 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) (۰/۸ گرم Nutrient broth، ۱ میلی‌لیتر KCl ۱۰ درصد و ۱ میلی‌لیتر  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ۱/۲ درصد، ۲۵۰ میکرولیتر  $MnCl_2$  (۰/۰۱ مولار)، ۲۵۰ میکرولیتر  $Ca(NO_3)_2$  (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) PlyS

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 OptimumGene™ codon optimization tool، *E. coli* Gene Script's Rare و Codon Usage Analyzer 2.1

## تثبیت آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز بر روی سطح اسپور باکتری باسیلوس سوبتیلیس

به مدت ۱ تا ۶۰ روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد، سنجش شد. میزان فعالیت دو فرم آنزیمی در روز اول ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و باقی مانده فعالیت در روزهای بعدی به صورت درصد فعالیت باقی مانده آنزیمی نسبت به روز اول محاسبه شد. کلیه آزمایش‌های این مطالعه به صورت ۳ آزمون مستقل با ۳ تکرار انجام شد.

### سنجش فعالیت آنزیمی

به منظور سنجش فعالیت کلی (Total Activity) آنزیم OPH آزاد و متصل به اسپور، در یک واکنش آنزیمی از ۱۵ میکرولیتر سوبسترای پاراکسون ۴۰ میلی مولار، ۵۸۵ میکرولیتر بافر تریس ۵۰ میلی مولار با pH برابر ۷/۴، ۱/۵ میکرولیتر کلرید کبالت ۱۰۰ میلی مولار و ۱۵۰ میکرولیتر محلول آنزیمی یا آنزیم متصل به اسپور استفاده شد. واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شد. محصول واکنش فوق پارانیتروفنول است که میزان تولید آن با دستگاه اسپکتوفتومتر ۲۱۰۰ (UNICO، چین) در طول موج ۴۱۰ 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 سانتی گراد در مدت زمان یک دقیقه آزاد کند [۱۸] که از قانون بیر - لامبرت (Beer-Lambert) و بر طبق معادله زیر محاسبه شد.

$$A = \epsilon C L$$

A: جذب نوری

ε: ضریب خاموشی پارانیتروفنول برابر ۱۷۱۰۰ لیتر/مول بر سانتی متر

C: غلظت بر حسب میکرومول بر دقیقه

L: طول مسیر تابش که برابر با عدد ۱ است

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

آنزیم‌ها، با قرار دادن اسپورها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد، اسپورها، سه مرتبه با آب دیونیزه سرد شسته و در ۱ میلی لیتر آب دیونیزه سرد حل و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند [۱۶، ۱۷].

## اتصال آنزیم OPH به سطح اسپور باکتری

### باسیلوس سوبتیلیس

تعداد  $1 \times 10^{11}$  اسپور خالص شده باکتری باسیلوس سوبتیلیس که شمارش آن‌ها با لام نئوبار انجام شده بود به مدت ۲ ساعت در بافر سیترات سدیم با pH های ۴، ۵، ۷ و ۱۰ در دمای اتاق روی یک شیکر (Shaker) در دور آهسته قرار گرفت. سپس اسپورها در  $10000 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و بافر سیترات سدیم حذف شد و مقدار ۳۰۰ میکرولیتر آنزیم OPH با غلظت ۳۰۰ واحد آنزیمی بر میلی لیتر روی اسپورها ریخته و به مدت دو ساعت در دمای اتاق روی یک شیکر در دور آهسته قرار داده شد. مخلوط اسپور و آنزیم به مدت ۱۰ دقیقه در  $10000 \times g$  سانتریفوژ و فعالیت آنزیمی محلول رویی و اسپور به صورت جداگانه به منظور 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)  $\times 100$

به منظور بررسی میزان ظرفیت اسپور برای جذب آنزیم OPH واکنش تثبیت آنزیم به سطح اسپور با غلظت‌های مختلف آنزیم از ۱۰ تا ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر روی مقدار ثابتی از اسپور ( $1 \times 10^{11}$ ) 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

