مجله علوم و صنایع غذایی ایران



مقاله علم<u>ى پژو</u>هشى

استفاده از فناوری رزونانس پلاسمون سطحی برای ارزیابی اولیه فعالیت آنتی توکسین اگزوپلی ساکارید دكستران عليه انتروتوكسين حساس به حرارت اشرشيا كلى مجتبى آذرى آنپار^{٢٥١}، فريده طباطبايي يزدى^٣، پاسكال دقغاو[†]، ناديا اولال^٥، كامبيز جهانبين^[°] ۱- دانشجوی دکتری زیست فناوری مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران ۲- دانشجوی دکتری زیست فناوری مواد غذایی، واحد تحقیقاتی ISARA ،BioDyMIA، دانشگاه کلود برنارد لیون ۱، لیون، فرانسه

۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، زیست فناوری مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۴- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، تکنولوژی مواد غذایی، واحد تحقیقاتی ISARA ،BioDyMIA، دانشگاه کلود برنارد لیون ۱، لیون، فرانسه

۵- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، زیستفناوری مواد غذایی، واحد تحقیقاتی ISARA ،BioDyMIA دانشگاه کلود برنارد لیون ۱، لیون، فرانسه

۶- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، تکنولوژی مواد غذایی، دانشکده مهندسی کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

-117		
اطلاعات مقالة	چکيده	
تاریخ های مقاله :	باکتری اشرشیا کلی انتروتوکسیژنیک با اتصال به مخاط روده و تولید انتروتوکسینهای حساس به حرارت،	
14+1/0/10 ··· il. · · ···	متداولترین عامل بیماری باکتریایی ایجاد کننده اسهال است. مطالعه حاضر با هدف روشن کردن برهمکنش	
تاریخ دفر ش: ۱۴۰۱/۶/۲۱ تاریخ دفر ش: ۱۴۰۱/۶/۲۱	دو نوع اگزوپلی.ساکارید دکستران با وزن.های مولکولی مختلف ((kDa ۱۱–۹) و (kDa ۷۶–۶۰)) تولید	
	شده از باکتری پروبیوتیک Leuconostocmesenteroides با توکسین حساس به حرارت (زیرواحد	
	B–پنتامر) (LTB) با استفاده از رزونانس پلاسمون سطحی انجام شد. بر اساس نتایج به دست آمده از	
	سینتیک برهمکنش حاصله در دمای۲۹۸K، هر دو نوع دکستران با وزن مولکولی پایین و بالا، به ترتیب	
کلمات کلیدی:	دارای میل ترکیبی بالایی(M-1) (LTB و۱٬۰۷×۱۰۶M-۱۰۶M) نسبت به توکسین LTB در شرایط	
دكستران،	برون تنی داشتند. از نقطه نظر ترمودینامیکی مقادیر به دست آمده از معادله وانت هوف، انرژی آزاد گیبس	
بوکسین حساس به حرارت، د دو نانب بلاسمه ن سطحی،	منفی(>ΔG>)، آنتالپی و آنتروپی نیز هر دو مثبت (<ΔH• و<ΔS •) ارزیابی شدند که به ترتیب نشان	
اگروپلیساکارید،	دهندهی فرآیند اتصال از نوع خود به خودی، گرماگیر و مبتنی بر بینظمی بود. با توجه به این یافتهها، فعل	
برهمکنش.	و انفعالات آبگریز به همراه پیوندهای هیدروژنی به نظر میرسد که نقش مهمی در برهمکنش هر دو نوع	
	دکستران با توکسین LTB می توانند ایفا کنند. بنابراین، می توان نتیجه گرفت که اگزوپلی ساکارید دکستران	
DOI: 10.22034/FSCT.20.136.1	می توانند با توکسین LTB تعامل داشته و تا حدودی خاصیت ضد توکسینی از خود نشان بدهند. به طور	
DOR:20.1001.1.20088787.1402.20.136.1.9	کلی، این نتایج می تواند بینش بیشتری برای شروع تحقیقات گسترده روی اگزوپلیساکاریدهای با منشا	
* مسئول مكاتبات:	باکتریهای اسید لاکتیک در برهمکنش با توکسینهای باکتریهای پاتوژن مواد غذایی ارائه دهد.	

tabatabai@um.ac.ir

۱- مقدمه

توکسینهای باکتریایی، اولین فاکتورهای ویرولانس ^۱ باکتریها هستند که تا به امروز شناخته شدهاند. توکسینهای باکتریایی را به طور کلی می توان به دو گروه اندوتوکسینها و اگزوتوکسینها تقسیم نمود. یکی از شناخته شده ترین باکتریهای تولید کننده اگزوتوکسین، گروههای پاتوژنیک *اشرشیا کلی* تحت عنوان اشرشیای انتروتوکسیژنیک^۲ (ETEC)مطرح می باشد. اخیرا توجه به نقش *اشرشیا کلی* به عنوان عامل بیماری اسهال به واسطه ظهور سویه 157:H7 سویههای انتروهموراژیک^۳، به علت شدت بیماری مربوطه، افزایش یافته است.دو ویژگی ویرولانس مشخص روده و همچنین تولید انتروتوکسین می باشد.انتروتوکسینهای تولید شده به وسیلهی این باکتریها شامل دو گروه توکسینهای حساس به حرارت^۴ (LT) مشابه کلرا توکسین^۵ (CT) و توکسین های مقاوم به حرارت^۹ (ST) می باشد که در ساختار، آنتی ژنیسیته و مکانیسم عمل تفاوت دارند [۱].

