مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۸، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۸
صفحه ۱۳۱-۱۲۱

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 2

همسانه سازی و بیان هترولوگ لاکاز در *Pichia pastoris* و تعیین خصوصیات بیوشیمیایی لاکاز نوترکیب

Cloning and heterologous expression of Laccase in *Pichia pastoris* and determination of some biochemical properties

الهام سلیمانی[1*]، قربانعلی‌نعمت‌زاده[1*]، روحا کسری کرمانشاهی[2]، سوسانارودریگز[3]

Elham Soleimani[1*], Rouha Kasra Kermanshahi[2], Ghorbanali Nematzadeh[1], Susana Rodriguez Couto[3]

۱- پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- دانشگاه الزهرا (س)
3. Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Spain

1. Genetic & Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT). Sari Agricultural Sciences & Natural Resources University (SANRU)
2. Alzahra university Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: solimanielham@yahoo.com or Gh.nematzadeh@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۸/۴/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۶/۴)

چکیده

لاکازها آنزیم‌هایی حاوی مس می‌باشند که اکسیداسیون ترکیبات آروماتیک و غیرآروماتیک را از طریق احیای مولکول اکسیژن به آب کاتالیز می‌کنند . همچنین به دلیل قابلیت اکسیداسیون طیف وسیعی از ترکیبات فنلی کاربرد وسیعی در صنعت دارند. در این مطالعه توالی نوکلئوتیدی ژن لاکاز بر اساس ترجیح کدونی میزبان مخمری *Pichia pastoris* GS115 بهینه شد، سپس توسط شرکت اینویتروژن سنتز و در حامل بیانی pPICZ alpha A همسانه‌سازی شد و تحت پیشبر AOX1 به مخمر پیکیا پاستوریس به روش الکتروپوریشن منتقل شد. به منظور تعیین شرایط بهینه بیش بیان آنزیم، در سطوح مختلفی از دما، غلظت مس و متانول القای بیان صورت گرفت و فعالیت آنزیم در هریک از سطوح ارزیابی شد. بیش بیان آنزیم در غلظت ۰/٤ میلی‌مولار مس و ۰/۸ درصد متانول و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به دست‌آمد. بیش بیان ترشحی لاکاز در شرایط بهینه U/L ۹٦۰۰ به دست‌آمد. پس از بررسی کیفی و کمی آنزیم برخی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم تعیین شد. دما و pH بهینه لاکاز نوترکیب به ترتیب٤۰ درجه سانتی‌گراد و ۳ تعیین شد. بررسی پایداری دمایی و pH لاکاز نشان داد که این آنزیم پایداری بالایی در برابر حرارت داشته و قادر به فعالیت در طیف وسیعی از pH می‌باشد. بررسی خصوصیات کینتیکی آنزیم با استفاده از سوبسترای ABTS، mM ۰/۰۸۹ =*Km* تعیین شد. نتایج این تحقیق نشان داد که مخمر پیکیا پاستوریس می‌تواند کاندیدای مناسبی برای بیان لاکاز نوترکیب به منظور استفاده در صنایع متعدد جهت پاکسازی پساب، بیوسنسور و سایر کاربردها باشد.

واژه‌های کلیدی

لاکاز،
پیکیا پاستوریس،
بیان هترولوگ،
زیست‌پالایی،
همسانه‌سازی

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.3.1]

مقدمه

لاکازها (EC 1.10.3.2) آنزیم‌های حاوی اتم مس می‌باشند که در مقایسه با سایر آنزیم‌های اکسیداتیو طیف وسیعی از مولکول‌های آلی و غیرآلی نظیر مونو و دی فنل‌ها، پلی‌فنل‌ها، دی‌آمین‌ها، آمین-های آروماتیک و آلیفاتیک را در محدوده‌ی وسیعی از pH با احیای مولکول اکسیژن به آب اکسید می‌کنند Ratanapongleka *et al.* 2017; Hong *et al.* 2007; Vasconcelos *et al.* 2000 ; Couto *et al.* 2007 Lassouane *et al.* 2019). این آنزیم‌ها حاوی ٤ اتم مس می‌باشند و رنگ آبی پروتئین نیز به دلیل وجود اتم‌های مس می‌باشد (Fernandez *et al.* 2013; Quatarino *et al.* 2009; Noreen *et al.* 2015).

لاکازها در گیاهان، قارچ‌ها، حشرات، مخمر و باکتری شناسایی شده‌اند (Strong *et al.* 2011; Janusz *et al.* 2006; Misra *et al.* 2014). در میان منابع مختلف تولید کننده‌ی لاکاز، قارچ‌های سفید عامل پوسیدگی چوب (White rot fungus) مورد توجه قرار گرفته‌اند (Canas & Camarero 2010; Duran *et al*, 2002; Fortes *et al*, 2017; Araújo *et al*, 2005). قابلیت اکسیداسیون مولکول‌های آلی به ویژه در حضور حدواسط‌هایی نظیر ABTS واکنش‌پذیری با طیف وسیعی از سوبستراها، به همراه پایداری نسبتا بالای آنزیم، آنها را کاندیدای مناسبی برای استفاده در فرآیندهای صنعتی نظیر: صنایع غذایی، چرم، چوب و کاغذ، دارویی، تصفیه‌ی پساب و نانوبیوتکنولوژی کرده‌است (Rodgers *et al.* 2009; Arockiasamy *et al.* 2008; Yang *et al.* 2017; Mukhopadhyay *et al.* 2015 Eghareyba, 2017). علی‌رغم کاربرد وسیع لاکازها در فرآیندهای صنعتی، هزینه بالای تولید این آنزیم از جمله موانع استفاده از آنها در صنعت می‌باشد (Trupkin *et al.* 2003; Wang *et al.* 2016). قارچ‌های طبیعی تولیدکننده‌ی لاکاز رشد کندی دارند و میزان تولید لاکاز از منابع طبیعی پایین بوده و برای کاربردهای صنعتی مقرون به صرفه نمی‌باشد به همین دلیل بهینه‌سازی فرآیند تولید مقرون به صرفه لاکاز به منظور توسعه کاربرد آنزیم در صنعت ضروری است (Bronikowski *et al.* 2017; Callejon *et al.* 2017). از سویی دیگر یک موجود زنده که به طور طبیعی تولید کننده‌ی لاکاز ممکن است چندین ایزوزایم مختلف لاکاز را به طور همزمان تولید کند که خصوصیات بیوشیمیایی متفاوتی را نشان می‌دهند، بیان لاکاز در یک میزبان یوکاریوت، امکان تولید آنزیم به میزان بالاتر و با هزینه‌ی کمتر فراهم می‌آورد (Molares-Alvarez *et al.* 2017). همچنین با استفاده از سویه‌هایی که چند نسخه از ژن مورد نظر را دارند، پروموترهای قوی و توالی‌های تنظیمی مناسب می‌توان میزان تولید را افزایش داد (Wang *et al.* 2016).

