

Isolation, Purification, and Determination of Biochemical Properties of Catechol 1, 2 Dioxygenase from Microbial Flora in Petroleum-Contaminated Soils

Rabbani F.¹ MSc, Jafarian V.^{*1} PhD, Asoodeh A.² PhD

¹ Biology Department, Science Faculty, University of Zanjan, Zanjan, Iran

² Chemistry Department, Science Faculty, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Abstract

The present study was accomplished to isolate, purify, and biochemically characterize the phenol-degrading enzyme from the bacteria existed in petroleum-contaminated soils. The catechol 1, 2 dioxygenase was extracted from *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 and purified using Q-Sepharose ion exchange chromatography column. The enzyme activity was examined under different pHs (ranged from 4 to 9), at different temperatures (ranged from 20 to 70°C), in the presence of various metal ions chloride salts (Ca²⁺, K⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, and Na⁺), and with various solvents (ethanol, ethyl acetate, petroleum ether, acetonitrile, N-amyl alcohol, N-hexane, and toluene). In addition, the enzyme activity was investigated using different substrates such as phenol, catechol, benzoic acid, pyrogallol, and α -naphthol. SDS-PAGE analysis indicated that there was a single-band protein with a molecular weight of approximately 40kDa. The catechol 1, 2 dioxygenase had a maximum activity at 30°C and pH= 8.5. Moreover, the catalytic activity of the enzyme was increased in the presence of cobalt chloride and zinc chloride ions (5mM) as well as organic solvent of amyl alcohol, while it was decreased or inhibited in the presence of the other metal ions and organic solvents used. Among different substrates, catechol was the most favorable for the enzyme, so that, the V_{max} and K_m were 8.959U/mg and 4.992 μ m/ml for the substrate, respectively.

Keywords

Petroleum Pollutant [Not in MeSH];

Phenol Degradation [Not in MeSH];

Protein Purification [Not in MeSH];

Catechol 1, 2 Dioxygenase

[<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=Catechol+1%2C+2+Dioxygenase>]

*Corresponding Author

Tel: +98 (24) 33052531

Fax: +98 (24) 33052543

Post Address: Biology Department, Science Faculty, University of Zanjan, University Boulevard, Zanjan, Iran.

Postal Code: 4537138791.

v.jafarian@znu.ac.ir

Received: May 14, 2019

Accepted: April 14, 2020

ePublished: June 10, 2020

جداسازی، خالص‌سازی و تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم کتکول‌او۲دی‌اکسیژناز از فلور میکروبی خاک‌های آلوده نفتی

فائزه ربانی MSc

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

وهب جعفریان PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

احمد آسوده PhD

گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

مطالعه حاضر با هدف جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی بیوشیمیایی آنزیم تجزیه‌کننده فنول از باکتری‌های موجود در خاک‌های حاوی آلاینده‌های نفتی انجام شد. پروتئین کتکول‌او۲دی‌اکسیژناز از باکتری *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 استخراج و با استفاده از ستون کروماتوگرافی تبادل یونی Q- سفارز تخلیص شد. فعالیت آنزیم در pHهای مختلف بین ۴ تا ۹، محدوده دمایی ۲۰ تا ۷۰°C و در حضور نمک کلرید یون‌های فلزی مختلفی مانند Ca^{2+} ، K^{+} ، Mn^{2+} ، Co^{2+} ، Zn^{2+} ، Mg^{2+} و Cu^{2+} و Na^{+} و حلال‌های گوناگون شامل اتانول، اتیل‌استات، پترولیوم‌اتر، استونیتریل، ان-آمیل‌الکل، ان-هگزان و تولوئن ارزیابی شد. همچنین فعالیت این آنزیم با استفاده از سوبستراهای گوناگون مانند فنول، کتکول، بنزوئیک‌اسید، پیروگالول و آلفا-نفتول بررسی شد. آنالیز پروتئین به روش SDS-PAGE بیانگر وجود تک‌بند پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۴۰ کیلودالتون بود. آنزیم کتکول‌او۲دی‌اکسیژناز در pH= ۸/۵ و دمای ۳۰°C بیشترین فعالیت را داشت. فعالیت کاتالیتیکی آنزیم در حضور یون‌های کلرید کبالت و کلرید روی (۵ میلی‌مولار) و همچنین حلال آلی آمیل‌الکل افزایش یافت، ولی دیگر یون‌های فلزی و حلال‌های آلی به‌کاررفته باعث کاهش و یا مهار فعالیت آنزیم شدند. از میان سوبستراهای مختلف، کتکول سوبسترای بسیار مطلوب‌تری برای آنزیم بود، به طوری که V_{max} و K_m آنزیم برای این سوبسترا به ترتیب ۸/۹۵۹ واحد بر میلی‌گرم و ۴/۹۹۲ میکرومول بر میلی‌لیتر است.

کلیدواژه‌ها: آلاینده نفتی، تجزیه فنول، تخلیص پروتئین، کتکول‌او۲دی‌اکسیژناز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۲۶

*نویسنده مسئول: v.jafarian@znu.ac.ir

مقدمه

گسترش چشمگیر صنعت در چند دهه اخیر، مشکلات آلودگی محیط زیست و پساب‌های خطرناک را با خود به همراه داشته است [1]. آلودگی آب توسط ترکیبات آلی و معدنی ناشی از فرآورده‌های نفتی امروزه موجب نگرانی عمومی شده است [2]. آلودگی‌های نفتی از قبیل هیدروکربن‌های آروماتیک مانند فنول و مشتقات آن که پایدارترین و سمی‌ترین قسمت نفت را تشکیل می‌دهند، به‌ویژه در کشورهای نفت‌خیز همچون ایران به‌عنوان یک مشکل اجتناب‌ناپذیر به شمار می‌آیند [3]. امروزه فنول در بسیاری از صنایع به‌عنوان ماده خام اولیه کاربرد دارد. با این حال به‌عنوان

آلاینده‌ای مهم، توسط فاضلاب بسیاری از صنایع وارد محیط زیست می‌شود و به‌دلیل ویژگی‌های جهش‌زایی و سرطان‌زایی، سلامتی انسان‌ها و سایر موجودات را در معرض خطر جدی قرار می‌دهد [4]. از این رو، توجه و تلاش‌های بسیاری برای دستیابی به فناوری‌های پاک‌سازی و بازیابی جزیی یا کامل فنول از مناطق آلوده شده است.

