بررسی اثر پلاسمای سرد فشار اتمسفری بر روی فعالیت آنزیم فیتاز

مهسا فراست(۱)، ساره ارجمند(۲)، سید امید رعنایی سیادت(۲)، حمیدرضا قمی مرزدشتی(۱)، یحیی سفید بخت(۲)

۱- ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، پردیس عمومی، پژوهشکده لیزر و پلاسما

۲- ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، پردیس عمومی، مرکز تحقیقات پروتئین

چکیده - **فیتاز یکی از آنزیمهای پرکاربرد صنعتی است که با تولید فسفات غیرآلی در بهبود استفاده از منابع فسفر در غذای دام کارایی دارد و افزایش فعالیت این آنزیم از نظر تجاری بسیار ارزشمند است. پلاسمای سرد فشار اتمسفری روشی است که میتواند اثراتی را بر روی ساختار پروتئینها ایجاد کند و فعالیت آنها را افزایش یا کاهش دهد. در این مقاله اثر پلاسمای سرد فشار اتمسفری جت هلیم بر روی آنزیم فیتاز بررسی شده است. به این منظور محلول آنزیم فیتاز در زمانهای مختلف با استفاده از پلاسمای سرد فشار اتمسفری تیمار و فعالیت آن اندازه گیری شد. نتایج نشان دهنده‌ی افزایش فعالیت فیتاز با زمان پلاسمادهی و عدم تاثیر pH مورد بررسی در روند اثر گذاری پلاسمای سرد بود.**

کلید واژه- آنزیم فیتاز، پلاسمای سرد فشار اتمسفری، جت هلیم، فعالیت آنزیمی

Effect of Atmospheric pressure plasma on phytase enzyme activity

Mahsa Farasat(1), Sareh Arjmand(2), Omid Ranaei siadat(2), Hamidreza Ghomi marzdashti(1), Yahya Sefidbakht(2)

1- Laser Plasma Institute, G. C., Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
2- Protein Research Center, G. C., Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Abstract- Phytase is one of the valuable industrial enzyme which is applied in the improvement of animal feed by providing non-organic phosphate. Increasing the phytase enzyme activity is commercially worthwhile. Using atmospheric pressure cold plasma is a strategy which could change protein activity by affecting their structures. In this study the effect of Helium plasma jet on phytase enzyme was investigated. For this purpose, phytase enzyme solution was treated with plasma in different time durations and enzyme activity was evaluated. The obtained results indicated the increase in enzyme activity which was positively related to the exposure time, and lack of pH effect on the trends of plasma treatment results.

Keywords: Phytase Enzyme, Atmospheric Pressure Cold Plasma, Helium Jet, Enzyme Activity

۱- مقدمه

پلاسما به عنوان حالت چهارم ماده معرفی می‌شود و به دو گروه پلاسمای حرارتی و پلاسمای غیر حرارتی تقسیم بندی می‌شود. در پلاسمای حرارتی (گرم) تعادل حرارتی بین الکترون‌ها و یون‌ها وجود دارد در صورتی که در پلاسمای غیر حرارتی (سرد) اختلاف دمایی زیادی بین یون‌ها و الکترون‌ها وجود دارد [1]. در ابتدا پلاسمای سرد فقط در فشار پایین تولید می‌شد ولی با پیشرفت و گسترش فیزیک پلاسما پلاسمای سرد در فشار اتمسفر هم تولید شد که به خاطر راحتی در استفاده و مقرون به صرفه بودن بسیار مورد توجه قرار گرفت این نوع پلاسما قادر به ایجاد گونه‌های فعال ROS وRNS در فشار اتمسفر و دمای پایین می‌باشد. پلاسمای سرد اتمسفریک (ACP) یک تکنولوژی امید بخش و موثر در زمینه‌های مختلف زیست‌شناسی و زیست‌پزشکی است. مطالعات نشان داده است که این تکنولوژی عملکرد قابل توجهی در موارد مختلف از جمله انعقاد خون [2]، درمان بافتهای زنده [3]، تکثیر سلولی [4]، آپوپتوز سلولهای سرطانی [5] و غیره دارد. تعداد زیادی از عملکردهای منسوب به ACP مربوط به اثر پلاسما روی واحدهای پروتئینی است.