توکسین حساس به حرارت LTجزء اگزوتوکسینهای پروتئینی محسوب میشود. این پروتئین به صورت متصل به لیپوپلی ساکاریدهای سطحی *اشرشیا کلی* باقی میماند و قابلیت اتصال به قندهای گروه خونی A، مولکول TLR و پذیرندههای گانگلیوزیدی سطح انتروسیتها را دارد. مکانیسمعمل آن مشابه کلرا توکسین بوده و چرخهی آدنیلات سیکلاز را فعال کرده غلظت CAMP را در سلول افزایش میدهد و موجب ترشح مقادیر زیادی آب و یونها از جمله کلر به روده شده و نهایتا منجر به اسهال میشود. TLساختمانی با فرمول A-B-5 دارد که

- 1.Virulence
- 2. Enterotoxigenic Escherichia coli
- 3.Enterohemorrhagic
- Heat-labile enterotoxin
 Cholera toxin
- 6. Heat-stable enterotoxin

متشکل از یک زیر واحد A و ۵ زیر واحد B^۷(LTB) هستند [۱].

امروزه همراه با پیشرفت علم بیوتکنولوژی در زمینههای مختلف توجه به استفاده از میکروارگانیسمهایی که به طور طبیعی قادر به فعالیت و تولید متابولیتهای مفید هستند، در صنعت غذا و داروسازی بیشتر متمرکز گردیده است. از این رو توجه دانشمندان به تولید و شناسایی متابولیتهای جدید میکروارگانیسمها به عنوان ترکیبات دارویی فعال و درک سازوکار عمل آنها معطوف شده است [۲].

باکتریهای اسید لاکتیک مانند بسیاری از باکتریهای دیگر قادر به تولید چندین نوع پلیساکارید خارج سلولی یا گلیکانهایی تحت عنوان بیوپلی مرهای کربوهیدراتی با تنوع ساختاری بسیار متنوع هستند. در این خصوص یکی از مهمترین متابولیتهای تولید شده توسط باکتریهای اسید لاکتیک پروبیوتیک، اگزوپلی ساکاریدها میباشد که دارای کاربردهای بالقوهی فراوانی در مکمل های غذایی و داروسازی هستند [۳، ۴]. اگزوپلی ساکاریدها پس از تولید توسط باکتریهای اسید لاکتیک، قابلیت اتصال به سطح سلول خودرا دارند و یا اینکه میتوانند به محیط اطراف خود رها شده و با عوامل دیگری وارد واکنش شوند [۲].

اعتقاد محققین در سالهای اخیر بر این است که اگزوپلی ساکاریدهای تولید شده توسط باکتریهای اسید لاکتیک میتوانند منجر به کاهش اثرات سیتوتوکسیکی[^]فلزات سنگینو حتی توکسین های باکتریهای پاتوژن در بیماریهای گاستروآنتریت⁴ شوند. به عبارت دیگر اگزوپلی ساکاریدهای تولید شده توسط پروبیوتیکها شاید به عنوان یک مانع فیزیکی عمل کرده که بتواند هم از طریق مسدود کردن گیرندههای توکسین موجود در سطح سلولهای آنتروسیت^{۱۰} رودهای میزبان شده و یا هم به عنوان یک جاذب زیستی، توکسینهای باکتریرا احاطه کرده که نهایتا مانع از اتصال

^{7.}heat-labile enterotoxin B-pentamer8.cytotoxic9.Gastroenteritis10.Enterocytes

توکسین به سطح سلولهای یوکاریوتی میشود[۲، ۵، ۶، ۷، ۸ ۹].

از آنجائیکه هیچ گونه تحقیقاتی مبنی بر برهمکنش بین اگزوپلی ساکارید باکتریهای اسید لاکتیک و توکسین LTتا به حال صورت نپذیرفته است و صرفا فرضیاتی در این خصوص پیشنهاد شده است. لذا بررسی های دقیق روی برهمکنش اگزویلی ساکاریدهای دکستران با توکسین مورد بحث در شرایط in vitro، می تواند بینش دقیقی از درک فعل و انفعالات این زیست مولکولها فراهم سازد. از این رو مطالعات برون تنی in) vitro) امکان بررسی های اختصاصی برهمکنش بین مولکولی را به آسانی فراهم میسازد و اطلاعات ارزشمندی از جزئیات پیوند آنها در اختیار محققین قرار می دهد. همچنین، اگرچه گزارشات حاکی از آن است که پارامترهای محلول مانند pH عوامل مهمی برای کنترل حالتهای مختلف برهمکنش بین پروتئین و پلی ساكاريد هستند، اما نوع پروتئين ها/پلي ساكاريدها، وزن مولکولی، چگالی بار و آب گریزی پلیمرهای زیستی نیز نقش مهمی در میزان کمپلکس شدن بین دو پلیمر در شرایط ثابت دارند[۱۰]. درنتیجه هدف اصلی این پژوهش بررسیاثر دکستران های با وزن مولکولی مختلف بر روی برهمکنش مولکولی توکسین حساس به حرارت زیر واحد **B** (**B** پنتامر) (LTB) به عنوان بخش مهم در اتصال به سلول های اپیتلیالروده بااستفاده از مطالعات کنتیکی و ترمودینامیکی و به روش رزونانس پلاسمون سطحى مىباشد.

