مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۷، شهریور ۱۳۹۷، ۵۲۲-۵۱۱

خالص‌سازی آنزیم لاکاز قارچ *Trametes* و تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی لاکاز نوترکیب: یک مطالعه آزمایشگاهی

اردشیر حسام‌پور[۱]، نوشین مهندسی[۲]

دریافت مقاله: ۹۶/۱۱/۱۵ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۷/۲/۹ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۷/۳/۲۱ پذیرش مقاله: ۹۷/۳/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: لاکازها یکی از اصلی ترین پروتین‌ها با قابلیت کاتالیز اکسیداسیون ترکیبات فنولی می‌باشند که به‌عنوان بیوکاتالیست در بیوتکنولوژی جهت رنگ بری و رنگ زدایی در صنایع رنگ، سم‌زدایی در محیط زیست، شفاف‌سازی آب میوه‌ها در صنایع غذایی کاربرد دارند. هدف از این پژوهش، تولید لاکاز نوترکیب، خالص‌سازی با بازده بالا و تعیین خصوصیات بیوشیمیایی و کینتیکی لاکاز تخلیص شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، لاکاز نوترکیب قارچ ترامتوس که در میزبان مخمری به شکل خارج سلولی، بیان شده است. طی چندین مرحله با استفاده از روش‌های اولترافیلتریزاسیون و کروماتوگرافی به روش ژل فیلتریزاسیون تخلیص شد و کارآیی روند تخلیص تعیین و پس از تعیین وزن مولکولی، خصوصیات فیزیکوشیمیایی لاکاز نوترکیب بررسی و میزان پایداری حرارتی آنزیم تعیین شد. تمامی آزمون‌ها با انجام حداقل ۳ تکرار و احتساب میانگین و انحراف از معیار انجام گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد لاکاز با موفقیت و بازده ۵/۶۷ برابر با حفظ ۴۹/۷ درصد فعالیت آنزیمی تخلیص شد و وزن مولکولی لاکاز نوترکیب ۶۵ کیلودالتون تعیین شد. دما و pH بهینه لاکاز تخلیص شده به ترتیب $60^{\circ}C$ و ۴/۸ تعیین شد. خصوصیات کینتیکی آن نیز تعیین شد. بررسی پایداری دمایی لاکاز نوترکیب نشان داد که لاکاز پایداری بالایی در برابر حرارت دارد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که روش کروماتوگرافی ژل می‌تواند روشی کارآمد جهت خالص‌سازی لاکاز نوترکیب با حفظ خصوصیات آنزیمی و پایداری حرارتی بالا باشد، به‌طوری‌که لاکاز نوترکیب تخلیص شده با بازده بالا و حفظ فعالیت می‌تواند در صنایع دارویی، نساجی، محیط زیست و غذایی و سم‌زدایی محیط زیست، کاربرد داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: خالص‌سازی، آنزیم لاکاز، قارچ Trametes ،خصوصیات فیزیکوشیمیایی

۱- (نویسنده مسئول) استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران
تلفن: ۲۲۶۸۶۹۰۶-۰۲۱، دورنگار: ۲۲۶۸۶۹۰۶-۰۲۱، پست الکتریکی :a.hesampour@gmail.com
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-04-23]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.6.6.5]

مقدمه

لاکازها (E.C. 1.10.3.2) آنزیم‌های حاوی مس با چند هسته هستند که اکسیداسیون انواع ترکیبات فنولی و غیر آلی را به همراه کاهش اکسیژن به آب انجام می‌دهند. لاکاز در طبیعت به‌طور گسترده‌ای توزیع و در گیاهان، حشرات، باکتری‌ها و به ویژه قارچها شناسایی شده است. سوبسترهای لاکاز دارای تنوع زیادی از ترکیبات دی‌فنولی و پلی فنولی تا دی آمین، آروماتیک آمین و فنول‌های جایگزین متغیر است. این آنزیم‌های اکسیداتیو به‌طور خاص در قارچ‌های بازیدیومیست فراوان هستند که می‌توانند باعث کاهش تجزیه لیگنین‌ها، به طور طبیعی شوند. لاکازهای قارچی برای کاتالیز کردن پلیمریزاسیون، دپلیمریزاسیون، متیلاسیون و دمتیلاسیون ترکیبات فنولی شناخته شده‌اند [۲-۱]. قارچ *Trametes* که متعلق به گروه قارچ‌های White-rot در بازیدیومیست‌ها است، یکی از مهم‌ترین تولید کنندگان لاکاز به شمار می‌آید.

در مورد نقش لاکازها در مباحث کاربردی بیوتکنولوژی هم‌چون پالایش زیستی، کاتالیزر در سم‌زدایی و پایداری در محلول‌های آلی مطالعات متعددی انجام شده است. از آنجایی‌که لاکازهای تولید و ترشح شده از منابع طبیعی به دلیل بازده تولیدی کم و هزینه‌های گزاف پروسه‌های آماده‌سازی و خالص‌سازی آنزیم، برای اهداف صنعتی و تولید انبوه مناسب نیستند، لذا با استفاده از بیان هترولوگوس و تخلیص لاکاز نوترکیب می‌توان بازده تولید آنزیمی را افزایش داد. از آنجایی که لاکازها به صورت طبیعی در مقیاس اندک و به با خلوص پایین توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند، لذا کارآیی مناسبی در مطالعات و کاربری ندارند و اثرپذیری کندی دارند. بنابراین در صورت تولید نوترکیب لاکاز و تخلیص آن، می‌توان لاکازی با فعالیت ویژه بالا با عملکردی سریع داشت تا بتوان در سطوح آزمایشگاهی جهت بررسی ساختاری و مهندسی پروتئین، خصوصیات کینتیکی و پایداری حرارتی و pH تا پایلوت در پاکسازی محیط زیست از آن در مطالعات پژوهشی آزمایشگاهی و صنعتی استفاده نمود. همچنین تخلیص لاکازها مرحله ای ضروری جهت تعیین خصوصیات دقیق کینتیکی و بیوشیمایی آنزیم به منظور کاربری در صنایع دارویی، نساجی و غذایی و هم‌چنین محیط زیست می‌باشد [۵-۳].

