Investigating the Bioconversion of Tyrosol to Hydroxyltyrosol by Recombinant *Bacillus Subtilis* Spores and the Anticancer Effects of Hydroxytyrosol on MCF-7

Afrouz Hosseini
Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Iran, hosseini@sci.ui.ac.ir

Abstract

Introduction: Tyrosol (2-(4-Hydroxyphenyl) ethanol) is one of the natural phenolic compounds in olive which has antioxidant and anticancer effects. During the olive oil mill process, a lot of the phenolic compounds are released into the water which can contaminate the environment.However, these can be converted into useful ingredients and valuable dietary supplements. In the present study, tyrosol was converted to hydroxytyrosol by spore displayed tyrosinase and the anticancer effect of hydroxyl tyrosol was studied on MCF-7 breast cancer cells.

Materials and Methods: Spore suspension of the recombinant *Bacillus subtilis* DB104 (pSDJH-*cot*E-*tyr*), constructed in our previous research by genetic engineering methods and surface display technique, was prepared in sporulation medium. The spores were used in the bioconversion of tyrosol to hydroxytyrosol and the reaction was assayed by high-performance liquid chromatography. The anticancer effect of hydroxytyrosol on the MCF-7 breast cancer cell line was studied by a flow-cytometer.

Results: The results of the study revealed that 1mM of tyrosol was converted to 1mM of hydroxytyrosol after 60 min. The anticancer effect of hydroxytyrosol on MCF-7 was determined more than 80% after 48 h incubation.

Discussion and conclusion: According to the obtained results, spore displayed tyrosinase as an active enzyme is able to produce useful compounds with anti-cancer properties from olive oil derivatives. The anti-cancer effects of hydroxytyrosol produced by biotransformation of tyrosol on MCF-7 breast cancer cells are confirmed by previous studies.

Key words: Bioconversion, Tyrosol, Hydroxytyrosol, Recombinant Spore, MCF-7

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)
سال یازدهم، شماره ۴۱، بهار ۱۴۰۱، صفحه ۸ - ۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۲۶ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۰
Doi: 10.22108/BJM.2021.117400.1213

تبدیل زیستی تیروزول به هیدروکسی تیروزول با استفاده از اسپور نوترکیب *باسیلوس سابتیلیس* و بررسی اثرات ضدسرطانی هیدروکسی تیروزول بر سلول‌های MCF-7

افروز السادات حسینی: استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه اصفهان، ایران، af.hosseini@sci.ui.ac.ir

چکیده

مقدمه: تیروزول (۲ و ۴- هیدروکسی فنیل اتانول) از ترکیبات فنلی طبیعی موجود در زیتون است که اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی آن شناخته شده‌اند. بخش درخور توجهی از این ترکیبات فنلی در فرایند تولید روغن از زیتون، خارج و به آب استفاده‌شده در فرایند و درنهایت به پساب کارخانه وارد می‌شوند؛ درحالی‌که می‌توان این ترکیبات را به مواد فراسودمند و مکمل‌های غذایی تبدیل کرد. در این مطالعه تیروزول در اثر تبدیل زیستی با استفاده از آنزیم تیروزیناز تثبیت‌شده در سطح اسپور به هیدروکسی تیروزول تبدیل و اثر ضدسرطانی ترکیب حاصل بر سلول‌های سرطان سینه رده MCF-7 بررسی شد.

مواد و روش‌ها: اسپورهای سویهٔ نوترکیب *Bacillus subtilis* DB104 (pSDJH-cotE-tyr) که در پژوهش قبلی با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک و تکنیک نمایش پروتئین در سطح ایجاد شده بودند، در محیط اسپورزایی تهیه شدند. واکنش تبدیل زیستی تیروزول به هیدروکسی تیروزول با استفاده از اسپورها انجام و روند واکنش با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا ارزیابی شد. اثر ضدسرطانی هیدروکسی تیروزول بر رده سلولی MCF-7 با استفاده از فلوسیتومتری مطالعه شد.