۲- مواد و روشها

۲–۱–مواد

مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه شامل: توکسین LTB (سیگما-آمریکا)، دکستران با وزن مولکولی پایین (۹–۱۱ kDa (سیگما، کانادا) و وزن مولکولی بالا (۹۶–۷۶ kDa) (سیگما، آمریکا)، محلول آمونیای ۲۵ درصد (سیگما- آلمان)، اسید

مركاپتوتاندكانوئيك-۱۱' (سيگما، هند)، N-اتيل-N-(۳-دی اتيل آمينوپروپيل) كربوميد' (EDC) (سيگما، مجارستان)، N هيدروكسي سوكسينيميد'' (NHS) (سيگما، كانادا) بودند.

۲-۲- روش ها

۲–۲–۱– رزونانس پلاسمون سطحی[†]

آزمون اتصال دو بیومولکول با استفاده از دستگاه رزونانس پلاسمون سطحی دو کاناله (MP-SPR Navi 210A، فنلاند) بر اساس Tampere-region،BioNavis Ltd. فنلاند) بر اساس مطالعات قبلی فتحی و همکاران(۲۰۱۹) انجام گرفت.آزمون مورد نظر در حالت زاویه ثابت و با استفاده از یک لیزر nm ۶۷۰ برای تحریک پلاسمون سطحی انجام گرفت.استخراج و تحلیل داده های مربوط به محاسبات میلترکیبی و ثابت جنبشیبه ترتیب توسط Trace و SPR Navi TM Data viewer و ایرا.

۲-۲-۲ آماده سازی نمونهها

Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-12

^{1.11-}mercaptoundecanoic acid

^{2.}N-ethyl- N-(3-diethylaminopropyl) carbodiimide

^{3.}N- hydroxysuccinimide

^{4.}Surface plasmon resonance

غلظتهای مختلف دکسترانبا وزن مولکولی مختلف (۹ – ۱۱ و ۶۰ – ۷۶ هkDa به عنوان لیگاند^ا آماده تزریق شدند. ۲-۲-۳-آمادهسازی تراشهی طلا برای تثبیت توکسین LTB ۲-۲-۳-آمادهسازی تراشه کودآرایی^۲(SAM) اسید ۲-۲-۳-۱-تشکیل تکلایههای خودآرایی^۲(SAM) اسید مرکاپوتاندکانوئیک-۱۱ به منظور تشکیل SAMاسید مرکاپوتاندکانوئیک-۱۱، ابتدا تراشه های SPR با روکش طلا (Bionavis، فنلاند) در محلول داغ

های SPK با روکش طلا (Bionavis، فنلاند) در محلول داغ ۲۰۰۳ آمونیا، ۲۰۰۰ پراکسید هیدروژن و آب مقطر دوبار تقطیر (۷/۷/۷) در دمای C° ۹۰ به مدت ۲۰min غوطهور شدند. بدین منظور عمل شستشو چندین بار با آب دو بار تقطیر و اتانول خالص انجام شدند تا عاری از هرگونه مواد ناخالصی روی تراشه باشند. سپس تراشه مورد نظر تحت جریان گاز نیتروژن خشک گردید. اسید مرکاپوتاندکانوئیک-۱۱ (Mm ۵) در محلول اتانول و آب مقطر دوبار تقطیر بانسبت حجمی ۳:۲ (۷/۷) به مدت ۲۴ ساعت در دمای C° ۲۵ تیمار شدند. نهایتا، تراشه تیمار شده سه بار با آب و سه بار با سدیم فسفات بافر شسته شد و دوباره تحت جریان گاز نیتروژن خشک شد[۱۱].

۲–۲–۳–۲–تثبیت توکسین LTB با استفاده از آمینهای کویلینگ^۳

در این بخش ابتدا تراشهی تیمار شده با MUA درون دستگاه MpH قرار گرفت و سپس سدیم فسفات بافر(۷ = MpH درون دستگاه تزریق شد تا بتواند خط پایه ثابتی را در سنسوگرام ایجاد کند.به طور خلاصه، به منظور فعال کردن آن، سطح تراشهی طلای تیمار شده با MUA همراه با انتهای کربوکسیل در معرض مخلوطی از N۰/۲ –اتیل –N–(۳–دی اتیل آمینوپروپیل) کربومید (EDC) و N ۵۰/۰ ۸ هیدروکسی نهایت، پس از قرار گرفتن در معرض محلول توکسین LTB در

سدیم فسفات بافر (۸۵ M،pH ۹۵/۵) به مدت ۸۳in با سرعت جریان¹-µL.min ۳۰ مکانهای اتصال غیراختصاصی روی سطح تراشه توسط اتانول آمین (۱۸) به مدت۸min مسدود شدند[۱۱].