## 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 برجسب 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، ۴، ۵، ۷، ۱۰، ۱۱ و ۱۳) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت 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 به مدت ۱۰ دقیقه در دماهای (۴، ۲۵، ۳۷، ۵۵، ۶۵، ۷۵، ۹۰ درجه سانتی‌گراد) انجام و فعالیت آنزیمی محاسبه شد. میزان فعالیت آنزیمی فرم آزاد و متصل به اسپور با استفاده از ضربیب خاموشی پارانیتروفنول و به ترتیب بر حسب واحد آنزیمی/میلی‌لیتر/دقیقه (U/ml/min) و واحد آنزیمی/۱۰<sup>۱۰</sup> اسپور/دقیقه (U/10<sup>10</sup> 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 به مدت ۶۰ دقیقه در pHهای (۳، ۴، ۵، ۷، ۱۰، ۱۱ و ۱۳) بافر تریس و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس فعالیت آنزیمی باقی مانده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد محاسبه شد.

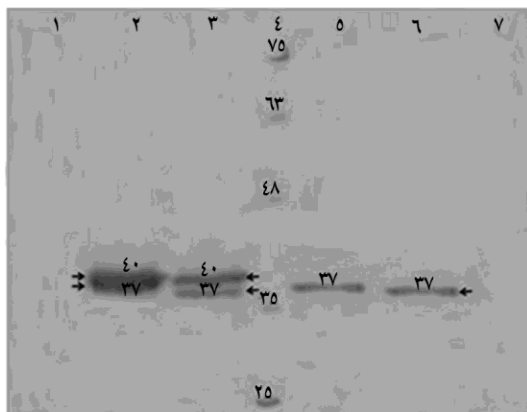
برای بررسی میزان پایداری آنزیم آزاد و متصل به اسپور نسبت به دماهای مختلف، دو فرم آنزیم به مدت ۱ ساعت در دماهای (۴، ۲۵، ۳۷، ۵۵، ۶۵، ۷۵، ۹۰ درجه سانتی‌گراد) نگهداری و سپس درصد فعالیت آنزیمی باقی مانده در بافر تریس با pH برابر ۸/۸ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد محاسبه شد.

## نتایج

ژن *opd* به طور 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 (-D-1-β) 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 اسیدآمینو ابتدایی آنزیم OPH که مربوط به پپتید نشانه (Signal Peptide) آنزیم است به طور 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 ۴۰ و ۳۷ کیلودالتونی مشاهده شد که به ترتیب 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)

## تثبیت آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز بر روی سطح اسپور باکتری باسیلوس سوبتیلیس

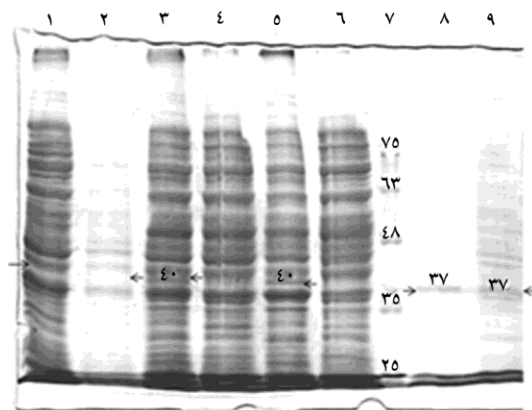
نتایج این آزمایش نیز بیان این آنزیم را در سیتوپلاسم و همچنین ترشح آن را به فضای خارج سلولی باکتری تأیید نمود (شکل ۲).



شکل ۲ نتایج وسترن بلات 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) رسوب باکتری که آنزیم OPH در سیتوپلاسم آن بیان شده است در ۲۴ ساعت بعد از القا با IPTG، (ستون ۳) رسوب باکتری که آنزیم OPH در سیتوپلاسم آن بیان شده است در ۷ ساعت بعد از القا با IPTG، (ستون ۴) استاندارد وزن مولکولی بر حسب کیلودالتون، (ستون ۵) محیط کشت باکتری حاوی آنزیم OPH ترشح شده به داخل آن در ۲۴ ساعت بعد از القا با IPTG، (ستون ۶) آنزیم OPH خالص شده از محیط کشت باکتری، (ستون ۷) رسوب باکتری اشریشیاکلی دارای پلاسمید (+) pET-26b بدون قطعه مربوط به ژن *opd* در ۷ ساعت بعد از القا با IPTG (کنترل منفی)

