

## بررسی زیست‌داده‌ای ویژگی‌های ساختاری، عملکردی و دامنه میزبانی آنزیم‌های باکتریایی مؤثر در مقاومت به استرس‌های اکسیداتیو

نازنین غلامپور فاروجی<sup>۱</sup>، علی اکبر حدادمشهدریزه<sup>۳\*</sup> و سمانه دولت آبادی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، علوم و تحقیقات خراسان رضوی، گروه زیست‌شناسی

<sup>۲</sup> مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، پژوهشکده فناوری زیستی، گروه سلولی و مولکولی

<sup>۳</sup> مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

<sup>۴</sup> نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۳

### چکیده

گونه‌های اکسیژن فعال که می‌توانند از دو مسیر داخل و خارج سلولی منجر به استرس‌های اکسیداتیو و بیماری‌های ناشی از آن شوند، توسط برخی از آنزیم‌های باکتریایی قابل شناسایی و حذف می‌باشند. لذا پایش ساختاری، عملکردی و آشکارسازی دامنه میزبانی این نوع از آنزیم‌ها، ضمن ارائه راهکارهایی در جهت طراحی سازه‌های ژنتیکی، معرفی گونه‌های باکتریایی با قابلیت پروبیوتیکی را به دنبال خواهد داشت. به این منظور توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژنهای *gshR1*، *gshR.sodA*، *sodA*، *katE*، *katE.katA*، *trxR* و *trxR1* از بانک‌های اطلاعاتی استحصال و پایش ساختاری، عملکردی، ویژگی‌های فیزیوشیمیایی، توپولوژیکی، و نیز دامنه میزبانی و قرابت‌یابی آنزیم‌های مرتبط صورت پذیرفت. نتایج حاصل از این تحقیق علاوه بر آشکارسازی ویژگی‌های فیزیوشیمیایی، ترشحی بودن آنزیم‌های *KATE*، *KATA*، *KATE\** و *SODA* را آشکار نمود. پایش ساختاری این آنزیم‌ها ضمن معرفی دمین‌های عملکردی و مشترک با قابلیت حذف گونه‌های فعال اکسیژن، تجزیه پراکسید هیدروژن و تنظیم واکنش‌های اکسایش کاهش، دمین‌هایی با قابلیت تحریک پاسخ ایمنی و حذف آمونیاک را در برخی موارد نشان داد. در همین راستا بررسی میل اتصالی آنزیم‌ها به عوامل اکسیدان، میل بالای آنها به ویژه *KATA* به مولکول  $O_2^-$  را مشخص نمود. همچنین بررسی پراکنش میزبانی این آنزیم‌ها، حضور توالی‌های همگون به‌ویژه شبه توالی‌های مشابه با *TRXR* و *TRXB1* با ارزش مناسب در گونه‌های مختلف از جنس‌های باکتریایی غیرمیزبانی شامل *Weissella*، *Tetragenococcus*، *Leuconostoc*، *Pediococcus*، *Listeria* و *Peptoniphilus* را مشخص نمود، که در این میان حضور ۷ نوع توالی کدگذار با قابلیت احتمالی مقاومت به استرس‌های اکسیداتیو در محتوی ژنومی گونه‌های باکتریایی *Pediococcus acidilactici*، *Lactobacillus pentosus* و *Lactobacillus plantarum* آشکار شد.

واژه‌های کلیدی: گونه‌های اکسیژن فعال، استرس اکسیداتیو، سرطان، آنزیم‌های ضد اکسیدانی، پروبیوتیک

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۱۳۸۸۰۳۷۹۶، پست الکترونیکی: a.haddad@um.ac.ir

### مقدمه

گونه‌های اکسیژن فعال که از جمله علل ایجاد بیماری‌های مختلف سرطانی و غیرسرطانی محسوب می‌شوند، در نتیجه متابولیسم طبیعی سلول (۲۹) و یا مواد شیمیایی زنبوتیک بیرونی همچون داروها و هورمون‌ها ایجاد می‌شوند (۱۵ و ۳۹). در همین راستا کاهش سطح آنتی اکسیدان‌های آنزیمی در نتیجه تغییر در بیان ژن‌های مرتبط نیز

اکسیدانی باکتریهای اسید لاکتیک فاقد فعالیت‌های کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز، به طور گسترده‌ای با تراریخت‌سازی آنها با هترولوگهای کاتالاز و یا سوپراکسیددیسموتاز صورت پذیرفته است (۳). همچنین آنزیمهای پروبیوتیکی دخیل در مقاومت به استرس اکسیداتیو همچون تیوردوکسین ردوکتاز، گلوکاتیون ردوکتاز به منظور تقویت خواص آنتی‌اکسیداتیو و بهبود استحکام آنها مهندسی شده، و بیان بیش از حد هریک از این ژنها در سویه پروبیوتیکی تراریخت منجر به تقویت تحمل اکسیداتیو آنها شده است (۴۶). بنابراین هدف این تحقیق ضمن پروفایل نمودن آنزیمهای کلیدی مؤثر در مقاومت به استرسهای اکسیداتیو پروبیوتیکهای باکتریایی رایج، پایش ویژگیهای ساختاری، عملکردی و دامنه میزبانی آنها به منظور ارائه دمن‌های مؤثر در جهت طراحی سازه‌های ژنتیکی با قابلیت بالا بردن توان آنتی‌اکسیدانی سویه‌های پروبیوتیکی و نیز معرفی گونه‌های باکتریایی با قابلیت بالا در برابر استرسهای اکسیداتیو، به عنوان سویه‌های پروبیوتیکی پرتوان، مبتنی بر حضور دمن‌های مؤثر در شرایط مجازی می‌باشد.

### مواد و روشها

**واکوی داده‌ها:** با هدف آشکارسازی ژنهای دخیل در مقاومت به استرسهای اکسیداتیو، مکانیسمهای مولکولی مرتبط با فرآیند در برخی سویه‌های باکتریایی رایج پروبیوتیکی بررسی، و ژنهای کلیدی مرتبط شامل *kate*، *kata*، *kate*<sup>\*</sup>، *soda*<sup>\*</sup>، *soda*، *gshR1*، *gshR4*، *gshR* و *trxR* انتخاب شدند.

**دستیابی به توالیهای نوکلئوتیدی و پروتئینی آنزیمهای انتخابی:** توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژنهای انتخابی با شماره‌های شناسایی ۱۰۶۲۰۱۶، ۳۷۷۷۸۷۲، ۹۳۷۴۸۱، ۳۱۶۶۱۵۴، ۱۱۱۴۰۱۹، ۱۰۶۴۲۱۱، ۱۰۶۲۱۸۸، ۱۱۴۷۹۶۷۱۴، ۱۳۸۷۱۰۹۲ و شماره‌های دستیابی NP\_391784.2، YP\_394780.1، WP\_033609335.1

منجر به تولید گونه‌های اکسیژن فعال می‌شود (۴ و ۴۱). بنابراین شناخت مکانیسمهای مولکولی مؤثر در تولید این گونه ترکیبات و یا راهکارهای حذف آنها می‌تواند ارائه کننده روشهایی مفید در جهت مقابله با بیماریهای مرتبط از جمله سرطانها باشد. این نوع از بیماریها که از برهم خوردن هموستاز سلولی، تکثیر کنترل نشده سلولهای تغییر شکل یافته و گسترش آنها به سایر نقاط بدن حاصل می‌آید (۱۶)، عامل شایع مرگ و میر در جهان می‌باشد (۱۲)، لذا توسعه روشهای نوین درمانی، تشخیصی و یا پیشگیری از این بیماریها در حال گسترش هستند. در این میان استفاده از باکتریها در پیشگیری و درمان بیماریهای سرطانی، در اشکال مختلف از جمله در درمانهای غذایی مبتنی بر پروبیوتیکها جایگاه ویژه‌ای پیدا کرده است (۳۲). پروبیوتیکها، میکروارگانیسم‌های باکتریایی و غیرباکتریایی زنده‌ای هستند که در صورت مصرف به میزان کافی (۱۳)، صرف‌نظر از مکانیسمهای متعدد و مهم در پیشگیری و درمان بیماریهای مختلف، مقابله با استرس اکسیداتیو و کاهش بار گونه‌های اکسیژن فعال نقش دارند. در این راستا فعالیت آنتی‌اکسیدانی باکتریهای پروبیوتیکی چون باکتریهای اسیدلاکتیک ممکن است منجر به پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن، مهار آنزیم و کاهش فعالیت یا مهار اتواکسیداسیون آسکوربات در روده از طریق خنثی سازی رادیکالهای آزاد شود (۲). در چندین گزارش نشان داده شده است که سویه‌های باکتریهای اسیدلاکتیک خواص آنتی‌اکسیدانی دارند و گونه‌های اکسیژن فعال را از طریق مکانیسمهای آنزیمی غیرفعال می‌کنند (۲۳، ۲۰، ۱۰). بنابراین این آنزیمها به واسطه حذف گونه‌های اکسیژن فعال، دارای قابلیت سم‌زدایی می‌باشند (۸). از این رو، با استفاده از پروبیوتیکهایی با قابلیت جذب گونه‌های فعال اکسیژن و عوامل ایجادکننده آن از یکسو و نیز بالا بردن قابلیت آنتی‌اکسیدانی آن مبتنی بر فرآیندهای مهندسی ژنتیک، می‌توان پیشگیری بسیاری از بیماریها از جمله بیماریهای سرطانی را توقع داشت. در همین راستا بهبود خواص آنتی

پایگاه‌های اطلاعاتی colby و pubchem به ترتیب با آدرسهای <http://www.colby.edu/chemistry/molecules> و <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> صورت پذیرفت. تبدیل فرمت SDF مولکولها به PDB با برنامه تحت شبکه SMILES Translator با آدرس <http://cactus.nci.nih.gov/translate> انجام شد.

