کلون سازی و بیان ژن رمزکننده آنزیم لاکاز قارچ *Trametes* در میزبان مخمری و تعیین خصوصیات کینتیکی و بیوشیمیایی آنزیم

اردشیر حسام پور *، نوشین مهندسی

۱.گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه ، واحد تهران مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران ، ایران.

***نویسنده مسئول**: *a.hesampour@gmail.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۲۸

چکیده

لاکاز متعلق به خانواده پلی فنول اکسیداز است و به دلیل خواص ساختاری و عملکردی در حذف آلودگی‌های زیست محیطی اهمیت بسیار زیادی دارد. اخیرا قابلیت اکسیداسیون مواد فنلی و غیر فنلی لاکاز مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است. هدف از این پژوهش، تولید لاکاز نوترکیب و تعیین خصوصیات بیوشیمایی و کینتیکی آنزیم است. از آنجائیکه قارچ *Trametes* قابلیت تولید مقدار اندک لاکاز را دارد، جهت تولید انبوه، توالی آمینواسیدی لاکاز شناسایی و توالی ژنی مطابق ترجیح کدونی میزبان مخمری *Pichia pastoris*، طراحی و سنتز شد. ژن لاکاز سنتزی تحت کنترل پروموتور قوی القایی AOX و سیگنال پپتید αMF در ناقل PpinkαHC کلون سازی و پس از انتقال به میزبان متیلوتروف *Pichia pastoris* داخل ژنوم اینتگره شد و به ترتیب در محیط‌های بیانی BMGY و القایی BMMY با متانول به صورت خارج سلولی بیان شد. پس از بررسی‌کمی وکیفی آنزیم، خصوصیات فیزیکوبیوشیمیایی آنزیم نوترکیب تعیین شد. بررسی فعالیت لاکازی سوپرناتانت مخمرهای ترانسفورم شده، بیان خارج سلولی آنزیم نوترکیب فعال را نشان داد. بررسی سوپرناتات نشان داد وزن مولکولی لاکاز نوترکیب ۶۵ کیلو دالتون است. همچنین بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی لاکاز نوترکیب، محدوده pH اسیدی وسیع با pH بهینه ۴/۸ و نتایج سنجش پروفایل دمایی، بهینه دمای ۶۰ °C را نشان داد. با بررسی پارامترهای کینتیکی، K_m =۱۴۰µM تعیین شد که نتایج بدست آمده نشان داد لاکاز نوترکیب با مقدار تولید انبوه و خصوصیات فیزیکوشیمیایی مناسب با معیارهای صنعتی، به صورت فعال و خارج سلولی بیان شده است. آنزیم لاکاز نوترکیب بیان شده قابلیت کاربری در صنایع متعدد دارویی، غذایی و استفاده در بیوتکنولوژی جهت پاکسازی محیط زیست را دارد.

واژگان کلیدی: لاکاز، پیکیا پاستوریس، قارچ ترامتس، مخمر.

مقدمه

امروزه آنزیم‌ها (کاتالیزورهای زیستی) از نظر بیوتکنولوژی اهمیت ویژه‌ای دارند و در صنایع متعدد مانند صنایع غذایی، دارویی، تصفیه پساب‌ها و پاکسازی محیط زیست کاربردهای گوناگونی دارند. لاکاز از جمله آنزیم هایی است که کاربری بیوتکنولوژیکی فراوانی در بسیاری از صنایع از جمله داروسازی، فرایند شفاف سازی آبمیوه‌ها، رنگ‌زدایی صنعتی پارچه، صنایع غذایی و کاغذسازی دارد. در سال‌های اخیر از لاکاز در پاکسازی محیط زیست (Bioremidation) و سم-زدایی فاضلاب و تجزیه مواد گزنوبیوتیک مانند افت‌کش‌ها و مواد فنولی آروماتیک استفاده شده است (Ryan et al.,2006; Campo et al.,2006). کاربردهای وسیع لاکاز باعث شده است تا تلاش برای تولید لاکاز صنعتی با پایداری بیشتر در برابر حرارت و اثر بر سوبستراهای بیشتر از اهمیت ویژه ای برخوردار و همواره مورد توجه محققین باشد. لاکازها (بنزندیول-اکسیژن اکسیدوردوکتاز ;EC: ۱,۱۰,۳,۲) پلی فنول اکسیدازهایی متعلق به خانواده اکسیدازهای چند مسی blue (MCOs) - گروه بزرگی از آنزیم‌هایی که حداقل با وجود ۴ یون مسی در دومینCupredoxin شناسایی می شوند- هستند. لاکاز در بسیاری از روندهای بیولوژیکی مانند تجزیه لیگنین، بیوسنتز سلول گیاهی، ریخت زایی قارچی و قدرت بیماریزایی قارچها (virulence) و ملانیزاسیون باکتری‌های بیماریزا در حشرات، شرکت دارد. همچنین

سوبستراهای لیگنوسلولزی‌که گروه وسیعی از گزنوبیوتیک‌ها (آفت‌کش‌ها، هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAH) و رنگ‌ها می باشد که معمولا دارای گروه‌های آمینی فنولی یا آروماتیک بوده که توسط لاکازهای بازیدیومیست‌ها با شکست پیوند یا oxidative coupling تبدیل می شوند (Antosova et al.,2016; Campo et al., 2013). از آنجا که لاکازهای تولید و ترشح شده از منابع طبیعی به دلیل بازده تولیدی کم و هزینه‌های گزاف فرایندهای آماده‌سازی و خالص‌سازی آنزیم، برای اهداف صنعتی و تولید انبوه مناسب نیستند، لذا با استفاده از بیان هترولوگوس می‌توان بازده تولید آنزیمی را افزایش داد (Janusz et al.,2013; Wang et al., 2016; Effenberger et al., 2017.) بیان پروتئین نوترکیب در میزبان‌هایی که به راحتی قابل کشت هستند، باعث تولید بیشتر در زمان کمتر و همچنین کاهش هزینه‌های تولید می شود. تولید آنزیم را می توان با افزایش تعداد کپی‌های ژن، استفاده از پروموتر قوی و توالی نشانه موثر جهت هدایت پروتئین به محیط خارج سلولی، افزایش داد. دستیابی به سیستم بیان نوترکیب لاکاز و بهینه سازی آن، امکان تولید آنزیم‌هایی که متناسب با نیاز مصرف کننده یا فرایندهای صنعتی باشد را فراهم کرده است (Hesampour et al., 2015; Mohandesi et al., 2016; Yang et al., 2016; Meijin et al., 2008). در این تحقیق هدف تولید لاکاز نوترکیب در میزبان مخمری به میزان بیان بالا و تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنزیم نوترکیب به منظور کاربرد های غذایی، دارویی و تحقیقاتی منطبق با معیارهای صنعتی است.