بودند به طور جداگانه از نظر میزان فعالیت آنزیم OPH ارزیابی شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که در بین pHهای مورد مطالعه، در pH حدود ۵ که زیر pH ایزوالکتریک آنزیم OPH (۷/۷) است، بیشترین فعالیت آنزیمی، تقریباً حدود ۴۲ درصد، در ارتباط با اسپورها دیده شد. از آنجا که سطح اسپور دارای بار منفی است و عمده این بار منفی به سبب وجود گروه کربوکسیل قابل یونیزه شدن روی قشر (Cortex) و پوشش سطحی اسپور (Coat) است و از طرف دیگر در محیطهای آبدار، در pH پایین تر از pH ایزوالکتریک، آنزیم OPH به شدت پروتونه و دارای بار مثبت است، در نتیجه

conjugated with HRP) که علیه دنباله پلی هیستیدینی انتهایی C تریمینال آنزیم OPH است و به آنزیم پراکسیداز ترب کوهی (Horseradish Peroxidase) متصل است، انجام شد و

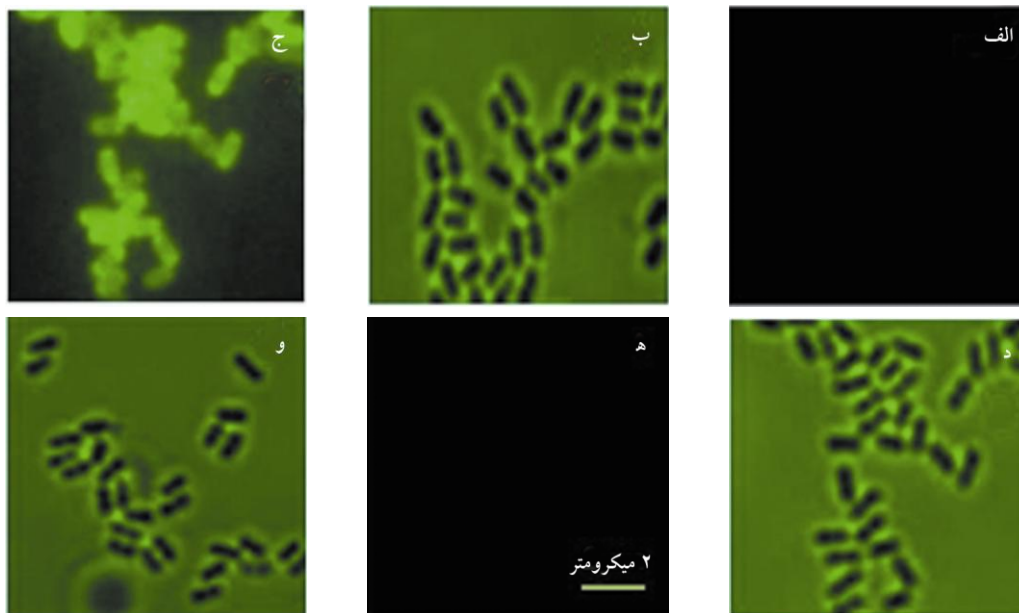


شکل ۱ نتایج SDS-PAGE و آشکارسازی آنزیم نوترکیب OPH: (ستون ۱) رسوب باکتری اشریشیاکلی دارای پلاسمید (+) pET-26b و دارای قطعه مربوط به ژن *opd* در زمان قبل از القا با IPTG (عدم بیان آنزیم)، (ستون ۲) محیط کشت باکتری در زمان قبل از القا با IPTG (عدم بیان آنزیم)، (ستون ۳) رسوب باکتری که آنزیم OPH در سیتوپلاسم آن بیان شده است در ۷ ساعت بعد از القا با IPTG، (ستون ۴) رسوب باکتری اشریشیاکلی دارای پلاسمید (+) pET-26b بدون قطعه مربوط به ژن *opd* در ۷ ساعت بعد از القا با IPTG (کنترل منفی)، (ستون ۵) رسوب باکتری که آنزیم OPH در سیتوپلاسم آن بیان شده است در ۲۴ ساعت بعد از القا با IPTG، (ستون ۶) رسوب باکتری اشریشیاکلی دارای پلاسمید (+) pET-26b بدون قطعه مربوط به ژن *opd* در ۲۴ 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 ۲۴ ساعت بعد از القا با IPTG