LTB تجزیه و تحلیل جنبشی برهمکنش توکسین trB ثبیت شده با دکستران

غلظتهای مختلف دکسترانهای با وزن مولکولی پایین $(kDav_{5} - 8v)$ و بالا ($kDav_{5} - 8v$) در سدیم فسفات بافربا سرعت جریان¹⁻¹ سلما ۳۰ به مدت ۳۳in تزریق شد.از آنجایی که توکسین LTB در دو سلول جریانتثبیت شده بود، یکی از آن ها (کانال ۱)برای تزریق نمونه و دیگری (کانال ۲) به عنوان مرجع استفاده شد.تمام مراحل ذکر شده در بالا، در بافر یکسان و باpH= انجام شد. با این حال، مدل دو مولکولی برای تخمین ثابتهای سرعت اتصال (k) و تفکیک (k) استفاده شد.سپس محاوی بر ای تا تقسیم k_{4} بر محاسبه شد.

۲–۲–۵– تجزیه و تحلیل ترمودینامیکی برهمکنش توکسین LTBتثبیتشده با دکستران

اثر دما بر اتصال دکسترانها به LTBبرای به دست آوردن پارامترهای ترمودینامیکی تشکیل کمپلکس دکستران–LTB مورد بررسی قرار گرفت. اندازه گیری SPR در سه دمای مختلف (۲۹۸، ۳۰۳ و ۲۰۳ K) انجام شد. بدین منظور، پارامترهای ترمودینامیکی برهمکنش با اندازه گیری K_A در دماهای مختلف تعیین شد.در نهایت، تغییرات در آنتالپی استاندارد (ΔH)، آنتروپی (ΔS)، وانرژی آزاد گیبس (ΔG) ازتجزیه و تحلیلمعادله وانت هوف[†] دادهها با جایگزینیK_A با Δ/ادر معادله وانت هوف تخمین زده شد(معادله (۱)).

 $LnK_{A} = -(\Delta H/R) \times (1/T) + \frac{\Delta S}{R}$

^{1.}Ligand

^{2.}Self-assembled monolayer

^{3.}Amine coupling

^{4.}van't Hoff



Fig 1: Estimations of LTB toxin physiochemical properties (**A**) hydropathy (**B**) net charge vs pH.



که R نشان دهنده ثابت جهانی گاز است، T دمای مطلق و ΔΗ و ΔS به ترتیب تغییرات در آنتالپی و آنتروپی استاندارد را نشان میدهند. ÄG با استفاده از معادله انرژی آزاد گیبس پس از به دست آوردن مقادیر ΔH وΔS محاسبه شد (معادله (۲))[۱۲].

 $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$

٣- نتايج و بحث

SPR-۱-۳ تجزیه و تحلیل

در آزمایشSPR، در حالیکه لیگاند مورد نظر در فاز جریان در حال حرکت است، پروتئین به سطح تراشهای با سطحی از جنس طلا متصل شده است. به دنبال آن اتصال و یا تفکیکپروتئین-لیگاند منجر به تغییر در ضریب شکست در لایه سطحی و تغییر در زاویهSPR میشود. جابجاییها نظارت میشوند و به واحدهای رزونانس دلخواه⁽ (RU) تبدیل میشوند و به صورت سنسورگرام نشان داده میشوند. به طور کلی SPR را میتوان به عنوان ابزار خودکار مفیدی برای تعیین کمیت برهمکنش دکستران و توکسین LTB در این تحقیق در نظر گرفت که میتواند داده های سینتیکی و ترمودینامیکی را در زمان واقعی ارائه دهد [۱۱و۲].

LTB تثبيت توكسين

برای اطمینان از برهمکنش بالای الکترواستاتیکی بین پروتئین با بار مثبت و MUA با گروه کربوکسیبا بار منفی، pH محلول بافر مورد استفاده برای تثبیت LTB، کمتر از *pI* پروتئین درنظر گرفته شود (۵/۵ = pH).

^{1.}Arbitrary resonance units

Fig 2 LTB toxin immobilization processes by an SPR sensorgram on a CMD chip

و سرعت جریان بالا (۱۹۱۱، ۱۹۱۱) برای جلو دیری از اتر انتقال جرم و محدود کردن مقدار LTBمورد استفاده در مراحل تثبیت، انجام شد.روش مبتنی بر SPR، که در آن توکسین LTB بر روییک تراشه حسگر MUAتثبیت شد، برای تعیین k_a و k_d برای اتصال دکسترانها به توکسین LTB استفاده گردید.شکل ۳ سنسورگرامهایSPRبا توکسین LTB تثبیت شده روی تراشه تیمار شده باSPR توکسین LTB تثبیت شده روی تراشه تیمار شده باMUAدر حضور غلظتهای مختلف دکسترانهای با وزن مولکولی پایین و بالا (۲۵/۰ – ۲⁻¹mg.ml)را در سه دمای مختلف (۲۹۸، ۳۰۳ و ۲۰/۵۱) نشان می دهد. مقادیر RU بربوطه با افزایش غلظت هر دودکستران افزایشیافت، که نشان دهنده اتصال دکستران به توکسین LTB تثبیت شده می باشد. k_a دهنده اتصال دکستران به توکسین LTB تشیت شده می باشد. k_a