سرعت رشد بالا، قابلیت ترشح پروتئین به خارج سلول، توانایی انجام تغییرات پس از ترجمه مانند گلیکوزیلاسیون و پایداری انتقال ژن به دلیل ورود ژن به ساختار کروموزوم از طریق نوترکیبی، پیکیا پاستوریس را میزبان مناسبی برای بیان ژن‌های یوکاریوت در مقایسه با سایر سیستم‌های بیانی که دستکاری آنها پیچیده‌تر می‌باشد، کرده‌است (Hong *et al.* 2002; Li *et al.* 2014). مخمر متیلوتروفیک پیکیا پاستوریس می‌تواند برای بیان پروتئین‌های نوترکیب تحت کنترل پروموتر الکل اکسیداز مورد استفاده قرار گیرد (Mellitzer *et al.* 2012). آنزیم لاکاز از منابع مختلف قارچی مانند *Laccaria bicolor* ، به طور موفقیت‌آمیزی در پیکیا بیان شده‌است. آنزیم انتخاب شده در این مطالعه به طور طبیعی در قارچ *Trametes versicolor* تولید می‌شود، تغییرات پس از ترجمه نظیر گلیکوزیلاسیون برای تشکیل ساختار نهایی و فعال آنزیم ضروری‌ست. گلیوکوزیلاسیون موجب حفاظت آنزیم در برابر پروتئولیز، پایداری در برابر گرما و هدایت پروتئین به خارج می‌شود (Rodgers *et al.* 2002)، بنابراین بیان هترولوگ لاکاز در میزبان پروکاریوت موفق نخواهد بود، پیکیا پاستوریس به عنوان میزبان یوکاریوت ساده که قادر به انجام تغییرات پس از ترجمه نظیر گلیکوزیلاسیون نیز می‌باشد، می‌تواند برای بیان آنزیم‌های قارچی از جمله لاکاز مورد استفاده قرار گیرد.

هدف از پژوهش حاضر بهینه‌سازی توالی ژن لاکاز بر اساس ترجیح کدونی میزبان مخمری، بهینه‌سازی بیان لاکاز در پیکیا جهت دستیابی به بیشینه‌ی بیان و تعیین برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم نوترکیب به منظور استفاده در فرآیندهای صنعتی می‌باشد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.3.1]

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده: محیط کشت و مواد شیمیایی از شرکت سیگما و فرمنتاز، و آنزیم‌های برشی و کیت‌های مورد نیاز برای تکثیر و برش پلاسمید از شرکت فرمنتاز تهیه شد.

تهیه سازه بیانی نوترکیب

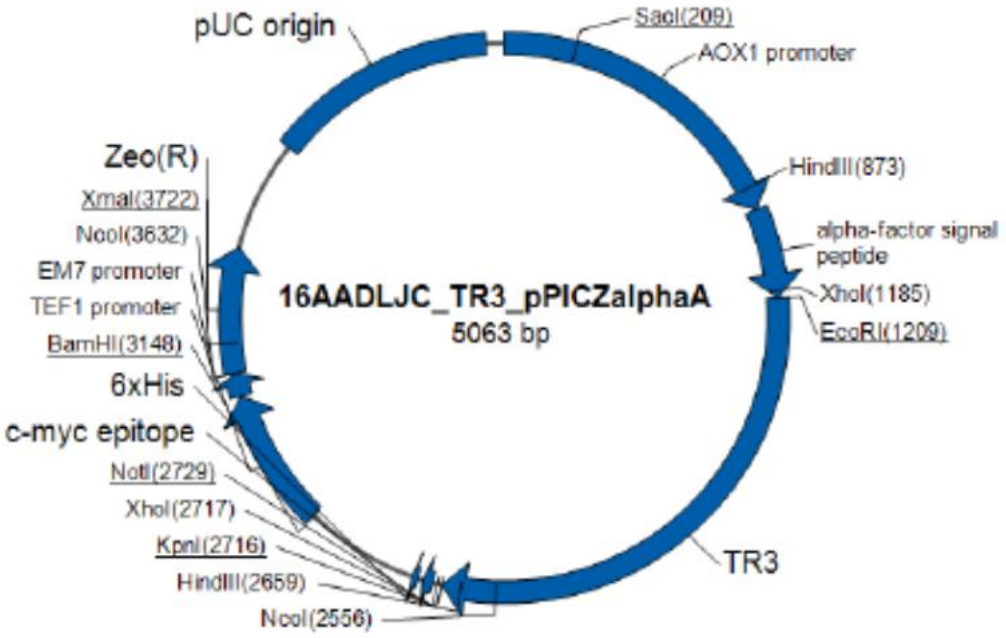
توالی ژن لاکاز مربوط به قارچ *Trametes versicolor* با شماره دسترسی AY081188.1 در بانک داده NCBI توسط شرکت اینویتروژن با نرم‌افزار Gene Art بر اساس ترجیح کدونی پیکیا *پاستوریس* بهینه شد. پس از حذف توالی ترشحی از ابتدای توالی ژن، ژن لاکاز بهینه شده توسط شرکت اینویتروژن سنتز و در جایگاه کلونینگ حامل بیانی pPICZ alpha A بین جایگاه شناسایی آنزیم برشی *Eco*RI و *Kpn*I همسانه‌سازی شد (شکل ۱). پودر لیوفیلیزه پلاسمید در آب مقطر عاری از نوکلئاز حل شد. ترنسفورماسیون به باکتری*E.coli* Top10 به روش شوک حرارتی انجام شد (Chang *et al.* 1989) ، و بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک زئوسین با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کشت شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از ظهور کلونی‌ها بر روی محیط کشت انتخابی، به منظور شناسایی کلونی-های حاوی پلاسمید نوترکیب آزمون کلونی پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن لاکاز انجام شد. اجزای واکنش زنجیره-ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر Master mix ساخت شرکت Ampliqun، ۰/۵ میکرولیتر آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت با غلظت ۱۰۰ پیکومول، ۹ میکرولیتر آب و مقداری از کلنی باکتری به عنوان الگو افزوده شد. برنامه پی‌سی‌آر شامل یک سیکل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹٤°C به مدت ۲ دقیقه، ۳۰ سیکل دمای ۹٤°C ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد و ۲ دقیقه دمای بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد، و ۵ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بسط نهایی انجام شد. الکتروفورز محصول پی‌سی‌آر بر روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد. استخراج پلاسمید نمونه‌هایی که کلونی پی‌سی‌آر آنها مثبت بود با استفاده از کیت استخراج پلاسمید GeneJet plasmid miniprep kit (K0503) شرکت Thermo Fischer Scientific انجام شد. جهت تایید صحت ورود ژن به درون وکتور هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *Eco*RI(ER0271, Thermo scientific) و *Kpn*I(ER0521, Thermo scientific) انجام شد و محصول حاصل از هضم بر روی ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