هدف از پژوهش حاضر، تولید لاکاز نوترکیب، خالص‌سازی با بازده بالا و تعیین خصوصیات بیوشیمیایی و کینتیکی لاکاز تخلیص شده بود.

مواد و روش‌ها

محیط‌های کشت BMMY ,BMGY,YPD و PAD (*Pichia Adenine Dropout*) از شرکت Invitrogen خریداری شد. کلیه مواد شیمیایی مورد آزمایش از شرکت‌های Sigma و Merck خریداری شد. ستون اولترافیلتریزاسیون آمیکون و غشاهای دیالیز از شرکت میلی‌پور تهیه شد. ستون کروماتوگرافی تمایلی از شرکت GE Healthcareآمریکا خریداری شد. باکتری *E.coli* سویه DH5α جهت کلون‌سازی و ترانسفورماسیون مورد استفاده قرار گرفت. مخمر پیکیا پاستوریس (*Pichia pastoris*) سویه GS115 (his4) و ناقل بیانی pPinkα-HC(7/9Kb) از شرکت Invitrogen خریداری شد. کلونی پیکیا پاستوریس نوترکیب حامل لاکاز در محیط مایع بیانی BMGY کشت داده شد و به منظور القاء بیان ژن لاکاز تحت کنترل پروموتور القائی AOX به محیط القائی مایع BMMY منتقل شد و با استفاده از متانول (v/v) ۱

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-04-23]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.6.6.5]

درصد به صورت روزانه به مدت ۴ روز القاء گردید [۶]. به‌منظور بررسی کمی بیان آنزیم لاکاز نوترکیب، سوپرناتانت جداسازی شد و سنجش فعالیت آنزیمی لاکاز با سوبسترای سرین گالدازین در دمای ۳۰°C و طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۸-۷]. نمودار استاندارد برآدفورد با استفاده از سنجش نمونه‌ها با غلظت مشخص پروتئین BSA، تهیه شد که جهت استاندارد نمودن نتایج جذب نوری نمونه‌های سوپرناتانت با فعالیت لاکازی جهت تعیین پروتئین کل مورد استفاده قرار گرفت. همچنین نمودار استاندارد لاکاز جهت استاندارد نمودن نتایج جذب نوری نمونه‌های سوپرناتانت با فعالیت لاکازی مورد استفاده قرار گرفت و در نهایت فعالیت ویژه لاکاز در مراحل خالص‌سازی بر حسب U/mg تعیین شد. بهترین شرایط کشت به منظور تولید حداکثری لاکاز استفاده شد [۹] و سوپرناتانت فیلتر شده دارای فعالیت حداکثر لاکازی جهت مراحل خالص‌سازی استفاده شد. تمامی مراحل خالص‌سازی در ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. ابتدا ۱۵۰ سی سی از سوپرناتانت دارای فعالیت لاکازی توسط اضافه نمودن پودر آمونیوم پرسولفات در محدوه تغلیظ ۰ تا ۶۵ درصد رسوب‌دهی شد. بعد از اضافه نمودن آمونیوم سولفات، محلول حاصل در دمای ۴ċ برای ۲۴ ساعت نگهداری و سپس در دمای ۴ċ با ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شد و پس از حذف محلول رویی و رسوب در بافر سدیم فسفات با pH= ۵ حل شد. به منظور کاهش میزان نمک، محلول آنزیمی در داخل غشاء دیالیزی (D0530 SIGMA) با MW= 12400 در معرض بافر سدیم فسفات به مدت ۱۸ ساعت و با ۳ بار تعویض بافر دیالیز شد. سپس محتویات کیسه دیالیز با استفاده از فیلترهای ساخت کمپانی آمیکون با قدرت تفکیک (Cutoff) a ۳۰ و ۵۰ کیلو دالتون به روش اولترافیلتریزاسیون برای مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و مایع رویی فیلتر جداسازی شد. در مرحله آخر ۲ سی‌سی از محلول حاصله به ستون کروماتوگرافی Superdex ساخت کمپانی Amersham که از قبل با محلول استات سدیم ۰/۲ مولار Equilibration Buffer (pH5.5) به تعادل رسیده بود، تزریق شد. سپس با استفاده از بافر سدیم استات ۱۰۰ میلی‌مولار حاوی کلرید سدیم ۱۵۰ میلی‌مولار، ستون با Flow rate برابر با ۰/۳ میلی لیتر در دقیقه توسط دستگاه AKTA Purifier (Amersham bioscience, USA) شستشو شد و فراکشن‌ها درحجم ۲/۵ میلی‌لیتری توسط فراکشن کالکتور جمع آوری شد و مورد سنجش فعالیت لاکازی قرار گرفت. نمونه‌های که دارای فعالیت آنزیمی بودند، مخلوط شد و سپس مجدد اولترافیلتره شد و در ادامه جهت تعیین ویژگی‌های آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. جهت تعیین وزن مولکولی و خلوص نمونه از روش SDS-PAGE با ژل آکریل آمید ۱۲ درصد استفاده شد. پس از انجام الکتروفورز، ژل به مدت ۶۰ دقیقه در محلول کوماسی بلو G250 رنگ‌آمیزی و در نهایت رنگ بری شد. جهت به‌دست آوردن پارامترهای کینتیکی آنزیمی، فعالیت لاکاز تخلیص شده 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 نرم‌افزار Graphpad prism 6 نمودار میکائیلیس منتون نمونه رسم شد و ضرایب کینتیکی *Km* و*Vmax* محاسبه شد. به منظور تعیین دمای بهینه لاکاز خالص‌سازی شده، فعالیت آن در دماهای متفاوت از ۲۰°C تا ۹۰ و با فاصله ۱۰°C