در میان روش‌های گوناگون در حذف فنول، تیمار زیستی به‌دلیل بازدهی بالا و تولید محصولات نهایی بی‌ضرر و سازگار با محیط از اهمیت بالایی برخوردار است. میکروارگانیسم‌های موجود در منابع آلوده، کاتالیزورهای توانمندی برای تجزیه زیستی ترکیبات سمی به‌صورت هوازی و بی‌هوازی هستند و به‌صورت انتخابی از آنها به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند. این میکروارگانیسم‌ها از جمله منابع باارزش برای تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات آروماتیک مانند فنول و مشتقات آن به شمار می‌آیند [5، 6]. در تجزیه ترکیبات آروماتیک توسط میکروارگانیسم‌ها، کتکول نقشی اساسی دارد که به‌صورت یک ترکیب حد واسط شکل می‌گیرد و همچنین سمیت آن از فنول بیشتر و بنابراین حذف آن از آلاینده‌ها بسیار مهم است [7]. کتکول‌او۲دی‌اکسیژناز، آنزیمی کلیدی در مسیر تجزیه ترکیبات آروماتیک است. فعالیت این آنزیم به شکسته‌شدن حلقه آروماتیک کتکول و تولید سیس، سیس-موکونیک‌اسید منجر می‌شود و سمیت آن را به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد [8، 9]. بررسی‌های گوناگونی روی آنزیم کتکول‌او۲دی‌اکسیژناز انجام شده است. در پژوهشی این آنزیم از باکتری *Pseudomonas aeruginosa* با استفاده از بنزوئیک‌اسید به‌عنوان منبع کربن و انرژی خالص‌سازی شد که دارای ویژگی‌های خاص از جمله وزن مولکولی کم و فعالیت در شرایط اسیدی بود [10]. همچنین این آنزیم از باکتری تجزیه‌کننده فنول، *Rhodococcus sp.* جداسازی و فراسنجه‌های بیوشیمیایی آن مورد بررسی قرار گرفت [5]. میلار [11] به جداسازی و شناسایی آنزیم کتکول‌او۲دی‌اکسیژناز از باکتری تجزیه‌کننده فنول *Acinetobacter sp.* پرداخت. این سویه توانایی تجزیه آگرم بر لیتر فنول را داشت. در مطالعه‌ای نیز این آنزیم از سه سویه متفاوت *Rhodococcus pyridinivorans*، *Ochrobactrum intermedium* و سودوموناس YL8 خالص‌سازی شد و پس از بررسی تجزیه مواد فنولی توسط این سویه‌ها دریافتند که آنزیم‌های کتکول‌او۲دی‌اکسیژناز استخراج و خالص‌سازی شده از سویه‌های گوناگون عملکرد و کارایی گوناگونی تحت شرایط مختلف دارند [12].

بنابراین با توجه به ضرورت حذف آلاینده‌های نفتی از محیط و نیز بازیابی آنها از طریق روش‌های زیستی، مطالعه حاضر در راستای جداسازی و تخلیص آنزیم کتکول‌او۲دی‌اکسیژناز از باکتری *Aneurinibacillus migulanus* که از خاک‌های آلوده نفتی واقع در مناطقی از کرمانشاه جداسازی شده بود، انجام شد تا با مطالعه پایداری و فعالیت بیوشیمیایی این آنزیم در حضور مواد

جداسازی، خالص‌سازی و تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم کتکول ۲ و ۱ دی‌اکسیژناز از ... ۲۹
برادفورد با استفاده از آلبومن سرم گاوی به‌عنوان استاندارد تعیین
شد [14].

مطالعه ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم خالص‌شده

سنجش فعالیت آنزیم در pH های مختلف، بین ۴ تا ۹ به فاصله نیم‌واحد از یکدیگر با استفاده از سه سیستم بافری سدیم‌استات، سدیم‌فسفات و بورات در دمای ۳۰°C با سوبسترای کتکول انجام شد. همچنین برای یافتن دمای بهینه، فعالیت آنزیم در محدوده دمایی ۲۰ تا ۷۰°C با فواصل ۵°C توسط سوبسترای کتکول در ۸/۵ pH به دست آمد. به‌منظور بررسی اثر نمک‌های مختلف بر فعالیت آنزیم کتکول ۲ و ۱ دی‌اکسیژناز از نمک کلرید یون‌های فلزی مختلفی مانند K^+ ، Ca^{2+} ، Mn^{2+} ، Co^{2+} ، Zn^{2+} ، Mg^{2+} و Cu^{2+} و Na^+ در سه غلظت ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار، در دمای ۳۰°C و ۸/۵ pH و در حضور سوبسترای کتکول در مقایسه با یون آهن به‌عنوان شاهد استفاده شد. اثر حلال‌های اتانول، اتیل‌استات، پترالیوم‌تر، استونیتریل، ان-آمیل‌الکل، ان-هگزان و تولوئن با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰٪ نیز در دمای ۳۰°C و ۸/۵ pH و در حضور سوبسترای کتکول انجام شد.

برای تعیین سوبسترای مناسب به‌منظور بررسی فعالیت آنزیم مورد نظر از غلظت ۱۰ میلی‌مولار سوبستراهای فنول، کتکول، پایروگالول، بنزوئیک‌اسید و آلفا-نفتول استفاده شد. فعالیت آنزیم برای هر یک از سوبستراهای مورد نظر، در دمای ۳۰°C و ۸/۵ pH در مقایسه با نمونه شاهد (دارای سوبسترا و فاقد آنزیم) سنجیده شد.

بررسی غیرفعال‌شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر

نمونه آنزیمی خالص‌شده به همراه بافر بهینه (بورات با ۸/۵ pH) در دماهای ۲۰، ۳۰، ۴۵ و ۶۰°C با فاصله‌های زمانی صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه گرم‌گذاری (انکوبه) و سپس بلافاصله به یخ منتقل شد. نمونه‌ها پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون از یخ خارج شدند و فعالیت نسبی آنها در سه تکرار در دمای ۳۰°C اندازه‌گیری شد. این آزمایش در سه روز و سه تکرار انجام شد.