تراریزش حامل بیانی نوترکیب به میزبان بیانی *Pichia pastoris* GS115

به دلیل بالاتر بودن نرخ ترنسفورماسیون DNA خطی نسبت به DNA حلقوی در پیکیا پاستوریس به روش الکتروپوریشن، سازه-ی نوترکیب با آنزیم *Sac* I برش داده شد. از آنجایی که فقط یک جایگاه شناسایی آنزیم *Sac* I بر روی پلاسمید وجود دارد، پلاسمید پس از هضم با این آنزیم به صورت خطی در خواهد آمد. محصول حاصل از هضم بر روی ژل آگارز ۱ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. الکتروپوریشن با استفاده از دستگاه BTX, San Diego,CA,USA انجام شد. آماده‌سازی سلول مخمر جهت انجام الکتروپوریشن بر اساس پروتکل شرکت اینویتروژن انجام شد (*Pichia* expression kit, pages 77) بلافاصله پس از الکتروپوریشن ۱ سی‌سی سوربیتول ۱ مولار سرد افزوده شد و سلول‌ها به مدت دو ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس بر روی محیط کشت انتخابی حاوی زئوسین با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پخش شده و به مدت دو روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.پس از ظهور کلنی‌ها بر روی محیط کشت انتخابی، به منظور غربالگری کلون‌های نوترکیب آزمون کلونی پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن لاکاز (Lac F , Lac R) و آغازگرهای ژن الکل اکسیداز (Alpha factor, AOX1R) انجام شد. برنامه‌ی آزمون کلونی پی‌سی‌آر مانند مرحله‌ی قبل اجرا شد.

کلنی‌هایی که نتایج آزمون کلنی پی‌سی‌آر آنها مثبت بود، به محیط کشت MM حاوی سوبسترای ABTS با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار و سولفات مس با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار انتقال یافتند. در اثر اکسیداسیون سوبسترای ABTS توسط آنزیم نوترکیب، هاله‌ی سبزرنگی در اطراف کلنی‌های تولیدکننده‌ی لاکاز تشکیل شد، و این کلنی‌ها برای بررسی بیان در مراحل بعدی انتخاب شدند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.3.1]



شکل ۱- نقشه‌ی پلاسمید pPICZ alpha A نوترکیب با ژن لاکاز (TR3)

Figure 1: plasmid map of recombinant pPICZ alpha A contains laccase gene (TR3)

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی آغازگرهادر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (ناحیه خط کشی در توالی آغازگرها به ترتیب جایگاه شناسایی آنزیم برشی *Eco*RI و *Kpn*I)

Table 1: list of primers used in this study

آغازگر	توالی نوکلئوتیدی
آغازگر رفت (ژن لاکاز)	5´ GAATTCGGTATCGGTCCAGTTG 3´
آغازگر برگشت (ژن لاکاز)	5´ GGTACCTTGATCGGATGGGTC 3´
آغازگر رفت (alpha factor)	5´ TACTATTGCCAGCATTGCTGC 3´
آغازگر برگشت (AOX1)	5´ GCAAATGGCATTCTGACATCC 3´

بیان لاکاز نوترکیب

کلونی نوترکیب حاوی ژن لاکاز در محیط مایع BMGY کشت شد، و سپس برای القای بیان به محیط BMMY منتقل شد. برای القای بیان ژن لاکاز تحت کنترل پروموتر الکل اکسیداز از متانول به عنوان القاگر استفاده شد.

برای دستیابی به بیشینه‌ی بیان، سطوح مختلفی از متانول هر ۲٤ ساعت و سولفات مس در ابتدا به محیط کشت افزوده شد. متانول نیز با غلظت وزنی حجمی ۰/٤، ۰/۸ و ۱/۲ درصد هر ۲٤ ساعت و سولفات مس در غلظت‌های ۰/٤، ۰/۸ و ۱/۲ میلی‌مولار به محیط کشت افزوده گشت. نمونه‌برداری هر ۲٤ ساعت تا ۱۰ روز ادامه یافت. از آنجایی‌که بیان لاکاز به صورت ترشحی می‌باشد، به منظور سنجش کمی بیان لاکاز در نمونه‌ها، سوپرناتانت جداسازی شد و سنجش استاندارد آنزیمی با سوبسترای ABTS در طول موج ٤۳٦ نانومتر انجام شد (Niku-Paavola *et al.* 1990).

آماده‌سازی سلول‌ها، محلول‌ها و محیط کشت‌های مورد استفاده برای القای بیان بر اساس دستورالعمل شرکت اینویتروژن انجام شد. (*Pichia* expression kit, K1710)

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.3.1]

سنجش فعالیت لاکاز

سنجش لاکاز بر اساس اکسیداسیون ABTS به عنوان سوبسترا در طول موج ٤٣٦ نانومتر اندازه‌گیری شد(Niku-Paavola *et al.* 1990). یک واحد آنزیم برابر با مقداری از آنزیم است که می‌تواند ١ میکرومول سوبسترای ABTS را در مدت ١ دقیقه اکسید کند.

بررسی برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم نوترکیب

دما و pH بهینه

pH بهینه فعالیت لاکاز بر اساس سنجش فعالیت آن در محدوده ٢ تا ٩ دردمای اتاق تعیین شد. بافرهای گلایسین- اسیدکلریدریک (pH ٢،٣) Glycine-HCl، سوکسینات بافر (pH ٥،٦،٤) ، و بافر تریس (pH ٧،٨،٩) برای سنجش فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. تاثیر دما بر فعالیت بیوکاتالیست بر اساس سنجش فعالیت آنزیم در دماهای ٢٠ تا ٨٠ درجه سانتی‌گراد در pH بهینه مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت لاکاز بر اساس سنجش استاندارد با ABTS اندازه‌گیری شد (Niku-Paavola *et al.* 1990).