A+B + AB

آز

مقادیر ka و ka برای واکنش تشکیل کمپلکس توکسین LTB با هر دو نوع دکستران در سه دمای مختلف به دست آمد (جدول در دمای بالاتر افزایشیافت در حالی که $k_{\rm d}$ تقریباً بدون $k_{\rm a}.$ (۱ تغییر باقی ماند.مقدارK_Aدر دمایK۲۹۸ برای هر دو نوع دکستران با وزن مولکولی پایین و بالا به ترتیب¹ M⁻¹ ×۱۰۰ ا و ۱۰^۰ M⁻¹ محاسبه شد که نشان دهنده تمایلهر دو دكسترانبه توكسينLTBاست.اين نتايج نشان داد كه تشكيل کمپلکس این دو مولکول زیستیدارای فرآیندی تقریباًبا اتصال سريعو نرخ تفكيك كم است.بر اساس تجزيه و تحليلسينتيكي سنسورگرامها، افزایشنسبی در K_A هنگام افزایش دما را نیز می توان به بهبود ثابت نرخ اتصال نسبت داد. به نظر می رسد که افزایش اتصال هر دو دکستران به توکسینLTB در دماهای بالاتر به بهبود برخورد مولكول هايدكستران به مولكول هايتثبيت شده یتوکسینLTB روی سطح تراشه و انتشار بهتر مولکولهای دکستران مربوط می شود. از طرف دیگرمطابق با نتایج بدست آمده، وزن مولکولی دکسترانها تاثیری در ثابت اتصال تعادل نداشتو یا به عبارت دیگر وزن مولکولی تاثیر قابل توجهی در برهمكنش هاى أن ها با توكسين LTBنداشت.

در این خصوص، توسط ماشین حساب پپتیدیInnovagen (InnovagenAB, <u>https://pepcalc.com</u>)، محاسبات و تخمین هایی را در مورد خواص فیزیکوشیمیایی، بار خالص و pI توكسين LTB انجام گرفت (شكل ۱، A و B). طبق نتايج بدست آمده از مدل مورد نظر، توکسین LTB حلالیت خوبی نسبت به آب داشته و در PH=vدارای بار خالص' برابر ۱/۱ میباشد. همچنین نقطه ایزوالکتریک آن برابر با ۸/۰۸ =pH تخمین زده شد.با این تفاسیر pH مطلوب بافر مورد نظر برای تقویت تثبیت توکسین LTBروی سطح حسگر طلا،۵/۵ در نظر گرفته شد[۱۴]. شکل ۲شماتیک تثبیت کردن توکسین LTBرا روی سطح حسگر طلایی نشان میدهد.پس از تمیز کردن سطح تراشه طلا، سطح SAMبا انتهای کربوکسیلیک مولکول،هایMUA روی تراشه تشکیل شد.MUA به عنوان یکی از آلکانتیولاتهای جایگزین ٔ ۵ در نظر گرفته میشود که از زنجیرههای هیدروکربنی آبگریز و گروههای سر آبدوست تشکیل شده است.سیس، گروه های کربوکسیلیک مولکولهای MUA توسط EDC/NHS به منظور جفت شدن گروههای آمینتوکسین LTB فعال شدند. در نهایت، اتانول آمین برای مسدود کردن مکانهای واکنش نداده سطح تراشه اعمال شد.مراحل ثبت شده سنسوگرام SPR (شکل ۲) و همچنین تغییر در رزونانس زاویهای پس از فرآیند تثبیت، تثبیت موفقیت آمیزتوکسین LTBرا در سطح تراشهی طلا تیمار شده با MUA همراه با انتهای کربوکسی تایید کرد. منحنی اوليه فرآيند فوق الذكر افزايش زاويه SPR را حدود ۰/۳۲ درجه را نشان داد. (۶۹/۲۶ (قبل از تثبیت)– ۶۹/۵۸ (بعد از تثبیت)). در واقع تثبيتتوكسين LTB، به افزايش ضخامت لايه جذب شده ناشی از تشکیل لایه جدید روی سطح تراشه طلا نسبت داده می شود.

۳–۳– تجزیه و تحلیلسینتیکی بر همکنش

^{1.}Net charge 2.ω–substituted alkanethiolates



Fig 3. SPR sensorgrams of the interaction of LTB toxin with different concentrations of low MW dextran (top) and high MW dextran(bottom) (0.25–2 mg/ml in sodium phosphate buffer; 10 mM; pH 7) in the presence of various temperatures 298 K (A, D), 303 K (B, E), and 310 K (C, F).

Table 1The kinetic parameters (association rate constant (k_a), dissociation rate constant (k_d), and equilibrium constants (K_A)) of LTB toxin binding with dextrans (low MW dextran and high MW dextran) at three different temperatures (298, 303, 310 K).