اسپورهای باکتری باسیلوس سوبتیلیس سویه *Trpc2* در محیط کشت DSM تولید و بعد از خالص سازی با لام نئوبار شمارش شدند. تعداد اسپورها در یک میلی لیتر تقریباً حدود  $5 \times 10^{10}$  بود که برای تثبیت به روش جذب سطحی از  $300$  واحد بر میلی لیتر آنزیم OPH و  $1 \times 10^{10}$  اسپور استفاده شد. واکنش جذب سطحی آنزیم OPH روی اسپور در بافر سیترات با pHهای ۴، ۵، ۷، و ۱۰ انجام شد و بعد از اتمام مرحله انکوباسیون، سوسپانسیون اسپور و آنزیم سانتیفرژ شد و محلول رویی که حاوی مولکولهای آنزیمی است که به اسپور اتصال پیدا نکرده است و همچنین اسپورهایی که رسوب کرده

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 ۴ الف). کنترل منفی دوم، اسپورهای بدون آنزیم OPH بودند که تنها با آنتی‌بادی ثانویه تیمار شدند (شکل ۴ 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 ه و شکل ۴ ج).

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 ۴ 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 ۴۲ تا ۴۵ درصد بیشتر از نمونه‌های کنترل منفی است (شکل ۴ د) که با نتایج به‌دست



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. (ه) 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 (ه) 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

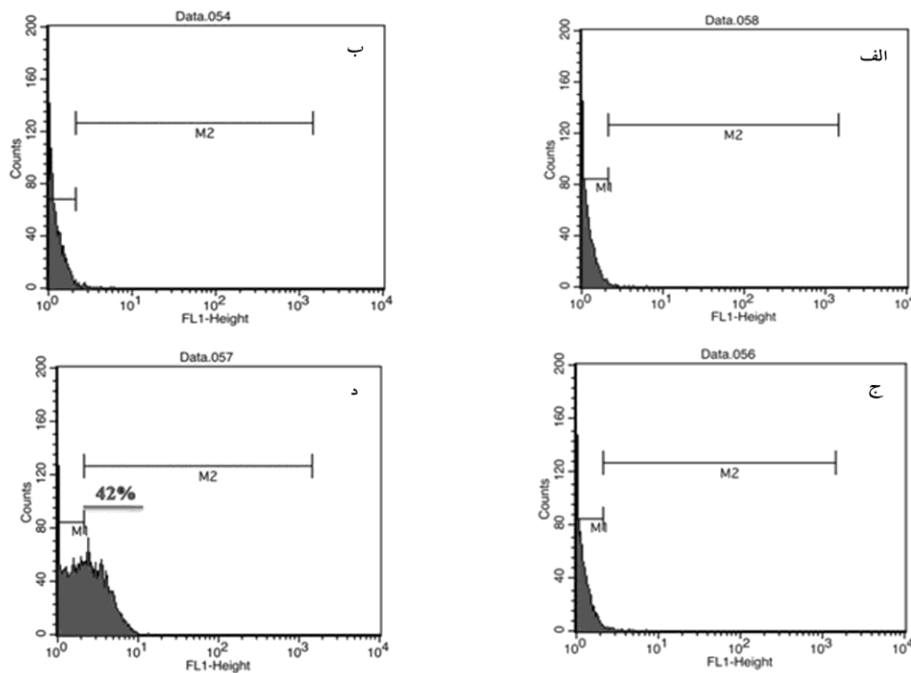
۳ تا ۱۳ مطالعه شد. نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم آزاد و متصل به اسپور در pH حدود ۱۱ بود و با اتصال آنزیم به سطح اسپور در pH بهینه برای فعالیت آنزیم تغییری ایجاد