پایداری آنزیم در برابر حرارت و pH

تاثیر pH بر پایداری آنزیم با انکوباسیون آنزیم در سطوح مختلف pH، به مدت ٢٤ ساعت در pH(2-9) در دمای اتاق تعیین شد. تاثیر حرارت بر پایداری آنزیم با انکوباسیون آنزیم به مدت ٢٤ ساعت در دماهای ٢٠ تا ٨٠ درجه سانتی‌گراد در pH بهینه مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت باقی‌مانده لاکاز مانند مرحله‌ی قبل سنجش شد (Niku-Paavola *et al.* 1990).

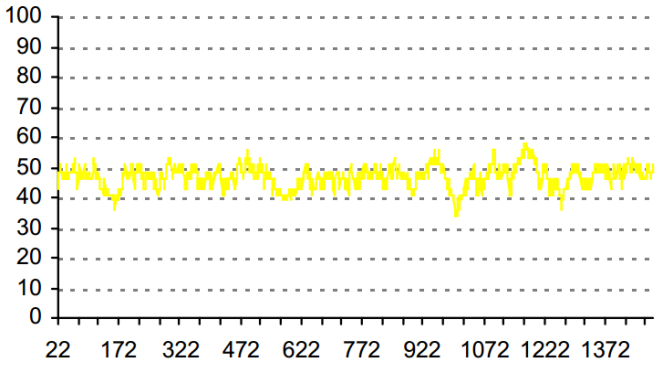
تعیین پارامترهای کینتیکی

برای تعیین مقادیر V_{max} و K_m آنزیم لاکاز، فعالیت مقدار ثابتی از آنزیم در غلظت‌های مختلف ABTS (0.1-5 mM) بر اساس سنجش استاندارد اندازه‌گیری شد (Niku-Paavola *et al.* 1990).

نتایج و بحث

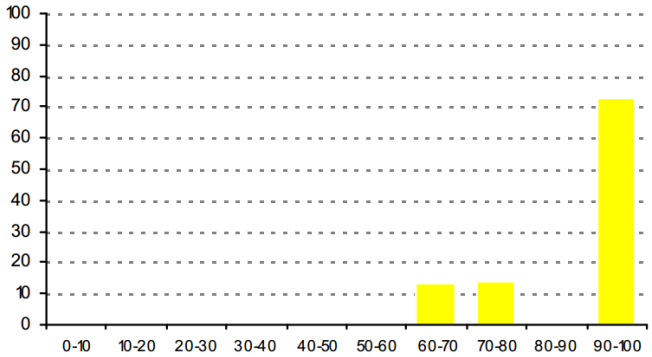
بهینه‌سازی توالی

پس از بهینه‌سازی، نواحی دارای عناصر سیس (مانند جعبه‌ی TATA)، که ممکن بود اثر منفی بر روی بیان پروتئین نوترکیب داشته باشند تا حد امکان حذف شدند. محتوای GC برای افزایش نیمه عمر mRNA تنظیم شد (شکل ٢) .نوکلئوتیدها بر اساس ترجیح کدونی در پیکیا پاستوریس بدون تغییر در نوع اسیدآمینه، تغییر یافته و شاخص CAI (codon adaptation index) به ٠/٩١ رسید (شکل ٣) . (این پارامتر میزان هماهنگی کدون‌های موجود در توالی را با ترجیح کدونی میزبان (کدون‌های پرتکرار) نشان می‌دهد، شاخص ١ ایده‌آل می‌باشد، و مقادیر بالاتر از ٠/٩ نیز بیان بالایی خواهند داشت).



شکل ٢- درصد GC : ٤٧ درصد، تنظیم محتوای GC که موجب پایداری mRNA می‌شود.

Figure 2: Average GC content: 47%, GC content was adjusted to prolong mRNA half life



شکل ٣- درصد توزیع کدون‌های توالی هدف بر اساس ترجیح کدونی پیکیا پاستوریس پس از بهینه‌سازی توسط نرم‌افزار Gene Art، ستون افقی دسته‌بندی کدون‌ها بر اساس میزان فراوانی و ترجیح کدونی میزبان می‌باشد، ستون عمودی درصد حضور کدون‌های توالی هدف را پس از بهینه‌سازی در این دسته‌ها نشان می‌دهد.

Figure 3: Codon usage was adapted to the bias of *Pichia pastoris* resulting in a CAI value 0.91. The histogram shows the percentage of sequence codons which fall into a certain quality class.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.3.1]

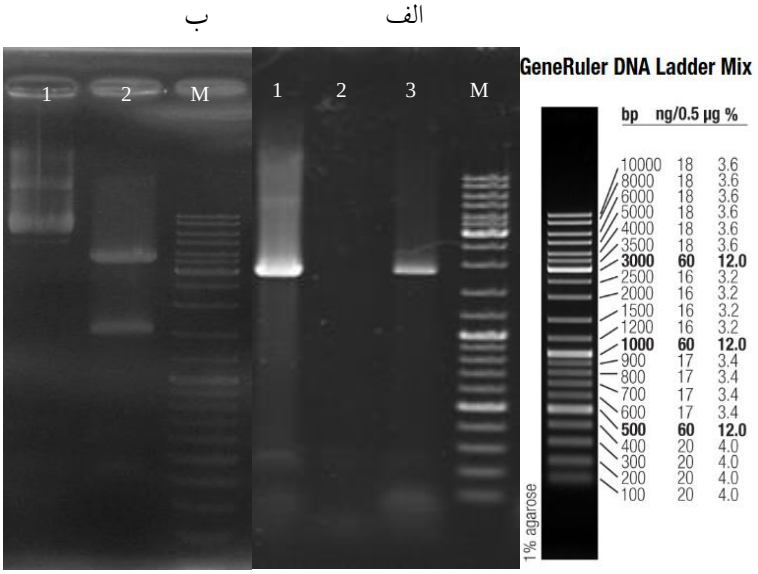
نتایج الکتروفورز حاصل از کلونی پی‌سی‌آر باندی به وزن ۱۹۰۰ جفت باز را نشان داد(شکل ٤، الف) و هضم آنزیمی نیز صحت ورود ژن در جایگاه مورد نظر را تایید کرد (شکل ٤، ب).

بیان آنزیم لاکاز

بیشینه‌ی بیان آنزیم در غلظت ۰/۸ درصد متانول، ۰/٤ میلی‌مولار سولفات مس، دمای ۲۵ درجه و روز هشتم به دست‌آمد، سنجش فعالیت لاکاز با استفاده از سوبسترای ABTS در طول موج ٤۳٦ نانومتر میزان ۹٦۰۰ U/L را تایید کرد.