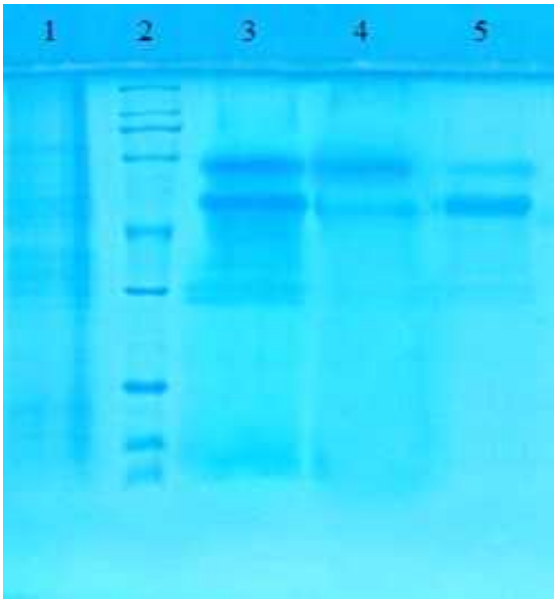
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-04-23]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.6.6.5]

در بافر استات سدیم ۰/۲ مولار pH برابر با 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. پروفایل pH و تعیین pH بهینه آنزیم لاکاز نوترکیب، با سنجش فعالیت آنزیم در pH های متفاوت بافری (۱ تا ۸) در دمای ثابت ۳۷ °C به مدت ۳۰ دقیقه تعیین شد. به منظور تعیین پایداری دمایی لاکاز، نمونه خالص شده در محدوده دمایی ۲۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه تیمار حرارتی شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ در دمای ۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و در نهایت سنجش فعالیت آنزیمی بر روی آن‌ها در دمای ۳۷ °C به مدت ۳۰ دقیقه و در بافر استات سدیم ۰/۲ مولار در pH ۵/۵ انجام گرفت و فعالیت لاکازی محاسبه گردید. میزان پایداری در دمای ۲۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در فواصل ۱۰ċ تعیین و نمودار بر اساس میزان فعالیت نسبی آنزیمی در مقابل لاکاز تیمار نشده با حرارت در دماهای متفاوت رسم شد. تمامی آزمون‌ها با انجام حداقل ۳ تکرار و احتساب میانگین و انحراف از معیار (Standard derivation) انجام گردید.

نتایج

تعیین وزن مولکولی لاکاز نوترکیب: کلنی‌های انتقال داده شده در محیط BMMY کشت داده شدند. در محیط القائی BMMY با استفاده از متانول پروموتور AOX ژن لاکاز طی ۴ روز القاء شد. سوپرناتانت نمونه‌های دارای فعالیت لاکازی بر روی ژل SDS-PAGE بررسی شد (شکل ۱). پروتئین لاکاز با وزن مولکولی ۶۵ کیلودالتون بر روی ژل آکریل آمید مشاهده شد.



شکل ۱- ژل SDS-PAGE از سوپرناتانت‌های محیط بیانی BMMY. چاهک ۱: پروتئین‌های ترشحی پیکیا پاستوریس پذیرنده وکتور pPink فاقد ژن لاکاز (کنترل منفی). چاهک ۲: مارکر پروتئینی. چاهک‌های۳ الی ۵: سوپرناتانت محیط بیانی پیکیا پاپتوریس حامل ژن لاکاز

پس از کشت میزبان پیکیا پاستوریس حامل ژن لاکاز نوترکیب در محیط القائی و در شرایط بهینه کشت، سوپرناتانت دارای حداکثر فعالیت لاکازی جداسازی و پس از فیلتریزاسیون میکروبی، نمونه توسط آمونیوم سولفات اشباع ۵۵ درصد با حداکثر رسوب و بازده فعالیت آنزیمی تغلیظ شد. پس از انجام دیالیز، نمونه به ستون (۱۵×۱ سانتی‌متری) sepharose تزریق و با استفاده از شیب بافری طی ۳ مرحله کروماتوگرافی انجام شد و فراکشن‌گیری شد. در مرحله اول در هیچ‌کدام از فراکشن‌های جداسازی شده فعالیت لاکازی مشاهده نشد اما در مرحله دوم در تعدادی از فراکشن‌ها فعالیت لاکازی با قله پروتئینی مشاهده شد که پس از یکسان سازی آنها، فراکشن حاصله به منظور تعیین خصوصیات و ویژگی‌های آنزیم خالص‌سازی شده مورد استفاده قرار گرفت. در بررسی فعالیت آنزیمی فراکشن‌های مرحله سوم جداسازی نیز فراکشن‌های دارای فعالیت لاکازی مشاهده شد، اما