نتایج: نتایج حاصل از کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا نشان دادند ۱ میلی‌مولار از تیروزول پس از ۶۰ دقیقه توسط تیروزیناز بیان‌شده در سطح اسپور به ۱ میلی‌مولار هیدروکسی تیروزول تبدیل شد. همچنین اثرات ضدسرطانی هیدروکسی تیروزول حاصل بیش از ۸۰ درصد در سلول‌های سرطانی MCF-7 پس از ۴۸ ساعت مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: براساس نتایج حاصل، از تیروزیناز تثبیت‌شده در سطح اسپور می‌توان به‌عنوان آنزیمی فعال برای تولید ترکیبات فراسودمند با خاصیت ضدسرطانی از مشتقات روغن زیتون استفاده کرد. اثرات ضدسرطانی هیدروکسی تیروزول تولیدشده در اثر تبدیل زیستی تیروزول بر سلول‌های سرطانی MCF-7، براساس مطالعات انجام‌شده بر سایر سلول‌های سرطانی تأیید شده است.

واژه‌های کلیدی: تبدیل زیستی، تیروزول، هیدروکسی تیروزول، اسپور نوترکیب، رده سلول MCF-

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

2322-5181/ © 2022 The Authors. Published by University of Isfahan
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

مقدمه

تکنیک نمایش سطحی[1] برای تولید بیوکاتالیست‌ها به‌خصوص با استفاده از اسپور باکتری‌ها تکنیکی جدید و منحصربه‌فرد است. برخی باکتری‌ها ازجمله *باسیلوس‌ها* در شرایط نامساعد محیطی به فرم اسپور تبدیل می‌شوند. اسپورزایی باکتریایی فرایندی برای محافظت از ماده ژنتیکی است که در پوشش سخت و خشک قرار گرفته است و برای سال‌ها در این مرحله می‌تواند باقی بماند (۱ و ۲). اسپور از چند لایه پروتئین پوششی تشکیل شده است که اسپور را از آسیب‌های محیطی حفظ می‌کند و پایداری آن را در اثر تغییرات pH، درجه حرارت بالا و خشکی و اشعه‌های UV و گاما افزایش می‌دهد (۳ و۴). بیان آنزیم‌ها در سطح اسپور با استفاده از تکنیک نمایش در سطح، نوعی تثبیت ژنتیکی آنزیم محسوب می‌شود. در این حالت علاوه بر حفظ پایداری ساختار و ویژگی‌های آنزیم، با توجه به اینکه اسپورها ویژگی‌های مقاومت منحصربه‌فردی دارند و می‌توانند در شرایط حاد دمایی، خشکی، مواد شیمیایی مهلک و حلال‌ها زنده باقی بمانند و تولید آنها آسان است، امکان استفادهٔ مداوم این آنزیم تثبیت‌شده به‌ویژه در صنعت فراهم می‌شود (۵). تیروزیناز[2] یک مونواکسیژناز[3] حاوی دو یون مس است که با شش اسیدآمینه هیستیدین احاطه شده و در طیف وسیعی از ارگانیسم‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی دیده شده است (۶). این آنزیم براساس نوع و فرم اتم‌های مس به سه فرم مت (CuII-CuII)، داکسی (CuI-CuI) و اکسی (CuII-O2-CuII) در سلول وجود دارد که فرم مت غالب است (۷). از قابلیت‌های آنزیم تیروزیناز تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدان با هیدروکسیله‌کردن حلقهٔ فنلی مواد است (۸)؛ بنابراین، از این آنزیم در تولید ترکیبات فراسودمند از ضایعات یا پسماندهای گیاهان می‌توان استفاده کرد که غنی از ترکیبات فنلی‌اند. با توجه به کاربردهای گستردهٔ تیروزیناز و اهمیت آن در صنایع به‌ویژه صنعت داروسازی مطالعات گسترده‌ای روی این آنزیم و روش‌های افزایش پایداری و مقاومت آن صورت گرفته است. در تحقیقی که به‌منظور افزایش پایداری و قابلیت استفادهٔ مجدد آنزیم انجام شده است، آنزیم تیروزیناز *باسیلوس مگاتریوم*[4] روی سطح اسپور باکتری *باسیلوس سابتیلیس*[5]، بیان و پایداری آنزیم تثبیت‌شده در سطح اسپور اثبات شد و نتایج نشان دادند آنزیم بدون کاهش فعالیت بارها می‌تواند استفاده شود (۵).