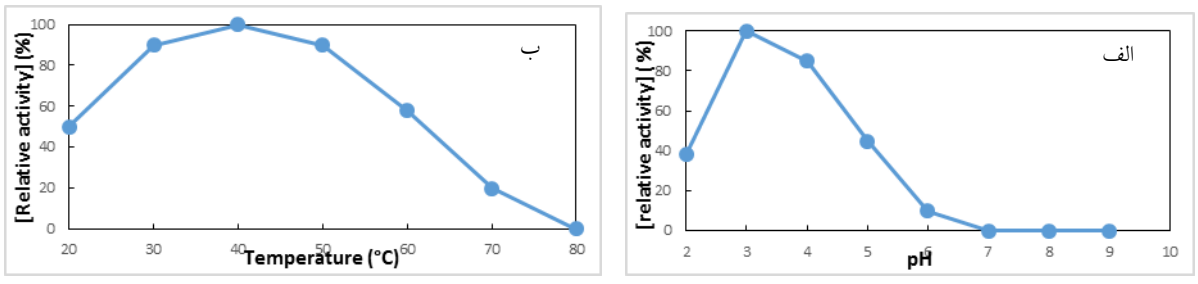
بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم نوترکیب :دما و pH بهینه

بیشینه فعالیت آنزیم لاکاز در حضور سوبسترای ABTS، در pH= ۳ تعیین شد(شکل۵). نتیجه حاصل از سنجش فعالیت آنزیم در دماهای مختلف (۷۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد) در pH بهینه و با استفاده از سوبسترای ABTS نشان داده‌است که آنزیم لاکاز نوترکیب بیشترین میزان فعالیت را در دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد دارد (شکل ۵).



شکل ٤- الف: ۱- محصول کلنی PCR پیکیا پاستوریس نوترکیب حاوی ژن لاکاز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن لاکاز و آغازگرهای اختصاصی ناحیه پپتید نشانه alpha mating factor داخل پلاسمید بیانی pPICZ alpha A. ۲- کنترل منفی. ۳- محصول کلونی PCR جهت شناسایی کلون‌های نوترکیب پس از ترنسفورماسیون به باکتری. M- مارکر وزنی فرمنتاز (SM0333). ب: محصول هضم آنزیمی حامل بیانی pPICZ alpha A. ۱- پلاسمید بدون هضم آنزیمی. ۲- پلاسمید پس از هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Kpn*I و *Eco*RI. M- مارکر وزنی فرمنتاز (SM0333).

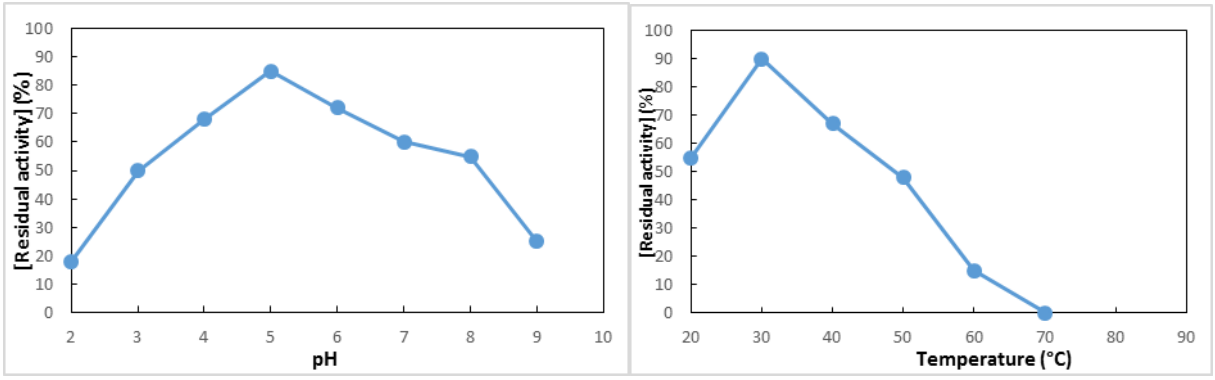
Figure 4. (A) 1- colony PCR product with specific primers alpha mating factor (forward) and AOX1 (reverse) (*Pichia pastoris* clones DNA was used as template). 2- Negative control. 3- Colony PCR product after transformation to *E.coli* TOP10. M- Molecular weight marker (SM0333). lane3: (B) Enzymatic digestion of pPICZalphaA. 1- Undigested pPICZalphaA. 2- Digested pPICZalphaA by *Kpn*I & *Eco*RI. M- Molecular weight marker (SM0333).



شکل۵- الف: پروفایل فعالیت آنزیم لاکاز نوترکیب در محدوده‌ی pH ۲-۹ در دمای اتاق. ب: پروفایل فعالیت آنزیم لاکاز نوترکیب در دمای ۲۰-۸۰ درجه سانتی‌گراد.

Figure 5: (A) Optimal pH laccase activity profile at room temperature (ranging from 2 to 9). (B) Optimal temperature profile at optimal pH (4) for recombinant laccase (from 20°C to 80°C).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.3.1]



شکل ٦- الف: پروفایل پایداری آنزیم در pH های مختلف در دمای اتاق. ب: پروفایل پایداری آنزیم در دماهای مختلف.

Figure 6: (A) laccase stability profile at different pH value at room temperature. (B) And stability profile at different temperatures at optimal pH (5) for laccase.

پایداری آنزیم در برابر حرارت و pH

بر اساس نمودارهای ارائه شده در شکل ٦، آنزیم لاکاز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین میزان پایداری را داشت (شکل٦ب). همچنین بیشینه پایداری آنزیم در pH=۵ تعیین شد(شکل٦الف).

خصوصیات کینتیک

ضریب میکائیلیس منتون (K_m) و سرعت ماکزیمم (V_{max}) به ترتیب ۰/۰۸۹ mM و ۱۰/۲۱ mM min^{-1} تعیین شد.

وجود چند ایزوآنزیم در ارگانیسم‌های تولید کننده‌ی لاکاز، مطالعه‌ی هر آنزیم به صورت جداگانه را دشوار می‌سازد. با کلونینگ و بیان نوترکیب ژن امکان مطالعه‌ی خصوصیات بیوشیمیایی و تخلیص هر آنزیم وجود دارد (Garg *et al.* 2012).