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-04-23]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.6.6.5]

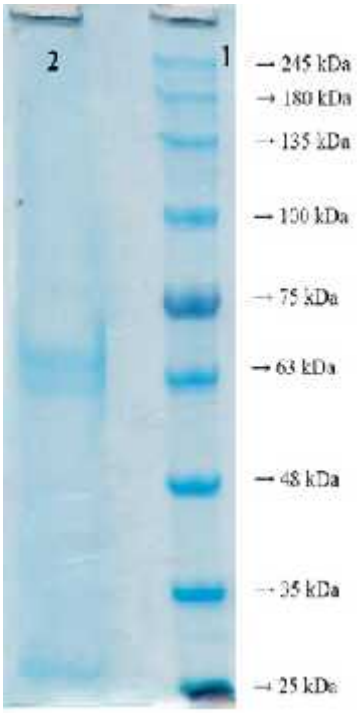
فعالیت لاکازی آنها در مقایسه با فراکشن‌های دارای فعالیت لاکازی جداسازی شده در مرحله دوم بسیار اندک بود و مطالعه آتی روی آنها صورت نگرفت. در نهایت فراکشن انتخابی در مرحله دوم پس از اولترافیلتریزاسیون، خشک و مورد سنجش آنزیمی قرار گرفت. در طی مراحل خالص‌سازی، نمونه‌ها مورد سنجش آنزیمی و غلظت پروتئین تعیین شد. در نهایت فعالیت ویژه هر کدام به منظور بررسی و مقایسه بازدهی روش خالص‌سازی تعیین شد که در جدول ۱ نتایج نشان داده شده است.

بررسی نتایج نشان داد که طی چند مرحله خالص‌سازی در مرحله اول پس از اشباع‌سازی با استفاده از آمونیوم سولفات ۵۵ درصد راندمان خالص‌سازی برای این مرحله ۴/۲۴ برابر در مقایسه با سوپرناتانت و حفظ ۶۴/۶ درصد از فعالیت آنزیمی بود.

جدول ۱- مراحل خالص‌سازی لاکاز

	فعالیت آنزیم (واحد آنزیم)	میزان پروتئین کل (میلی گرم)	فعالیت ویژه (میلی گرم/واحد آنزیمی)	خلوص(مرتبه)	بازده (درصد)
سوپرناتانت حاصل از سانتریفیوژ کشت	۱۸۶/۷۶	۸/۶	۲۱/۷۱	۱	۱۰۰
اولترافیلتراسیون	۱۴۷/۰۰	۳/۰۱	۴۸/۸۳	۲/۲۴	۷۸/۷
رسوب دهی با ۵۵٪ آمونیوم سولفات	۱۲۰/۷۱	۱/۳۱	۹۲/۱۴	۴/۲۴	۶۴/۶
کروماتوگرافی ژل فیلتریزاسیون	۹۲/۸۹	۰/۷۵۳	۱۲۳/۳۵	۵/۶۸	۴۹/۷

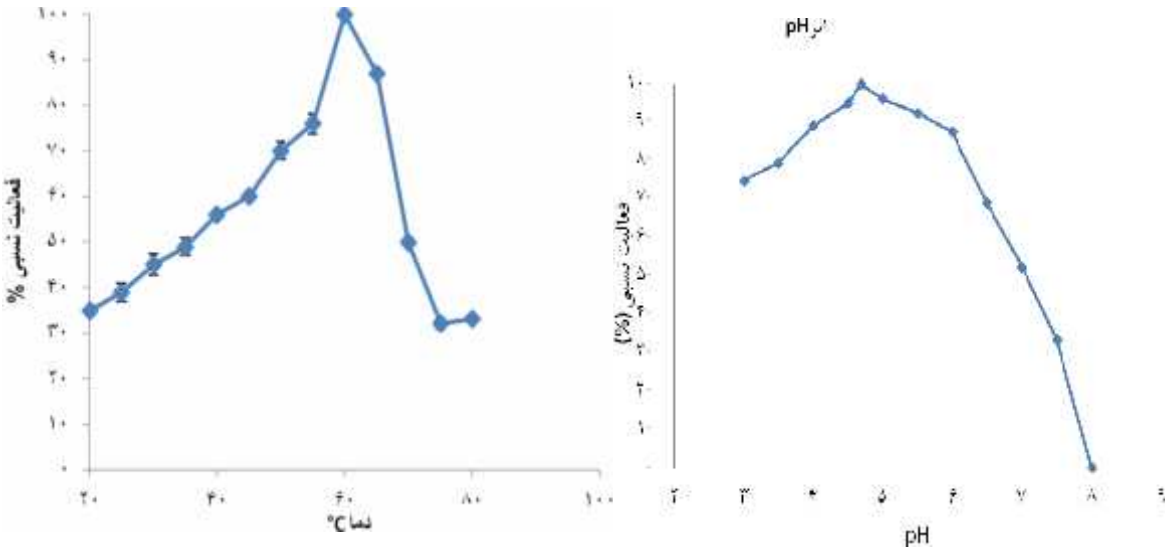
سپس در ادامه خالص‌سازی با استفاده از کروماتوگرافی توسط ستون ژل فیلتریزاسیون نتایج نشان داد بازده این روش در مقایسه با سوپرناتانت ۵/۶۸ برابر و حفظ ۴۹/۷ درصد از فعالیت آنزیمی است. بررسی داده‌های مراحل خالص‌سازی نشان داد. استراتژی به کار رفته در مسیر خالص‌سازی به‌طور موفقیت آمیزی منجر به خالص نمودن لاکاز نوترکیب با بازده مناسب شده است. نتایج خالص‌سازی پس از استفاده از ستون کروماتوگرافی در شکل ۲ نمایش داده شد.