پروتئینها حاملهای عملکردهای زیستی هستند و عملکرد پلاسمای سرد اتمسفری روی پروتئینها در کاربردهایی مانند استریل کردن محیط، القای مرگ سلولهای سرطانی، و همچنین افزایش یا کاهش عملکرد آنزیمها در محیطهای غیر زیستی، بسیار اهمیت یافته است. مکانیسمهای مختلفی برای اثر پلاسما روی فعالیت زیستی پیشنهاد شده است و برای دستیابی به بینش بیشتر نیازمند مطالعه برهمکنش ACP در سطح مولکولی هستیم. فیتیک اسید و نمک‌های آن (فیتات ها) جزء مهمی از غلات، حبوبات ، دانه‌های روغنی و بعضی از میوه‌ها و سبزیجات و همچنین خاک هستند. ۸۰ درصد فسفر کلی برای حیوانات تک معده مانند ماهی به صورت غیر قابل هضم است. برای حل این مشکل به جیره غذایی دام آنزیم فیتاز اضافه می‌شود. فیتاز یکی از آنزیمهای پرکاربرد صنعتی است که با هیدرولیز باندهای فسفودی-استری در فیتات و تولید فسفات غیرآلی در بهبود استفاده از منابع فسفر در غذای دام و همچنین کاهش آلودگی زیست محیطی ناشی از کود آنها کارایی دارد و افزایش فعالیت این آنزیم از نظر تجاری بسیار ارزشمند است.

هدف از انجام این تحقیق بررسی تاثیر تیمار ACP برروی فعالیت آنزیم تجاری فیتازاست.

۲- روش کار

۲-۱- مواد و محلول‌ها

آنزیم فیتاز تجاری مشتق از قارچ *آسپرژیلوس نایجر* از کمپانی Novozyme دانمارک خریداری شد. سدیم استات، سدیم کربنات، آمونیوم هپتامولیبدات، اسید سولفوریک ۹۵-۹۸ درصد، استیک اسید، استون از کمپانی Merck آلمان خریداری شدند. از گاز هلیوم ۹۹,۹۹۹٪ برای تشکیل پلاسما استفاده شد.

۲-۲- ساخت منبع تغذیه

جت پلاسما یکی از دستگاه‌های تولید کننده پلاسمای سرد فشار اتمسفری است جت‌ها با توجه به ساختار الکترودهای آنها و منبع تغذیه‌ای که به آنها اعمال می‌شود دارای ویژگی‌های متفاوتی است. در این تحقیق از جت پلاسمای تک الکترود با منبع تغذیه DC پالسی استفاده شد. ساختار جت پلاسمای استفاده شده شامل یک لوله‌ی کوارتز به عنوان دی الکتریک بود. یک سیم مسی به عنوان الکترود روی قسمت بیرونی لوله‌ی کوارتز و به فاصله‌ی ۱ سانتی متر از انتهای لوله چسبانده شده و قسمت بالایی سیم به ولتاژ مثبت وصل شده بود. گاز هلیم توسط شیلنک به داخل لوله‌ی کوارتز هدایت و جت پلاسما از انتهای لوله خارج می‌شد. منبع تغذیه استفاده شده دارای ولتاژ ۱۱ کیلوولت و فرکانس ۱۰ کیلوهرتز بود.و حدود دمای پلاسما ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد است.