بررسی سینتیکی آنزیم کتکول ۲ و ۱ دی‌اکسیژناز

به‌منظور محاسبه K_m و V_{max} آنزیم کتکول ۲ و ۱ دی‌اکسیژناز، فعالیت آن در دما و pH بهینه در غلظت‌های صفر، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌مولار سوبسترا سنجیده شد. با استفاده از نرم‌افزار Graphpad prism 6 و با رسم مقادیر جذب‌های به‌دست‌آمده در برابر هر غلظت، نمودار میکائیلیس-منتن و با معکوس کردن داده‌های هر محور نمودار لاینویوربرگ به دست آمد و مقادیر K_m و V_{max} محاسبه شدند.

تعیین غلظت کتکول طی واکنش آنزیمی با HPLC

به‌منظور تعیین غلظت کتکول به‌عنوان سوبسترای بهینه و میزان حذف آن طی واکنش آنزیمی از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) طبق روش بریگانتی و همکاران [15] استفاده شد. به این منظور واکنش آنزیمی در زمان‌های صفر، ۴، ۸ و ۱۲ دقیقه با جوشاندن به مدت ۵ دقیقه متوقف شد و پس از سرد شدن برای تعیین غلظت سوبسترای باقیمانده مورد استفاده

مختلف شیمیایی و سوبستراهای گوناگون، گامی به سوی استفاده گسترده از این نوع آنزیم در صنعت زیست‌پالایی برداشته شود.

مواد و روش‌ها

گزینش باکتری

در این مطالعه از باکتری *Aneurinibacillus migulanus* که پیش‌تر فعالیت فنولازی آن در آزمایشگاه تحقیقاتی زیست‌شناسی دانشگاه زنجان مشخص شده بود، استفاده شد. این باکتری از خاک شیل‌های نفتی مربوط به ارتفاعات منطقه دودان (N ۳۵°۰۱۳′۲۳" و E ۴۶°۱۱′۸″) واقع در غرب استان کرمانشاه جداسازی و پس از بررسی‌های مولکولی (شناسایی توالی 16S rDNA) با عنوان *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 نامگذاری شده بود.

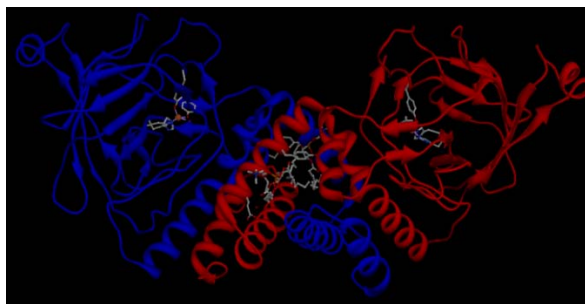
جداسازی و خالص‌سازی آنزیم

فرآیند جداسازی و تخلیص آنزیم کتکول ۲ و ۱ دی‌اکسیژناز طبق روش نداف و قوش [5] انجام شد. خالص‌سازی آنزیم پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تلقیح باکتری به محیط کشت بهینه انجام گرفت. محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ و رسوب باکتری حاصل، با افزودن ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات به حالت سوسپانسیون در آورده شد. سوسپانسیون تحت سونیکاسیون قرار گرفت. سپس سلول‌های شکسته‌شده با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ شدند و محلول رویی برای استفاده در مراحل بعدی جدا شد. کروماتوگرافی تبادل یونی با استفاده از ستون Q- سفارز طی دو مرحله و با استفاده از بافر سدیم‌فسفات ۲۰ میلی‌مولار با pH های برابر ۷/۸ و ۸/۵ انجام شد. به‌منظور تعیین وزن مولکولی آنزیم خالص‌شده از الکتروفورز ژل‌پلی‌آکریل‌آمید-سدیم‌دودوسیل‌سولفات (SDS-PAGE) استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم

تعیین فعالیت آنزیم کتکول ۲ و ۱ دی‌اکسیژناز به روش اسپکتروفتومتری با اندازه‌گیری جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر براساس تولید محصول سیس،سیس-موکونیک‌اسید انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۳۹۰ میکرولیتر محلول بافر بوریک‌اسید (۵۰ میلی‌مولار؛ pH= ۸) و ۱۶۰ میکرولیتر کتکول (۱۰ میلی‌مولار)، ۲۰۰ میکرولیتر سولفات آهن (۵۰ میلی‌مولار)، و ۲۰۰ میکرولیتر آسکوربیک‌اسید (۲۰ میلی‌مولار) بود. پس از افزودن ۵۰ میکرولیتر آنزیم (با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به مخلوط واکنش، ویال‌ها در حمام آب گرم ۳۰°C به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. در نمونه شاهد، به جای آنزیم از محلول بافر بوریک‌اسید ۵۰ میلی‌مولار استفاده شد. ضریب خاموشی محصول اکسیده‌شدن کتکول برابر ۱۶۸۰۰ بر مول بر سانتی‌متر است. یک واحد از فعالیت آنزیم برابر است با مقدار آنزیمی که بتواند امیکرومول محصول در مدت زمان ۱ دقیقه در دمای ۳۰°C تولید کند [13]. غلظت آنزیم به روش

Isolate ZNU05 نیز الیگومر و در هر مونومر یک جایگاه فعال وجود داشته باشد. این گروه از آنزیم‌ها حدوداً متشکل از ۳۰۰ باقیمانده اسید آمینه هستند و در جایگاه فعال آنها باقیمانده‌های آمینواسیدی ترئونین، پرولین و تیروزین وجود دارند، به طوری که اسید آمینه پرولین در این جایگاه بسیار حفاظت شده است. با توجه به اسیدهای آمینه جایگاه فعال آنزیم، این جایگاه قطبی است و به نظر می‌رسد سوپسترا در مسیر حرکت خود به سمت جایگاه فعال از یک کانال آب‌گریز عبور می‌کند. نتایج حاصل از مطالعات دیگر حاکی از این است که تقریباً تمام اعضای خانواده کتکول (۲) دی‌اکسیژناز هومودایمر و دارای یک کوفاکتور آهن (III) در هر مونومر هستند [15, 16]. بنا بر گزارش‌های پیشین، آنزیم کتکول (۲) دی‌اکسیژناز استخراج شده از باکتری *Pseudomonas arvilla* موردی استثنایی و حاوی دو زیرمجموعه بسیار متجانس است که می‌تواند یک هموئید یا هتروداایمر باشد. این آنزیم شبیه به شکل بومرنگ است و به همین ترتیب می‌تواند به وضوح به سه حوزه شامل دو حوزه کاتالیزوری که در هر انتهای بومرنگ ساکن هستند و یک حوزه لینکر در مرکز، تقسیم شود [17]. در مرکز حوزه لینکر، تونل آب‌گریز قرار دارد که دو فسفولیپید در هر انتهای آن متصل است [18].