در طب سنتی از زیتون و روغن آن به‌عنوان داروی ملین، تب‌بر، نیروبخش، مؤثر در درمان عفونت‌های مجاری ادراری و برطرف‌کنندهٔ سردرد یاد شده است (۹). اسیدهای چرب روغن زیتون شامل مریستیک‌اسید، پالمتیک‌اسید، استئاریک‌اسید، اولئیک‌اسید و لینولئیک‌اسید و مواد غیرصابونی آن شامل هیدروکربن‌ها، ترکیبات فنولی و توکوفرول‌هاست (۱۰). همچنین روغن زیتون حاوی ویتامین‌های E و A و بتاکاروتن است (۱۱). از سایر ترکیبات این روغن می‌توان به تیروزول، هیدروکسی‌تیروزول، اریترودیول و الئانولیک‌اسید اشاره کرد (۱۲). در مراحل فراوری زیتون و تولید روغن زیتون با مصرف آب زیاد در کارخانه بخش عمده‌ای از این ترکیبات به پساب کارخانهٔ روغن زیتون‌سازی وارد و باعث افزایش بار فنلی پساب می‌شوند که به دنبال آن آلودگی زیست‌محیطی را در پی خواهد داشت. روش‌های فیزیکی یا شیمیایی مختلفی برای حذف یا بازیابی این ترکیبات مطالعه و استفاده شده‌اند (۱۳). از ویژگی‌های ارزشمند این ترکیبات می‌توان به اثرات ضدسرطانی،

جلوگیری از بیماری‌های قلبی عروقی، حذف رادیکال‌های آزاد، حفاظت در برابر تخریب اکسیداتیو ماده ژنتیکی، جلوگیری از تجمع پلاکت‌ها و ... اشاره کرد (۱۴). با توجه به قابلیت‌های آنزیم تیروزیناز در ایجاد گروه هیدروکسیل روی حلقه فنلی، تیروزیناز می‌تواند ترکیباتی متنوع با ویژگی آنتی‌اکسیدانی بیشتر تولید کند. تیروزول یکی از ترکیبات موجود در روغن زیتون است که اثرات ضدسرطانی دارد. این ترکیب با تیروزیناز به هیدروکسی تیروزول تبدیل می‌شود (۸). مطالعات نشان داده‌اند اثرات ضدسرطانی هیدروکسی تیروزول به‌علت داشتن ویژگی‌هایی ازجمله آنتی‌اکسیدان‌بودن و جلوگیری از تکثیر و افزایش آپوپتوز در بسیاری از لاین‌های سلول‌های سرطانی چندین برابر تیروزول است. اثرات ضدسرطانی این ترکیب بر سلول‌های توموری ریه، کلون، پانکراس و پروستات تاکنون گزارش شده است (۱۵).

هدف از این تحقیق استفاده از تیروزیناز تثبیت‌شده در سطح اسپور و تبدیل زیستی تیروزول حاصل از زیتون به هیدروکسی تیروزول و بررسی اثر ضدسرطانی ترکیب حاصل بر سلول‌های MCF-7 سرطان سینه است. با توجه به اینکه تیروزول در پساب روغن زیتون‌سازی به وفور وجود دارد، این مطالعه قابلیت‌های تیروزیناز تثبیت‌شده در سطح اسپور را برای تبدیل زیستی این ترکیب به یک مادهٔ فراسودمند با خاصیت ضدسرطانی بررسی می‌کند.