شکل ۲- ژل SDS-PAGE پس از خالص‌سازی لاکاز نوترکیب با استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتریزاسیون ۱-مارکر پروتئین ۲- باند لاکاز پس از خالص‌سازی

خصوصیات دما و pH بهینه لاکاز: نتایج پروفایل دمایی مطابق نمودار ۱ نشان داد که دمای بهینه فعالیت آنزیم ۶۰ċ می‌باشد. پروفایل pH پس از محاسبه فعالیت ویژه هر نمونه تعیین و نمودار رسم شد، نتایج مطابق نمودار ۱، pH بهینه ۴/۸ را نشان داد.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-04-23]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.6.6.5]

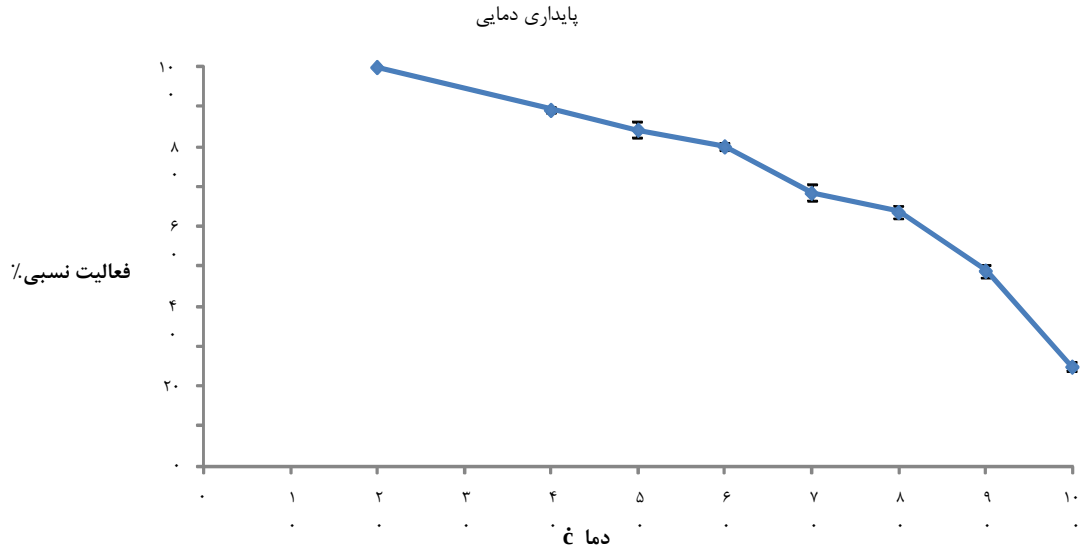


الف- دمای بهینه لاکاز خالص شد ب- pH بهینه لاکاز خالص شده

نمودار ۱- الف پروفایل فعالیت لاکازی در دماهای متغیر را نشان می‌دهد. محور افقی دماهای متغیر و محور عمودی فعالیت ویژه نسبی نمونه را نشان می‌دهد. نمودار ۱-ب فعالیت لاکازی در pHهای متغیر را نشان می‌دهد. محور افقی pHهای متغیر و محور عمودی فعالیت ویژه نسبی نمونه را نشان می‌دهد

.

منحنی پایداری دمایی : میزان فعالیت نسبی آنزیمی در دماهای مختلف تعیین و رسم شد. طبق نمودار۲ آنزیم بر اثر تیمار دمایی در ۷۰ ، ۸۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۶۸/۵، ۶۳/۷ و ۴۹ درصد پایداری حرارتی نسبت به لاکاز قبل از تیمار حرارتی نشان می‌دهد.



نمودار ۲- پروفایل فعالیت لاکازی در دماهای متغیر را نشان می‌دهد که فعالیت ویژه نمونه‌ها با غلظت کل پروتئین ثابت بر اساس فعالیت نسبی در مقابل دماهای مختلف نشان داده شده است.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-04-23]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.6.6.5]

خصوصیات کینتیکی لاکاز : فعالیت لاکاز نوترکیب خالص‌سازی شده با غلظت پروتئینی یکسان در غلظت‌های گرادیان سوبسترایی سرین گالدازین نشان داد که آنزیم تخلیص شده دارای پارامترهای کینتیکی K_m =۱۴۰µM ، V_{max} = ۱۳۲ µmol $min^{-1}mg^{-1}$ و s^{-1} K_{cat} = ۱۶۸ است.

بحث

مطالعات زیادی بر روی لاکازها از لحاظ عملکرد زیستی، اختصاصیت سوبسترایی، ساختار همراه با مس و کاربردهای صنعتی انجام شده است. قارچ ترمنتوس جزو بازیدومیست می‌باشد که لاکاز را به عنوان آنزیم اصلی جهت فعالیت هضم لیگنین سنتز می‌نماید. تلاش‌های متعددی به منظور یافتن سویه قارچی تولید کننده لاکاز به مقدار بالا انجام شده است. در مواردی نیز محیط کشت‌های مهندسی شده به منظور افزایش بیان لاکاز در قارچ‌های طبیعی استفاده شده است [۱۰، ۷].

