

هُوَ الْحَكِيمُ

پنجمین همایش بین المللی و سیزدهمین همایش ملی

بیوتکنولوژی ایران

5th Interational &
13th National Biotechnology Congress

۱۶-۱۸ مهر ماه ۱۴۰۲ - مرکز همایش های بین المللی دانشگاه شهید بهشتی



biotech13-08900795

زیست‌فناوری جانوری

بررسی و تولید آنزیم‌های نوترکیب تخریب کننده دی اکسی نیوالنول

Production of recombinant enzymes for biodegradation of deoxynivalenol

جوادمنش علی

علی جوادمنش^{۱،۲*}، زهرا موسوی^۳، محمد هادی سخاوتی^۱ و محسن فرزانه^۴

^۱ دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۲ گروه تحقیقاتی بیوتکنولوژی صنعتی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۳ دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۴ دانشیار بیماری شناسی گیاهی-قارچ شناسی و بیماری‌های قارچی، گروه مهندسی کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه

شهید بهشتی، تهران، ایران

javadmanesh@um.ac.ir

چکیده

در سالهای اخیر استفاده از روشهای مختلف برای مقابله با مایکوتوکسین ها به کار برده شده است که برای جذب مایکوتوکسینی همچون دی اکسی نیوالنول (DON) و هم خانواده های آن موفقیت آمیز نبود. یکی از راه های مقابله با این مایکوتوکسین استفاده از آنزیم ها است که می توانند با تغییر شکل زیستی توکسین ها اثر خود را اعمال کنند. لذا هدف کلی از این مطالعه تولید مخلوط آنزیمی نوترکیب به منظور تجزیه مایکوتوکسین DON در شرایط آزمایشگاهی می باشد. در مرحله ی اول داکینگ مولکولی بین DEP A و DEP B با DON و حدواسط آن جهت بررسی انرژی و جایگاه اتصال هم به روش استاتیک و هم به روش دینامیک انجام شد. سپس کانستراکت مورد نظر در پلاسמיד بیانی pPIC9K تهیه و این حامل از طریق الکتروپوریشن به سلول های مستعد پیکیا پاستوریز GS115 منتقل شد. جهت تایید انتقال پلاسמיד، کلنی PCR و الکتروفورز انجام شد. از محیط کشت های BMMY و BMGY جهت بیان آنزیم ها استفاده شد. تمامی نمونه ها پس از تخلیص، توسط SDS-PAGE و بردفورد مورد ارزیابی قرار گرفتند. MTT assay در سلول های C2C12 به منظور بررسی اثرپذیری آنزیم بر روی DON انجام شد. در نهایت اثر آنزیم نوترکیب و DON (4mg/kg وزن بدن (بر عملکرد، پارامترهای خونی و هیستوپاتولوژی بافت روده ی موش های نر نژاد Balb/C در سن ۱۰ هفتهگی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مربوط به داکینگ مولکولی نشان داد که هر دو آنزیم DEP A و DEP B در جایگاه مناسب به DON متصل شدند و نتایج دینامیک مولکولی در هر دو مورد مشابه بود. در بخش آزمایشگاهی مشخص شد کانستراکت مورد نظر به درستی به ژنوم مخمر منتقل شد. پس از الکتروفورز آنزیم نوترکیب، باندهای ۶۲ و ۳۷ KDa متناسب با اندازه دو آنزیم نوترکیب بر روی ژل مشاهده شدند. کمیت بیان آنزیم ها توسط بردفورد ۱۱ میکروگرم/میلی لیتر تخمین زده شد. نتایج MTT assay نشان داد که با

افزایش میزان آنزیم میزان زنده مانی سلول های C2C12 که در معرض سم بودند افزایش یافت ($P < 0.05$). وزن و مصرف خوراک موش ها در هر دو هفته در گروه مصرف کننده DON با آنزیم در مقایسه با گروه مصرف کننده DON بهبود معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$). بررسی ها بر روی پارامترهای خونی نشان داد که میزان گلبول سفید، گلبول قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین، پلاکت و لنفوسیت در گروه مصرف کننده DON همراه با آنزیم نسبت به DON بهبود معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$). در نهایت بررسی ژژنوم موش های مصرف کننده DON نشان از وجود پرخونی و التهاب داشت و در سطح سلول نیز نکروز مشاهده شد. در حالیکه در گروه مصرف کننده DON همراه با آنزیم با گروه کنترل اختلافی مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: دی اکسی نیوالنول، مایکوتوکسین، پیکیا پاستوریز، آنزیم نو ترکیب

Production of recombinant enzymes for biodegradation of deoxynivalenol

Ali Javadmanesh^{1, 2*}, Zahra Mousavi³, Mohammad Hadi Sekhavati¹, Mohsen Farzaneh⁴

¹Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

²Industrial Biotechnology Research Group, Biotechnology Research Institute, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

³PhD student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

⁴Associate Professor, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

javadmanesh@um.ac.ir

Abstract

Mycotoxin contamination of agricultural products is an essential issue regarding food safety and public health worldwide. In recent years, various methods have been employed to mitigate mycotoxins. However, they have not successfully absorbed toxins such as deoxynivalenol (DON) and related trichothecenes. One promising approach is using enzymes that can detoxify mycotoxins by altering their chemical structures. Therefore, the overall goal of this study was to produce a recombinant enzyme mixture for detoxifying DON. In the first bioinformatics phase, molecular docking between DEP A/DEP B and DON was performed to evaluate binding energies and orientations using static and dynamic simulations. For the experimental phase, the DEP A and DEP B sequences were obtained from NCBI and cloned into the pPIC9K vector for expression in *Pichia pastoris* GS115 yeast via electroporation. Colony PCR and electrophoresis confirmed plasmid integration into the host genome. Enzymes were expressed using BMGY and BMMY media and analyzed by SDS-PAGE and Bradford assays. An MTT assay with C2C12 cells assessed enzyme efficacy against DON toxicity. Finally, the effects of the enzymes and DON (4 mg/kg body weight) on performance, blood parameters, and intestinal histopathology were evaluated in 10-week-old male Balb/C mice. Examination of predicted protein structures indicated successful modeling.

Molecular docking showed DEPs bound DON appropriately, corroborated by molecular dynamics simulations. Laboratory results demonstrated correct plasmid construction and transformation. SDS-PAGE revealed distinct 62 kDa and 37 kDa bands for the enzymes, with an estimated 11 $\mu\text{g/ml}$ concentration. MTT assay exhibited increased cell viability with higher enzyme levels ($P<0.05$). Mice receiving DON and enzymes showed improved weight gain and feed intake versus DON alone ($P<0.05$). Blood parameters, including leukocytes, erythrocytes, hematocrit, hemoglobin, platelets, and lymphocytes, were also improved with enzyme treatment ($P<0.05$). Finally, DON caused intestinal hyperemia, while the enzyme mixture prevented histopathological changes. In conclusion, these recombinant enzymes represent a promising strategy for mitigating the toxicity of mycotoxins like DON.

Key words: Dioxynivalenol, Mycotoxin, Pichia pastoris, Recombinant Enzyme