ارزیابی میل اتصال آئیمها به گونه‌های فعال اکسیژن: ارزیابی توان اتصال آئیمهای انتخابی به گونه‌های بسیار واکنش پذیر اکسیژن شامل  $H_2O_2$  و  $O^-$  با استفاده از برنامه تحت شبکه PatchDock با آدرس <http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock> صورت پذیرفت. نتایج حاصل از این آزمون براساس انرژی واکنش پذیری اتمی (ACE) در بین ۲۰ راه حل اولیه با بیشترین اعتبار مورد بررسی و مطلوب‌ترین آن در ارتباط با هر یک از آئیمها انتخاب شدند. آشکار سازی صحت اتصال در موقعیت مناسب با استفاده از نسخه ۱ برنامه Pymol صورت پذیرفت.

همگون‌یابی و قرابت‌یابی توایها: تعیین پراکنش دامنه میزبانی توای آئیمهای انتخابی با استفاده از برنامه تحت شبکه Protein Blast با آدرس <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> مبتنی بر ماتریکس‌های BLUSUM62، PAM250 و BLUSUM45 انجام شد. نتایج حاصل بر اساس ارزش E، درصد همسانی و همپوشانی ارزیابی و قرابت توایهای انتخابی همگون با استفاده از نسخه ۶ برنامه MEGA6 انجام و خوشه بندی توایها بر اساس الگوریتم UPGMA صورت پذیرفت.

## نتایج

ویژگیهای ساختاری و دامنه میزبانی ژنهای مقاومت به استرسهای اکسیداتیو: نتایج حاصل از واکاری میکروارگانسیم‌های پروبیوتیکی توانا در برابر استرسهای اکسیداتیو منجر به معرفی ۷ گونه باکتریایی متعلق به

YP\_141130.1، NP\_266564.1، YP\_004888400.1، YP\_004890792.1، ABI79324.1، YP\_006751102.1 و WP\_021336670.1 به ترتیب از پایگاه‌های اطلاعات ژنی و پروتئینی NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) استحصال شدند.

## پایش ویژگیهای ساختاری و عملکردی توایهای انتخابی

: پایش توایهای نوکلئوتیدی و پروتئینی ژنهای انتخابی از نظر اندازه با استفاده از داده‌های موجود در پایگاه اطلاعات ژنی و پروتئینی (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)، صورت پذیرفت. در همین راستا آشکار سازی دمین‌های عملکردی این توایها با استفاده از برنامه‌های تحت شبکه 5 InterProScan Motifscan و پایگاه ConservedDomain به ترتیب با آدرسهای (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5/>) و ([www.motifscan.org](http://www.motifscan.org)) و cdd/ به طور جداگانه انجام شد. همچنین ویژگیهای فیزیکوشیمیایی این توایها با استفاده از برنامه ProtParam موجود در بانک اطلاعاتی ExPASy با آدرس (<http://web.expasy.org/protparam>) جهت تعیین و پیش بینی توپولوژی پروتئینها از برنامه TMHMM با آدرس (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) استفاده شد.

## دستیابی به ساختار ۳ بعدی توایهای پروتئینی: ساختار ۳

بعدی توایهای پروتئینی از پایگاه اطلاعاتی PDB با آدرس (<http://www.rcsb.org>) استحصال و یا با برنامه تحت شبکه swissmodel با آدرس (<http://swissmodel.expasy.org>) مدل‌سازی شدند. در این راستا تنها ساختار ۳ بعدی توای پروتئینی KATE با شماره شناسایی 1JKU از پایگاه اطلاعاتی PDB استحصال و ساختار سایر توایها مدل‌سازی شدند.

دستیابی به ساختار ۳ بعدی ترکیبات شیمیایی: استحصال ساختار ۳ بعدی گونه‌های اکسیژن فعال با استفاده از

جنسهای *Bacillus*، *Streptococcus*، *Lactobacillus* و *Lactococcus* با قابلیت آنتی‌اکسیدانی و ویژگیهای ساختاری متفاوت شد (جدول ۱). همان طوری که در این

جدول ۱- دامنه میزبانی، ویژگیهای ساختاری و قابلیت آنتی‌اکسیدانی ژنهای مقاومت به استرسهای اکسیداتیو. (علامت + در ستون تأثیری گذاری نتیجه بررسی قابلیت این آزمایشها در فرآیند آنتی‌اکسیداتیو پس از تراریخت‌سازی آنها در گزارشهای مختلف می‌باشد، علامت +: نشان دهنده ایجاد تحمل اکسیداتیو کم، ++: متوسط، +++: زیاد، ++++: خیلی زیاد)

| ردیف | نام ژن       | سویه باکتریایی                        | طول ژن | نام آنزیم          | طول آنزیم | تأثیرگذاری |
|------|--------------|---------------------------------------|--------|--------------------|-----------|------------|
| ۱    | <i>katE</i>  | <i>Lactobacillus plantarum</i>        | ۱۴۵۵   | کاتالاز            | ۴۸۴       | +          |
| ۲    | <i>katA</i>  | <i>Lactobacillus sakei</i>            | ۱۵۰۰   | کاتالاز            | ۴۷۹       | ++         |
| ۳    | <i>katE*</i> | <i>Bacillus subtilis</i>              | ۲۰۶۱   | کاتالاز            | ۶۸۶       | ++++       |
| ۴    | <i>sodA*</i> | <i>Streptococcus thermophilus</i>     | ۶۶۳    | سوپراکسیددیسموتاز  | ۲۲۰       | ++         |
| ۵    | <i>sodA</i>  | <i>Lactococcus lactis</i>             | ۶۲۱    | سوپراکسیددیسموتاز  | ۲۰۶       | +          |
| ۶    | <i>gshR1</i> | <i>Lactobacillus plantarum</i>        | ۱۳۳۲   | گلوتاتیون ردوکتاز  | ۴۴۳       | +          |
| ۷    | <i>gshR4</i> | <i>Lactobacillus plantarum</i>        | ۱۳۳۵   | گلوتاتیون ردوکتاز  | ۴۴۴       | +          |
| ۸    | <i>gshR</i>  | <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> | ۱۳۳۸   | گلوتاتیون ردوکتاز  | ۴۴۵       | +          |
| ۹    | <i>trxBI</i> | <i>Lactobacillus casei</i>            | ۱۰۴۷   | تیوردوکسین ردوکتاز | ۳۴۸       | ++         |
| ۱۰   | <i>trxR</i>  | <i>Lactobacillus plantarum</i>        | ۹۳۹    | تیوردوکسین ردوکتاز | ۳۱۲       | +++        |

اکسیداتیو، مبین ترش‌چی و غشایی بودن آنها بود (جدول ۳). همان طوری که در این جدول مشاهده می‌شود در این میان پروتئینهای KATE، KATA، KATE\* و SODA ترش‌چی بوده و سایر موارد با دارا بودن ۱ تا ۴ دمین گذرنده از غشاء موقعیت غشایی را نشان دادند.

ارزیابی قابلیت پروتئینهای آنتی‌اکسیداتیو: بررسی قابلیت پروتئینهای آنتی‌اکسیداتیو انتخابی در حذف مولکولهای اکسیدان، مبین قابلیت تمامی آنها در اتصال به ۲ مولکول اکسیدان  $H_2O_2$  و  $O_2^-$  بود، با این وجود همان طوری که در شکل ۱ نمایش داده شده است به‌طور کلی قابلیت اتصال این مولکولها با  $O_2^-$  بیشتر است.