شکل ۱) مدل سه‌بعدی ساختار آنزیم کتکول (۲) دی‌اکسیژناز جداسازی و تخلیص شده از باکتری *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 رسم شده توسط نرم‌افزار کایمرا

SDS-PAGE و تعیین غلظت پروتئین

پس از بیان و تخلیص پروتئین کتکول (۲) دی‌اکسیژناز با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی Q- سفارز، الکتروفورز به روش SDS-PAGE حاکی از وجود تک‌باند پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۴۰ کیلوالتون بود (شکل ۲).

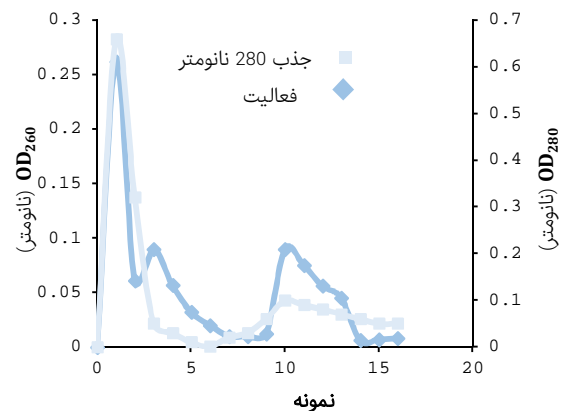


شکل ۲) ژل الکتروفورز آنزیم کتکول (۲) دی‌اکسیژناز؛ الف) عصاره خام؛ ب) نمونه ۱ (ستون در مرحله اول؛ پ) آنزیم خالص؛ ت) مارکر وزن مولکولی (کیلوالتون)

قرار گرفت. با رسم منحنی استاندارد کتکول در غلظت‌های ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۱۲، ۰/۳۱۲ و ۰/۱۵۶ میلی‌مولار بر حسب سطح زیر پیک نمودار در هر غلظت و با استفاده از معادله حاصل از آن با توجه به غلظت سوپسترای باقیمانده در نمونه و مقدار کتکول موجود در ابتدای واکنش، میزان حذف آن محاسبه شد.

یافته‌ها و بحث

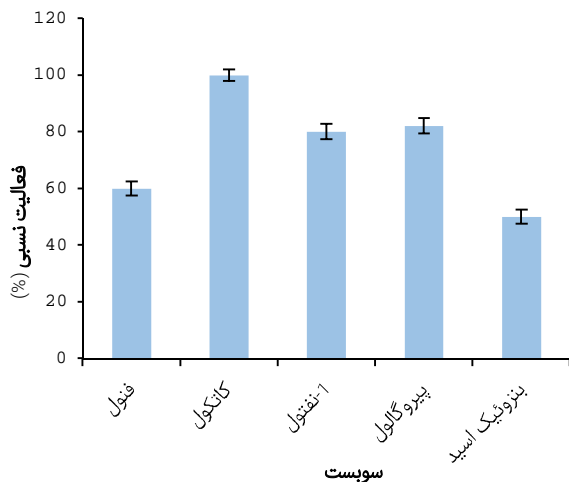
استخراج و تخلیص پروتئین کتکول (۲) دی‌اکسیژناز از باکتری *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 پس از استخراج آنزیم کتکول (۲) دی‌اکسیژناز از باکتری *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 و دیالیز نمونه، تخلیص پروتئین با استفاده از ستون Q- سفارز (pH= ۷/۸) و با عبور بافر فسفات در همین pH و همچنین در غلظت‌های نمکی ۰/۱ تا ۰/۵ مولار سدیم کلرید انجام و تعداد ۱۶ نمونه از ستون جمع‌آوری شد. میزان نسبی پروتئین و فعالیت آنزیمی در هر نمونه اندازه‌گیری شد. با توجه به فعالیت آنزیمی و حداکثر میزان نسبی پروتئین نمونه اول (نمونه متصل نشده به ستون) نسبت به سایر نمونه‌ها (غلظت‌های نمکی)، این نمونه دوباره پس از دیالیز در pH= ۸/۵ در ستون Q- سفارز بارگذاری و کروماتوگرافی انجام شد. فعالیت و میزان نسبی پروتئین در نمونه اول بیشترین میزان فعالیت آنزیمی بود (نمودار ۱). غلظت پروتئین خروجی با رسم منحنی استاندارد برادفورد در حضور آلبومین سرم گاوی مورد بررسی قرار گرفت و آنزیم پس از غرق شدن در نیتروژن مایع با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک شد.



نمودار ۱) تخلیص آنزیم در pH= ۸/۵

برای درک بهتر نحوه عمل آنزیم استخراج شده، مدل سه‌بعدی ساختار آنزیم کتکول (۲) دی‌اکسیژناز توسط نرم‌افزار کایمرا ۱-۴ با استفاده از پایگاه داده پروتئین (PDB) براساس مدل 1MPY و شباهت عملکرد (در مصرف سوپسترای کتکول) رسم شد (شکل ۱). با توجه به بررسی الگوی ساختاری ۲۱ نوع آنزیم کتکول (۲) دی‌اکسیژناز، به نظر می‌رسد آنزیم کتکول (۲) دی‌اکسیژناز استخراج شده از باکتری *Aneurinibacillus migulanus*

حضور سوبسترای کتکول مشاهده شد (نمودار ۳). کتکول سوبسترای اصلی این آنزیم است و سوبسترهای به‌کاررفته دیگر در مسیر تجزیه خود ابتدا به کتکول تبدیل می‌شوند و به نظر می‌رسد سرعت آنزیم در تجزیه سوبسترای کتکول نسبت به سوبسترهای دیگر بیشتر است. با توجه به نتایج حاصل از شکست حلقه آروماتیک کتکول، این آنزیم می‌تواند تثبیت و در زیست‌پالایی فاضلاب‌های آلوده به کتکول استفاده شود.