اما به‌منظور کاربری لاکاز در صنایع دارویی، غذایی و محیط زیست احتیاج به مقادیر عمده آنزیم می‌باشد که با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک و تولید لاکازهای نوترکیب می‌توان به این هدف دست یافت.

از آنجایی که آنزیم انتخاب شده از منبع قارچی ارگانیسم یوکاریوت می‌باشد و بر روی پروتئین طبیعی (Native) قارچی تغییرات پس از ترجمه (Post translational modification) از قبیل گلیکوزیلاسیون انجام می شود؛ بنابراین تولید این آنزیم در سیستم‌های پروکاریوتی کارایی نخواهد داشت و باید از سیستم‌های بیانی از قبیل مخمرها 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 پروتئین‌های نوترکیب به شمار می‌آیند [۱۳-۱۱].

ژن لاکاز با منبع قارچی در میزبان‌های متعدد کلون‌سازی و بیان شده است و شرایط ایده ال بیان در محیط‌های ارزان حداقل با تنها منبع کربن متانول است لذا میزبان مخمری به منظور تولید لاکاز نوترکیب گزینه مناسبی است [۱۵-۱۴، ۷].

اما در مرحله بعد نکته حائز اهمیت خلوص لاکاز نوترکیب می‌باشد که می‌توان با استفاده از روش‌های متعدد خالص‌سازی که یکی از بهترین روش‌ها کروماتوگرافی است، لاکاز را خالص‌سازی نمود. کروماتوگرافی پروتئین‌ها بر اساس خصوصیات پروتئین‌ها و روش جداسازی تمایلی و سایز پروتیئن‌ها تقسیم‌بندی می‌شود. در مطالعه مذکور در ابتدا لاکاز با منبع قارچ ترامنتیس در میزبان مخمری پیکیا پاستوریس کلون‌سازی و بیان شد و سپس لاکاز نوترکیب خارج سلول فعال طی چندین مرحله خالص‌سازی با موفقیت و با بازده ۵/۶۸ برابر و حفظ ۴۹/۷ درصد فعالیت آنزیمی در مقایسه با سوپرناتانت آنزیمی خالص‌سازی شد [۲].

پژوهش‌های متعددی جهت خالص‌سازی لاکاز از قارچ‌های طبیعی انجام شده است. به‌طوری‌که Gupe و همکاران موفق شدند با استفاده از روش کروماتوگرافی و با استفاده از ستون سفارز لاکاز قارچ *P.ostreatus* HP1 را با بازده ۱۳/۳ برابر و حفظ فعالیت ۷۷/۶۳ درصد را خالص‌سازی نمایند. همچنین Sahay و همکاران، لاکاز را با ۱۰/۷۱ برابر خالص‌سازی و ۳/۴۶ درصد بازده از *Pleurotus sajor-caju* MTCC141 خالص‌سازی نمودند [۱۷-۱۶].

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-04-23]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.6.6.5]

در مطالعه دیگری نیز که توسط Diaz و همکاران انجام شد، توانستند لاکاز *Coriolopsis rigida* با ۳۱/۲ برابر خالص‌سازی و بازده ۲/۵ درصد خالص‌سازی شد [۱۸]. در پژوهش حاضر که خالص‌سازی لاکاز نوترکیب انجام شد، نتایج خالص‌سازی در مقایسه با گزارش‌های انجام شده مناسب و بازده خالص‌سازی جهت پژوهش‌های آزمایشگاهی و مطالعات فیزیکوشمیایی مناسب می‌باشد.

Jaiswal و همکاران موفق به خالص‌سازی لاکاز papaya با بازده ۶۱/۵ درصد و پایدار در برابر حرارت تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد شدند. همچنین Wang و همکاران در پژوهشی، لاکاز *Coprinopsis cinerea* را به صورت نوترکیب در مخمر بیان کردند و پس از خالص‌سازی، خصوصیات لاکاز نوترکیب تخلیص شده را هم‌چون دما، pH، پایداری دمایی و مهارکننده‌های آنزیمی تعیین شدند [۲۰-۱۹]. نتایج بررسی خصوصیات بیوشیمیایی بر روی لاکاز خالص‌سازی شده نشان داد که دارای pH با تمایل و پایداری در محدوده pHهای اسیدی است که حداکثر فعالیت در pH=۴/۸ مشاهد شد. بررسی رفتار لاکاز خالص‌سازی شده نشان داد که فعالیت و مقاومت در pHهای اسیدی می‌تواند به دلیل الگوی گلیکوزیلاسیون مخمری و گلیوزیلاسیون در جایگاه آسپارژین لاکاز باشد که باعث شده تا آنزیم مذکور با توجه pH اسیدی گزینه مناسبی جهت کاربری صنعتی باشد [۲۲-۲۱، ۸].

مطالعات در مورد محدوده فعالیت دمایی لاکاز نوترکیب نشان داد که لاکاز خالص‌سازی شده دارای بهینه دمای ۶۰ċ است و این درحالی است که لاکازهای نوترکیب تولید شده در میزبان‌های مخمری دارای دمای بهینه ۵۰ċ تا ۵۵ می‌باشد [۲۲، ۱۲، ۷].