پایش ساختاری و عملکردی ژنهای مقاوم به استرسهای اکسیداتیو: نتایج حاصل از پایش ساختاری و عملکردی توالیهای پروتئینی ژنهای مقاومت به استرسهای اکسیداتیو منجر به آشکارسازی دمین‌های عملکردی و جایگاههای فعال مرتبط در موقعیتهای مختلف توالیهای مرتبط شد

ویژگیهای فیزیکوشیمیایی توالی پروتئینی ژنهای مقاوم به استرسهای اکسیداتیو: نتایج حاصل از ارزیابی ویژگیهای فیزیکوشیمیایی توالی پروتئینی ژنهای کلیدی مؤثر در مقاومت به استرسهای اکسیداتیو، مبین وزن مولکولی آنها در محدوده ۲۳ تا ۵۵ کیلودالتون، بار الکتریکی منفی ۲۲ تا منفی ۷۲، pH ایزوالکتریک (pI) ۴/۹۲ تا ۵/۶، هیدروفوبیستی منفی ۰/۶۵۲ تا ۰/۰۱۰، نیمه عمر بیش از ۱۰ ساعت در تمامی موارد و نیز شاخص ناپایداری ۲۱/۹۱ تا ۳۳/۷۲ آنها بود (جدول ۲). همان طوری که در این جدول نمایش داده شده است، توالی پروتئین KATE\* با بیشترین فعالیت و ضریب تأثیرگذاری، دارای بیشترین بار منفی می‌باشد، با این وجود تفاوت معنی‌داری در سایر موارد مشهود نبود. در همین راستا GSHR بیشترین پایداری را نشان داد.

ویژگیهای توپولوژی پروتئینهای آنتی‌اکسیداتیو: بررسی موقعیت سلولی پروتئینهای مؤثر در مقاومت به استرسهای

آمونیاک از گلوتامین شد. بررسی دقیق جایگاه‌های فعال این پروتئینها دخالت ۱۶ اسیدآمینه در این جایگاه با موقعیت ۴۲-۵۸ در KATA و KATE و موقعیت ۸۳-۶۷ در KATE\* را مشخص نمود. آشکار شدن دمین مشترک و عملکردی OxRdtase-FAD/NAD در موقعیت‌های مختلف توالیهای پروتئینی GSHR1، GSHR4، GSHR، TRXB1 و TRXR از دیگر نتایج حاصل از پایش ساختاری و عملکردی بود.

(جدول ۴). همان طوری که در این جدول نمایش داده شده است، دمین‌های عملکردی ضمن آنکه با مکانیسمهای مختلف منجر به مقاومت در برابر استرسهای اکسیداتیو می‌شوند، طولی متفاوت نیز دارند. از سویی دیگر بررسی نتایج حاصل از پایش توالیهای پروتئینی KATA، KATE و KATE\* ضمن آنکه حضور دمین‌های مؤثر در تجزیه H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> را در هر یک از آنها آشکار نمود، منجر به معرفی دمین‌های تحریک‌کننده پاسخ ایمنی در آنها و نیز دمینی در موقعیت ۶۸۶-۵۴۱ توالی KATE\* با قابلیت حذف

جدول ۲- برخی از ویژگیهای فیزیوشیمیایی توالی پروتئینی ژنهای مقاومت به استرسهای اکسیداتیو. (شاخص آلفاتیک یک پروتئین به عنوان حجم نسبی زنجیره آلفاتیک جانبی (آلانین، والین، ایزولوسین، و لوسین) در یک پروتئین می‌باشد که می‌توان آن را به عنوان یک عامل مثبت برای افزایش مقاومت حرارتی پروتئینهای کروی در نظر گرفت)

| ردیف | نام توالی | وزن ملکولی | بار الکتریکی | pI   | هیدروفوبیسیته | نیم عمر | شاخص ناپایداری | شاخص آلفاتیک |
|------|-----------|------------|--------------|------|---------------|---------|----------------|--------------|
| ۱    | KATE      | 55003.6    | -52.0        | 5.37 | -0.571        | >10 h   | 26.24          | 71.85        |
| ۲    | KATA      | 54320.5    | -64.0        | 5.21 | -0.652        | >10 h   | 31.04          | 70.04        |
| ۳    | KATE*     | 40446.4    | -72.0        | 5.60 | -0.643        | >10 h   | 33.47          | 61.20        |
| ۴    | SODA*     | 24734.0    | -34.0        | 5.09 | -0.260        | >10 h   | 30.03          | 88.86        |
| ۵    | SODA      | 23253.8    | -32.0        | 5.03 | -0.446        | >10 h   | 33.72          | 80.58        |
| ۶    | GSHR1     | 47280.6    | -30.0        | 5.29 | 0.010         | >10 h   | 21.99          | 95.40        |
| ۷    | GSHR4     | 48258.5    | -34.0        | 5.18 | -0.124        | >10 h   | 30.53          | 94.95        |
| ۸    | GSHR      | 48617.0    | -44.0        | 4.92 | -0.196        | >10 h   | 21.91          | 95.06        |
| ۹    | TRXB1     | 38062.4    | -22.0        | 6.10 | -0.252        | >10 h   | 29.30          | 82.10        |
| ۱۰   | TRXR      | 33504.6    | -26.0        | 4.93 | -0.186        | >10 h   | 25.73          | 86.54        |

جدول ۳- ویژگیهای توپولوژی پروتئینهای آنتی‌اکسیداتیو.

| ردیف | نام توالی | نوع پروتئین | موقعیت و تعداد دمین‌های گذرنده از غشاء |         |         |
|------|-----------|-------------|--|---------|---------|
| ۱    | KATE      | ترشحي       | -                                      | -       | -       |
| ۲    | KATA      | ترشحي       | -                                      | -       | -       |
| ۳    | KATE*     | ترشحي       | -                                      | -       | -       |
| ۴    | SODA*     | غشايی       | ۱۳-۴۲                                  | ۱۲۸-۱۵۹ | -       |
| ۵    | SODA      | ترشحي       | -                                      | -       | -       |
| ۶    | GSHR1     | غشايی       | ۲-۳۵                                   | ۱۲۷-۱۴۷ | ۱۶۴-۱۹۷ |
| ۷    | GSHR4     | غشايی       | ۵-۵۱                                   | ۱۶۰-۲۰۴ | ۳۲۰-۳۵۳ |
| ۸    | GSHR      | غشايی       | ۴-۴۳                                   | -       | -       |
| ۹    | TRXB1     | غشايی       | ۵-۷۶                                   | ۹۴-۱۲۲  | ۲۵۳-۲۸۶ |
| ۱۰   | TRXR      | غشايی       | ۲-۵۹                                   | ۲۸۱-۳۱۰ | -       |

جدول ۴- ویژگی‌های ساختاری و عملکردی توالی پروتئینی ژنهای مقاومت به استرس اکسیداتیو.

| ردیف | نام توالی | نام دمین / موتیف           | موقعیت  | عملکرد                                       |
|------|-----------|----------------------------|---------|--|
| ۱    | KATA      | Catalase_core              | ۶-۳۸۸   | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> تجزیه          |
|      |           | Catalase_immune_responsive | ۴۰۹-۴۷۲ | تحریک پاسخ ایمنی                             |
|      |           | Catalase_AS                | ۴۲-۵۸   | جایگاه فعال                                  |
| ۲    | KATE      | Catalase_core              | ۶-۳۸۹   | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> تجزیه          |
|      |           | Catalase_immune_responsive | ۴۱۵-۴۷۵ | تحریک پاسخ ایمنی                             |
|      |           | Catalase_AS                | ۴۲-۵۸   | جایگاه فعال                                  |
| ۳    | KATE*     | Catalase_core              | ۱۰-۴۱۹  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> تجزیه          |
|      |           | Catalase_immune_responsive | ۴۴۳-۵۱۱ | تحریک پاسخ ایمنی                             |
|      |           | Catalase_AS                | ۶۷-۸۳   | جایگاه فعال                                  |
|      |           | Class_I_gatase-like        | ۵۴۱-۶۸۶ | حذف آمونیاک از گلوتامین                      |
| ۴    | SODA*     | Mn/Fe-SOD                  | ۱۷-۲۱۹  | تبدیل رادیکالهای سوپراکسید به O <sub>2</sub> |
| ۵    | SODA      | Mn/Fe_SOD                  | ۱-۲۰۵   | تبدیل رادیکالهای سوپراکسید به O <sub>2</sub> |
| ۶    | GSHR1     | OxRdtase-FAD/NAD           | ۶-۳۰۱   | حذف رادیکالهای سوپراکسید                     |
| ۷    | GSHR4     | OxRdtase-FAD/NAD           | ۸-۳۰۴   | حذف رادیکالهای سوپراکسید                     |
| ۸    | GSHR      | OxRdtase-FAD/NAD           | ۹-۳۰۴   | حذف رادیکالهای سوپراکسید                     |
| ۹    | TRXB1     | OxRdtase-FAD/NAD           | ۳۷-۳۱۲  | حذف رادیکالهای سوپراکسید                     |
|      |           | OxRdtase-AS                | ۱۶۴-۱۸۴ | جایگاه فعال                                  |
| ۱۰   | TRXR      | OxRdtase-FAD/NAD           | ۶-۲۷۹   | حذف رادیکالهای سوپراکسید                     |
|      |           | OxRdtase-AS                | ۱۳۳-۱۵۳ | جایگاه فعال                                  |