نمودار ۳ اثر سوبسترهای مختلف بر فعالیت آنزیم کتکول و ۲-دی‌اکسیژناز

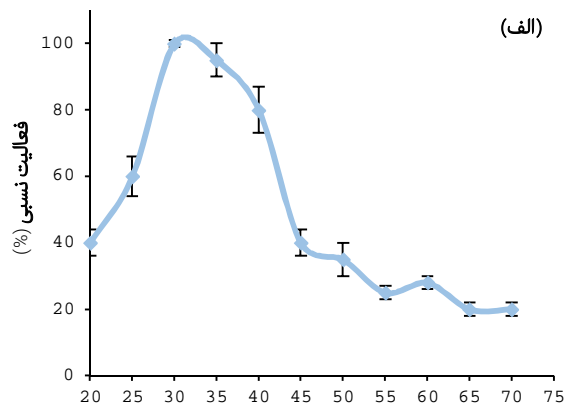
در مطالعه ماترا و همکاران [9]، کتکول و ۲-دی‌اکسیژناز جداسازی شده از باکتری *R. opacus*، فعالیت بالایی نسبت به کتکول و متیل‌کتکول نشان داد. همچنین در میان تعدادی از مشتقات کتکول مورد آزمایش در مطالعه وانگ و همکاران [10]، بالاترین فعالیت آنزیم کتکول و ۲-دی‌اکسیژناز حاصل از باکتری *P. aeruginosa* در حضور سوبسترای پایروگالول بود.

اثر برخی حلال‌های آلی و یون‌های مختلف فلزی بر فعالیت آنزیم
حلال‌های آلی بر میان‌کنش‌های الکتروستاتیک پروتئین‌ها اثر می‌گذارند، چراکه ثابت دی‌الکتریک آنها با آب متفاوت است. به‌طور کلی کاهش خاصیت قطبی حلال و کاهش ثابت دی‌الکتریک سبب افزایش دافعه الکتروستاتیک و منجر به باز شدن ساختار پروتئین‌ها می‌شود [19].

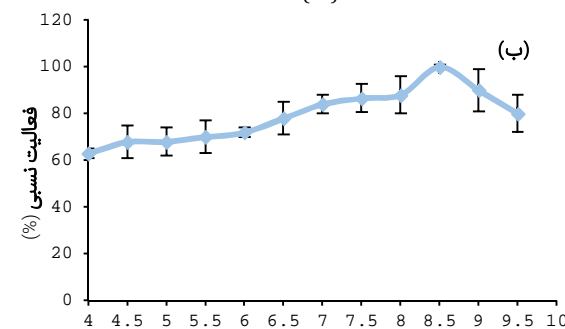
معیار استفاده از حلال‌های مختلف بررسی اثر قطبیت حلال بر فعالیت آنزیم است. نتایج بررسی فعالیت آنزیم کتکول و ۲-دی‌اکسیژناز در حضور حلال‌های آلی به‌کاررفته شامل اتانول، اتیل‌استات، پترالیوم‌اتر، استونیتریل، ان-آمیل‌الکل، ان-هگزان و تولوئن با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰٪ نشان داد که اتانول، استونیتریل، تولوئن و ان-آمیل‌الکل که ترکیبات دوقطبی با درجه قطبیت متفاوت هستند، باعث افزایش فعالیت آنزیم شدند، در حالی که حلال‌های ان-هگزان، اتیل‌استات و پترالیوم‌اتر که ترکیبات غیرقطبی به شمار می‌آیند، فعالیت آنزیم را متوقف کردند (نمودار ۴) [20]. با توجه به قطبیت حلال‌های آلی و مدل ارائه شده برای آنزیم مورد مطالعه، به نظر می‌رسد حلال آلی آمیل‌الکل از سر

بررسی فعالیت و پایداری آنزیم در دماها و pHهای گوناگون

بررسی نتایج تاثیر pH بر فعالیت آنزیم کتکول و ۲-دی‌اکسیژناز نشان داد که این آنزیم در محدوده pH مورد مطالعه قادر به فعالیت است و بیشترین فعالیت آن در pH= ۸/۵ مشاهده شد (نمودار ۲). همچنین بررسی نتایج تاثیر دما بر فعالیت آنزیم کتکول و ۲-دی‌اکسیژناز نشان داد که حداکثر فعالیت آنزیم در دمای ۳۰°C رخ می‌دهد (نمودار ۲).



دما (°C)



p

نمودار ۲ اثر دما (الف) و pHهای (ب) مختلف بر میزان فعالیت آنزیم کتکول و ۲-دی‌اکسیژناز

در بسیاری از مطالعات، pH بهینه برای آنزیم مورد نظر در محدوده قلیایی گزارش شده است. از جمله این مطالعات می‌توان به مطالعه سیلوا و همکاران [4] روی آنزیم کتکول و ۲-دی‌اکسیژناز استخراج شده از باکتری *Mycobacterium fortuitum* با حداکثر فعالیت در دمای ۴۵°C و pH= ۸ و مطالعه نواف و قوش [5] روی آنزیم استخراج شده از باکتری *Rhodococcus sp.* با حداکثر فعالیت در دمای ۳۰°C و pH= ۷/۵ اشاره کرد.