پیکیا پاستوریس میزبان یوکاریوت ساده‌ای است که قادر به انجام بسیاری از تغییرات پس از ترجمه نظیر گلیکوزیلاسیون و تشکیل پیوند دی‌سولفیدی می‌باشد. بنابراین میزبان مناسبی برای بیان آنزیم‌های لیگنوسلولزی و سایر پروتئین‌هایی که برای تاخوردگی صحیح، فعالیت و پایداری به تغییرات پس از ترجمه نیاز دارند، می‌باشد. به علاوه، پیکیا به طور طبیعی هیچ‌یک از آنزیم‌های لیگونوسلولیتیگ را در مقادیر قابل توجهی تولید نمی‌کند، بنابراین امکان تولید آنزیم نوترکیب بدون صرف هزینه‌های بالای فرآیندهای پایین دستی در این میزبان وجود دارد (Mellitzer *et al.* 2012; Pinar *et al.* 2017; Hong *et al.*2002). محیط کشت ساده و سهولت بهینه‌سازی شرایط کشت در بیورآکتور امکان دستورزی پیکیا و تولید آنزیم با صرف هزینه‌ی پایین را فراهم می‌آورد. به همین دلیل با تولید پروتئین نوترکیب در پیکیا امکان کاهش هزینه‌های پایین‌دستی که از موانع اصلی استفاده از این آنزیم در صنعت می‌باشد، وجود دارد (Mellitzer *et al.* 2012).

گستره‌ی وسیع کاربرد آنزیم لاکاز در فرآیندهای مختلف نظیر: تجزیه‌ی انواع آلاینده‌ها، سوخت‌های زیستی، بیوسنسور توجه زیادی را در سال‌های اخیر به خود معطوف کرده‌است. سطح بیان پایین، هزینه‌ی بالای تولید آنزیم native و کند رشد بودن ارگانیسم‌های تولید کننده‌ی آنزیم از موانع اصلی استفاده از این آنزیم در صنعت می‌باشد. تلاش‌های زیادی به منظور افزایش سطح تولید آنزیم به صورت نوترکیب و کاهش هزینه‌ها انجام شده که منجر به افزایش میزان تولید لاکاز نوترکیب در مقایسه با لاکاز طبیعی شده‌است (Wang *et al.* 2016; Lu *et al.*2009).

در این تحقیق با توجه به پتانسیل پیکیا برای تولید پروتئین به میزان انبوه، به عنوان میزبان برای بیان و تولید انبوه لاکاز انتخاب شد.

پیکیا پاستوریس می‌تواند کاندیدای مناسبی برای تولید پروتئین نوترکیب با منشا یوکاریوتی باشد. سرعت رشد بالا، ظرفیت تولید پروتئین در مقادیر گرم بر لیتر، انجام تغییرات پس از ترجمه، ترشح پروتئین از جمله مزیت‌های بیان پروتئین در پیکیا می‌باشد. بیان موفق با بازده بالا در پیکیاپاستوریس به عوامل متعددی از جمله شرایط محیطی مانند دما، pH محیط، ترکیبات محیط کشت،

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.3.1]

غلظت القاگر، زمان، میزان اکسیژن محلول، پروموتر بستگی دارد که باید مورد توجه قرار گیرد. تولید لاکاز نوترکیب در میزبان‌های مختلفی مورد بررسی قرار گرفته‌است (Heyland *et al.* 2011).

گرک و همکاران ژن لاکاز از قارچ *Cyathus bulleri* را تحت پیشبر الکل اکسیداز در حامل بیانی pPICZαA کلون کرده و در میزبان بیانی *Pichia pastoris* بیان کردند. آنها بیشینه‌ی فعالیت آنزیم را U/L ۷۲۰۰ را گزارش کردند (Garg *et al.* 2012). همچنین آنزیم لاکاز از قارچ *Coriolopsis polyzona* در حامل بیانی pPICZC همسانه‌سازی و تحت پیشبر AOX1 در پیکیا پاستوریس به میزان U/L ۸۰۰ به صورت ترشحی بیان شد (Pinar *et al.* 2017).

سطح تولید لاکاز نوترکیب در پیکیا پاستوریس با تنظیم غلظت متانول، سولفات مس و زمان می‌تواند بهبود یابد. برای القای بیان ژن تحت کنترل پروموتر AOX1 متانول روزانه به محیط کشت افزوده شد، تنظیم غلظت متانول برای القای بیان ژن‌های تحت پروموتر AOX1 حیاتی است (Avelar *et al.* 2017). غلظت‌های پایین متانول ممکن است موجب کاهش کارایی پروموتر و عدم تولید آنزیم به میزان کافی شود، از طرفی غلظت‌های بالای متانول نیز برای سلول سمی می‌باشد و منجر به از دست رفتن کارایی پروموتر، مرگ سلولی به دلیل افزایش غلظت فرمالدهید و پراکسیدهیدروژن و افزایش سطح پروتئاز می‌شود. به علاوه افزایش غلظت متانول موجب ناپایداری لاکاز نیز خواهد شد(Hong *et al.* 2002)، در این مطالعه ٤ سطح مختلف متانول به منظور دستیابی به غلظت بهینه برای القای تولید لاکاز به محیط کشت افزوده شد: ۰/٤، ۰/۸ و ۱/۲ درصد. بالاترین میزان تولید و ترشح لاکاز در غلظت ۰/۸ درصد متانول به دست آمد. در پژوهش‌های قبلی Wang و همکاران (۲۰۱٦) و همچنین Grag و همکاران (۲۰۱۲) غلظت ۱ درصد متانول، و Li و همکاران (۲۰۱٤) غلظت ۰/٦ درصد متانول را به عنوان غلظت بهینه گزارش کردند.

علاوه بر این، وجود یون مس در محیط کشت برای تاخوردگی و فعالیت صحیح لاکاز ضروری است، و همبستگی مثبتی بین غلظت مس و فعالیت لاکاز وجود دارد (Huifang *et al.* 2013)، از آنجایی که غلظت‌های بالای مس برای مخمر سمی می‌باشد، بنابراین بهینه‌سازی غلظت مس از جمله عوامل موثر برای تولید بیشینه لاکاز می‌باشد (Hong *et al.* 2002). در این مطالعه بیشترین میزان تولید و فعالیت لاکاز در غلظت ۰/٤میلی‌مولار سولفات مس به دست آمد. غلظت بهینه‌ی سولفات مس برای بیشینه‌ی بیان آنزیم در بازه‌ی ۰/۲ تا ۰/۵ میلی‌مولار گزارش شده‌است (Hong *et al.* 2006; Avelar *et al.* 2017; Wang *et al.* 2016; Huang *et al.* 2011).