مواد و روش‌ها

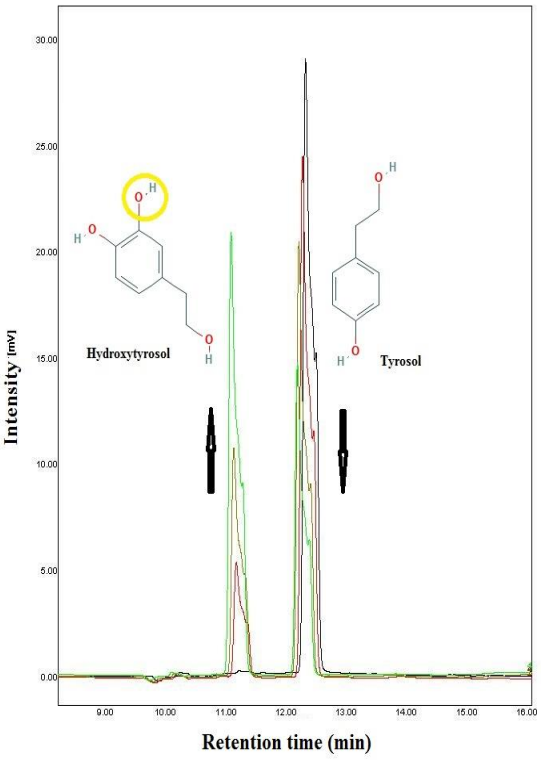
فعال‌سازی سویهٔ نوترکیب و تولید اسپور: سویهٔ مهندسی ژنتیک شده *Bacillus subtilis* DB104 (pSDJH-cotE-tyr) حاصل از پژوهش‌های قبلی به‌عنوان سویهٔ نوترکیب بیان‌کنندهٔ آنزیم تیروزیناز استفاده شد (۵). ابتدا سویهٔ مدنظر در محیط کشت MSR[۶] حاوی ۲/۵ درصد عصارهٔ مخمر، ۱/۵ درصد باکتوتریپتون[۷]، ۱ درصد گلوکز و ۰/۳ درصد K_2HPO_4 تلقیح شد و در گرمخانهٔ شیکردار در ۳۷ درجه و rpm ۲۰۰ به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. برای تولید اسپور، سویه در محیط کشت DSM[۸] حاوی ۰/۸ درصد وزن به حجم نوترینت براث، ۰/۰۱ میلی‌مولار کلرید منگنز، ۰/۱ درصد کلرید پتاسیم، ۰/۰۱ میلی‌مولار سولفات آهن، ۱ میلی‌مولار نیترات کلسیم و ۰/۰۲۵ درصد سولفات منیزیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با pH ۷ تلقیح و در گرمخانهٔ شیکردار برای ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در rpm ۲۰۰ هوادهی شد. برای جمع‌آوری اسپورها، محیط کشت در rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد (۱۶).

شرایط واکنش تبدیل زیستی: $۴*۱۰^{۸}$ اسپور همراه با ۱۰ میکرولیتر از سولفات مس ۱ میلی‌مولار برای تقویت فعالیت آنزیم و میزان ۹۲۴ میکرولیتر از بافر اسید بوریک ۵۰۰ میلی‌مولار با pH ۹ در حمام آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. پس از انکوباسیون، ۵۰ میکرولیتر از اسید آسکوربیک ۵ میلی‌مولار و ۱۰ میکرولیتر از تیروزول ۱ میلی‌مولار به مخلوط واکنش، اضافه و در مدت زمان‌های مختلف ۰، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند (۱۷). پس از گذشت زمان انکوباسیون هرکدام از نمونه‌ها، مخلوط واکنش با استفاده از ۵۰ میکرولیتر اسید هیدروکلریک ۱ مولار متوقف شد و نمونه‌ها با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC (Thermo Scientific Hypersil GOLD C18) بررسی شدند.

بررسی اثرات ضدسرطانی هیدروکسی تیروزول تولیدشده در کشت سلول MCF-7: رده سلولی MCF-7 از بانک سلول گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان تهیه شد. سلول‌ها در ۴ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM غنی‌شده با ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین – استرپتومایسین در فلاسک $25\ cm^2$ کشت داده و در گرمخانه با رطوبت ۹۵ درصد و $5\ CO_2$ درصد در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از تریپسینه‌کردن و تهیه سوسپانسیون سلولی، تعداد 2×10^5 سلول در هر چاهک از پلیت ۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سپس محیط کشت خارج شد و سلول‌ها با غلظت ۱ میلی‌مولار هیدروکسی تیروزول به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. مایع رویی حاوی سلول‌های مرده در فالکون ریخته شد و سلول‌ها تریپسینه شدند. پس از جداسازی، سلول‌ها با PBS، ۲ مرتبه شست‌وشو داده شدند و درنهایت، ۱۰۰ میکرولیتر رنگ PI با غلظت ۵ μM/ml برای رنگ‌کردن سلول‌ها اضافه شد. سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (Becton Dickinson FACSCalibur) همراه با نرم‌افزار CellQuest بررسی شدند (۱۸).