اثر سوبسترهای مختلف بر فعالیت آنزیم کتکول و ۲-دی‌اکسیژناز

آنزیم مورد مطالعه در حضور تمام سوبسترهای به‌کاررفته شامل فنول، کتکول، بنزوئیک‌اسید، پیروگالول و آلفا- نفتول (۱۰ میلی‌مولار) بیش از ۵۰٪ فعالیت خود را حفظ کرد و بر این اساس می‌توان آن را برای زیست‌پالایی در خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های مختلف، به کار برد. حداکثر فعالیت آنزیم در

سبب افزایش فعالیت آنزیم شوند. نتایج مشابهی در مطالعات انجام شده روی آنزیم کتکول^۲ و^۱دی اکسیژناز استخراج شده از *Mycobacterium fortuitum* توسط سیلو و همکاران^[4] و *P. aeruginosa* توسط وانگ و همکاران^[10] نشان دادند که فعالیت این آنزیم در حضور یونهای آهن و جیوه تحریک و در حضور یونهای مس، آمونیوم و منگنز مهار می شود.

بررسی غیرفعال شدن حرارتی برگشتناپذیری

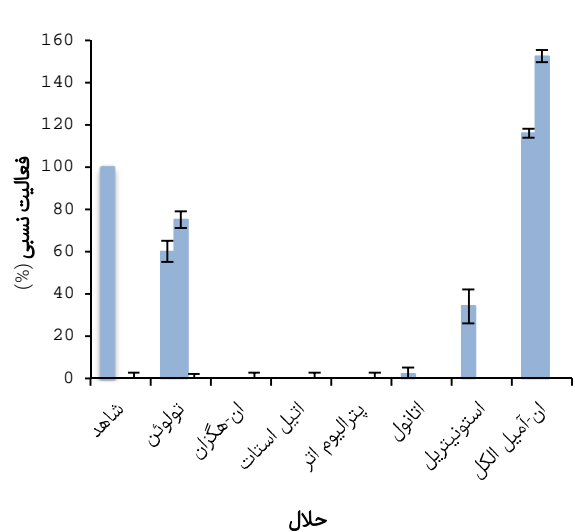
پس از انکوبه کردن آنزیم در یک دمای خاص تغییرات ساختاری آنزیم رخ می دهد که در تفسیر مبتنی بر ترمودینامیک کلاسیک آماری می توان گفت که در برگشت به دمای پایین، بر حسب دما و مدت زمان انکوباسیون، تغییر ساختار در بخشی از جمعیت مولکولی برگشتناپذیر است و این تعداد از مولکولهای آنزیم، ساختار طبیعی خود را کسب نمی کنند که متناسب با این تغییرات ساختاری برگشتناپذیری، از فعالیت آنزیم کاسته می شود^[12]. نتایج حاصل از آزمایشهای غیرفعال شدگی برگشتناپذیر ناشی از حرارت (نمودار ۶)، نشان می دهد که آنزیم کتکول^۲ و^۱دی اکسیژناز، بر حسب شرایط انکوباسیون، با شیب متفاوتی دچار افت فعالیت شده است که این تفاوت در روند کاهش فعالیت، بازتابی از تغییرات ساختاری برگشتناپذیر است. اگر این تغییر رفتار، به طور کیفی در منحنی مقایسه شود، مشاهده می شود که کمترین روند کاهش فعالیت در دمای ۳۰°C رخ داده است که البته این دما، همان دمای بهینه فعالیت آنزیم است. علاوه بر این، در مقایسه کمی داده ها، مشخص شد که مدت زمان لازم برای کاهش فعالیت به نصف مقدار اولیه در این نمونه، ۳۰ دقیقه است که در مقایسه با نمونه های دیگر، طولانی تر و بازتابی از پایداری ساختاری آنزیم در این شرایط است. همچنین، بهترین زمان ممکن برای واکنش آنزیم با سوبسترا، پس از ۱۰ دقیقه محاسبه شد. نتایج این بررسی نشان می دهد که دمای ۳۰°C که به عنوان دمای بهینه گزارش شده است، دمایی است که در آن آنزیم بیشترین پایداری حرارتی را در شیوه انکوباسیون دمایی از خود نشان می دهد.

تعیین غلظت کتکول با HPLC

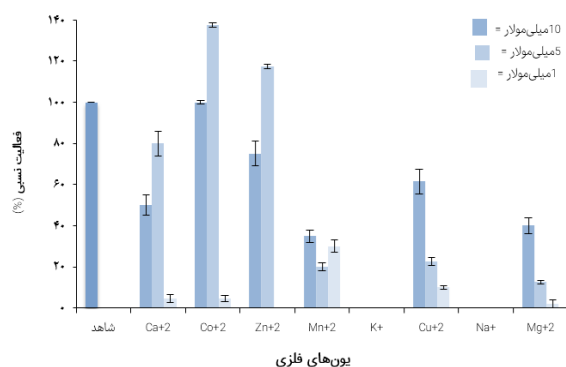
نمونه ها توسط دستگاه HPLC با استفاده از ستون C18 (۴۶×۲۵۰ میلی متر) بررسی شدند. بدین منظور، متانول- آب حاوی ۱٪ اسیداستیک (حجمی/حجمی) به عنوان محلول در جریان ۰/۸ میلی لیتر و طول موج ۲۷۷ نانومتر استفاده شد. براساس منحنی استاندارد کتکول، غلظت باقیمانده کتکول طی واکنش آنزیمی توسط دستگاه HPLC محاسبه شد (نمودار ۷). نتایج نشان دهنده کاهش غلظت کتکول طی واکنش آنزیمی و در نتیجه تجزیه آن به وسیله آنزیم کتکول^۲ و^۱دی اکسیژناز بود (نمودار ۸).

از میان سوبستراهای مختلف، کتکول سوبسترای مطلوب تری برای فعالیت آنزیم بود. نتایج محاسبه سینتیکی آنزیم کتکول^۲ و^۱دی اکسیژناز برای سوبسترای کتکول نشان داد که مقادیر V_{max} و K_m آنزیم به ترتیب ۸/۹۵۹ واحد بر میلی گرم و ۴/۹۹۲ میکرومول بر میلی لیتر است.