دما پارامتر مهمی برای بهینه‌سازی بیان لاکاز در سیستم‌های بیانی مخمر میباشد. میزان بیان لاکاز نوترکیب در ساکارومایسز سرویزیه با کاهش دما افزایش یافت، همچنین سطح بیان لاکاز در پیکیا پاستوریس نیز در دمای ۱۹-۱٦ درجه سانتی‌گراد بالاتر از ۲۸ درجه گزارش شده‌است (Hong *et al.* 2002). مطالعه‌ی حاضر نیز تایید کرد که کاهش دما تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد منجر به افزایش سطح بیان لاکاز نوترکیب می‌شود. این امر ممکن است به دلیل کاهش فعالیت پروتئازها که از سلول‌های مرده و یا سایر سلول‌ها به محیط کشت ترشح می‌شوند باشد، که در نتیجه منجر به کاهش تجزیه‌ی لاکاز در دماهای پایین‌تر می‌شود. علاوه بر این کاهش دما موجب بهبود تاخوردگی صحیح پروتئین نوترکیب پس از ترجمه می‌شود، دمای پایین موجب کاهش رشد سلول‌ها و سرعت سنتز پروتئین شده و زنجیره‌های پپتیدی زمان بیشتری برای تاخوردگی صحیح خواهند داشت، که در نهایت منجر به افزایش تولید پروتئین نوترکیب فعال خواهد شد (Hong *et al.* 2002). در دمای ۲۰ درجه میزان بیان آنزیم کاهش یافت، که ممکن است به دلیل کاهش میزان تکثیر پیکیا به دلیل کاهش دما باشد.

بررسی خصوصیات بیوشیمیایی لاکاز

بیشینه‌ی فعالیت لاکاز در دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد ویژگی مطلوبی جهت استفاده از این آنزیم در فرآیندهای صنعتی می‌باشد. همچنین حفظ فعالیت با انکوباسیون در دمای بالا نیز در کاربردهای تجاری آنزیم حائز اهمیت می‌باشد، هرچه پایداری حرارتی آنزیم بالاتر باشد قادر است مدت زمان طولانی‌تری فعالیت کرده و این به معنی مصرف کمتر آنزیم می‌باشد (Li *et al.*

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.3.1]

2013). فعالیت و حفظ فعالیت در محدوده‌ی pH وسیع با pH بهینه ۳، معیار مثبت دیگری برای استفاده از این آنزیم در صنعت می‌باشد.

در این تحقیق لاکاز نوترکیب با خصوصیات فیزیکوشیمیایی مطلوب و متناسب با کاربردهای صنعتی به طور موفقیت‌آمیزی در پیکیا پاستوریس بیان شد. بیشینه‌ی بیان لاکاز نوترکیب به میزان 9600 U/L با به کارگیری سطوح مختلف فاکتورهای موثر در تولید آنزیم تحت شرایط زیر به دست آمد: دما ۲۵ درجه سانتی-گراد، متانول ۰/۸ درصد و سولفات مس ۰/٤ میلی‌مولار.

با توجه به مجموع خصوصیات مثبت لاکاز، این آنزیم کارایی زیادی برای حل معضلات زیست محیطی و حذف آلاینده‌های مرتبط با صنایع مختلف نظیر : نساجی، چوب و کاغذ، رنگ و ... غیره خواهد داشت. استفاده از ترانسفورمانت‌های حاوی چندین نسخه از ژن نوترکیب، تولید آنزیم لاکاز در فرمانتور و در شرایط کنترل شده محیطی مانند دما، pH، اکسیژن محلول، امکان تولید مقادیر بیشتر لاکاز را در مقایسه با ارلن فراهم می‌آورد. تولید انبوه و با صرفه‌ی اقتصادی این آنزیم موجب کاهش هزینه‌ی تولید لاکاز شده و استفاده از آن در صنعت را تسهیل می‌کند. به دلیل خصوصیات و ویژگی‌های مطلوب و کاربردی این آنزیم، بهینه-سازی شرایط تولید لاکاز در حجم‌های بالاتر ضروری است.

منابع

Araújo JHBd, Uemura VO, Moraes FFd, Barbosa AdM, Zanin GM. 2005. A comparative study on fungal laccases immobilized on chitosan. Brazilian Archives of Biology and Technology 48:1-6.

Arockiasamy S, Krishnan IPG, Anandakrishnan N, Seenivasan S, Sambath A, Venkatasubramani JP. 2008. Enhanced production of laccase from Coriolus versicolor NCIM 996 by nutrient optimization using response surface methodology. Applied biochemistry and biotechnology 151:371-379.

Avelar M, Olvera C, Aceves-Zamudio D, Folch JL, Ayala M. 2017. Recombinant expression of a laccase from Coriolopsis gallica in Pichia pastoris using a modified α-factor preproleader. Protein expression and purification 136:14-19.

Bronikowski A, Hagedoorn P-L, Koschorreck K, Urlacher VB. 2017. Expression of a new laccase from Moniliophthora roreri at high levels in Pichia pastoris and its potential application in micropollutant degradation. AMB Express 7:73-86.

Callejón S, Sendra R, Ferrer S, Pardo I. 2017. Recombinant laccase from *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 with ability to degrade tyramine. PloS one. 12(10):e0186019.

Cañas AI, Camarero S. 2010. Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. Biotechnology advances 28:694-705.

Chung C, Niemela SL, Miller RH. 1989. One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proceedings of the National Academy of Sciences 86:2172-2175.

Couto SR, Osma JF, Saravia V, Gübitz G, Herrera JT. 2007. Coating of immobilised laccase for stability enhancement: a novel approach. Applied Catalysis A: General 329:156-160.

Durán N, Rosa MA, D'Annibale A, Gianfreda L. 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. Enzyme and microbial technology 31:907-931.

Egharevba O. 2017. Cloning and Expression of Four Laccase genes isolated from Arctic marine Psychrobacter strains in *Escherichia coli* and psychrophilic Pseudomonas: Master thesis, NTNU, https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/handle/11250/2451529?locale-attribute=en

Fernández-Fernández M, Sanromán MÁ, Moldes D. 2013. Recent developments and applications of immobilized laccase. Biotechnology advances 31:1808-1825.

Fortes CC, Daniel-da-Silva AL, Xavier AM, Tavares AP. 2017. Optimization of enzyme immobilization on functionalized magnetic nanoparticles for laccase biocatalytic reactions. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification 117:1-8.