نتایج

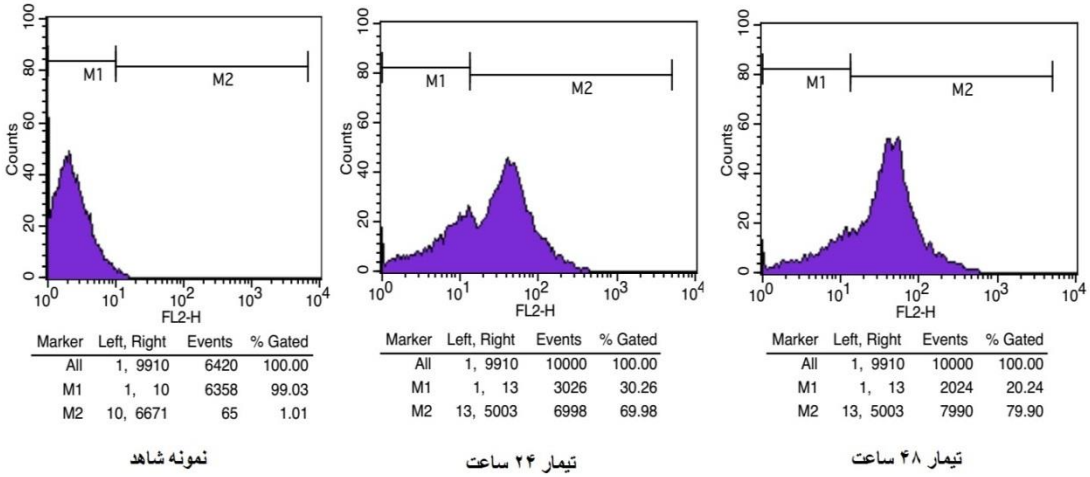
تبدیل زیستی تیروزول به هیدروکسی تیروزول با استفاده از آنزیم تیروزیناز بیان‌شده در سطح اسپور: همان‌طور که اشاره شد، برای بررسی روند واکنش آنزیمی و تبدیل تیروزول به هیدروکسی تیروزول با استفاده از آنزیم تیروزیناز تثبیت‌شده در سطح اسپور *باسیلوس سابتلیس* از کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا استفاده شد. شکل ۱ نمودار حاصل از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا است. همان‌طور که در شکل نشان داده شده است ۱ میلی‌مولار از تیروزول توسط آنزیم تیروزیناز بیان‌شده در سطح اسپور طی ۶۰ دقیقه به هیدروکسی تیروزول تبدیل شده است. زمان نگهداری[۹] برای تیروزول ۱۲ و ۱۶ دقیقه و برای هیدروکسی تیروزول ۵ و ۱۱ دقیقه است. براساس واکنش حاصل آنزیم تیروزیناز با مکانیسم ′۳ هیدروکسیلاسیون به تولید هیدروکسی تیروزول از تیروزول منجر شد.



شکل ۱- دیاگرام کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا از واکنش تبدیل زیستی تیروزول به هیدروکسی تیروزول با استفاده از تیروزیناز بیان‌شده در سطح اسپور در ۶۰ دقیقه

اثر هیدروکسی تیروزول بر زنده‌مانی سلول‌های سرطان سینه MCF-7: اثر کشندگی ۱ میلی‌مولار هیدروکسی تیروزول به‌دست‌آمده در اثر تبدیل زیستی تیروزول با استفاده از آنزیم تیروزیناز تثبیت‌شده در سطح سلول پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت براساس آنالیز

فلوسایتومتری در شکل ۲ نشان داده شده است. مطابق شکل ۲، ناحیهٔ M1 تجمع سلول‌های زنده را نمایش می‌دهد که با PI رنگ نشده‌اند و ناحیهٔ M2 نشان‌دهندهٔ تجمع سلول‌های مرده است. براساس نتایج حاصل، پس از ۲۴ ساعت حدود ۷۰ درصد و پس از ۴۸ ساعت حدود ۸۰ درصد سلول‌ها در اثر تیمار با هیدروکسی تیروزول از بین رفته‌اند. این نتایج اثر ضدسرطانی هیدروکسی تیروزول روی سلول‌های سرطانی MCF-7 را اثبات می‌کند.