قطبی خود با جایگاه فعال و از سر غیرقطبی با کانال آب گریز در مسیر عبور سوبسترا میان کنش برقرار کرده است و سبب تسریع حرکت سوبسترا به سمت جایگاه فعال آنزیم و افزایش فعالیت آن می شود. البته مهار فعالیت آنزیمها در حلالهایی آلی نظیر آن-هگزان، اتیل استات و پترالیوم تر می تواند ناشی از تخریب ساختار آنزیم نیز باشد^[19]. همچنین نتایج بررسی فعالیت آنزیم کتکول^۲ و^۱دی اکسیژناز در حضور یونهای مختلف فلزی شامل Ca^{2+} ، K^{+} ، Mn^{2+} ، Co^{2+} ، Zn^{2+} ، Mg^{2+} و Cu^{2+} نشان داد که بیشتر یونهای فلزی سبب کاهش یا مهار فعالیت آنزیم می شوند، در حالی که یونهای کبالت و روی در غلظت ۵ میلی مولار سبب افزایش فعالیت آنزیم شدند (نمودار ۵).



نمودار ۴) اثر حلالهای آلی بر فعالیت آنزیم کتکول^۲ و^۱دی اکسیژناز



نمودار ۵) اثر غلظت های مختلف یونهای فلزی بر فعالیت آنزیم کتکول^۲ و^۱دی اکسیژناز

آنزیم کتکول^۲ و^۱دی اکسیژناز در ساختار خود حاوی یونهای آهن و جیوه است و در بیشتر مطالعات حضور این یونها در مخلوط واکنش آنزیمی به دلیل داشتن نقش ساختاری و کاتالیتیک، سبب افزایش فعالیت آنزیم می شود^[9, 21]. با توجه به اینکه یونهای کبالت و روی با یونهای آهن و جیوه در یک گروه قرار دارند، انتظار می رود که این یونها رفتار مشابهی از خود نشان دهند و

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر اولین گزارش در مورد استخراج و خالص‌سازی آنزیم کتکول‌آو۲دی‌اکسیژناز از باکتری *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 است که طی دو مرحله خالص‌سازی انجام شد. تخلیص پروتئین با استفاده از ستون کروماتوگرافی تبادل یونی Q- سفارز و آنالیز پروتئین به روش SDS-PAGE انجام شد. نتایج بیانگر وجود تک‌بند پروتئینی با وزن مولکولی تقریباً ۴۰ کیلو دالتون است. همچنین pH و دمای مطلوب برای آنزیم کتکول‌آو۲دی‌اکسیژناز به ترتیب ۸/۵ و ۳۰°C بود. فعالیت این آنزیم در pHهای متفاوت مزیتی برای استفاده از آن در تصفیه فاضلاب‌ها بر حسب pH آنها است. فعالیت کاتالیتیکی آنزیم در حضور یون‌های کلرید کبالت و روی و همچنین حلال آلی آمیل‌الکل افزایش می‌یابد، در حالی که در حضور دیگر یون‌های فلزی و حلال‌های آلی به کاررفته، کاهش پیدا می‌کند و یا به‌طور کلی مهار می‌شود. بنابراین می‌توان گفت که پایداری آنزیم در حلال آلی تحت تأثیر عوامل مختلف مثل ماهیت حلال، خواص آنزیم، مقدار آب مورد نیاز برای کاتالیز و کنفورماسیون آنزیم قرار می‌گیرد. کتکول سوبسترای بسیار مطلوب‌تری برای آنزیم کتکول‌آو۲دی‌اکسیژناز است. نتایج غیرفعال‌شدگی حرارتی نشان داد که کمترین روند کاهش فعالیت ناشی از انکوباسیون دمایی، در دمای ۳۰°C است و این دما را می‌توان به‌عنوان دمای بهینه برای پایداری ساختاری و منطبق بر فعالیت بهینه آنزیم تایید کرد. به نظر می‌رسد که یافته‌های این مطالعه می‌تواند باعث ترغیب پژوهشگران برای مطالعه بیشتر روی آنزیم کتکول‌آو۲دی‌اکسیژناز استخراج‌شده از باکتری *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 به‌منظور کاربرد در سطح صنعتی شود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از همکاری موثر گروه شیمی دانشگاه فردوسی مشهد و مجموعه آزمایشگاه‌های تحقیقاتی دانشگاه زنجان در انجام مطالعه حاضر سپاسگزاری می‌کنند.

تاییدیه اخلاقی: مطالعه حاضر توسط همه نویسندگان مورد تایید و به نشریه دیگری ارسال و یا چاپ نشده است.

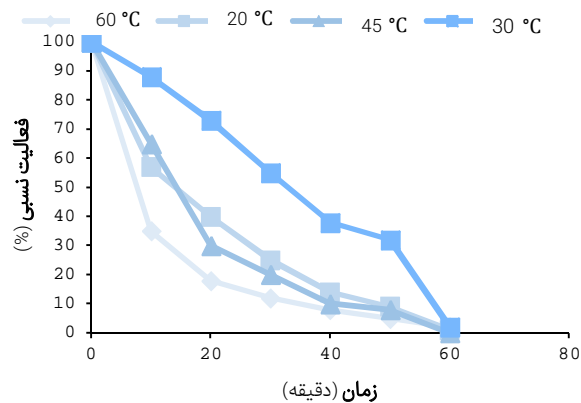
تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: فاتحه ربانی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۳۰٪)؛ وهب جعفریان (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ احمد آسوده (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۳۰٪)

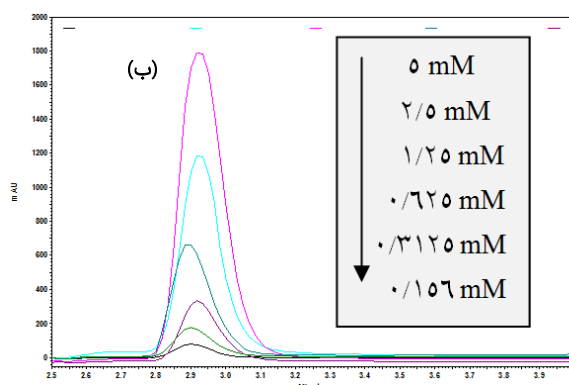
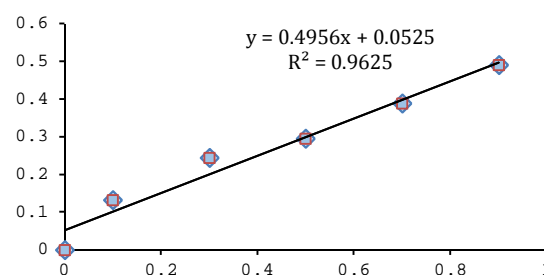
منابع مالی: این مطالعه مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد و با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه زنجان انجام شده است.