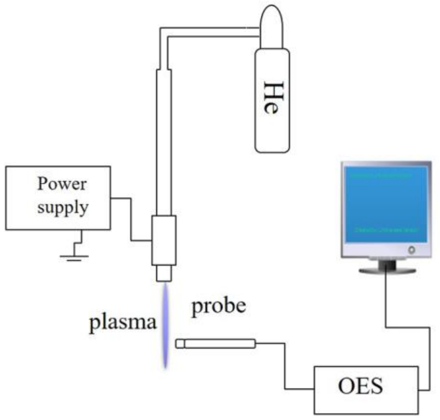
۲-۳- ریخت شناسی پلاسما

جهت بررسی عوامل و گونه‌های فعال درون پلاسما از طیف OES[1] استفاده شد. به این صورت که فیبر اپتیکی به صورت موازی مقابل جت پلاسما (همان ناحیه‌ای که به نمونه‌ها اثر داده شد) قرار داده شد و طیف حاصل از آن

---

[1] Optical Emission Spectroscopy

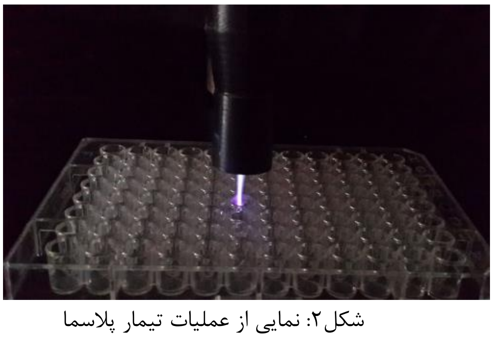
در طول موجهای ۲۰۰ تا ۱۱۰۰ توسط رایانه ثبت شد. شکل ۱ شمایی از جت پلاسمای ساخته شده را نشان می‌دهد.



شکل۱: شمایی از جت پلاسما

۲-۴- عملیات تیمار با پلاسما

محلول آنزیم فیتاز با غلظت g/ml ۰/۱ در بافر سدیم استات (pH ۵/۵) تهیه شد. ۳۰۰ ماکرولیتر از محلول آنزیمی درون هر یک چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد و با فاصله ۱ سانتی‌متر تحت تابش پلاسما در مدت زمان‌های ۶۰، ۱۲۰، ۲۴۰، ۳۶۰ ثانیه قرار گرفت. پس از آن سنجش فعالیت آنزیم با روش رنگ سنجی انجام شد. عملیات تیمار با پلاسما به دو صورت مستقیم و غیر مستقیم انجام شد. در حالت مستقیم ACP مستقیما به محلول آنزیم و بافر اعمال شد و در حالت غیر مستقیم ACP به بافر اعمال می‌شود و سپس پودر آنزیم به آن اضافه شد. شکل۲ نمایی از تیمار پلاسما رانشان می‌دهد.



شکل۲: نمایی از عملیات تیمار پلاسما

۲-۵- سنجش فعالیت آنزیم

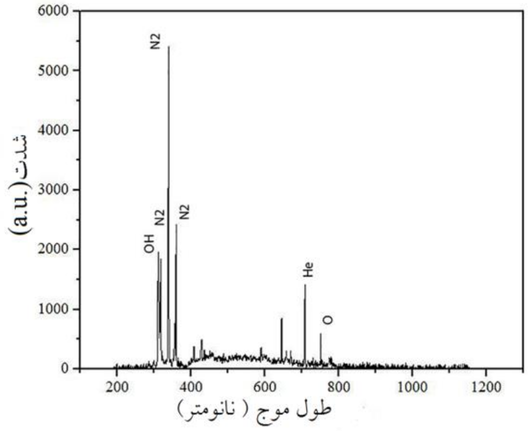
سنجش فعالیت فیتاز با استفاده از روش رنگ سنجی، و مطابق آنچه قبلا توسط Heinonen و همکارانش معرفی شده بود، انجام شد [6]. به طور خلاصه، محلول فیتیک اسید ۲۰ میلی مولار به عنوان سوبسترا و محلول ۲۰۰ میلی مولار سدیم استات با pH ۵/۵ به عنوان بافر استفاده شد. محلول واکنش شامل ۵۰ ماکرولیتر محلول آنزیمی بود که درون ۴۵۰ ماکرولیتر بافر حل شده بود. ۵۰۰ ماکرولیتر فیتیک اسید به عنوان سوبسترا به آن اضافه شد و برای همدما شدن درون حمام آب با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن ۲ میلی‌لیتر محلول رنگی AMS ((w/v) ۰/۳٪ آمونیوم هپتامولیبدات، (v/v) ۵۰٪ استون، (v/v) ۲۵٪ اسیدسولفوریک ۵ نرمال ۹۵-۹۸ درصد) به آن اضافه شد. برای متوقف کردن واکنش از ۱۰۰ ماکرولیتر اسیداستیک استفاده شد. در نهایت جذب توسط اسپکترومتر در طول موج ۳۸۰ نانومتر خوانده شد.