شکل ۲- نمودار هیستوگرام فلوسایتومتری از سلول‌های **MCF-7** تیمارشده با هیدروکسی تیروزول

بحث و نتیجه‌گیری

تبدیل زیستی ترکیبات طبیعی به ترکیبات فراسودمند توسط آنزیم تیروزیناز تاکنون در چندین مطالعه بررسی شده است و نتایج نشان داده‌اند این آنزیم به‌طور مؤثری با انجام هیدروکسیلاسیون منجر به تولید ترکیبات فعال زیستی می‌شود. پژوهش پیشین در استفاده از تیروزیناز تثبیت‌شده در سطح اسپور برای تبدیل زیستی ترکیبات حاصل از سویا و در تبدیل زیستی دیدزین (′۴ و ۷ دی هیدروکسی ایزوفلاون)[۱۰] به 3'-ODI[۱۱] نشان داد ۱ میلی‌مولار از دیدزین توسط این آنزیم به مدت ۶۰ دقیقه به ۱ میلی‌مولار 3'-ODI تبدیل شده است (۱۹). در مطالعهٔ حسینی و طیبی در سال ۲۰۱۹، از تیروزیناز تثبیت‌شده در سطح اسپور برای تبدیل زیستی جنیستئین[۱۲] سویا به اروبول[۱۳] استفاده شد. اثر ضدسرطانی اروبول حاصل بر سلول‌های سرطانی MCF-7 نشان‌دهندهٔ افزایش چشمگیر در خاصیت ضدسرطانی اروبول نسبت به جنیستئین بوده است (۲۰). در مطالعهٔ حاضر از آنزیم تیروزیناز تثبیت‌شده در سطح اسپور باکتری به‌عنوان آنزیمی پایدار و فعال برای تبدیل زیستی تیروزول به هیدروکسی تیروزول استفاده شد. نتایج نشان دادند ۱ میلی‌مولار از تیروزول پس از ۶۰ دقیقه توسط این آنزیم به ۱ میلی‌مولار هیدروکسی تیروزول تبدیل می‌شود. نتایج حاصل، اهمیت استفاده از تیروزیناز تثبیت‌شده در سطح اسپور در تبدیل زیستی ترکیبات طبیعی و تولید ترکیبات فراسودمند را نشان می‌دهند.

همچنین با توجه به مقاومت اسپور، تثبیت ژنتیکی آنزیم در سطح اسپور و براساس نتایج حاصل از پژوهش‌های انجام‌شده، این آنزیم قابلیت پایداری و

استفادهٔ مجدد دارد (۵). تثبیت ژنتیکی تیروزیناز در سطح اسپور سبب حفظ فعالیت آنزیم طی نگهداری طولانی مدت در دمای محیط می‌شود و علاوه بر آن، اسپورهای نوترکیب حاوی آنزیم به‌طور چشمگیری قابلیت استفادهٔ مکرر با حفظ فعالیت داشتند (۵ و ۲۰).

نقش هیدروکسی تیروزول به‌عنوان یک ترکیب شیمیایی ضدسرطان، در سلول‌های کارسینومای انسانی در بسیاری از مطالعات آزمایشگاهی به اثبات رسیده است (۲۱-۲۳). محققان نشان داده‌اند اثرات ضدسرطانی هیدروکسی تیروزول به‌علت داشتن ویژگی‌هایی ازجمله آنتی‌اکسیدان‌بودن و جلوگیری از تکثیر و افزایش آپوپتوز در بسیاری از لاین‌های سلول‌های سرطانی چندین برابر تیروزول است. اثرات ضدسرطانی این ترکیب بر سلول‌های توموری ریه، کلون، پانکراس و پروستات تاکنون گزارش شده‌اند (۲۴و۲۵). مطالعات در خصوص اثرات هیدروکسی تیروزول بر سلول‌های سرطان کبد و کلون نشان‌دهندهٔ اثر این ترکیب در مهار فاکتورهای القاکنندهٔ تومور، ممانعت از سنتز DNA، توقف چرخهٔ سلولی و سرکوب مسیرهای AKT (NF-κB[۱۴]) است (۲۶و۲۷)؛ بنابراین، به‌طور گسترده در مطالعات، هیدروکسی تیروزول را ترکیب ضدسرطان با قابلیت کاهش قابل ملاحظهٔ زنده‌مانی سلول سرطانی توصیف می‌کنند و از آن به‌عنوان فاکتور پیشگیری‌کننده یا درمانی نام برده‌اند. در مطالعهٔ حاضر نیز اثرات ضدسرطانی هیدروکسی تیروزول بیش از ۸۰ درصد در سلول‌های سرطانی MCF-7 پس از ۴۸ ساعت مشاهده شدند.