بررسی مطالعه پارامترهای کینتیکی لاکاز خالص شده نشان داد که لاکاز نوترکیب دارای پارامترهای کینتیکی *Km, Vmax, Kcat* و تأثیر کینتیکی مشابهی با لاکاز طبیعی و لاکازهای قارچی گزارش شده می‌باشد که تمایل بالایی به سوبسترا داشته و فعالیت آنزیمی مناسبی جهت کاربری در صنعت دارد [۲۳، ۱۴، ۷، ۴]. بررسی نتایج پایداری دمایی نشان دارد که لاکاز دارای پایداری در محدوده دمایی ۷۰ تا ۹۰ درجه سانتیگراد می‌باشد که احتمالا رفتار لاکاز در برابر تیمار دمایی می‌تواند تا حدی به دلیل پیوندهای دی سولفید موجود در لاکاز باشد هم‌چنین کاهش فعالیت آنزیمی بر اثر تیمار حرارتی احتمالاً مربوط به بر هم ریختگی ساختار فضایی لاکاز در مقابل حرارت باشد [۲۵-۲۳، ۱۹، ۱۷].

نتیجه‌گیری

بررسی‌های انجام شده طی مطالعه مذکور بر روی لاکاز نوترکیب خالص‌سازی شده و تعیین خصوصیات بیوشیمیایی، کینتیکی و پایداری حرارتی لاکاز نوترکیب خالص شده نشان داد که آنزیم لاکاز خالص شده قابلیت کاربری در مطالعات آزمایشگاهی جهت بررسی ساختاری، عملکری و مهندسی لاکاز و در مقیاس صنعتی قابلیت کاربری در صنایع کشاورزی، محیط زیست و غذایی را دارد.

تشکر و قدردانی

مقاله مذکور استخراج شده از از طرح تحقیقاتی با عنوان " کلون‌سازی و بیان ژن رمز کننده آنزیم لاکاز قارچ *Trametes* در میزبان مخمری و تعیین کننده خصوصیات کینتیکی و بیوشیمیایی آنزیم" و با کد مجوز ۱۴۰۴/۲۱۴۴۰۱ مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی می‌باشد و نویسندگان مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی به دلیل حمایت از طرح تحقیقاتی ذیل نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-04-23]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.6.6.5]

References

[1] Bertrand B, Martinez-Morales F, Tinoco S, Rojas-Trejo S, Serrano-Carreon L. Induction of laccases in Trametes versicolor by aqueous wood extracts. *World J Microbiol Biotechnol* 2013; 30(1): 135-42.

[2] Bleve G, C. Lezzi S,.Spagnolo P, Rampino C, Perrotta G, Mita C, et al. Construction of a laccase chimerical gene: recombinant protein characterization and gene expression via yeast surface display. *Appl Biochem Biotechnol* 2014; 172(6): 2916-31.

[3] Effenberger I, Harport M, Pfannstiel J, Klaiber I, Schaller A. Expression in Pichia pastoris and characterization of two novel dirigent proteins for atropselective formation of gossypol. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016; 101(5): 2021-32.

[4] Janusz G, Kucharzyk K, Pawlik A, Staszczak M, Paszczynski A. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. *Enzyme Microb Technol* 2012; 52(1): 1-12.

[5] Wang B, Yan Y, Tian Y, Zhao W, Li Z, Gao J, et al. Heterologous expression and characterisation of a laccase from *Colletotrichum lagenarium* and decolourisation of different synthetic dyes. *World J Microbiol Biotechnol* 2016; 32(3): 40-8.

[6] Hesampour A ,Ranaei O,Malboobi M, Harati J,Mohandesi N. Comparison of biochemical properties of recombinant phytase expression in favourable methylotrophic platforms, *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*. *Progress in Biological Sciences* 2014; 4.1-12.

[7] Feng B.Z , Li P. Cloning.Characterization and expression of a novel laccase gene Pclac2 from Phytophthora capsici. *Braz J Microbiol* 2014; 45(1): 351-7.

[8] Kalyani D, Tiwari M, Li J, Kim S, Kalia V, Kang Y, et al. A highly efficient recombinant laccase from the yeast *Yarrowia lipolytica* and its application in the hydrolysis of biomass. *PLoS One* 2015; 10(3): 21-29.

[9] Hesampour A,Siadat S.E, Malboobi M, Mohandesi N, Arab S.S, Ghahremanpour M. Enhancement of thermostability and kinetic efficiency of *Aspergillus niger* PhyA phytase by site-directed mutagenesis. *Appl Biochem Biotechnol* 2014; 175(5): 2528-41.

[10] Xu X,Xuo B,Ma Y, Lei H, Song H, Ying Q, Xu M,et al. Proteomic analysis reveals the mechanisms of Mycena dendrobii promoting transplantation survival and growth of tissue culture seedlings of Dendrobium officinale. *J Appl Microbiol* 2015; 118(6): 1444-55.

[11] Bryjak J, Rekuc A. Effective purification of Cerrena unicolor laccase using microfiltration,

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-04-23]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.6.6.5]

ultrafiltration and acetone precipitation. *Appl Biochem Biotechnol* 2009; 160(8): 2219-35.

[12] Huang S.J, Liu Z.M, Huang X.L, Guo L.Q, Lin J.F. Molecular cloning and characterization of a novel laccase gene from a white-rot fungus *Polyporus grammocephalus* TR16 and expression in *Pichia pastoris*. *Lett Appl Microbiol* 2011; 52(3): 290-7.