مواد و روش کار

مواد شیمیایی و آنزیم ها

آنزیم‌های محدودگر *Xho*I و *Kpn*I استفاده شده در این تحقیق از شرکت Takara ژاپن تهیه شد. آنزیم T4 DNA Ligase و DAN Polymerase از شرکت Roche تهیه شد که طبق شرایط توصیه شده کارخانه استفاده گردید. تخلیص DNA پلاسمیدی و کیت استخراج DNA از شرکت Roche خریداری شد.

محیط‌های کشت BMMY ,BMGY,YPD و PAD[1] از شرکت Invitrogen خریداری شد. کلیه مواد شیمیایی مورد آزمایش از شرکت‌های Sigma و Merck خریداری شد.

ارگانیسم‌ها و ناقل‌ها

تمامی سویه‌های باکتری و مخمری و ناقل‌های مربوطه مورد استفاده در جدول ۱ عنوان شده است. باکتری *E.coli* سویه DH5α جهت کلون سازی و ترانسفورماسیون مورد استفاده قرار گرفت. مخمر پیکیا پاستوریس[2] سویه GS115 (his4) و ناقل بیانی pPinkα-HC (7.9Kb) (شکل ۱) از شرکت Invitrogen خریداری شد.

تهیه سلول مستعد (Competent Cell) و انتقال ژنتیکی

یک میلی لیتر از پیش کشت باکتری *E.coli* سویه $DH_5\alpha$، به ارلن حاوی ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت لوریا برتانی LB (Merck, USA)[3] اضافه شد و ارلن حاوی کشت به شیکر انکوباتور با دمای ۳۷°C و دور ۱۸۰ rpm برای رسیدن به OD_{550}=۰/۳ انتقال یافت (حدود ۳ ساعت طول کشید). پس از رسیدن به OD مناسب جهت تهیه سلول های مستعد طبق روش استاندارد Sambrook تهیه شد (Sambrook & Fritsch, 1989). پس از انجام مراحل لیگاسیون و تهیه سلول‌های باکتریایی مستعد، محصول لیگاسیون با استفاده از شوک حرارتی به درون سلول مستعد منتقل شد (Sambrook & Fritsch, 1989).

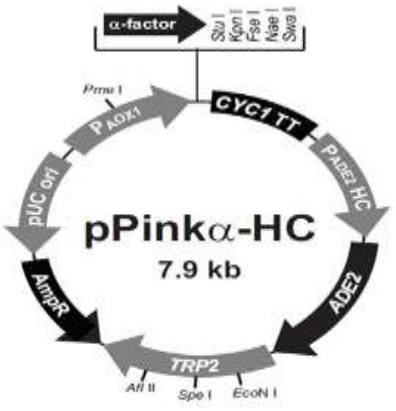
طراحی پرایمر و انجام PCR

1. Pichia Adenine Dropout (PAD)
2. *Pichia pastoris*
3 .Luria-Bertani (LB)

پرایمرهای فرادست و فرودست پس از آنالیز کامپیوتری توسط نرم افزار Oligo طراحی شد و توالی‌ها مطابق جدول ۱ توسط شرکت TAG A/S Copenhagen (Denmark) سنتز شد. ساخت ناقل بیانی حامل ژن لاکاز و انتقال به میزبان مخمری *Pichia pastoris*

توالی آمینواسیدی پروتئین لاکاز در قارچ *Trametes pubescens* بررسی شد و توالی نوکلئوتیدی آن بر اساس ترجیح کدونی[4] میزبان بیانی متیلوتروف *Pichia pastoris* و با حذف اسید آمینه های ناحیه سیگنال پپتید ابتدای N ترمینال طراحی و توسط شرکت Gene Art آلمان در ناقل کلونینگ PUC57 سنتز شد. ناقل کلونینگ PUC57 حاوی ژن سنتتک لاکاز و ناقل بیانی pPinkα- HC توسط آنزیم های محدودالاثر *Xho*I و *Kpn*I به غلظت ۱۰ واحد آنزیمی در دمای C° ۳۷ به مدت ۹۰ دقیقه برش دوگانه داده شد و قطعات حاصل از ژل الکتروفورز ۱ ٪ جداسازی شد و پس از یون زدایی توسط کیت یون زدایی خریداری شده از شرکت Vivantis، قطعه ژن LCC (Insert) به غلظت ۲۵ نانوگرم و pPinkα-HC (Vector) به غلظت ۱۰۰ نانوگرم به وسیله آنزیم T4 ligase به غلظت ۱ واحد آنزیمی و بافر لیگاسیون در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر مطابق روش استاندارد کلون-سازی شد(Sambrook & Fritsch, 1989). پلاسمید نوترکیب pPinkα –LCC به سلول مستعد *E. coli* $DH_5\alpha$ منتقل شد و کلون‌های نوترکیب با استفاده از روش کلونی PCR توسط پرایمرهای اختصاصی فرادست و فرودست ژن لاکاز (LACF و LACR) در شرایط دناتوراسیون اولیه C° ۹۵ (۳ دقیقه)، دناتوراسیون C°۹۵، اتصال C°۶۰، طویل شدن C°۷۲ در ۳۰ سیکل انجام شد. پس از غربالگری پلاسمید نوترکیب حامل ژن لاکاز با استفاده از کیت استخرج پلاسمید جداسازی و توسط آنزیم برشی *BsptI* (Vivantis) در ناحیه لوکوس TRP 2 که محل اینتگریشن در ژنوم میزبان *Pichia pastoris* است، در دمای C° ۳۷ به مدت ۸۰ دقیقه بریده شد. قطعات بریده شده پس از تائید برش توسط ژل الکتروفورز، یون زدایی شده و جهت انتقال به میزبان مخمری مورد استفاده قرار گرفت و به وسیله روش الکتروپوریشن بر روی v ۱۸۵۰ :V ، Ω ۲۰۰ :R ، μF ۲۵:C تنظیم و توسط دستگاه الکتروپوریتور (BTX Harvard ECM 630) قطعه خطی شده به میزبان *Pichia pastoris* مستعد شده منتقل شد و بر روی محیط انتخابی PAD ساخت کمپانی Invitrogen (آمریکا) به مدت ۳ الی ۵ روز در دمای C° ۲۸ کشت داده شد (Hesampour *et al.*, 2014)) ناقل بیانی PichiaPink فاقد ژن لاکاز نیز پس از خطی سازی به طور موازی به میزبان مستعد پیکیا پاستوریس *Pichia pastoris* با روش الکتروپوریشن به عنوان کنترل منفی انتقال داده شد.