همان‌طور که اشاره شد، در اثر مراحل استخراج روغن زیتون از زیتون، بخش زیادی از ترکیبات روغن زیتون وارد پساب می‌شوند. بخش درخور توجهی از این ترکیبات فنلی در فرایند تولید روغن از زیتون خارج و به آب استفاده‌شده در فرایند و درنهایت به پساب کارخانه وارد می‌شوند. در این حالت با افزایش بار فنلی پساب، آلودگی زیست‌محیطی در پی خواهند داشت و همچنین باعث کاهش ارزش آنتی‌اکسیدان‌های موجود در روغن زیتون می‌شوند. در ایران نیز برای تصفیهٔ پساب فنلی حاصل از مراحل استخراج روغن از زیتون، از روش‌های شیمیایی، آنزیم‌های پراکسیدازی یا قارچ‌ها برای تجزیهٔ ترکیبات فنلی استفاده شده است (۲۸)؛ اما قابلیت تبدیل این ترکیبات به مواد آنتی‌اکسیدانی فراسودمند تاکنون بررسی نشده است. برای بازیابی آنتی‌اکسیدان‌های فراسودمند در پساب حاصل و تولید آنتی‌اکسیدان‌های جدید از ترکیبات فنلی موجود، تیروزیناز تثبیت‌شده در سطح اسپور به‌عنوان یک منبع آنزیمی پایدار حائز اهمیت است. با توجه به تثبیت این آنزیم به‌صورت ژنتیکی و بیان آن در سطح اسپور و اینکه اسپور *باسیلوس* بسیار مقاوم به تغییرات pH، دما، خشکی، اشعه و ... است، آنزیم تثبیت‌شده در سطح اسپور نیز پایدار بوده است و قابلیت استفادهٔ مکرر دارد (۵). گفتنی است *باسیلوس سابتیلیس* یک باکتری پروبیوتیک و کاملا امن است؛ بنابراین، این روش نسبت به روش‌های شیمیایی کاملا سازگار با محیط زیست است.

براساس نتایج حاصل، از تیروزیناز تثبیت‌شده در سطح اسپور به‌عنوان آنزیمی فعال برای تولید هیدروکسی تیروزول از تیروزول استفاده می‌شود. همچنین این آنزیم قابلیت حذف آلاینده‌های فنلی ناشی از فعالیت کارخانه‌های روغن زیتون‌سازی را دارد و برای تهیه مواد فراسودمند با خاصیت ضدسرطانی استفاده می‌شود؛ البته در این خصوص به مطالعات گسترده‌تر نیاز است.

References

(1) Knecht LD, Pasini P, Daunert S. Bacterial spores as platforms for bioanalytical and biomedical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011; 400 (4): 977-989.

(2) Sangal A, Pasini P, Daunert S. Stability of spore-based biosensing systems under extreme conditions. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2011; 158 (1): 377-382.

(3) Desnous C, Guillaume D, Clivio P. Spore photoproduct: a key to bacterial eternal life. *Chemical Reviews*. 2009; 110 (3): 1213-1232.

(4) Ghosh S, Zhang P, Li YQ, Setlow, P. Superdormant spores of *Bacillus* species have elevated wet-heat resistance and temperature requirements for heat activation. *Journal of Bacteriology*. 2009; 191 (18): 5584-5591.

(5) Hosseini-Abari A, Kim BG, Lee SH, Emtiazi G, Kim W, Kim JH. Surface display of bacterial tyrosinase on spores of *Bacillus subtilis* using CotE as an anchor protein. *Journal of Basic Microbiology*. 2016; 56 (12): 1331-1337.

(6) Sendovski M, Kanteev M, Ben-Yosef VS, Adir N, Fishman A. First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. *Journal of Molecular Biology*. 2011; 405 (1): 227-237.

(7) Sanchez-Ferrer A, Rodriguez-Lopez JN, Garcia-Canovas F, Garcia-Carmona F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta Journal*. 1995; 1247 (1): 1–11.

(8) Espin JC, Soler-Rivas C, Cantos E, Tomas-Barberan FA, Wichers HJ. Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49: 1187−1193.

(9) Somova LI, Shode FO, Ramnanan P, Nadar A. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003; 84 (2–3): 299-305.