## تثبیت آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز بر روی سطح اسپور باکتری سوبتیلیس

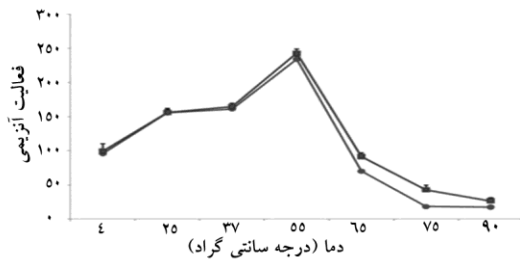
فرم‌های آنزیمی تیمار شده در pHهای مختلف نسبت به فرم‌های آنزیمی مشابه بدون تیمار محاسبه شد. نتایج نشان داده که فرم آزاد آنزیم بعد از تیمار یک ساعته در pHهای ۳، ۴ و ۵ به ترتیب ۴۲/۳، ۴۸/۹ و ۵۱/۲ درصد از فعالیت خود را در مقایسه با فرم آزاد آنزیم بدون تیمار در pHهای اشاره شده حفظ نمود؛ در حالی که آنزیم جذب شده روی سطح اسپور در این pHها به ترتیب ۶۶، ۷۱/۹ و ۷۴/۶ درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ نمود (شکل ۶). در pHهای قلیایی ۱۰، ۱۱ و ۱۳ فرم آزاد آنزیم ۳۳/۱، ۵۱/۹ و ۴۸/۹ درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ نمود در حالی که آنزیم جذب شده روی اسپور در این pHها به ترتیب ۸۰/۲، ۶۱/۴ و ۷۰/۴ 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 ۶).

نشده است (شکل ۵). سنجش فعالیت آنزیمی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت 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 به تدریج با افزایش pH فعالیت آنزیمی نیز به صورت صعودی افزایش می‌یابد. به عبارت 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 به مدت یک ساعت در pHهای مختلف و در دمای ۴ 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

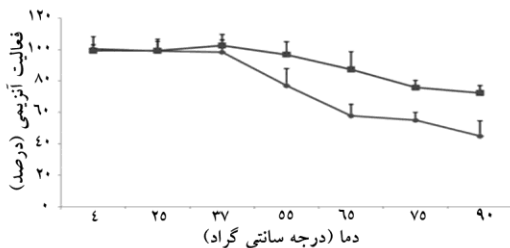


شکل ۴ تأیید اتصال آنزیم به سطح اسپور با فلوسیتومتری؛ (الف) اسپورهای بدون آنزیم OPH که با هر دو آنتی‌بادی اولیه (آنتی‌بادی بر علیه دنباله پلی هیستیدین) و آنتی‌بادی ثانویه دارای FITC رنگ‌آمیزی شدند (کنترل منفی). (ب) اسپورهای بدون آنزیم OPH که تنها با آنتی‌بادی ثانویه رنگ‌آمیزی شدند (کنترل منفی). (ج) اسپورهایی 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).

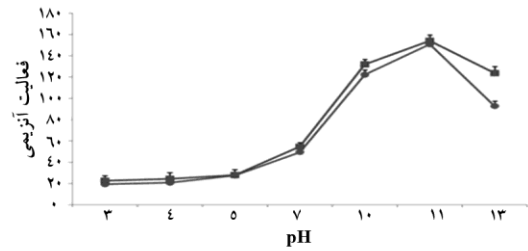
مذکور قرار گرفت و سپس باقی مانده فعالیت آنزیمی آن‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه اندازه‌گیری شد و سپس درصد فعالیت آنزیمی باقی مانده دو فرم‌های تیمار شده آنزیم در مقایسه با فرم‌های آنزیم بدون تیمار دمایی محاسبه شد (شکل ۸). نتایج نشان داد که هر دو فرم آنزیمی که مدت یک ساعت در دماهای ۴ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته بودند، تقریباً ۱۰۰ درصد فعالیت خود را حفظ نمودند اما آنزیم آزاد در دماهای ۶۵، ۷۵ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۵۸، ۵۵/۲ و ۴۵/۱ درصد از فعالیت خود را حفظ نمود در حالی که فرم آنزیمی جذب شده روی سطح اسپور در این دماها به ترتیب ۸۷/۴، ۷۵/۸ و ۷۲/۴ 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.