گونه‌های مختلف از جنس میزبانی و غیرمیزبانی دور و نزدیک شد، که در این میان ۱۰۵ سویه باکتریایی حائز اهمیت بودند. با این وجود حضور توالیهای پروتئینی شبه گلوکاتایون ردوکتاز در گونه‌های مختلف از ۳ جنس باکتریایی *Pediococcus*, *Weissella* و *Leuconostoc* و توالیهای شبه تیوردوکسین ردوکتاز در گونه‌های مختلف ۲ جنس باکتریایی *Pediococcus* و *Tetragenococcus* از ارزش بالایی برخوردارند که قرابت آنها در شکل ۳ آورده شده است. همان طوری که در این شکل نمایش داده شده است، در این میان گونه باکتریایی *Pediococcus clausenii* دارای توالی پروتئینی با شماره دستیابی WP\_014271906.1 با قرابت نزدیک به توالی پروتئینی GSHR و GSHR4 می‌باشد، و نزدیکی توالی پروتئینی با

آشکارسازی قرابت توالی پروتئینی ژنهای مقاوم به استرسهای اکسیداتیو: نتایج حاصل از قرابت‌یابی توالی پروتئینی ژنهای مؤثر در مقاومت به استرسهای اکسیداتیو همان طوری که انتظار می‌رفت، منجر به قرارگیری آنها در ۴ خوشه مستقل متعلق به کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز، گلوکاتایون ردوکتاز و تیوردوکسین ردوکتاز شد (شکل ۲). همان طوری که در این شکل مشاهده می‌شود این قرابت‌یابی نزدیکی پروتئینهای گلوکاتایون ردوکتاز و تیوردوکسین ردوکتاز را آشکار نمود.

پراکنش میزبانی توالیهای پروتئینی شبه گلوکاتایون ردوکتاز و تیوردوکسین ردوکتاز: واکاوی باکتریهای واجد توالی پروتئینی همگون با گلوکاتایون ردوکتاز و تیوردوکسین ردوکتاز، منجر به آشکارسازی ۱۵۰۰ توالی مشابه با همسانی، همپوشانی و ارزش E مناسب در

توالیهای پروتئینی آنزیمهای کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز را نشان داد (شکل ۴).

فراوانی و پراکنش توالیها و شبه توالیهای پروتئینی مقاومت در برابر استرسهای اکسیداتیو: بررسی حضور توالیها و شبه توالیهای پروتئینی مقاومت در برابر استرسهای اکسیداتیو در گونه‌های باکتریایی پایش شده، ضمن آنکه مبین حضور توالیهای TRXB1 و TRXR به ترتیب در ۲۲ و ۱۹ گونه باکتریایی با ارزش مناسب بود، حضور ۱ تا ۷ نوع از این توالیها را در باکتریهای ردیابی شده آشکار نمود (جدول ۵). همان طوری که در این جدول نمایش داده شده است، در محتوی ژنومی گونه باکتریایی *Lactobacillus acidophilus* تنها ۱ توالی، در حالی که در ژنوم گونه‌های *Lactobacillus pentosus*، *Pediococcus acidilactici* و *Lactobacillus plantarum* حضور ۷ توالی کدگذار احتمالی مرتبط با مقاومت به استرسهای اکسیداتیو آشکار شد.

شماره WP\_046871913.1 متعلق به گونه *Pediococcus damnosus* به TRXB1 و TRXR مشهود است.

پراکنش میزبانی توالیهای پروتئینی شبه کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز: واکاوی باکتریهای واجد توالی پروتئینی شبه کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز نیز منجر به آشکارسازی ۱۵۰۰ توالی مشابه با همسانی، همپوشانی و ارزش E مناسب در گونه‌هایی از جنس میزبانی و غیرمیزبانی دور و نزدیک شد. بررسی دقیق این نتایج مبین حضور توالی شبه پروتئینی KATA، KATE\*، KATE\*، SODA\* و SODA\* به ترتیب در گونه‌های مختلف از ۳،۳،۷ و ۸ جنس باکتریایی شد. بررسی قرابت توالیهای آشکار شده نزدیکی توالیهای پروتئینی با شماره‌های دستیابی WP\_007475878.1، WP\_005917332.1، WP\_036754612.1، WP\_026681693.1، CON88561.1 و WP\_0192443313.1 از جنسهای مختلف باکتریایی به

جدول ۵- فراوانی و پراکنش توالیهای مقاومت به استرس اکسیداتیو در سویه‌های باکتریایی (حضور و یا عدم حضور توالی پروتئینی با علامت + و -، حضور توالیهای پروتئینی با همسانی و یا همپوشانی کمتر یا مساوی ۷۰ درصد با علامت\*+ و بیشتر از ۷۰ درصد با علامت\*\*+ نمایش داده شده

(است)

| ردیف | نام باکتری                            | KATA | katE | KATE* | SODA | SODA* | GSHR | GSHR1 | GSHR4 | TRXR | TRXB1 |
|------|---------------------------------------|------|------|-------|------|-------|------|-------|-------|------|-------|
| ۱    | <i>Lactobacillus fabifermentans</i>   | -    | -    | -     | -    | -     | -    | ***   | -     | ***  | ***   |
| ۲    | <i>Lactobacillus plantarum 2025</i>   | -    | ***  | -     | -    | -     | -    | ***   | ***   | ***  | ***   |
| ۳    | <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> | -    | -    | -     | -    | -     | ***  | -     | +     | -    | +     |
| ۴    | <i>Lactobacillus plantarum</i>        | +    | ***  | -     | -    | -     | +    | ***   | ***   | ***  | ***   |
| ۵    | <i>Lactobacillus paraplantarum</i>    | -    | ***  | -     | -    | -     | -    | -     | ***   | -    | -     |
| ۸    | <i>Lactobacillus pentosus</i>         | +    | ***  | -     | -    | -     | +    | ***   | ***   | ***  | ***   |
| ۶    | <i>Lactobacillus salivarius</i>       | -    | -    | -     | -    | -     | -    | ***   | -     | -    | -     |
| ۷    | <i>Lactobacillus acidophilus</i>      | -    | -    | -     | -    | -     | -    | -     | -     | -    | +     |
| ۸    | <i>Lactobacillus versmoldensis</i>    | -    | ***  | -     | -    | -     | +    | +     | ***   | -    | -     |
| ۹    | <i>Lactobacillus farciminis</i>       | -    | -    | -     | -    | -     | -    | -     | ***   | ***  | -     |
| ۱۰   | <i>Pediococcus clausenii</i>          | -    | -    | -     | -    | -     | -    | +     | ***   | ***  | ***   |