4 .Codon preference



شکل ۱_ نقشه ژنتیکی ناقل pPinkαHC دارای پروتور القایی AOX و ترمیناتور CYC، مارکر آنتی بیوتیکی آمپی سیلین، مارکر اگزوتروف ژن رمز کننده آدنین و محل اینتگریشن TRP2 را نشان می دهد (دستورالعمل شرکت Invitrogen).

جدول ۱- سویه‌ها، پلاسمید و پرایمرهای مورد استفاده در مراحل آزمایشگاهی

مواد	شرح خصوصیات	مرجع
سویه‌ها		
DH5α	*E.coli* ,α-complementation	Fermentase
پیکیا پاستوریس	میزبان بیانی پروتئین	Invitrogen
پلاسمید		
pPinkαHC	به منظور اینتگریشن به پیکیا پاستوریس	Invitrogen
پرایمرها		
LACF Forward	5'- CGCCAAGCTTGGAAAAGAGAGGTATC -3'	
LACR Reverse	5'- AAGGATCCTCATTAGTGGTGGTGGTGTTGGTCAGATGGG -3	

غربالگری ژنوم مخمرهای ترانسفورم شده

جهت غربالگری کلونی‌های ترانسفورم شده به محیط انتخابی PAD (فاقد آدنین)، آزمون کلونی PCR بر روی نمونه های مخمر حاوی ژن لاکاز اینتگره شده که بر روی محیط انتخابی PAD رشد کرده (کلونی سفیدرنگ) به وسیله پرایمرهای اختصاصی LACF و LACR ژن لاکاز و همچنین پرایمرهای اختصاصی ناحیه پپتید نشانه alpha mating factor پلاسمید pPinkα –HC، انجام شد (پرایمرهای اختصاصی از کیت PichiaPink™ Expression System ساخت کمپانی Invitrogen تهیه شد). به این منظور کلون‌های سفید رنگ لیز شد واز آن به عنوان الگو در فرآیند PCR استفاده شد (Hesampour et al.2014).

بیان لاکاز نوترکیب

کلونی‌های مخمری پیکیا پاستوریس نوترکیب حاوی ژن لاکاز که نتیجه آزمایش کلونی PCR آنها مثبت بود، جهت آماده-سازی به منظور بیان آنزیمی ابتدا به محیط جامد YPD و سپس به محیط مایع بیانی BMGY کشت داده شدند. در نهایت به منظور القای بیان ژن تحت کنترل پروموتور القاییAOX به محیط القایی مایع BMMY منتقل شد و با استفاده از متانول (v/v) ۱٪ به صورت روزانه به مدت ۴ روز القا شد (Hesampour et al.,2014).

آنالیز لاکاز نوترکیب بیان شده

جهت بررسی پروتئین لاکاز نوترکیب بیان شده به شکل خارج سلولی در سوپرناتانت مخمرهای ترانسفورم شده، از روش SDS-PAGE با ژل آکریل آمید ۱۲٪ استفاده شد. پس از انجام الکتروفورز، ژل به مدت ۶۰ دقیقه در محلول کوماسی بلو G250 رنگ آمیزی و در نهایت رنگ‌بری شد (Sambrook & Fritsch., 1989).

سنجش آنزیمی

به منظور بررسی کمی بیان آنزیم لاکاز نوترکیب، سوپرناتانت محیط BMMY القا شده حاوی مخمر ترانسفورم شده جداسازی شد و سنجش فعالیت آنزیمی لاکاز با سوبسترای سرین گالدازین در دمای ۳۰°C و طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه گیری شد (Feng & Li.,2014; Kalyani et al.,2015).

تعیین خصوصیات فیزیکو شیمیایی لاکاز نوترکیب

به منظور بدست آوردن پارامترهای کینتیکی آنزیمی، فعالیت لاکاز ترشح شده نوترکیب با غلظت پروتئینی یکسان در غلظت‌های گرادیانت سوبسترای سرین گالدازین (۱۴ غلظت سریالی از ۵۰ تا ۱۰۰۰) بر حسب میکرومول (µmol) مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از نرم افزار Graphpad prism 6 نمودار میکائیلیس منتون نمونه‌ها رسم شده و ضرایب کینتیکی *Km* و*Vmax* محاسبه شد. به منظور بدست آوردن دمای بهینه آنزیم، فعالیت آن در دماهای متفاوت از ۲۰°C تا ۹۰ و با فاصله ۱۰°C در بافر استات سدیم ۰/۲ مولار pH , ۵/۵ به مدت ۳۰ دقیقه تعیین و پس از محاسبه فعالیت ویژه، نمودار مربوطه که نمایانگر پروفایل دمایی آنزیم لاکاز نوترکیب بود رسم گردید. به منظور رسم پروفایل pH و تعیین pH بهینه آنزیم لاکاز نوترکیب، فعالیت آنزیم در pH های متفاوت بافری (۱ تا ۸) در دمای ثابت ۳۷°C به مدت ۳۰ دقیقه توسط بافرهای زیر تعیین شد .