(10) Owen RW, Haubner R, Wurtele G, Hull WE. Spiegelhalder B, Bartsch, H. Olives and olive oil in cancer prevention. *European Journal of Cancer Prevention*. 2004; 13 (4): 319-326.

(11) Huang ZR, Lin YK, Fang JY. Biological and Pharmacological Activities of Squalene and Related Compounds: Potential Uses in Cosmetic Dermatology. *Molecules.* 2009; 14 (1): 540-554.

(12) Duquesnoy E, Castola V, Casanova J. Triterpenes in the hexane extract of leaves of *Olea europaea L.*: analysis using 13C-NMR spectroscopy. *Phytochemical Analalysis*. 2007; 18 (4): 347-353.

(13) Aliabadi M, Fazel S, Vahabzadeh F. Application of Acid Cracking and Fenton Processes in Treating Olive Mill Wastewater. *Journal of Water and Wastewater*. 2006; 17 (1): 30-36.

(14) Cicerale S, Lucas L, Keast R. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *International Journal of Molecular Sciences.* 2010; 11: 458-479.

(15) Han J, Talorete TP, Yamada P, Isoda H. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology.* 2009; 59: 45-53.

(16) Harwood C, Cutting S. *Molecular Biological Methods for Bacillus*. England: John Wiley & Sons; 1990.

(17) Lee SH. *Fine control of tyrosinase dependent monophenol oxidation: production of functional hydrogels*. Korea: Seoul National University; 2017.

(18) Tayebi M. *Activity enhancement of spore displayed tyrosinase and studying its applications*. Iran: University of Isfahan; 2019.

(19) Hosseini-Abari A. Bioconversion of daidzein to 3'-ODI by *Bacillus Subtilis* spore displayed tyrosinase. *Biological Journal of*

Microorganism. 2018.

(20) Hosseini-Abari A, Tayebi M. Bioconversion of genistein to orobol by *Bacillus subtilis* Spore Displayed Tyrosinase and monitoring the anticancer effects of orobol on MCF-7 breast cancer cells. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2019; 24: 507-512.

(21) Notarnicola M, Pisanti S, Tutino V, Bocale D, Rotelli MT, Gentile A, et al. Effects of olive oil polyphenols on fatty acid synthase gene expression and activity in human colorectal cancer cells. *Genes & Nutrition*. 2011; 6: 63-69.

(22) Menendez JA, Lupu R. Mediterranean dietary traditions for the molecular treatment of human cancer: anti-oncogenic actions of the main olive oil's monounsaturated fatty acid oleic acid (18:1n-9). *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2006; 7: 495-502.

(23) Casaburi I, Puoci F, Chimento A, Sirianni R, Ruggiero C, Avena P, et al. Potential of olive oil phenols as chemopreventive and therapeutic agents against cancer: a review of in vitro studies. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2013; 57: 71-83.

(24) Fabiani R. Anti-cancer properties of olive oil secoiridoid phenols: a systematic review of in vivo studies, *Food and Function*. 2016; 7: 4145-4159.

(25) Han E, Yang Y, He Z, Cai J, Zhang X, Dong X. Development of tyrosinase biosensor based on quantum dots/chitosan nanocomposite for detection of phenolic compounds. *Analytical Biochemistry*. 2015; 486: 102-106.

(26) Vilaplana-Pérez C, Auñón D, García-Flores LA, Gil-Izquierdo A. Hydroxytyrosol and Potential Uses in Cardiovascular Diseases, Cancer, and AIDS. *Frontiers in Nutrition.* 2014.

(27) Sun L, Luo C, Liu J. Hydroxytyrosol induces apoptosis in human colon cancer cells through ROS generation. *Food & Function*. 2014; 1909–1914.

(28) Alemzadeh I, Mirzaei F. Phenol Removal from Industrial Wastewater by HRP Enzyme. *Journal of water and wastewater*. 2009; 19 (4): 2-8.

---

[1]- Surface display technique
[2]- Tyrosinase
[3]- Monooxygenase
[4] *Bacillus megaterium*
[5]- *Bacillus subtilis*
[6]- Medium super rich
[7]- Bacto tryptone
[8]- Difco Sporulation Medium
[9]- Retention time
[10]- Daidzein (4', 7-dihydroxyisoflavone)
[11]- 7, 3', 4'trihydroxyisoflavone (3'-ODI)
[12]- Genistein
[13]- Orobol
[14]- nuclear factor-kappa B