|     |     |   |     |   |     |     |     |     |     |                                     |    |
|-----|-----|---|-----|---|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------------------------|----|
| *** | *** | - | -   | - | -   | -   | -   | -   | -   | <i>Pediococcus damnosus</i>         | ۱۱ |
| *** | *** | + | -   | + | -   | -   | -   | -   | -   | <i>Pediococcus pentosaceus</i>      | ۱۲ |
| *** | *** | + | +   | + | -   | -   | -   | *** | *** | <i>Pediococcus acidilactici</i>     | ۱۳ |
| *** | *** | + | -   | - | -   | -   | -   | +   | *** | <i>Lactobacillus casei</i>          | ۱۴ |
| *** | *** | + | -   | - | -   | -   | -   | -   | -   | <i>Lactobacillus paracasei</i>      | ۱۵ |
| -   | -   | - | -   | + | -   | -   | -   | *** | *** | <i>Lactobacillus fructivorans</i>   | ۱۶ |
| -   | -   | - | -   | + | -   | -   | -   | -   | -   | <i>Lactobacillus florum</i>         | ۱۷ |
| *** | *** | - | -   | - | -   | -   | -   | -   | -   | <i>Lactobacillus rhamnosus</i>      | ۱۸ |
| *** | *** | - | -   | - | -   | -   | -   | +   | *** | <i>Lactobacillus sakei</i>          | ۱۹ |
| *** | *** | - | +   | - | -   | -   | -   | -   | -   | <i>Lactobacillus malefermentans</i> | ۲۰ |
| *** | *** | - | +   | - | -   | -   | -   | -   | -   | <i>Lactobacillus oryzae</i>         | ۲۱ |
| *** | *** | - | -   | - | -   | -   | -   | +   | *** | <i>Lactobacillus curvatus</i>       | ۲۲ |
| *** | *** | + | +   | + | -   | -   | -   | -   | -   | <i>Lactobacillus brevis</i>         | ۲۳ |
| *** | *** | - | -   | - | -   | -   | -   | -   | -   | <i>Lactobacillus saerimneri</i>     | ۲۴ |
| *** | *** | - | -   | - | -   | -   | -   | -   | -   | <i>Lactobacillus suebicus</i>       | ۲۵ |
| -   | -   | - | -   | - | *** | -   | *** | -   | -   | <i>Streptococcus pneumoniae</i>     | ۲۶ |
| -   | -   | - | -   | - | -   | -   | *** | -   | -   | <i>Salinibacillus aidingensis</i>   | ۲۷ |
| -   | -   | - | -   | - | -   | -   | *** | +   | +   | <i>Bacillus subtilis</i>            | ۲۸ |
| -   | -   | - | -   | - | -   | -   | *** | +   | -   | <i>Bacillus tequilensis</i>         | ۲۹ |
| -   | -   | - | -   | - | *** | -   | -   | -   | -   | <i>Streptococcus thermophilus</i>   | ۳۰ |
| -   | -   | - | -   | - | *** | -   | -   | -   | -   | <i>Streptococcus vestibularis</i>   | ۳۱ |
| -   | -   | - | -   | - | -   | *** | -   | -   | -   | <i>Lactococcus lactis</i>           | ۳۲ |
| -   | -   | - | -   | - | -   | *** | -   | -   | -   | <i>Lactococcus garvieae</i>         | ۳۳ |
| -   | -   | - | -   | - | -   | *** | -   | -   | -   | <i>Lactococcus raffinolactis</i>    | ۳۴ |
| -   | -   | - | +   | - | -   | +   | -   | +   | +   | <i>Enterococcus faecalis</i>        | ۳۵ |
| -   | -   | - | +   | - | -   | +   | -   | +   | +   | <i>Enterococcus faecium</i>         | ۳۶ |
| -   | -   | - | *** | - | -   | -   | -   | -   | -   | <i>Weissella thailandensis</i>      | ۳۷ |
| -   | -   | - | *** | - | -   | -   | -   | -   | -   | <i>Leuconostoc citreum</i>          | ۳۸ |
| -   | -   | - | *** | - | -   | -   | -   | -   | -   | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>    | ۳۹ |
| -   | -   | - | *** | - | -   | -   | -   | -   | -   | <i>Leuconostoc fallax</i>           | ۴۰ |
| -   | -   | - | *** | - | -   | -   | -   | -   | -   | <i>Leuconostoc lactis</i>           | ۴۱ |
| *** | -   | - | -   | - | -   | +   | -   | -   | -   | <i>Tetragenococcus halophilus</i>   | ۴۲ |
| +   | -   | - | -   | - | -   | -   | -   | -   | -   | <i>Tetragenococcus muriaticus</i>   | ۴۳ |
| -   | -   | - | -   | - | -   | -   | -   | -   | *** | <i>Listeria fleischmannii</i>       | ۴۴ |
| -   | -   | - | -   | - | -   | -   | -   | -   | *** | <i>Bifidobacterium asteroides</i>   | ۴۵ |



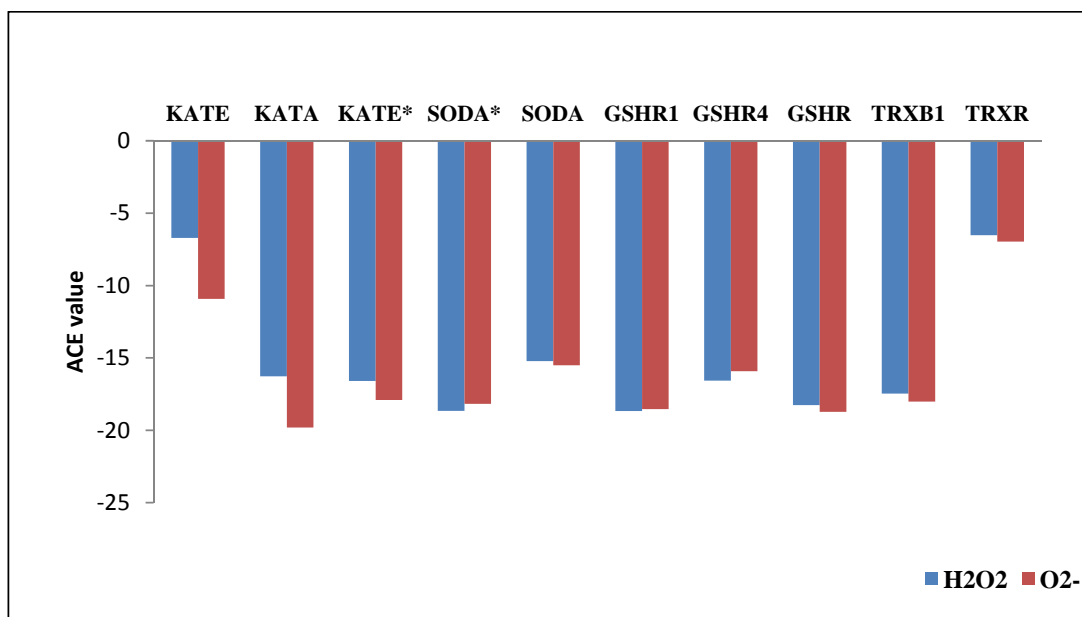
|   |   |   |   |   |     |   |   |   |     |   |    |
|---|---|---|---|---|-----|---|---|---|-----|---|----|
| - | - | - | - | - | -   | - | - | - | +++ | <i>Bifidobacterium sp. 7101</i>           | ۴۵ |
| - | - | - | - | - | -   | - | - | - | +++ | <i>Bifidobacterium actinocoloniiforme</i> | ۴۶ |
| - | - | - | - | - | -   | - | - | - | +++ | <i>Bifidobacterium bombi</i>              | ۴۷ |
| - | - | - | - | - | -   | - | - | - | +++ | <i>Weissella confusa</i>                  | ۴۸ |
| - | - | - | - | - | -   | - | - | - | +   | <i>Weissella hellenica</i>                | ۴۹ |
| - | - | - | - | - | +++ | - | - | - | -   | <i>Peptoniphilus lacrimalis</i>           | ۵۰ |
|   |   |   |   |   | +++ |   |   |   |     | <i>Bacillus megaterium</i>                | ۵۱ |
| - | - | - | - | - | -   | + | - | - | -   | <i>Veillonella ratti</i>                  | ۵۲ |
| - | - | - | - | - | -   | + | - | - | -   | <i>Bacillus massilioanorexius</i>         | ۵۳ |
| - | - | - | - | - | -   | + | - | - | -   | <i>Trichuris trichiura</i>                | ۵۴ |
| - | - | - | - | - | -   | + | - | - | -   | <i>Vagococcus lutrae</i>                  | ۵۵ |
| - | - | - | - | - | -   | + | - | - | -   | <i>Carnobacterium divergens</i>           | ۵۶ |

جهت تقویت قابلیت آنتی‌اکسیدانی سویه‌های پروبیوتیکی موجود را فراهم آورد، منجر به توسعه سویه‌های پروبیوتیکی نوین مبتنی بر پایش دامنه میزبانی این آنزیمها خواهد شد، که در این تحقیق در دستور کار قرار گرفته است. به‌طورکلی پایش مکانیسمهای مولکولی مقاومت در برابر استرسهای اکسیداتیو از ۷ گونه‌باکتریایی شاخص پروبیوتیکی آشکارسازی ۱۰ ژن کلیدی *kata* *katE* *katE*\* *soda* *soda*\* *trxR* *trxR* *atrxB1* *gshR* *gshR4* *gshR1* با قابلیت آنتی‌اکسیدانی و ویژگیهای ساختاری متفاوت را باعث شد (جدول ۱). نتایج حاصل از بررسی ویژگیهای ساختاری، فیزیوشیمیایی و توپولوژیکی محصول پروتئینی این ژنها (جدول ۱، ۲ و ۳)، منجر به معرفی KATE\* با بیشترین طول، بار منفی و ترش‌چی بودن انواع کاتالازها شد (جدول ۳)، که ممکن است قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالای KATE\* را (جدول ۱) با توجه به وابستگی حلالیت پروتئین با بار منفی و میل اتصالی بالا به عوامل اکسیدان (۱۸) توجیه‌پذیر نماید. در این رابطه می‌توان به قابلیت بیان خارج سلولی KATE\* در *Lactococcus lactis* و مقاومت ۸۰۰ برابری آن به استرسهای اکسیداتیو اشاره نمود (۳۱). در ادامه پایش ویژگیهای ساختاری و عملکردی توالیهای پروتئینی این ژنها منجر به