*تمامی آزمون ها با انجام حداقل ۳ تکرار و احتساب میانگین و انحراف از معیار[5] انجام گردید.

نتایج

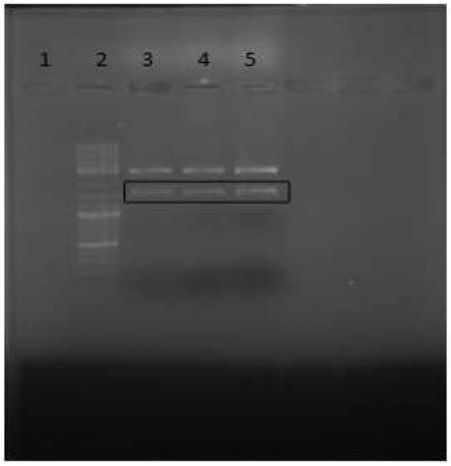
ساخت ناقل بیانی حامل لاکاز به منظور تولید لاکاز نوترکیب در مخمر متیلوتروف ***Pichia pastoris***

توالی نوکلئوتیدی ناحیه ORF ژن رمز کننده لاکاز قارچ *Trametes*پس از حذف توالی پپتید نشانه آن بر اساس ترجیح کدونی *Pichia pastoris* توسط نرم افزار Gene

5.Standard derivation

Optimizer طراحی و در داخل ناقل PUC سنتز شد. پلاسمیدهای نوترکیب PUC حامل ژن لاکاز از باکتری *E.coli DH5α* استخراج شد (شکل ۲). برش آنزیمی توسط آنزیم‌های *Xho*I و *Kpn*I ایجاد و جداسازی ژن لاکاز از پلاسمید نوترکیب PUC انجام شد (شکل ۳).

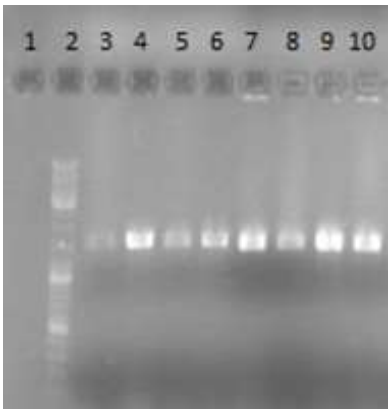
شکل ۲_استخراج پلاسمید PUC حامل ژن لاکاز از باکتری‌های تراریخت شده، چاهک ۱. کنترل منفی، چاهک ۲. مارکر ۱ کیلو باز و چاهک های ۳ تا ۵. پلاسمیدهای حاوی ژن لاکاز کلون شده در PUC می باشد. کنترل منفی (استخراج پلاسمید از باکتری *E.coli DH5α* فاقد پلاسمید).



شکل ۳_محصول هضم آنزیمی پلاسمید PUC-LCC، چاهک ۱. کنترل منفی، چاهک ۲. مارکر ۱ کیلو باز، چاهک‌های ۳،۴و ۵. هضم پلاسمید PUC-LCC با آنزیم‌های برشی *Xho*I و *Kpn*I که در شکل قطعه مربوط به ژن جدا شده از پلاسمید نمایش داده شده است. کنترل منفی (مواد هضم آنزیمی بدون DNA الگو)

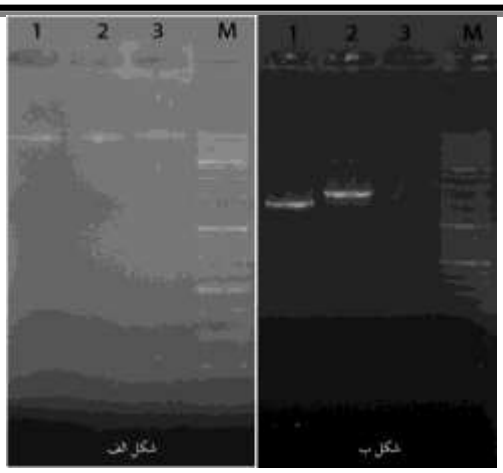
به منظور کلون‌سازی ژن لاکاز (LCC)، ناقل pPinkα-HC نیز توسط آنزیم‌های محدودگر *Xho*I و *Kpn*I هضم آنزیمی شد و پس از اتصال قطعات بریده شده با استفاده از آنزیم T4 ligase به یکدیگر، ناقل نوترکیب pPinkα-LCC حاصل

گردید و به میزبان*E.coli* منتقل شد. برای تایید صحت کلون‌سازی، برای کلونی‌های رشد کرده بر روی محیط انتخابیLB+AMP که باکتری‌های *E.coli* حامل پلاسمید نوترکیب (pPinkαHC-LCC) بودند، با استفاده از پرایمرهایLACF و LACR واکنش کلونی PCR انجام شد. نتایج حاصل، حضور ژن لاکاز را در ناقل نوترکیب pPinkαHC نشان داد (شکل ۴).