K _A	K _d	K _a	Temperature	
(M ⁻¹)	(s ⁻¹)	$(M^{-1} \times s^{-1})$	(K)	
$(1.07 \pm 0.02) \times 10^{6}$	$(1.25 \pm 0.25) \times 10^{-3}$	$(1.28 \pm 0.02) \times 10^3$	298	Low MW dextran
$(1.75 \pm 0.04) \times 10^6$	$(1.16 \pm 0.04) \times 10^{-3}$	$(2.02\pm0.4)\times10^3$	303	
$(3.86 \pm 0.81) \times 10^6$	$(1.6 \pm 0.40) \times 10^{-3}$	$(5.45 \pm 1.4) \times 10^3$	310	
$(0.95 \pm 0.01) \times 10^6$	$(1.50 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	$(1.40 \pm 0.15) \times 10^3$	298	High MW dextran
$(1.15 \pm 0.01) \times 10^6$	$(1.70 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	$(1.90 \pm 0.12) \times 10^3$	303	
$(1.89 \pm 0.02) \times 10^{6}$	$(2.90 \pm 0.07) \times 10^{-3}$	$(5.35 \pm 0.75) \times 10^3$	310	

۳–۴– تجزیه و تحلیل ترمودینامیکی برهمکنش

پارامترهای ترمودینامیکی مانند تغییرات آنتالپی و آنتروپی می توانند اطلاعات مفیدی در مورد تغییرات انرژی مرتبط با فرآیند جذب و همچنین نقش عوامل مختلف دخیل در تشکیلکمیلکس این دو مولکول زیستی مولکول زیستی ارائه دهند.جدول۲ نتایج مربوط به پارامترهای ترمودینامیکی برهمکنش بیندکسترانهاو توکسین LTBرا نیز خلاصه می کند. همانطور که در شکل ۴ نشان داده شد، نمودار وانت هوف برای هر دو نوع دکسترانیک خط مستقيم با شيب منفى است (به ترتيب ٧٣٥/ و ٩٩٨/ = (R² = ٠/٩٩٨). که نشان میدهد که تغییر آنتالیی برای تشکیل کمپلکس دکستران ها و توکسین LTBدر محدودهی دما ثابت میماند.علاوه بر این، شيب منفى نشان مىدهد كه اتصال بيندكستران و توكسينLTBگرماگير(ΔH>•) و از نظر تغييرات آنتالپيشاهد تاثیر قابل توجهی در برهمکنش بین آنها مشاهده نشد.مقادیر مثبتkJ mol⁻¹ ۰/۰۴۴ و ۳۹۲/۴۲) و KJ mol⁻¹ و Jmol⁻¹.k⁻¹۲۶۳/۹۳) از نمودار وانت هوف فرآیند جذب مبتنی بر آنتروپی را نشان میدهد.

با این تفاسیر و مطابق با خصوصیات ساختاری پیش گویی شده از توکسین LTB در بخش ۳-۲ (شکل۱، A) که بخش اعظم ساختار آنرا اسیدهای آمینهی آبگریز تشکیل میدهند، برهمکنش بین آن ودکسترانهابیشتر از طریق فعل و انفعالات آبگریز منتسب بیه کم آبیبخش آبگریزپروتئین میتواند انجام شد(Δ۲>۰ و Δ۵>۰).با این تفاسیر آنتروپی اتصال تخمینزده شده (Δ۲۵)، یک سهم آنتروپیک مطلوب (ΔS مثبت)، و همچنین افزایشتمایل اتصال توکسین LTBبا هر دو نوع دکستران در دمای بالا را نشان داد(جدول ۲).مقدار Δ۵در دمای ۲۹۸ برای هر دو بالا را نشان داد(جدول ۲).مقدار Δ۵در دمای ۲۹۸ برای هر دو خودانگیختگی و مطلوبیت اتصال دکسترانها به خودانگیختگی و مطلوبیت اتصال دکسترانها به توکسین TBلاساره دارد. به طور کلی،اگرچه جاذبه

پروتئین و پلیساکاریددر نظر گرفته می شود، اما گزارش شده است که پیوند هیدروژنی و برهمکنش آبگریز نقش ثانویهای برای پایداریتجمع پروتئین/پلی ساکارید ایفا میکند. با این تفاسیرمیزان پیوند هیدروژنی و برهمکنش آبگریز به دما بستگی دارد. پیشنهاد میشود اعمال حرارت ملایم و درنتیجه باز شدگی در ساختار پروتئینها منجر میشود که مکانهای واکنش پذیر (اسیدهای آمینه) بیشتری در معرض فاز حلال قرار گیرند و در نتیجه شانس بیشتری برای برهمکنش (یا اتصال) با پلیساکاریدها داشته این کار انتظار میرود که برهمکنشهای ایجاد شده از نوع آبگریز و هیدروژنی بین اگزوپلیساکاریدهای دکستران با توکسین و هیدروژنی بین اگزوپلیساکاریدهای دکستران با توکسین محصور کردن و به دنبال آن محدودیت توکسین ITB، به عنوان یک سد فیزیکی در اتصال به سلولهای اپیتلیال روده عمل کند.