بحث و نتیجه‌گیری: شیوع بالای بیماریهای سرطانی و مرگ و میر ناشی از آن، منجر به ارائه راهکارهایی متنوع در جهت پیشگیری، تشخیص و درمان این نوع از بیماریها شده است (۱۷). در این میان توجه به فراوانی ۹۰ تا ۹۵ درصد عوامل سرطان‌زا در محیط زیست انسان، فرصتی مناسب در جهت پیشگیری از این بیماریها را فراهم می‌آورد (۲۲)، به طوری که اصلاح عوامل تغذیه‌ای و الگوی مصرف مواد غذایی به تنهایی قابلیت پیشگیری از ۳۰ درصد تا ۴۰ درصد از موارد ابتلاء سرطان را دارا می‌باشد (۲۴). در این راستا استفاده از پروبیوتیکها و جایگزینی باکتریهای مفید از طریق مکملهای غذایی جایگاه ممتازی در جهت پیشگیری از انواع سرطان به‌ویژه سرطانهای دستگاه گوارش پیدا نموده (۲۷ و ۳۵)، که این مهم مستلزم شناخت ویژگیهای آنزیمی پروبیوتیکها در پیشگیری از سرطان می‌باشد. در این میان حذف عوامل اکسیدان از جمله گونه‌های اکسیژن فعال یکی از قابلیت‌های اساسی سویه‌های پروبیوتیکی مبتنی بر حضور آنزیمهای آنتی‌اکسیداتیو باکتریایی در پیشگیری از بیماریهای التهابی و سرطانهای دستگاه گوارش می‌باشند (۹، ۳۰، ۳۱، ۳۷، ۴۲ و ۴۷). بنابراین شناخت دقیق و پایش ویژگیهای ساختاری و عملکردی این آنزیمها ضمن آنکه می‌تواند راهکاری در

دیگر در این پروفایل دمینی با نام Mn/Fe\_SOD در آنزیمهای سوپراکسیددیسموتاز آشکار شد، که قابلیت حذف گونه‌های اکسیژن فعال توسط آن در پروکاریوت‌ها، قارچها، جلبکهای سبزآبی و میتوکندری نیز گزارش شده است (۴۰). در ادامه پایش مولکولی آنزیمهای گلوتاتیونردوکتاز و تیوردوکسین ردوکتاز منجر به آشکارسازی دمین عملکردی OxRdtase-FAD/NAD در هر ۲ این آنزیمها شد، که این مهم ضمن اشاره بر نقش آنتی‌اکسیدانی آنها می‌تواند دلالت بر جد مشترک آنها داشته باشد، که قرابت یابی این آنزیمها مؤید این نکته نیز شد (شکل ۱).

آشکارسازی پروفایلی از دمین‌های عملکردی با قابلیت‌های متفاوت به‌ویژه توانایی حذف گونه‌های اکسیژن فعال شد (جدول ۴). در این راستا در ساختار پروتئینی کاتالازها علاوه بر دمین مؤثر در حذف گونه‌های فعال اکسیژن (جدول ۴)، دمینی با قابلیت تعدیل پاسخ ایمنی آشکار شد، که در سایر تحقیقات بر حضور این دمین و تحریک سلولهای T توسط کاتالازها تأکید شده است (۱۴). بنابراین کاتالازهای مورد بررسی این تحقیق با عملکرد دوگانه حذف گونه‌های اکسیژن فعال و القای پاسخ ایمنی، محصولی کارآمد در پیشگیری از بیماریهای سرطانی محسوب شده که می‌تواند در توسعه پروبیوتیکها مورد استفاده قرار گیرند. از سویی



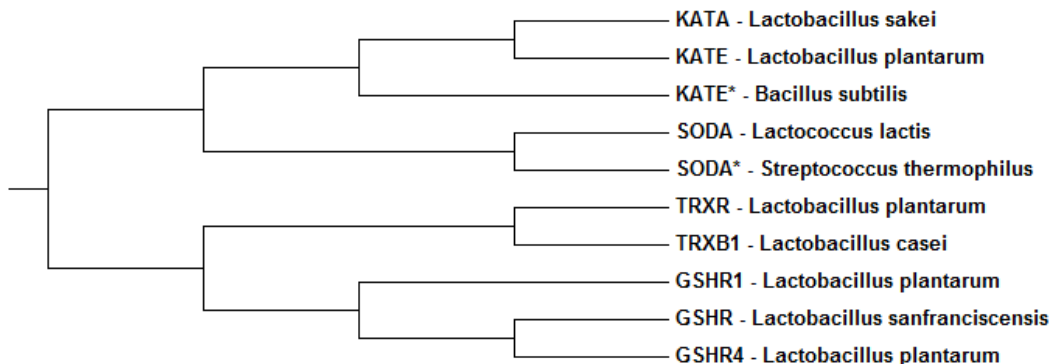
شکل ۱- مقایسه ارزش انرژی تماس اتمی پروتئینهای آنتی‌اکسیداتیو با  $H_2O_2$  و  $O_2^-$  بر اساس ACE.

گلوتاتیونردوکتاز و تیوردوکسین ردوکتاز در جنسهای غیرمیزبانی *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella* و *Tetragenococcus* شد، که در این میان قرابت شبه توالی مستقر در دو گونه *Tetragenococcus halophilus* و *Tetragenococcus muriticus* با TRXB1 و TRXR مشهود بود (شکل ۳). بنابراین حضور *T. halophilus* در طول تخمیر انواع غذاهایی تخمیری و شور (۳۸)، می‌تواند ناشی از حضور توالی شبه تیوردوکسینردوکتاز در این

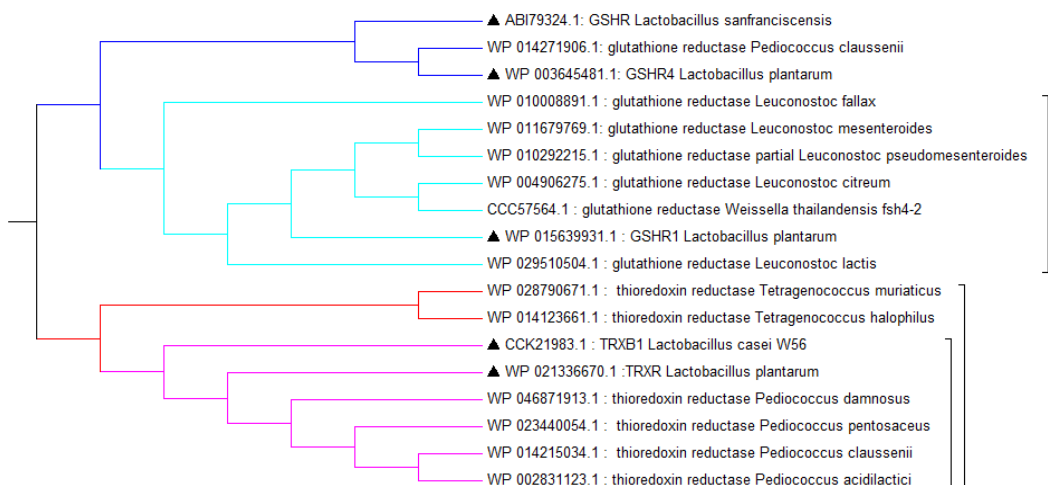
علاوه بر پایش ویژگیهای ساختاری و عملکردی آنزیمهای انتخابی، قابلیت آنتی‌اکسیدانی آنها با تعیین میل اتصالی این آنزیمها به گونه‌های فعال اکسیژن صورت پذیرفت، که حاکی از میل بالای این آنزیمها به ویژه KATA به مولکول  $O_2^-$  بود (شکل ۲)، با این وجود در سایر گزارشها به نقش کاتالازها برای تجزیه  $H_2O_2$  تأکید بیشتری شده است (۴۳ و ۴۴). از سوی دیگر پایش دامنه میزبانی آنزیمهای انتخابی منجر به آشکارسازی حضور توالیهای پروتئینی شبه

مقاومت به استرس اکسیداتیو این باکتری باشد، کاربری گسترده آن در طیف گسترده‌ای از محصولات لبنی تخمیری (۲۶) را نیز توجیه‌پذیر می‌سازد.

باکتری باشد که کمتر مورد توجه قرار گرفته است. از سوی دیگر آشکار شدن حضور شبه توالی گلوکاتایون‌ردوکتاز درجنس باکتریایی *Leuconostoc* ضمن آنکه می‌تواند مبین



شکل ۲- قرابت توالی پروتئینی ژنهای مقاومت به استرسهای اکسیداتیو مشتق از گونه‌های مختلف باکتریایی پروبیوتیکی.