شکل ۴_محصول کلونی PCR جهت شناسایی ژن لاکاز داخل ناقل بیانی pPinkα –HC، چاهک ۱. کنترل منفی ، چاهک ۲: DNA Ladder Mix چاهک‌های۳، ۴، ۵، ۶ الی ۹. نمونه های کلون ها چاهک ۱۰. کنترل مثبت (مواد Master Mix به علاوه PUC-LCC به همراه پرایمرهای LACF و LACR)

پس از استخراج pPinkα–LCC از باکتری، ناقل نوترکیب با استفاده از آنزیم برشی *BsptI* خطی شد و با روش الکتروپوریشن به میزبان مخمری مستعد شده *Pichia pastoris*منتقل شد. کلونی‌های ترانسفورم شده به منظور غربالگری به محیط انتخابی PAD که فاقد آدنین است منتقل شدند. کلونی‌هایی که پلاسمید pPink-LCC در داخل ژنوم آنها در محل ژن TRP2 وارد شده باشند به دلیل اینکه پلاسمید pPink دارای ژن ADE رمز کننده آدنین است به مخمرهای پروتوتروف تبدیل می شوند و قابلیت رشد در محیط انتخابی را دارند. پس از انتقال کلونی‌های سفید رنگ جداسازی شد و برای بررسی حضور ژن لاکاز اینتگره شده، ابتدا نمونه مخمر حاوی ژن لاکاز اینتگره شده که بر روی محیط انتخابیPAD رشد کرده (کلونی سفیدرنگ) استخراج شد (شکل ۵ الف) و سپس DNA ژنومی استخراج شده به عنوان الگو در فرآیند PCR توسط پرایمرهای اختصاصی LACF و LACR ژن‌لاکاز و همچنین پرایمرهای اختصاصی ناحیه پپتید نشانه alpha mating factor پلاسمید pPinkα HC– استفاده شد و حضور ژن لاکاز اینتگره شده در مخمرهای ترانسفورم شده تایید شد (شکل ۵ ب).

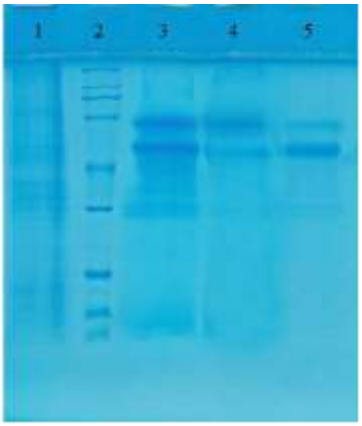


شکل ۵- الف) استخراج DNA ژنومی از کلون های مخمرهای سفید رنگ ، چاهک ۱ الی ۳. ژنوم پیکیا پاستوریس‌های حاوی لاکاز اینتگره شده داخل ژنوم را نشان می دهند، چاهک M، مارکر ۱ کیلو بازی می باشد.

ب) نتایج حاصل از PCR بر روی ژنوم پیکیا پاستوریس حاوی لاکاز اینتگره شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن لاکاز که در چاهک ۱ نشان داده شده است و پرایمرهای اختصاصی ناحیه پپتید نشانه alpha mating factor داخل پلاسمید بیانی pPinkα –HC که در چاهک ۲ نمایش داده شده است. چاهک ۳ کنترل منفی می باشد.

بیان لاکاز نوترکیب در میزبان مخمری متیلوترف

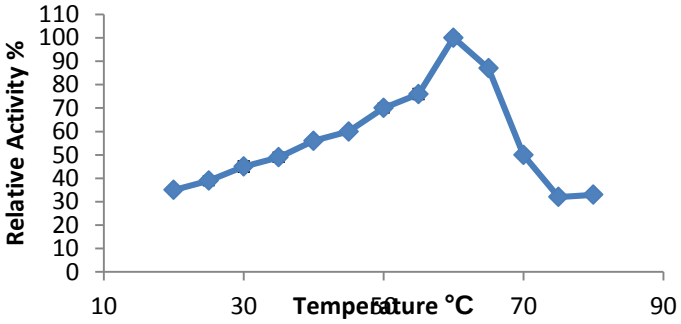
کلنی‌های ترانسفورم شده ابتدا در محیط رشدی BMGY کشت و سپس رسوب و در محیط بیانی BMMY کشت داده شدند. در محیط القایی BMMY با استفاده از متانول پروموتور AOX ژن لاکاز القا شد و طی ۴ روز القا از هر مرحله القا نمونه گیری انجام شد و پروفایل القایی بیان لاکاز نوترکیب رسم شد. سوپرناتانت نمونه های دارای فعالیت لاکازی بر روی ژل SDS-PAGE بررسی شد (شکل ۶). پروتئین لاکاز به دلیل قابلیت گلیکوزیلاسیون توسط میزبان مخمری گلیکوزیله شده و با وزن مولکولی ۶۵ کیلودالتون بر روی ژل آکریل آمید مشاهده شد.



شکل۶ـ ژل SDS-PAGE از سوپرناتانت‌های محیط بیانی BMMY. چاهک ۱. پروتئین های ترشحی پیکیا پاستوریس پذیرنده وکتور pPink فاقد ژن لاکاز (کنترل منفی). چاهک ۲. مارکر پروتئینی، چاهک‌های۳ الی ۵. سوپرناتانت محیط بیانی پیکیا پایتوریس حامل ژن لاکاز اینتگره شده در ژنوم.

تعیین خصوصیات فیزیکو شیمیایی لاکاز نوترکیب= محدوده دمایی فعالیت لاکاز نوترکیب

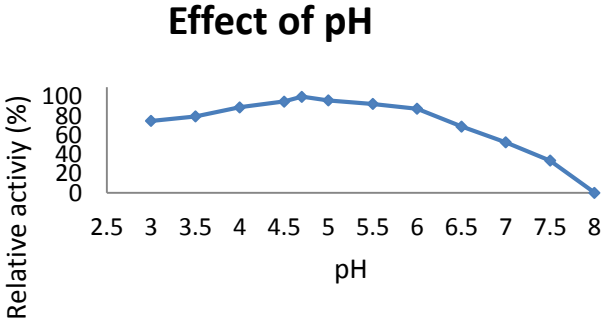
به منظور بدست آوردن دمای بهینه برای آنزیم، فعالیت آن در دماهای متفاوت از ۲۰°C تا ۹۰ و با فاصله ۱۰°C تعین و پس از محاسبه فعالیت ویژه هر نمونه، نمودار مربوطه که نمایانگر پروفایل دمایی لاکاز نوترکیب بود رسم گردید. نتایج مطابق نمودار نشان داد که دمای بهینه فعالیت آنزیم ۶۰° C می باشد (نمودار ۱).