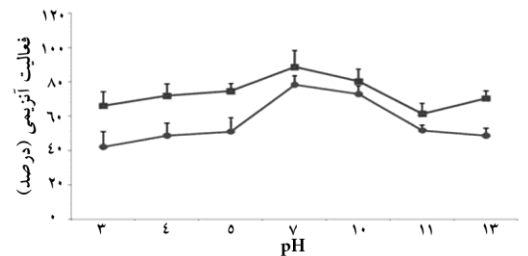
شکل ۷ بررسی دمای بهینه برای فعالیت آنزیم OPH در دو فرم آزاد (●) بر حسب (واحد آنزیمی/میلی‌لیتر/دقیقه) و جذب شده روی اسپور (■) بر حسب (واحد آنزیمی/۱۰<sup>۱۰</sup> اسپور/دقیقه)



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



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/۱۰<sup>۱۰</sup> اسپور/دقیقه)

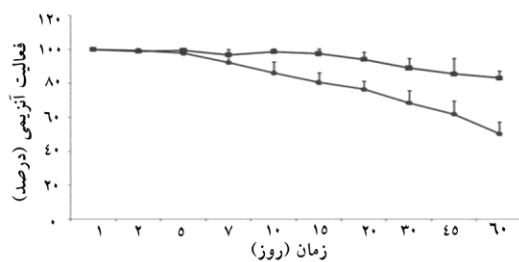


شکل ۶ سنجش فعالیت آنزیمی (درصد) دو فرم آزاد (●) و جذب شده روی سطح اسپور (■) آنزیم OPH به منظور بررسی پایداری آن‌ها در pH های مختلف

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

الگوی دمایی فعالیت آنزیم آزاد و متصل به اسپور در طیف ۴ 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 ۶۵ تا ۹۰ درجه، فعالیت آنزیمی با شیب تندی کاهش یافت. بنابراین با اتصال آنزیم به سطح اسپور هیچ گونه 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 ۴ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. بدین منظور هر دو فرم آنزیمی به مدت یک ساعت در دماهای

نگهداری آن افزایش یافت. به منظور سنجش و مقایسه پایداری آنزیم در فرم‌های محلول و تثبیت شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، فعالیت هر دو فرم آنزیمی در فاصله زمانی ۱ تا ۶۰ روز سنجش و مقایسه شد. همان‌طور که در شکل ۱۰ نشان داده شده است آنزیم محلول بعد از این که به مدت ۱۵ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، حدود ۸۰ درصد 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 ۶۰ روز، فرم محلول آنزیم 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 ۴ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با فرم محلول آنزیم افزایش یافت.



شکل ۱۰ سنجش فعالیت آنزیمی (درصد) دو فرم آزاد (●) و جذب شده روی سطح اسپور (■) آنزیم OPH به منظور بررسی پایداری آن‌ها طی ۱ تا ۶۰ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

## بررسی ظرفیت جذب آنزیم OPH روی سطح

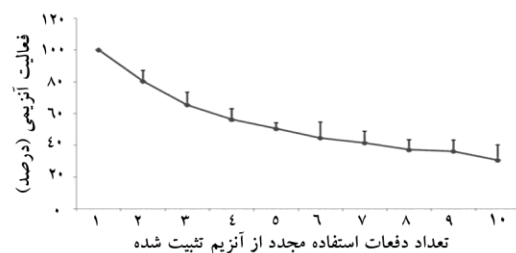
### اسپورهای باکتری باسیلوس سوبتیلیس

به منظور بررسی میزان ظرفیت اسپور برای جذب آنزیم OPH، واکنش تثبیت آنزیم به اسپور با مقادیر مختلف از آنزیم (۱۰ تا ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) روی یک مقدار مشخصی از اسپور ( $1 \times 10^{11}$ ) انجام گرفت. نتایج نشان داد که در ابتدا با افزایش غلظت آنزیم مورد استفاده در واکنش تثبیت، درصد اتصال آنزیم به سطح اسپور (بازده تثبیت) به صورت خطی افزایش یافت تا در غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنزیم، به