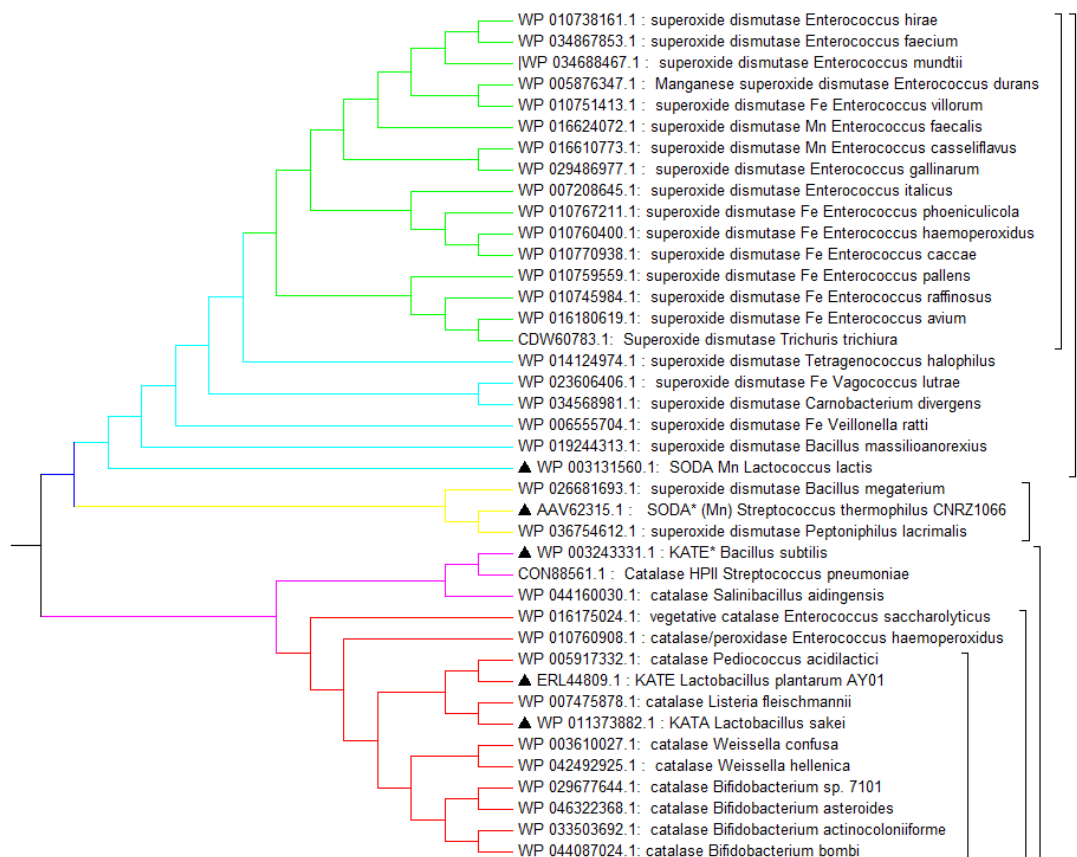
شکل ۳- قرابت توالیهای پروتئینی ژنهای مقاوم به استرسهای اکسیداتیو به توالیهای پروتئینی TRXR, TRXB1, GSHR, GSHR4, GSHR1 (▲) پروتئین همگون‌یابی شده)

توالی پروتئینی قابل اشتقاق از *Pediococcus damnosus* با گلوکاتایون‌ردوکتاز و تیوردوکسین‌ردوکتاز (شکل ۳)، ضمن کاربری گسترده این باکتری در صنایع تخمیری (۶ و ۳۳) قابلیت مقاومت این گونه در برابر استرسهای اکسیداتیو را نیز توجیه‌پذیر می‌سازد. علاوه بر این پایش دامنه میزبانی کاتالازها، منجر به آشکارسازی قرابت نزدیک KATE\* با پروتئینی با نام سودوکاتالاز در گونه باکتریایی *Streptococcus pneumonia* شد (شکل ۴) که قابلیت

در همین راستا اخیراً قابلیت پروبیوتیکی گونه *Leuconostoc mesenteroides* این جنس تحت شرایط شوری و دمای پایین گزارش شده است (۴۵). بنابراین براساس کاربرد این باکتری در شرایط استرس شوری، دمای پایین، و داشتن ویژگی مقاوم به اسید و به‌ویژه دارا بودن مقاومت احتمالی به استرس اکسیداتیو این گونه می‌تواند کاندید مناسب پروبیوتیکی باشد که تا کنون مورد توجه قرار نگرفته است. از سوی دیگر قرابت نزدیک شبه

*Listeria fleischmannii* با توانایی منحصر به فرد تخمیر D-مانیتول و D-گزیلوز (۷) می‌تواند کاندید مناسب پروبیوتیکی با خواص آنتی‌اکسیداتیو باشد.

بیماری‌زایی آن قبلاً مشخص شده است (۲۱). همچنین همگونی‌یابی توالیهای شبه KATA و KATE قرابت نزدیک آنها با شبه‌توالی‌هایی در گونه‌هایی از جنس باکتریایی *Listeria* را آشکار نمود (شکل ۴) که در این میان گونه



شکل ۴- قرابت توالی‌های پروتئینی ژنهای مقاوم به استرس‌های اکسیداتیو به توالی‌های پروتئینی KATA، KATE، KATE\*، SODA و SODA\*▲: پروتئین همگون‌یابی شده.

اکسیداتیو در محتوی ژنومی این باکتری شد (جدول ۵)، که کارآمدی بالای این باکتری در مقاومت به استرس‌های متفاوت را ممکن است توجیه پذیر نماید. ادامه پیش‌های میزبانی منجر به آشکارسازی اهمیت آنزیم‌های TRXB1 و TRXR نسبت به سایر آنزیم‌های مورد بررسی در این تحقیق در نتیجه دامنه گسترده میزبانی آنها شد، به طوری که شبه‌توالی این آنزیم‌ها به ترتیب در ۲۲ و ۱۹ گونه باکتریایی با قابلیت آنتی‌اکسیداتیو مطرح (۱، ۱۱، ۳۴ و ۳۶)، واکاوی شد (جدول ۵). همچنین آشکار سازی

از سوی دیگر وجود توالی شبه KATE با قرابت نزدیک در گونه باکتریایی *Pediococcus acidilactici* (شکل ۴)، می‌تواند کاربردی بودن این باکتری را نشان دهد، در همین ارتباط قابلیت مقاومت به استرس‌های دمایی، صفراوی، اسیدی، pH، فشار اسمزی و توانایی تولید پپتیدهای ضد میکروبی توسط این باکتری آن را به عنوان باکتری کاربردی در صنایع غذایی و پروبیوتیکی مطرح نموده است (۵، ۲۵ و ۲۸). در ادامه پایش توالی‌های آنتی‌اکسیداتیو منجر به آشکارسازی ۷ توالی شبه آنزیمی مقاوم به استرس‌های

تولید می‌کند (۱۹). به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق ضمن آشکارسازی دمین‌های عملکردی در آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو، منجر به معرفی گونه‌های باکتریایی با قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالا مبتنی بر حضور توالیهای شبه آنزیمی در محتوی ژنومی آنها و نیز تأکیدی بر قابلیت‌های نقش برخی از باکتری مبتنی بر حضور این نوع از توالیها شد که تا کنون به آن پرداخته نشده بود.

حضور ۷ توالی شبه آنزیمی در محتوی ژنومی گونه‌های *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus pentosus* افزون بر *Pediococcus acidilactici* از نتایج این تحقیق بود، که این موضوع می‌تواند هم راستا با قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالای *Lactobacillus plantarum* باشد، به طوری که بر اساس گزارشها در طول دوره رشد، این باکتری آنتی‌اکسیدانهایی معادل با تقریباً ۱۰۰mg ویتامین C

## منابع

- Ahotupa M, S. M., Korpela R (1996). "Antioxidant properties of lactobacillus GG." *Nutr Today Suppl* 31:51-52.
- Amaretti, A., M. di Nunzio, et al. (2013). "Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities." *Appl Microbiol Biotechnol* 97(2): 809-817.
- An, H., H. Zhou, et al. (2010). "High-level expression of heme-dependent catalase gene katA from *Lactobacillus Sakei* protects *Lactobacillus rhamnosus* from oxidative stress." *Mol Biotechnol* 45(2): 155-160.
- Barber, D. A. and S. R. Harris (1994). "Oxygen free radicals and antioxidants: a review." *Am Pharm NS34*(9): 26-35.
- Barros, R. R., M. G. Carvalho, et al. (2001). "Phenotypic and genotypic characterization of *Pediococcus* strains isolated from human clinical sources." *J Clin Microbiol* 39(4): 1241-1246.
- Bergsveinson, J., V. Pittet, et al. (2012). "RT-qPCR analysis of putative beer-spoilage gene expression during growth of *Lactobacillus brevis* BSO 464 and *Pediococcus clausenii* ATCC BAA-344(T) in beer." *Appl Microbiol Biotechnol* 96(2): 461-470.
- Bertsch, D., J. Rau, et al. (2013). "*Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese." *Int J Syst Evol Microbiol* 63(Pt 2): 526-532.
- Bolotin, A., P. Wincker, et al. (2001). "The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403." *Genome Res* 11(5): 731-753.
- Bruno-Barcelona, J. M., J. M. Andrus, et al. (2004). "Expression of a heterologous manganese superoxide dismutase gene in intestinal lactobacilli provides protection against hydrogen peroxide toxicity." *Appl Environ Microbiol* 70(8): 4702-4710.
- Bruno-Barcelona, J. M., M. A. Azcarate-Peril, et al. (2010). "Role of antioxidant enzymes in bacterial resistance to organic acids." *Appl Environ Microbiol* 76(9): 2747-2753.
- Choi, S. S., Y. Kim, et al. (2006). "Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro." *Lett Appl Microbiol* 42(5): 452-458.
- Elad, S., Y. Zadik, et al. (2010). "A systematic review of viral infections associated with oral involvement in cancer patients: a spotlight on Herpesviridae." *Support Care Cancer* 18(8): 993-1006.
- Gupta, V. and R. Garg (2009). "Probiotics." *Indian J Med Microbiol* 27(3): 202-209.
- Guy, B., T. Krell, et al. (2005). "Do Th1 or Th2 sequence motifs exist in proteins? Identification of amphipatic immunomodulatory domains in *Helicobacter pylori* catalase." *Immunol Lett* 96(2): 261-275.
- Halliwell, B. (1996). "Mechanisms involved in the generation of free radicals." *Pathol Biol (Paris)* 44(1): 6-13.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1): 57-70.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2010). "Cancer statistics, 2010." *CA Cancer J Clin* 60(5): 277-300.
- Kramer, R. M., V. R. Shende, et al. (2012). "Toward a molecular understanding of protein solubility: increased negative surface charge correlates with increased solubility." *Biophys J* 102(8): 1907-1915.
- Kuczowska, K., G. Mathiesen, et al. (2015). "*Lactobacillus plantarum* displaying CCL3 chemokine in fusion with HIV-1 Gag derived antigen causes increased recruitment of T cells." *Microb Cell Fact* 14(1): 169.