نمودار ۱_ نمودار پروفایل فعالیت لاکازی در دماهای متغییر را نشان می دهد که فعالیت ویژه نمونه ها با غلظت کل پروتئین ثابت در مقابل دماهای مختلف نشان داده شده است.

تعیین خصوصیات فیزیکو شیمیایی لاکاز نوترکیب= فعالیت آنزیمی لاکاز و پروفایل pH

به منظور رسم پروفایل pH و تعیین pH بهینه آنزیم لاکاز نوترکیب، فعالیت آنزیم در pH های متفاوت بافری (۱ تا ۸) تعیین شد. پس از محاسبه فعالیت ویژه هر نمونه، نمودار پروفایل pH لاکاز نوترکیب رسم گردید و بررسی نتایج، مطابق نمودار ۲، pH بهینه ۴/۸ را نشان داد.



نمودار۲_ نمودار پروفایل فعالیت لاکازی در pH متغییر را نشان می دهد که فعالیت ویژه نمونه ها با غلظت کل پروتئین ثابت در مقابل دماهای مختلف نشان داده شده است.

خصوصیات کینتیکی آنزیم لاکاز بیانی

به منظور بدست آوردن پارامتر های کینتیکی آنزیمی، فعالیت لاکاز نوترکیب با غلظت پروتئینی یکسان در غلظت‌های گرادیانت سوبسترایی سرین گالدازین سنجش شد. نتایج نشان داد که آنزیم نوترکیب دارای پارامترهای کینتیکی K_m =۱۴۰µM ، V_{max} = ۱۳۲ µmol $min^{-1}mg^{-1}$ و K_{cat} = ۱۶۸ s^{-1} و فعالیت ویژه[6] 1.14×10^{6} $s^{-1}mol^{-1}$ می باشد.

6. Kinetic Efficiency

بحث

اخیرا مطالعات وسیعی نیز در مورد تولید انبوه پروتئین های نوترکیب در میزبان های قارچی با قابلیت رشد سریع در محیط حداقل و ارزان، همچنین قابلیت تولید انبوه آنزیم نوترکیب (در مقیاس چند گرم) با خصوصیات کاملا حفظ شده یوکاریوتی از لحاظ تغییرات پس از رونویسی و ساختار مناسب انجام شده است. نتایج متعددی که از تولید لاکاز نوترکیب در میزبان‌های قارچی منتشر شده است نشان می دهدکه در مقایسه با بیان طبیعی، میزان لاکاز نوترکیب چندین برابر افزایش یافته است. (Ergün & Çalık., 2016; Kittl et al., 2012; Li et al., 2014; Kiiskinen & Saloheimo., 2004.) از آنجاییکه آنزیم انتخاب شده از منبع قارچی ارگانیسم یوکاریوت می باشد و بر روی پروتئین طبیعی[7] قارچی تغییرات پس از ترجمه[8] از قبیل گلیکوزیلاسیون انجام می شود؛ بنابراین تولید این آنزیم در سیستم‌های پروکاریوتی کارا نخواهد بود و باید از سیستم‌های بیانی از قبیل مخمر ها استفاده کرد که از نظر گلیکوزیلاسیون شبیه سیستم‌های قارچی هستند و از نظر سادگی عمل، ظرفیت بیان بالا و قابلیت استفاده برای تولید انبوه از بهترین سیستم‌های بیان پروتئین های نوترکیب به شمار می آیند. (Huang et al.,2011; Mohandesi et al.,201;, Bleve et al.,2014;Ludovic et al., 2000; Lehmann et al., 2002.)

ژن لاکاز با منبع قارچی در میزبان های متعدد کلون‌سازی و بیان شده است، اما به دلیل بیان اندک لاکاز نتوانسته اند علیرغم بیان فعال خارج سلولی به صورت صنعتی در صنایع استفاده شوند. از آنجائیکه در میزبان های مخمری متیلوتروف، پروتئین‌های یوکاریوتی متعددی با موفقیت کلون‌سازی و بیان شده بودند و با توجه به قابلیت دستورزی ژنتیکی آسان میزبان‌های مخمری و توانایی تولید پروتئین نوترکیب در محیط‌های ارزان حداقل با تنها منبع کربن متانول و همچنین مطالعات بسیاری که در مورد بیان انبوده آنزیم‌های صنعتی در آنها انجام پذیرفته است، میزبان مخمری به منظور تولید لاکاز نوترکیب انتخاب شد (Feng & L.,2013;Huang et al., 2011). از بین مخمرهای متیلوتروف نیز ژن لاکاز به صورت نوترکیب در میزبان‌های مخمری و قارچی نیز تولید نوترکیب شده است. در این تحقیق، بنابراین میزبان مخمری *Pichia pastoris* را انتخاب نمودیم تا بتوان علاوه بر تولید لاکاز نوترکیب با بررسی و مقایسه خصوصیات بیوشیمیایی و کینتیکی آنزیم با سایر لاکازهای نوترکیب، کاندیدای مناسب جهت تولید انبوه لاکاز را با توجه به معیارهای تولید صنعتی لاکاز شناسایی نماییم. (Gibson et al., 2007; Feng & Li., 2014; *Piscitelli* et al., 2010). بدین منظور از آنجائیکه قارچ های گروه بازیدیومیست عمده ترین تولیدکننده آنزیم لاکاز هستند، مناسب ترین ژن لاکاز قارچی از *Trametes* (ایزوآنزیم ۲ لاکازی با pH ایزوالکتریک ۲/۶ و۴۰٪ فعالیت لاکازی ایزوفرم غالب) انتخاب شد و مطابق ترجیح کدونی میزبان طراحی و همچنین پس از تغییر در برخی نواحی تنظیمی ژنی در مخمر *Pichia pastoris* کلون‌سازی شد به شکل موفقیت‌آمیز لاکاز نوترکیب با استفاده از پپتید نشانه Alpha mating factor به شکل خارج سلولی و فعال بیان شد. نتایج بررسی خصوصیات بیوشیمیایی نشان داد که لاکاز نوترکیب دارای pH با تمایل و پایداری در محدوده pH های اسیدی است که حداکثر فعالیت در pH=4.8 مشاهد شد. بررسی رفتار لاکاز نوترکیب نشان داد که فعالیت و مقاومت در pH های اسیدی می تواند به دلیل الگوی گلیکوزیلاسیون مخمری و گلیوزیلاسیون در جایگاه آسپارژین لاکاز باشد که باعث شده تا آنزیم مذکور با توجه به pH اسیدی گزینه مناسبی جهت کاربری صنعتی باشد. (Xu et al., 2017) مطالعات در مورد محدوده فعالیت دمایی لاکاز نوترکیب نشان داد که لاکاز نوترکیب تولید شده دارای بهینه دمای ۶۰ °C است و این درحالی است که لاکازهای نوترکیب