[13] Mohandesi N, Haghbeen K, Ranaei O, Arab S.S, Hassani S. Catalytic efficiency and thermostability improvement of Suc2 invertase through rational site-directed mutagenesis. *Enzyme Microb Technol* 2016; 96: 14-22.

[14] KiiskinenL, Saloheimo L. M. Molecular cloning and expression in Saccharomyces cerevisiae of a laccase gene from the *ascomycete Melanocarpus Albomyces*. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(1): 137-44.

[15] Feng,B, Li P.Q. Molecular characterization and functional analysis of the Nep1-like protein-encoding gene from *Phytophthora capsici*. *Genet Mol Res* 2013; 12(2): 1468-78.

[16] Han M.J, Choi H.T, Song H.G. Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *J Microbiol* 2005; 43(6): 555-60.

[17] Liu Z, Zhang D, Hua Z, Li J, Du G, Chen J. Improvement of laccase production and its properties by low-energy ion implantation. *Bioprocess Biosyst Eng* 2009; 33(5): 639-46.

[18] Diaz R, Saparrat M.C, Jurado M, Garcia-Romera I, Ocampo J, Martinez M. Biochemical and molecular characterization of *Coriolopsis rigida* laccases involved in transformation of the solid waste from olive oil production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 88: 133-42.

[19] Jaiswal N, Pandey VP, Dwivedi UN. Purification of a thermostable alkaline laccase from papaya (Carica papaya) using affinity chromatography. *Int J Biol Macromol* 2015; 72: 326-32.

[20] Wang B, Wang L, Lin Y, Han Q, Han J, Gao J et al. Purification and characterization of a laccase from *Coprinopsis cinerea* in Pichia pastoris. *World J Microbiol Biotechnol* 2014; 30(4): 1199-206.

[21] Patel, H., S. Gupte, M. Gahlout, A. Gupte. Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of Pleurotus ostreatus HP-1. *3 Biotech* 2014; 4(1): 77-84.

[22] Xu H, Guo M.Y, Gao Y.H, Bai X.H, Zhou X.W. Expression and characteristics of manganese peroxidase from *Ganoderma lucidum* in *Pichia pastoris* and its application

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-04-23]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.6.6.5]

in the degradation of four dyes and phenol. *BMC Biotechnol* 2017; 17(1): 19-28.

[23] Lisova Z.A, Lisov A.V, Leontievs A.A. Two laccase isoforms of the basidiomycete Cerrena unicolor VKMF-3196. Induction, isolation and properties. *J Basic Microbiol* 2010; 50(1): 72-82.

[24] Lu L, Zhao M, Zhang B.B, Yu S.Y, Bian X.J, Wang W,et al. Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 74(6): 1232-9.

[25] Mohandesi N, Siadat O, Haghbeen K, Hesampour A. Cloning and expression of *Saccharomyces cerevisiae* SUC2 gene in yeast platform and characterization of recombinant enzyme biochemical properties. *3 Biotech* 2016; 6(2): 129-38.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-04-23]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.6.6.5]

Purification of Fungal Laccase from *Trametes* and Characterization of Recombinant Laccase Physicochemical Properties: A Laboratory Study

A. Hesampour[1] , N. Mohandesi[2]

Received: 04/02/2018 Sent for Revision: 29/04/2018 Received Revised Manuscript: 11/06/2018 Accepted: 12/06/2018

Background and Objectives: Laccase is the most abundant member of protein family that catalyzes the oxidation of substituted phenols. Laccases are used as biocatalysts for decolorization and bleaching in dye industries, detoxification in environment, and juice clarification in food industries. The present study aimed at producing recombinant laccase, purifying with high yield and fold, and characterizing biochemical and kinetic properties of the purified laccase.

Materials and Methods: In this laboratory study, recombinant *Trametes* laccase, which was successfully expressed in yeast host in extracellular form, was purified through ultrafiltration and gel chromatography methods. The purification process yield and fold was determined and after molecular weight determination, physiochemical properties of recombinant laccase were studied and its thermostability was determined. All tests were conducted with at least 3 times repetition and mean and standard deviation calculation.

Results: Purification strategy showed that laccase was successfully purified with 5.67 fold and 49.7% yield and the molecular weight of recombinant laccase was determined 65KDa. Optimum pH and temperature of the recombinant laccase were determined 4.8 and 60°C, respectively. Its kinetic properties were also determined. The thermostability assessment showed that purified laccase is highly thermostable.

Conclusion: The results indicated that gel chromatography purification method can be an ideal to achieve high yield and fold purification of recombinant laccase with keeping enzyme properties and high thermostability, so that the recombinant purified laccase with high yield and fold can be used in drug, textile, and food industries, and environment and its detoxification.

Key words: Purification, *Laccase* enzyme, Trametes fungal, Physicochemical properties

Funding: This study was funded by Islamic Azad University, Central Tehran Branch.

Conflict of interest: None declared.

How to cite this article: Hesampour A, Mohandesi N. Purification of Fungal Laccase from *Trametes* and Characterization of Recombinant Laccase Physicochemical Properties: A Laboratory Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2018; 17 (6): 511-22. [Farsi]

1- Assistant Prof., Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, ORCID: 0000-0002-7324-5469

(Corresponding Author) Tel: (021) 22686906, Fax: (021) 22686906, Email: a.hesampour@gmail.com

2- Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, ORCID: 0000-0002-1043-3454.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-04-23]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.6.6.5]