## بررسی قابلیت استفاده مجدد از آنزیم 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 تغییر در محلول واکنش باقی می‌ماند، در صورتی که امکان بازیافت آنزیم از محلول واکنش وجود داشته باشد می‌توان از آن برای انجام واکنش دیگری استفاده نمود. آنزیم OPH در فرم محلول، بعد از انجام واکنش در محلول واکنش باقی می‌ماند و جداسازی آن از محلول واکنش با روش‌های ساده امکان پذیر نیست؛ اما با تثبیت آنزیم روی سطح اسپور باکتری باسیلوس سوبتیلیس می‌توان بعد از انجام واکنش، مخلوط واکنش را سانتریفوژ نمود و اسپورها و به تبع آنزیم متصل شده روی آن‌ها را به راحتی بازیافت و در واکنش‌های بعدی استفاده کرد. همان‌طور که در شکل ۹ نشان داده شده است، آنزیم OPH تثبیت شده روی سطح اسپور به روش جذب سطحی، ۵۰/۵ درصد از فعالیت اولیه خود را ضمن استفاده در ۵ واکنش آنزیمی مختلف حفظ نمود. علت 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

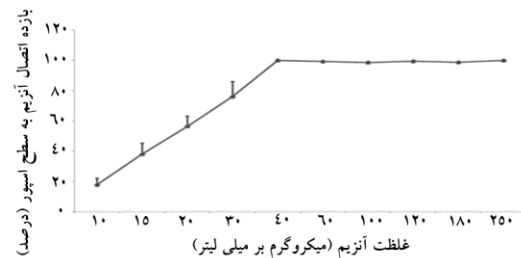
## بررسی قابلیت نگهداری فرم محلول و تثبیت

### شده آنزیم OPH

با تثبیت آنزیم بر سطح اسپور، پایداری آنزیم و قابلیت

خود می‌تواند به‌طور مداوم و مکرر استفاده شود [۲۲]. 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 [۲۳]. از پلیمرهای سنتزی پوشیده از لیگاندهای فلزی دو ظرفیتی [۲۴]، 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 [۲۵]. 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 [۲۵]. 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 کارایی بالا برای کاربرد در بیوتکنولوژی هستند [۲۶]. از اسپورهای مهندسی شده به‌عنوان تجزیه‌گرهای زیستی یا ابزارهایی در زیست‌پالایی نیز استفاده شده است [۲۷، ۲۸]. 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 [۱۴]. 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 دوستاناران محیط زیست با استقبال زیادی مواجه نشده است [۲۹، ۳۰]. اخیراً در یک تکنولوژی جدید، از اسپور باکتری‌ها برای تثبیت آنزیم‌ها به روش غیر ژنتیکی

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 ۴۰ میکروگرم آنزیم OPH برای  $1 \times 10^7$  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 ۱۱).



شکل ۱۱ 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 [۱۰]. استفاده از آنزیم خالص OPH در صنعت به‌واسطه چندین عامل محدود شده است. عمده‌ترین محدودیت آنزیم، گران‌قیمت بودن و ناپایداری آن است. همچنین بازیافت آنزیم از سیال خروجی راکتورها در انتهای واکنش، مشکل و هزینه‌بر است و در نتیجه آنزیم به‌صورت یک بار مصرف استفاده می‌شود [۲۰]. در چند دهه اخیر تحقیقات گسترده‌ای انجام شده است تا از این آنزیم به‌صورت مقرون به‌صرفه 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 [۲۱]. در این روش آنزیم از نظر فیزیکی در یک ناحیه مشخصی از فضا محدود شده، با حفظ فعالیت کاتالیتیکی

## تثبیت آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز بر روی سطح اسپور باکتری باسیلوس سوبتیلیس

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 کارایی 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.

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 اشیریشیا 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 شستشویهای 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

## 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.

- [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, McCrae 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  $\beta$ -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

- Y. Isolation, purification and characterization of a new organophosphorus 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  $\beta$ -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*  $\beta$ -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.