۲-۶- اثر pH

برای مطالعه اثر pH محلول آنزیمی بر روی نتایج بدست آمده از اعمال پلاسما، آنزیم فیتاز در بافرPBS (pH ۷/۲) حل شد و مراحل مربوط به تیمار پلاسما و سنجش فعالیت آنزیم تکرار گردید.

۳- نتایج

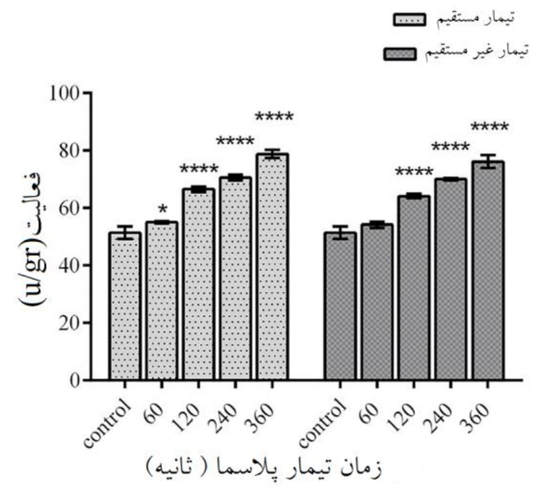
نتایج مربوط به طیف OES در شکل ۳ نشان داده شده است. طیف شامل قله‌هایی در طول موجهای ۳۰۹ ، ۳۱۵ ، ۳۳۷، ۳۵۷ نانومتر است که مربوط به N_2 می‌باشد. همچنین یک قله در ۷۰۶ نانومتر که مربوط به هلیم و یک قله در ۷۷۰ نانومتر که مربوط به O می‌باشد، ملاحظه گردید.



شکل ۳: طیف گسیلی از پلاسمای هلیم در هوا.

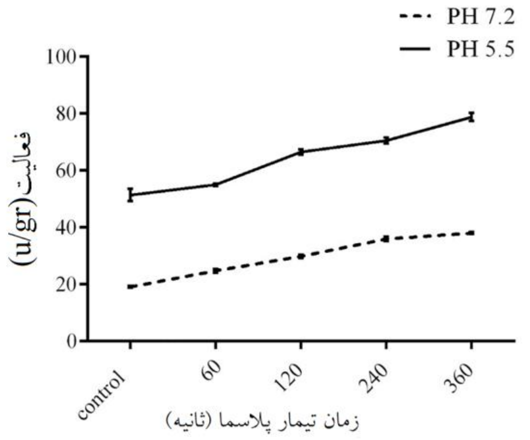
نتایج مربوط به بررسی اثر تیمار ACP به صورت مستقیم و غیرمستقیم و همچنین اثر مدت زمان تیمار پلاسما روی

فعالیت پروتئین فیتاز در شکل شماره ۴ نشان داده شده است.