Garg N, Bieler N, Kenzom T, Chhabra M, Ansorge-Schumacher M, Mishra S. 2012. Cloning, sequence analysis, expression of Cyathus bulleri laccase in Pichia pastoris and characterization of recombinant laccase. BMC biotechnology 12:75-86.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.3.1]

Heyland J, Fu J, Blank LM, Schmid A. 2011. Carbon metabolism limits recombinant protein production in Pichia pastoris. Biotechnology and Bioengineering 108:1942-1953.

Hong F, Meinander NQ, Jönsson LJ. 2002. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in Pichia pastoris. Biotechnology and Bioengineering 79:438-449.

Hong Y-z, Zhou H-m, Tu X-m, Li J-f, Xiao Y-z. 2007. Cloning of a laccase gene from a novel basidiomycete Trametes sp. 420 and its heterologous expression in Pichia pastoris. Current microbiology 54:260-265.

Janusz G, Rogalski J, Barwinska M, Szczodrak J. 2006. Effects of culture conditions on production of extracellular laccase by Rhizoctonia praticola. Polish Journal of microbiology 55:309-319.

Lassouane F, Aït-Amar H, Amrani S, Rodriguez-Couto S. 2019. A promising laccase immobilization approach for Bisphenol A removal from aqueous solutions. Bioresource technology. 2019;271:360-367.

Li Q, Pei J, Zhao L, Xie J, Cao F, Wang G. 2014. Overexpression and characterization of laccase from Trametes versicolor in Pichia pastoris. Applied biochemistry and microbiology 50:140-147.

Lu L, Zhao M, Liang SC, Zhao LY, Li DB, Zhang BB. 2009. Production and synthetic dyes decolourization capacity of a recombinant laccase from Pichia pastoris. Journal of applied microbiology 107:1149-1156.

Mellitzer A, Weis R, Glieder A, Flicker K. 2012. Expression of lignocellulolytic enzymes in Pichia pastoris. Microbial cell factories 11:61-71.

Misra N, Kumar V, Goel NK, Varshney L. 2014. Laccase immobilization on radiation synthesized epoxy functionalized polyethersulfone beads and their application for degradation of acid dye. Polymer 55:6017-6024.

Morales-Álvarez ED, Rivera-Hoyos CM, Cardozo-Bernal ÁM, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM, Díaz-Rincón DJ, et al. 2017. Plackett-Burman Design for rGILCC1 laccase activity enhancement in Pichia pastoris: Concentrated enzyme kinetic characterization. Enzyme research 2017: 1-10.

Mukhopadhyay A, Dasgupta AK, Chakrabarti K. 2015. Enhanced functionality and stabilization of a cold active laccase using nanotechnology based activation-immobilization. Bioresource technology 179:573-584.

Niku-Paavola M, Raaska L, Itävaara M. 1990. Detection of white-rot fungi by a non-toxic stain. Mycological Research 94:27-31.

Noreen S, Asgher M, Hussain F, Iqbal A. 2015. Performance improvement of Ca-alginate bead cross-linked laccase from Trametes versicolor IBL-04. BioResources 11:558-572.

Pinar O, BEHAR CT, KARATAŞ A. 2017. Heterologous expression and characterization of a high redox potential laccase from Coriolopsis polyzona MUCL 38443. Turkish Journal of Biology 41:278-291.

Quaratino D, Ciaffi M, Federici E, D'annibale A. 2008. Response surface methodology study of laccase production in Panus tigrinus liquid cultures. Biochemical Engineering Journal 39:236-245.

Ratanapongleka K, Punbut S. 2018. Removal of acetaminophen in water by laccase immobilized in barium alginate. Environmental technology 39:336-345.

Rodgers CJ, Blanford CF, Giddens SR, Skamnioti P, Armstrong FA, Gurr SJ. 2010. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? Trends in biotechnology 28:63-72.

Strong P, Claus H. 2011. Laccase: a review of its past and its future in bioremediation. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 41:373-434.

Trupkin S, Levin L, Forchiassin F, Viale A. 2003. Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 30:682-690.

Vasconcelos AFD, Barbosa AM, Dekker RF, Scarminio IS, Rezende MI. 2000. Optimization of laccase production by Botryosphaeria sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. Process Biochemistry 35:1131-1138.

Wang B, Wang X, Tian Y, Li Z, Gao J, Yan Y, Peng R, Yao Q. 2016. Heterologous expression and characterization of a laccase from Laccaria bicolor in Pichia pastoris. Biotechnology & Biotechnological Equipment 30:63-68.

Yang J, Li W, Ng TB, Deng X, Lin J, Ye X. 2017. Laccases: production, expression regulation, and applications in pharmaceutical biodegradation. Frontiers in microbiology 8:1-24.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.3.1]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 2

Cloning and heterologous expression of Laccase in *Pichia pastoris* and determination of some biochemical properties

Elham Soleimani[1*], Rouha Kasra Kermanshahi[2], Ghorbanali Nematzadeh[1*], Susana Rodriguez Couto[3]

1. Genetic & Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT). Sari Agricultural Sciences & Natural Resources University (SANRU)
2. Alzahra university Tehran, Iran,
3. Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Spain
*Corresponding Author, Email: solimanielham@yahoo.com or Gh.nematzadeh@gmail.com

ABSTRACT

Laccase (EC 1.10.3.2) enzymes are multi-copper oxidase which catalyze the oxidation of aromatic and non- aromatic compounds with electron reduction of molecular oxygen to water. These enzymes catalyze the oxidation of a wide array of phenolic compound and have been used in different industrial field. In this study, Nucleotide sequence of laccase (accession number: AY081188.1) was optimized according to the codon preference of *Pichia pastoris*. Laccase gene was synthesized and cloned into pPICZalpha A. under control of AOX1 promoter then transformed to *P. pastoris* by electroporation. Methanol concentration, copper salts concentration and temperature were varied in order to enhance laccase expression in the heterologous system. Optimal fermentation condition for laccase production in shake flask cultivation using BMGY medium were obtained by presence of 0.4 mM Cu^{+2}, at 25°C culture temperature, by 0.8% methanol added into culture every 24 h. the volumetric activity was achieved 9600 U/L after 12-day culture in fernbach flask. The biochemical properties of recombinant laccase and kinetic parameters were studied. The laccase activity was optimal at pH 3 and 40°C. Its K_m value was 0.089 mM For ABTS [2, 2´azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphoric acid)]. The result of this study was showed that *Pichia pastoris* can be useful tool for heterologous laccase expression in order to use in industrial application such as wastewater treatment, biosensor & etc.

Key words: laccase, *Pichia pastoris*, heterologous expression, bioremediation, Cloning

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.3.1]