منابع

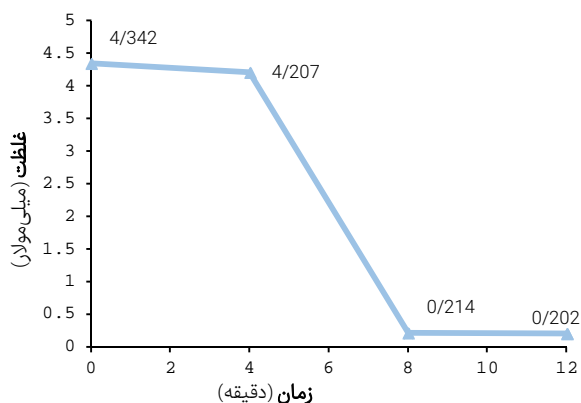
1- Lješević M, Gojgić-Cvijović G, Ieda T, Hashimoto S, Nakano T, Bulatović Sh, et al. Biodegradation of the aromatic fraction from petroleum diesel fuel by



نمودار ۶) نمودار غیرفعال‌شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم کتکول‌آو۲دی‌اکسیژناز در دماها و زمان‌های مختلف



نمودار ۷) نمودار استاندارد کتکول؛ الف) سطح زیر نمودار در غلظت‌های مختلف کتکول؛ ب) نمودار HPLC غلظت‌های مختلف کتکول



نمودار ۸) میزان غلظت کتکول باقیمانده طی واکنش آنزیمی کتکول‌آو۲دی‌اکسیژناز بر حسب زمان

- of high molecular weight polyaromatic hydrocarbons co-contaminated with metals in liquid and soil slurries by metal tolerant PAHs degrading bacterial consortium. *Biodegradation*. 2012;23(6):823-35.
- 13- Guzik U, Hupert-Kocurek K, Sitnik M, Wojcieszynska D. High activity catechol 1, 2-dioxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 as a useful tool in cis, cis-muconic acid production. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2013;103(6):1297-307.
- 14- 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(1-2):248-54.
- 15- Briganti F, Pessione E, Giunta C, Scozzafava A. Purification, biochemical properties and substrate specificity of a catechol 1, 2-dioxygenase from a phenol degrading *Acinetobacter radioresistens*. *FEBS Lett*. 1997;416(1):61-4.
- 16- Di Nardo G, Tilli S, Pessione E, Cavaletto M, Giunta C, Briganti F. Structural roles of the active site iron (III) ions in catechol 1, 2-dioxygenases and differential secondary structure changes in isoenzymes A and B from *Acinetobacter radioresistens* S13. *Arch Biochem Biophys*. 2004;431(1):79-87.
- 17- Nakai C, Kagamiyama H, Saeki Y, Nozaki M. Nonidentical subunits of pyrocatechase from *Pseudomonas arvilla* C-1. *Arch Biochem Biophys*. 1979;195(1):12-22.
- 18- Sikkema J, De Bont JA, Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem*. 1994;269(11):8022-8.
- 19- Bargeshadi Z, Pazhang Y, Jamei R. Effects of organic solvents on the enzyme activity of Subtilisin Carlsberg protease. *J Mol Cell Res*. 2019;32(2):236-46. [Persian]
- 20- Ruiz DM, De Castro RE. Effect of organic solvents on the activity and stability of an extracellular protease secreted by the haloalkaliphilic archaeon *Natrialba magadii*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2007;34(2):111-5.
- 21- Crowley JD, Traynor DA, Weatherburn DC. Enzymes and proteins containing manganese: An overview. *Met Ions Biol Syst*. 2000;37:209-78.
- 22- Shirdel SA, Khalifeh K. Thermodynamics of protein folding: Methodology, data analysis and interpretation of data. *Eur Biophys J*. 2019;48(4):305-16.
- Oerskovia sp. followed by comprehensive GC× GC-TOF MS. *J Hazard Mater*. 2019;363:227-32.
- 2- Besharati H. Microbial remediation of petroleum contaminated soils and the role of rhizosphere in microorganisms efficiency. *Iran J Soil Res*. 2015;28(3):573-84. [Persian]
- 3- Logeshwaran P, Megharaj M, Chadalavada S, Bowman M, Naidu R. Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environ Technol Innov*. 2018;10:175-93.
- 4- Silva AS, Jacques RJ, Andrezza R, Bento FM, Roesch LF, Camargo FA. Properties of catechol 1, 2-dioxygenase in the cell free extract and immobilized extract of *Mycobacterium fortuitum*. *Braz J Microbiol*. 2013;44(1):291-7.
- 5- Nadaf NH, Ghosh JS. Purification and characterization of catechol 1, 2-dioxygenase from *Rhodococcus* sp. NCIM 2891. *Res J Environ Earth Sci*. 2011;3(5):608-13.
- 6- Mishra VK, Kumar N. Microbial degradation of phenol: A review. *J Water Pollut Purif Res*. 2017;4(1):17-22.
- 7- Kumar A, Kumar Sh, Kumar S. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochem Eng J*. 2005;22(2):151-9.
- 8- Juhasz AL, Naidu R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the microbial degradation of benzo [a] pyrene. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2000;45(1-2):57-88.
- 9- Matera I, Ferraroni M, Kolomytseva M, Golovleva L, Scozzafava A, Briganti F. Catechol 1, 2-dioxygenase from the Gram-positive *Rhodococcus opacus* 1CP: Quantitative structure/activity relationship and the crystal structures of native enzyme and catechols adducts. *J Struct Biol*. 2010;170(3):548-64.
- 10- Wang CL, You SL, Wang SL. Purification and characterization of a novel catechol 1, 2-dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* with benzoic acid as a carbon source. *Process Biochem*. 2006;41(7):1594-601.
- 11- Milase RN. Purification and characterization of catechol- 1, 2- dioxygenase from *Acinetobacter* sp. Strain Y64 and *Escherichia coli* transformants [Dissertation]. Durban: University of KwaZulu-Natal; 2015.
- 12- Thavamani P, Megharaj M, Naidu R. Bioremediation