شکل۴ : بررسی اثر مستقیم و غیر مستقیم تیمار با ACP در مدت زمانهای مختلف بر روی فعالیت آنزیم. هر تیمار سه بار تکرار شده است و معنی دار بودن نتایج نسبت به کنترل با $p< 0.05$ (*) و $p<0.0001$ (****) نشان داده شده است.

اثر pH محیط روی نتایج به دست آمده مربوط به تیمار با ACP در شکل شماره۵ نشان داده شده است.



شکل۵: بررسی اثر pH بر روی نتایج تیمار با پلاسما. افزایش pH سبب کاهش کلی در فعالیت آنزیم شده است اما روند تغییرات ناشی از تیمار با ACP مشابه است.

۴- بحث و نتیجه گیری :

نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از تیمار ACP در محلول آنزیمی فیتاز باعث افزایش فعالیت آنزیم شده و افزایش زمان تیمار تا مدت زمان ۳۶۰ ثانیه اثر مثبتی روی این میزان افزایش داشته است. بررسیهای طیف سنجی مربوط به ریخت شناسی پلاسما نشان داد که جت پلاسمای تهیه شده انواع یونها و رادیکالهای آزاد را در فاز گازی تولید می‌کند. بر اساس مطالعات پیشین این رادیکالهای آزاد و یونها می‌توانند با آب واکنش دهند و انواع مختلفی از گونه‌های فعال با طول عمر کوتاه و بلند را تولید کنند که قادر به ایجاد انواع واکنشهای زیستی هستند. بعضی از انواع گونه‌های با طول عمر طولانی عبارتند پراکسیدهیدروژن (H_2O_2)، ازن (O_3)، و یون نیترات (NO_2^-)، و گونه‌های با طول عمر کوتاه مانند رادیکال هیدروکسیل (OH^-)، سوپراکسید (O_2^-)، و اکسیژن تکی[۷] تیمار به صورت مستقیم برروی محلول آنزیمی یا غیرمستقیم برروی بافر- قبل از حل کردن آنزیم- منجر به نتایج مشابهی شده است و تفاوت جزئی در نتایج می‌تواند به علت علکرد اثرات گونه‌های فعال با طول عمر کوتاه در روش مستقیم باشد. نتیجه بررسی اثر pH نشان داد که هرچند فیتاز به طور کلی در بافر اسیدی فعالیت بهتری دارد اما روند تغییرات مربوط به تیمار با ACP در هر دو pH بررسی شده مشابه است.

مراجع:

[1] A. Segat, N. N. Misra, P. J. Cullen, and N. Innocente, “Effect of atmospheric pressure cold plasma (ACP) on activity and structure of alkaline phosphatase,” *Food Bioprod. Process.*, vol. 98, pp. 181–188, 2016.

[2] S. P. Kuo *et al.*, “Contribution of a portable air plasma torch to rapid blood coagulation as a method of preventing bleeding,” *New J. Phys.*, vol. 11, 2009.

[3] D. Dobrynin, G. Fridman, G. Friedman, and A. Fridman, “Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue,” *New J. Phys.*, vol. 11, 2009.

[4] S. Kalghatgi *et al.*, “Effects of non-thermal plasma on mammalian cells,” *PLoS One*, vol. 6, no. 1, pp. 1–11, 2011.

[5] H. M. Joh, J. Y. Choi, S. J. Kim, T. H. Chung, and T.-H. Kang, “Effect of additive oxygen gas on cellular response of lung cancer cells induced by atmospheric pressure helium plasma jet,” *Sci. Rep.*, vol. 4, no. 1, p. 6638, 2015.

[6] J. K. Heinonen and R. J. Lahti, “A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase,” *Anal. Biochem.*, vol. 113, no. 2, pp. 313–317, 1981.

[7] K. Priya Arjunan and A. Morss Clyne, “Hydroxyl radical and hydrogen peroxide are primarily responsible for dielectric barrier discharge plasma-induced angiogenesis,” *Plasma Process. Polym.*, vol. 8, no. 12, pp. 1154–1164, 2011.