7. Native

8. Post translational modification

تولید شده در میزبان های مخمری دارای دمای بهینه ۵۰°C تا ۵۵ می باشد. (Huang et al., 2011; Feng & Li., 2013; Feng & L., 2014. به علاوه لاکاز نوترکیب تولید شده توسط *Pichia pastoris* دارای دامنه فعالیت حرارتی بهینه بین ۵۰°C تا ۶۵ است که با توجه به دمای بهینه C ۶۰° و محدوده دمایی می توان لاکاز نوترکیب را گرمادوست تعیین نمود که مناسب جهت استفاده در صنایع متعدد است (You et al,.2014; YouMa. et al.,2011.) بررسی مطالعه پارامترهای کینتیکی لاکاز نوترکیب نشان داد که لاکاز نوترکیب دارای پارامترهای کینتیکی *Km, Vmax, Kcat* و تاثیر کینتیکی مشابهی با لاکاز طبیعی و لاکازهای قارچی گزارش شده می باشد که تمایل بالایی به سوبسترا داشته و فعالیت آنزیمی مناسبی جهت کاربری در صنعت دارد (Kiiskinen& Saloheimo.,2004; Gibson et al., 2007).

نتیجه گیری

با بیان خارج سلولی آنزیم لاکاز نوترکیب در این تحقیق و بررسی‌های خصوصیات بیوشیمیایی و کینتیکی آنزیم نشان داد که آنزیم قابلیت‌کاربری صنعتی داشته و می توان در صورت تولید انبوه در مطالعات بیوتکنولوژی و کاربری صنعتی در رفع مشکلات محیط زیست نقش مهمی ایفا کند.

تشکر و قدردانی

مقاله مذکور استخراج شده از از طرح تحقیقاتی با عنوان " کلون سازی و بیان ژن رمز کننده آنزیم لاکاز قارچ *Trametes* در میزبان مخمری و تعیین کننده خصوصیات کینتیکی و بیوشیمیایی آنزیم " مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی می باشد و نویسندگان مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی به دلیل حمایت از طرح تحقیقاتی ذیل نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

1. Antosova, Z., Sychrová, H. 2016. Yeast Hosts for the Production of Recombinant Laccases: A Review. Mol Biotechnol, 58(2): 93-116.

2. Bleve, G., Lezzi , C., Spagnolo, S., Rampino, P., Perrotta, C., Mita, G., Grieco, F. 2014. Construction of a laccase chimerical gene: recombinant protein characterization and gene expression via yeast surface display. Appl Biochem Biotechnol, 172(6): 2916-2931.

3. Campo, I., Alegria, I., Zazpe, M., Echeverria, M., Echeverria, I. 2006. Diluted acid hydrolysis pretreatment of Agri-food wastes for bioethanol production. Ind Crops and Products, 24(3): 214-221.

4. Effenberger, I., Harport, M., Pfannstiel, J., Klaiber, I., Schaller, A. 2017. Expression in *Pichia pastoris* and characterization of two novel dirigent proteins for atropselective formation of gossypol. Appl Microbiol Biotechnol, 101(5): 2021-2032.

5. Ergün, BG., Çalık, P. 2016. Lignocellulose degrading extremozymes produced by *Pichia pastoris*: current status and future prospects. Bioprocess Biosyst Eng, 39(1): 1-36.

6. Feng, BZ., Li, P. 2014. Cloning, characterization and expression of a novel laccase gene Pclac2 from *Phytophthora capsici*. Braz J Microbiol, 8;45(1): 351-357.

7. Feng, BZ., Li, PQ., Fu, L., Yu, XM. 2015. Exploring laccase genes from plant pathogen genomes: a bioinformatic approach. Genet Mol Res, 30;14(4): 14019-1436.

8. Feng, BZ., Li, PQ. 2013.Cloning and expression of a novel laccase gene from *phytophthora capsici*. J Plant Pathology, 95(2): 417-421.

9. Gibson, S., Nyanhongo Gübitz, G., Sukyai, P., Leitner, C., Dietmar H., Ludwig, R. 2007. Oxidoreductases from *Trametes* sp. in Biotechnology: A Wealth of Catalytic Activity. Food Technology and Biotechnology, 45(3): 250–268.

10. 10.Huang, S.J., Liu, Z.M., Huang, X.L., Guo, L.Q., Lin, J.F. 2011. Molecular cloning and

concept for thermostability engineering of proteins: further proof of concept." Protein Eng, 15(5): 403-411.

19. Mohandesi, N., Ranaei Siadat, S.O., Haghbeen, K., Hesampour, A. 2016. Cloning and expression of *Saccharomyces cerevisiae* SUC2 gene in yeast platform and characterization of recombinant enzyme biochemical properties. J 3 Biotech, 6(2): 1-10.

20. Mohandesi, N., Haghbeen, K., Ranaei Siadat, S.O., Arab S.S. 2017. Catalytic efficiency and thermostability improvement of Suc2 invertase through rational site-directed mutagenesis. Enzyme and Microbial Technology, 96: 14-22.

21. Meijin, G., Haifeng, H., Taicheng, Z., Yingping Zh., Ju, Ch., Siliang Zh. 2008. Effect of glycosylation on biochemical characterization of recombinant phytase expressed in *Pichia pastoris*. Enzyme and Microbial Technology, 42(4): 340–345.