1.Aggregate

٨

<u>)</u>	Temperature	K _A	ΔH	ΔS	ΔG
١	(K)	(M ⁻¹)	(kJ mol ⁻¹)	(J mol ⁻¹ .k ⁻¹)	(kJ mol ⁻¹)
Low	298	$(1.07 \pm 0.02) \times 10^{6}$	0.08 ± 0.02	392.42 ± 6.53	-34.39 ± 0.55
MW	303	$(1.75\pm 0.04)\times 10^{6}$			-36.22 ± 0.57
dextran	310	$(3.86 \pm 0.81) \times 10^{6}$			-39.09 ± 1.3
High	298	$(0.95 \pm 0.01) \times 10^{6}$	263.39 ± 2.12 0.044 ± 0.01		-34.11 ± 0.24
MW	303	$(1.15\pm 0.01)\times 10^{6}$		263.39 ± 2.12	-35.16 ± 0.29
dextran	310	$(1.89 \pm 0.02) \times 10^{6}$			-37.25 ± 0.26

Table 2 The thermodynamic parameters of LTB toxin binding with dextran (low MW dextran and high
MW dextran) at three different temperatures (298, 303, 310 K)

اگزوپلی ساکاریدها در حضور توکسین LTB، مطالعات تکمیلی و بیشتری بر روی مدل های*in-vitroوin-vivoمو*رد انتظار است.

۵– تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت مالی دانشگاه کلود برنارد لیون ۱ – واحد تحقیقاتی BioDyMIA (Bioingénierie et DynamiqueMicrobienne aux Interfaces Alimentaires) در فرانسه و همچنین دانشگاه فردوسی مشهد به شماره طرح ۵۰۶۸۱در ایران سپاسگزار هستند.

8- منابع

- [1] Hosseini, F and Akbari, I. (2017). Microbial toxins. University Jihad Publications, pp:116-123, [in Persian].
- [2] Saadat, Y.R., Khosroushahi, A.Y. and Gargari, B.P., 2019. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteriaexopolysaccharides. *Carbohydrate polymers*, *217*, pp.79-89.

۴- نتیجه گیری

مطالعه حاضر، گزارشی در مورد پارامترهای جنبشی و ترموديناميكي برهمكنش وزنهاي مولكولي دكسترانها به توکسین LTBاست. از نقطه نظر سینتیکیو ترمودینامیکی در شرایط دمایی مختلف نتایج نشان داد که هر دو اگزویلیساکارید دکستران(با وزن مولکولی بالا و پايين) می توانند به توکسين LTB با میل ترکیبینسبتا بالا(K_A) از طریقیک تعامل گرماگیر و آنترویی محور متصل شود($\Delta H>• e^{\Delta H})$ که مطابق با مقادیر منفی انرژی آزاد گیبس فرآیند اتصال آن از نوع خودبخودی ارزیابی شد(ΔG-۰).در نتیجه فعل و انفعالات آبگریزبه نظر میرسد که نقش مهمی در برهمکنش هر دو نوع دکسترانباتوکسین LTBمی توانند داشته باشند.علاوه برپیوند آبگریزکه در ناحیه آبگریز میانی می تواند نقش ایفا کند،ییوندهای هیدروژنی با سطوح آبدوستینیز انتظار میرود که می توانند نقطه شروعی برای ایجاد پیوندهای قوى تر داشته باشند و به دنبال آن منجر به كاهش اثرات سيتوتوكسيكى توكسين LTBشوند.از طرف ديگر وزنمولكولى دکستران ها تاثیری روی نتایج برهمکنش این دو مولکلول زیستی نداشتند.یافته های حاصلاز مطالعه کنونی، تامل محققین را می توانند در خصوصبرهمکنش بیندکستران با توکسین LTBرا عميق تر سازد. لذا به منظور درک بهتر فعاليت ضد سيتو توکسيکي

Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-12

- Hidalgo-Cantabrana, C., López, P., [9] Gueimonde, M., Clara, G., Suárez, A., Margolles, A. and Ruas-Madiedo, P., 2012. Immune modulation capability of exopolysaccharides synthesised by lactic acid bacteria and bifidobacteria. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 4(4), pp.227-237.
- [10] Ghosh, A.K. and Bandyopadhyay, P., 2012. Polysaccharide-protein interactions and their relevance in food colloids. *The complex world of polysaccharides*, *14*, pp.395-406.
- [11] Fathi, F., Sharifi, M., Jafari, A., Kakavandi, N., Kashanian, S., Dolatabadi, J.E.N. and Rashidi, M.R., 2019. Kinetic and thermodynamic insights into interaction of albumin with piperacillin: Spectroscopic and molecular modeling approaches. *Journal of Molecular Liquids*, 296, p.111770.
- [12] Dehghani, M., Jalal, R. and Rashidi, M.R., 2021. Kinetic and thermodynamic insights into the interaction of A β 1–42 with astaxanthin and aggregation behavior of A β 1–42: Surface plasmon resonance, microscopic, and molecular docking studies. *Biophysical Chemistry*, 275, p.106612.
- [13] Jiménez-Vargas, J.M., Ramírez-Carreto, S., Corzo, G., Possani, L.D., Becerril, B. and Ortiz, E., 2021. Structural and functional characterization of NDBP-4 family antimicrobial peptides from the scorpion Mesomexovis variegatus. *Peptides*, 141, p.170553.
- [14] Heggelund, J.E., Heim, J.B., Bajc, G., Hodnik, V., Anderluh, G. and Krengel, U., 2019. Specificity of Escherichia coli heatlabile enterotoxin investigated by single-site mutagenesis and crystallography. *International journal of molecular sciences*, 20(3), p.703.