- 20- Kullisaar, T., M. Zilmer, et al. (2002). "Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics." *Int J Food Microbiol* 72(3): 215-224.
- 21- Kyte, J. and R. F. Doolittle (1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." *J Mol Biol* 157(1): 105-132.
- 22- La Vecchia, C., E. Negri, et al. (1991). "Dietary indicators of oral and pharyngeal cancer." *Int J Epidemiol* 20(1): 39-44.
- 23- Lee, J., K. T. Hwang, et al. (2005). "Resistance of *Lactobacillus plantarum* KCTC 3099 from Kimchi to oxidative stress." *J Med Food* 8(3): 299-304.
- 24- Marmot M, A. T., Byers T, Chen J, Hirohata T, Jackson A, James W, and K. S. Kolonel L, Leitzmann C (2007). "Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective." Washington, DC: AICR. p 46.
- 25- Mikulski, D., J. Jankowski, et al. (2012). "Effects of dietary probiotic (*Pediococcus acidilactici*) supplementation on performance, nutrient digestibility, egg traits, egg yolk cholesterol, and fatty acid profile in laying hens." *Poult Sci* 91(10): 2691-2700.
- 26- Ogier, J. C., E. Casalta, et al. (2008). "Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus." *Int J Food Microbiol* 126(3): 286-290.
- 27- Papadimitriou, K., G. Zoumpopoulou, et al. (2015). "Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches." *Front Microbiol* 6: 58.
- 28- Papagianni M, A. S. (2009). "Encapsulation of *Pediococcus acidilactici* cells in corn and olive oil microcapsules emulsified by peptides and stabilized with xanthan in oil-in-water emulsions: studies on cell viability under gastrointestinal simulating conditions." *Enzyme Microb Tech.* 2009; 45: 514-522.
- 29- Parke, D. V. and C. Ioannides (1990). "Role of cytochromes P-450 in mouse liver tumor production." *Prog Clin Biol Res* 331: 215-230.
- 30- Rochat, T., L. Bermudez-Humaran, et al. (2007). "Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice." *Microb Cell Fact* 6: 22.
- 31- Rochat, T., A. Miyoshi, et al. (2005). "High-level resistance to oxidative stress in *Lactococcus lactis* conferred by *Bacillus subtilis* catalase KatE." *Microbiology* 151(Pt 9): 3011-3018.
- 32- Saikali, J., C. Picard, et al. (2004). "Fermented milks, probiotic cultures, and colon cancer." *Nutr Cancer* 49(1): 14-24.
- 33- Sakamoto, K. and W. N. Konings (2003). "Beer spoilage bacteria and hop resistance." *Int J Food Microbiol* 89(2-3): 105-124.
- 34- Serata, M., T. Iino, et al. (2012). "Roles of thioredoxin and thioredoxin reductase in the resistance to oxidative stress in *Lactobacillus casei*." *Microbiology* 158(Pt 4): 953-962.
- 35- Serban, D. E. (2013). "Gastrointestinal cancers: Influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics." *Cancer Lett.*
- 36- Serrano, L. M., D. Molenaar, et al. (2007). "Thioredoxin reductase is a key factor in the oxidative stress response of *Lactobacillus plantarum* WCFS1." *Microb Cell Fact* 6: 29.
- 37- Stein, K., A. Borowicki, et al. (2012). "Effects of synbiotic fermentation products on primary chemoprevention in human colon cells." *J Nutr Biochem* 23(7): 777-784.
- 38- Takashi Kudaa, , Yukino Izawaa, Saori Yoshidaa, Takashi Koyanagib, Hajime Takahashia, Bon Kimuraa (2013). "Rapid identification of *Tetragenococcus halophilus* and *Tetragenococcus muriaticus*, important species in the production of salted and fermented foods, by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)."
- 39- Trush, M. A. and T. W. Kensler (1991). "An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis." *Free Radic Biol Med* 10(3-4): 201-209.
- 40- Vanaporn, M., M. Wand, et al. (2011). "Superoxide dismutase C is required for intracellular survival and virulence of *Burkholderia pseudomallei*." *Microbiology* 157(Pt 8): 2392-2400.
- 41- Vuillaume, M. (1987). "Reduced oxygen species, mutation, induction and cancer initiation." *Mutat Res* 186(1): 43-72.
- 42- Watterlot, L., T. Rochat, et al. (2010). "Intragastric administration of a superoxide dismutase-producing recombinant *Lactobacillus casei* BL23 strain attenuates DSS colitis in mice." *Int J Food Microbiol* 144(1): 35-41.
- 43- Zamocky, M., P. G. Furtmuller, et al. (2008). "Evolution of catalases from bacteria to

- humans." *Antioxid Redox Signal* 10(9): 1527-1548.
- 44- Zamocky, M., B. Gasselhuber, et al. (2012). "Molecular evolution of hydrogen peroxide degrading enzymes." *Arch Biochem Biophys* 525(2): 131-144.
- 45- Zanirati, D. F., M. Abatemarco, Jr., et al. (2014). "Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures." *Anaerobe* 32C: 70-76.
- 46- Zhang, Y. and Y. Li (2013). "Engineering the antioxidative properties of lactic acid bacteria for improving its robustness." *Curr Opin Biotechnol* 24(2): 142-147.
- 47- Zhong, L., X. Zhang, et al. (2014). "Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer." *World J Gastroenterol* 20(24): 7878-7886.

## An *in-silico* characterization of the structure, function and hosting of the antioxidative enzymes of the bacterial microorganisms

Gholampour-Faraji N.<sup>1</sup>, Haddad-Mashadrizesh A.A.<sup>2,3</sup> and Dolatabadi S.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Biology Dept., Khorasan Razavi Science and Research Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Cell and Molecular Biotechnology Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran

<sup>3</sup> Biology Dept., Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran

<sup>4</sup> Biology Dept., Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, I.R. of Iran

### Abstract

Reactive oxygen species, which lead to oxidative stress and related diseases via both intra- and extracellular pathways, could be identified and cleaning through some of the bacterial enzymes. Bearing in mind, the assessment of the structure, function and hosting of the antioxidative enzymes while lead to disclose species of bacteria with probiotics capability, provides approaches to designing genetics constructs. In this regard, the nucleotide and protein sequences of the *kata*, *katE*, *katE\**, *soda*, *soda\**, *gshR*, *gshR1*, *gshR4*, *trxB1* and *trxR* genes were retrieved from databases. Then the structural, functional, topological and physicochemical properties of the protein sequences of related enzymes were investigated. Moreover, their hosting in bacterial microorganisms were explored. The results of this study whilst disclosed the physicochemical properties of these enzymes reveal that KATE, KATA, KATE\* and SODA are secretory capacity. Structural monitoring of these enzymes introduced collaborative and pragmatic domains with the ability to remove reactive oxygen species, hydrogen peroxide decomposition and regulation of redox reactions as well as immunomodulatory effects and ammonia removal in some of them. In this regard, examination the binding affinity of these enzymes to oxidant agents revealed high binding affinity of them, in particular KATA, to O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Additionally, checking the host of these enzymes revealed the presence of homologous sequences especially sequences like to TRXB1 and TRXR in different species of *Weissella*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Tetragenococcus*, *Peptoniphilus* and *Listeria*. Meanwhile, similarity search lead to detection seven encoding sequences with antioxidative capacity in the genomic context of the *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum*.

**Key words:** Reactive oxygen species, oxidative stress, cancer, antioxidative enzymes, probiotics