22. Otterbein, L., Record, E., Longhi, S., Asther, M., Moukha, S. 2000. Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris*. Eur J Biochem, 267: 1619-1625.

23. Piscitelli, A., Pezzella, C., Giardina, P., Faraco, V., Sannia, G. 2010. Heterologous laccase production and its role in industrial applications, Bioeng Bugs. 1(4): 252–262.

24. Sambrook, J., Fritsch, E.F. 1989. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA."

25. Wang, B., Yan,Y., Tian, Y., Zhao, W., Li, Z., Gao, J., Peng, R., Yao, Q. 2016. Heterologous expression and characterisation of a laccase from *Colletotrichum lagenarium* and decolourisation of different synthetic dyes. World J Microbiol Biotechnol, 32(3): 40.

26. Xu, H., Guo, MY., Gao, YH., Bai, XH., Zhou, XW. 2017. Expression and characteristics of manganese peroxidase from *Ganoderma lucidum* in *Pichia pastoris* and its application in the characterization of a novel laccase gene from a white-rot fungus *Polyporus grammocephalus* TR16 and expression in *Pichia pastoris*. Letters in Applied Microbiology, 52: 290–297.

11. Hesampour, A., Ranaei Siadat, S.E., Malboobi, M.A., Mohandesi, N., Arab, S.S., Ghahremapour, M. 2015. Enhancement of thermostabilty and kinetic efficiency of *Aspergillus Niger* PhyA phytase by site directed mutagenesis. Appl Biochem Biotechnol, 175(5): 2528-2541.

12. Hesampour, A., Ranaei Siadat, S.O., Malboobi, M.A., Mohandesi, N., Harati, J. 2014. Comparison of biochemical properties of recombinant phytase expression in favourable methylotrophic platforms, *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*. Progress in Biological science, 4(1): 97-111.

13. Janusz, G., Kucharzyk, KH., Pawlik, A., Staszczak, M., Paszczynski, AJ. 2013. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. Enzyme Microb Technol, 52(1): 1-12.

14. Kittl, R., Gonaus, C., Pillei C., Haltrich, D., Ludwig, R. 2012. Constitutive expression of *Botrytis aclada* laccase in *Pichia pastoris*. Bioengineered, 3(4): 232-235.

15. Kiiskinen, L., Saloheimo, M. 2004. Molecular Cloning and Expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a Laccase Gene from the Ascomycete Melanocarpus albomyces. Appl Environ Microbiol, 70(1): 137–144.

16. Kalyani, D., Kumar, M., Jinglin, T., Li Sun, Ch.K., Vipin C., Kalia, Y.Ch.K. 2015. A Highly Efficient Recombinant Laccase from the Yeast *Yarrowia lipolytica* and Its Application in the Hydrolysis of Biomass. PLOS ONE,10.

17. Li, Q., Ge, L., Cai, J., Pei, J., Xie, J., Zhao, L. 2014. Comparison of two laccases from *Trametes versicolor* for application in the decolorization of dyes. J Microbiol Biotechnol, 24(4): 545-555.

18. Lehmann, M., Loch, C., Middendorf, A,. Studer, D., Lassen, S.F., Pasamontes, L. van Loon, A.P., Wyss, M. 2002. The consensus

cloning of a laccase gene from *Ganoderma lucidum* and heterologous expression in *Pichia pastoris*. J Basic Microbiol, 54.

29. Zhong-You, M.a., Pu, Sh.Ch., Bo Huang, J.J., Fan, M.Zh., Li, Z.Z. 2011. A novel thermostable phytase from the fungus *Aspergillus aculeatus* RCEF 4894: gene cloning and expression in *Pichia pastoris*." World J of Microbiology and Biotechnology, 27(3): 679-686.

degradation of four dyes and phenol. BMC Biotechnol, 23;17(1).

27. Yang, J., Xu, X., Ng, T.B., Lin, J., Ye, X. 2016. Laccase Gene Family in Cerrena sp. HYB07: Sequences, Heterologous Expression and Transcriptional Analysis. J of Molecules, 4;21(8).

28. You, L.F., Liu, Z.M., Lin, J.F., Guo, L.Q., Huang, X.L., Yang, H.X. 2014. Molecular

Cloning and expression of fungal *Trametes* Laccase gene in yeast host and characterization of recombinant enzyme biochemical properties and kinetic parameters

Hesampour A [*], Mohandesi N

1. Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[*]**Corresponding Author**: *a.hesampour@gmail.com*

Received: 10 May 2017 Accepted: 19 December 2017

Abstract

Laccase have received much attention from researchers in last decades due to their ability to oxidase both phenolic and non-phenolic lignin related compounds as well as highly recalcitrant environmental pollutants, which makes them very useful for their application to several biotechnological processes. Despite of *Trametes* Laccase wildly application as detoxification of industrial effluents, its native low expression, makes it unsuitable for industrial application. In this study, heterologous expression of *Trametes* Laccase gene in methylotrophic yeast, *P. pastoris* with αMF as signal peptide and PpinkαHC expression vector under methanol induction in BMGY and BMMY media was investigated and expressed active recombinant laccase biochemical and biophysical properties in compare with native *Trametes* Laccase was studied. According to codon performance of *P. pastoris*, *Trametes* Laccase gene sequence designed and synthetic genes under control of inducible AOX1 promoter was successfully high expressed as active form in yeast host, SDS-PAGE analysis showed the recombinant laccase in size of 65KDa with *Km*=140μM.Analysis of Laccase biochemical and biophysical properties demonstrated that recombinant Laccase has wide pH profile with pH optima 4.8 and optimum temperature of 60 °C with high activity in *P.pastoris* host. We conclude that recombinant *P. pastoris* Laccase could fulfil a serried of predefined industrial quality criteria to be used in industry like, broad pH optimum, substrate specify and proper thermal stability. Therefore, studied methylotrophic yeast could be an appropriate host for expression and production of recombinant Laccase, with industrial application.

Keywords: Laccase, *Pichia Pastoris*, *Trametes*, yeast.