- [3] Zajšek, K., Goršek, A. and Kolar, M., 2013. Cultivating conditions effects on kefiran production by the mixed culture of lactic acid bacteria imbedded within kefir grains. *Food chemistry*, 139(1-4), pp.970-977.
- [4] Jeong, D., Kim, D.H., Kang, I.B., Kim, H., Song, K.Y., Kim, H.S. and Seo, K.H., 2017. Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciensDN1* isolated from kefir. *Food Control*, 78, pp.436-442.
- [5] Ruas-Madiedo, P., 2014. Biosynthesis and bioactivity of exopolysaccharides produced by probiotic bacteria. *Food Oligosaccharides*, pp.118-133.
- [6] Ruas- Madiedo, P., Medrano, M., Salazar, N., De Los Reyes- Gavilán, C.G., Pérez, P.F. and Abraham, A.G., 2010. Exopolysaccharides produced bv Lactobacillus and Bifidobacterium strains abrogate in vitro the effect of bacterial cytotoxic toxins on eukaryotic cells. Journal ofapplied microbiology, 109(6), pp.2079-2086.
- [7] Kim, J.U., Kim, Y., Han, K.S., Oh, S., Whang, K.Y., Kim, J.N. and Kim, S.H., 2006. and Function of cell-bound released exopolysaccharides produced by Lactobacillus ATCC 9595. rhamnosus Journal of microbiology biotechnology, and 16(6). pp.939-945.
- [8] Hidalgo-Cantabrana, C., Sánchez, B., Milani, C., Ventura, M., Margolles, A. and Ruas-Madiedo, P., 2014. Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in Bifidobacterium spp. *Applied and Environmental Microbiology.*, 80(1), pp.9-18.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Using surface plasmon resonance technology for initial evaluation of the antitoxin activity of

Mojtaba Azari-Anpar^{1,2}, Farideh Tabatabaei Yazdi^{3*}, Pascal Degraeve⁴, Nadia Oulahal⁵, KambizJahanbin⁶

dextran exopolysaccharide against Escherichia coli heat-labile enterotoxin

¹Ph.D. Student of Food Biotechnology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad-91775-1163, Iran

²Ph.D. Student of Food Biotechnology, BioDyMIA Research Unit, ISARA Lyon, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, 155 ru8 Henri de Boissieu, F-01000, Bourg enBresse, France

³ Professor in Food Biotechnology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad -91775-1163, Iran

⁴ Professor in Food Science and Technology, BioDyMIA Research Unit, ISARA Lyon, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, 155 ru8 Henri de Boissieu, F-01000, Bourg enBresse, France

⁵ Associate Professor in Food Biotechnology, BioDyMIA Research Unit, ISARA Lyon, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, 155 ru8 Henri de Boissieu, F-01000, Bourg enBresse, France

⁶ Associate Professor in Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Engineering, Shahrood University of Technology, P.O. Box 361999-5161, Shahrood, Iran

Enterotoxigenic Escherichia coli is the most common bacterial agent causing diarrhea by

binding to the intestinal mucosa and producing heat-labile enterotoxins. The aim of this

study was to elucidate the interaction of two forms of dextran exopolysaccharides

(molecular weights of (11-9 kDa) and (76-60 kDa)) produced by the probiotic bacterium Leuconostocmesenteroides with the heat-labile enterotoxin((B-pentamer) (LTB)) by using surface plasmon resonance (SPR). According to the results of interaction kinetics at 298 K.

both low and high molecular weight dextran types exhibited high affinity (KA) (1.07×106) M-1 and 0.95×106 M-1, respectively) for LTB toxin in vitro. From a thermodynamic point

of view, the values calculated of the Gibbs energy were negative ($\Delta G < 0$), and also enthalpy

and entropy achieved both positive values ($\Delta H > 0$ and $\Delta S > 0$) via the van't Hof equation, indicating that the interaction was spontaneous, endothermic, and disordered, respectively.

With these findings, hydrophobic interactions appear to be important in the interaction

between dextran and LTB toxinswith hydrogenic bindings. Therefore, dextran molecules are capable of binding to LTB toxin and relatively displaying antitoxin effects. To sum up,

these results could provide further insights for initiating extensive research with other lactic acid-derived exopolysaccharides in bacterial interactions and also with foodborne pathogen

ABSTRACT

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2022/8/9 Accepted 2022/9/12

Keywords:

Dextran,

Heat-Labile Enterotoxin,

Surface Plasmon Resonance,

Exopolysaccharide,

Interaction

DOI: 10.22034/FSCT.20.136.1 DOR:20.1001.1.20088787.1402.20.136.1.9

*Corresponding Author E-Mail: tabatabai@um.ac.ir

toxins.