مجله دنیای میکروب‌ها
سال یازدهم شماره سوم (پیاپی ۳۶) پاییز ۱۳۹۷
صفحات ۲۲۹-۲۱۷

Original Article

طراحی بیوانفورماتیکی و بهینه سازی تولید آنزیم گلوکزاکسیداز نوترکیب بیان شده در مخمر *یاررووییا لیپولیتیکا*

فاطمه خدیوی درخشان[۱]، فرشاد درویشی*[۲]، مهروز دزفولیان[۳]، کاترین مادزاک[۴]

[۱]دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی، [۲]دانشیار، دانشگاه مراغه، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی، [۳] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی، [۴] استاد، دانشگاه پاریس، آگروپاریس تک.

چکیده

سابقه و هدف: آنزیم گلوکزاکسیداز کاربرد فراوانی در صنایع پزشکی، دارویی، غذایی، نساجی و محیطی دارد. بیان هترولوگ این آنزیم در میزبان های مخمری به دلیل برخی از محدودیت های تولید صنعتی این آنزیم توسط *آسپرژیلوس نایجر* بررسی شده است. این مطالعه با هدف بررسی ویژگی های بیوانفورماتیکی گلوکزاکسیداز در سویه نوترکیب مخمر *یاررووییا لیپولیتیکا* Po1g-GOX و بهینه سازی شرایط تولید این آنزیم به روش تاگوچی صورت گرفت.

مواد و روش ها: توالی پروتئین، ساختارهای اول، دوم، سوم و میزان گلیکوزیلاسیون آنزیم نوترکیب گلوکزاکسیداز با نرم افزارهای بیوانفورماتیکی بررسی شد. بهینه سازی تولید آنزیم نوترکیب برای گلوکز، پپتون، عصاره مخمر و pH در محیط YPD دارای تیامین در ٤ سطح برای نرم افزار Qualitek-4 تعریف شد. میزان تولید آنزیم سنجش و با نرم افزار تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها: گلوکزاکسیداز نوترکیب دارای ٦٠٥ اسیدآمینه بوده که ساختار دوم آن دارای ۲۹ درصد مارپیچ آلفا، ١٦ درصد صفحه بتا و ٥٤ درصد کویل است که با ساختار دوم توالی اسیدآمینه گلوکزاکسیداز طبیعی *آسپرژیلوس نایجر* تشابه زیادی را نشان داد. ۸ جایگاه گلیکوزیلاسیون در این پروتئین نوترکیب قرار دارد و ساختار سوم دارای یک دومین است و تشابه بالایی با گلوکزاکسیداز طبیعی دارد. بیشترین تولید آنزیم گلوکزاکسیداز نوترکیب در شرایط بهینه در محیط کشت حاوی ۳۰ گرم در لیتر گلوکز، ۵ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۱۵ گرم در لیتر پپتون و pH حدود ۷ به دست آمد.

نتیجه گیری: گلوکز اکسیداز نوترکیب *یاررووییا* به دلیل شباهت بالا با گلوکزاکسیداز طبیعی پتانسیل مناسبی به منظور کاربرد در صنایع دارویی و غذایی دارد.

واژگان کلیدی: *یاررووییا لیپولیتیکا*، گلوکزاکسیداز، بیوانفورماتیک، تاگوچی.

دریافت مقاله: آبان ماه ٩٦ پذیرش برای چاپ: دی ماه ٩٦

مقدمه

آنزیم گلوکز اکسیداز (β-D-گلوکز:اکسیژن 1-اکسیدوردوکتاز؛ EC 1.1.2.3.4) فلاووپروتئینی با وزن مولکولی ۱۷۵-۱۳۰ کیلودالتون است که با استفاده از اکسیژن مولکولی به عنوان پذیرنده الکترون، اکسیداسیون β-D-گلوکز را به اسید گلوکونیک کاتالیز نموده و باعث تولید پراکسید هیدروژن می شود (۱ و ۲). آنزیم گلوکزاکسیداز دارای کاربردهای فراوان در صنایع پزشکی، دارویی، غذایی و نساجی است.

گلوکزاکسیداز یک آنزیم تجاری مهم در صنایع دارویی است که یکی از مهمترین کاربردهای آن به عنوان حسگر زیستی به منظور تشخیص آنزیمی گلوکز در مایعات بدن می باشد. همچنین در صنایع غذایی برای حذف قند یا اکسیژن به منظور

*) آدرس برای مکاتبه: مراغه، دانشگاه مراغه، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی.
تلفن: ۰۹۱۴۸۷۴۶۸۴۶ پست الکترونیک: f.darvishi@ymail.com

Archive of SID
www.SID.ir

محافظت و بهبود رنگ، بافت، طعم، بو و افزایش عمر مفید مواد غذایی مورد استفاده قرار می گیرد (۱).

تولید آنزیم گلوکزاکسیداز ابتدا در قارچ *آسپرژیلوس نایجر* (*Aspergillus niger*) گزارش شده و هم اکنون این قارچ به عنوان مهمترین تولید کننده صنعتی این آنزیم به شمار می آید. متاسفانه تولید صنعتی آنزیم گلوکزاکسیداز توسط این قارچ با محدودیت هایی روبرو است. به ویژه تولید درون سلولی که در موارد استفاده در صنایع غذایی می تواند آلرژی زا باشد و همچنین تولید تجاری با این قارچ به دلیل آلودگی همزمان با سایر آنزیم هایی مانند کاتالاز، سلولاز و آمیلاز گران قیمت است (۳-۱). برای غلبه بر این مشکلات بهتر است این آنزیم در موجودات دیگر به صورت هترولوگ بیان گردد (۱ و ٤).

بیان پروتئین های خارجی در مخمر مزایا بیشتری نسبت به سایر سیستم های بیانی دارد به همین دلیل بیان ژن گلوکزاکسیداز *آسپرژیلوس نایجر* در مخمرهای مختلفی مانند *ساکارومایسس سرویزیه* (*Saccharomyces cerevisiae*)، *هانسونلا پلی مورفا* (*Hansonellis polimorfa*) و *پیکیا پاستوریس* (*Pichia pastoris*) صورت گرفته است (۷-٤).

آنزیم گلوکزاکسیداز نوترکیب تولید شده در هرکدام از مخمرهای یاد شده دارای مزایا و معایبی است و قابلیت صنعتی شدن ندارند. مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* (*Yarrowia lipolytica*) متعلق به گروه مخمرهای غیر معمول است که از سه دهه گذشته این مخمرها از لحاظ تحقیقات بنیادی و زیست فناوری مورد توجه قرار گرفته اند. مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* برای انسان غیر بیماریزا می باشد و توسط اداره دارو و غذا آمریکا برای فرآیندهای تولیدی و صنعتی به عنوان ارگانیسم ایمن GRAS (Generally Recognized as Safe) تایید شده است (۸ و ۹).

این مخمر، امروزه به دلیل داشتن توالی های پروموتری قوی با بازده بالا برای تولید و ترشح خارج سلولی پروتئین های نوترکیب، عدم گلیکوزیلاسیون بیش از حد پروتئین بر خلاف *ساکارومایسس*، قابلیت استفاده از سوبستراهای متنوع و ارزان قیمت به عنوان یکی از بهترین و مهمترین میزبان های یوکاریوتی برای بیان محصولات نوترکیب و هترولوگ مطرح است (۸، ۱۰ و ۱۱).

این آنزیم برای اولین بار در مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* توسط خدیوی درخشان (Khadivi Derakhshan) و همکاران بیان شد که تطابق وزنی آنزیم نوترکیب با آنزیم گلوکزاکسیداز طبیعی از مزیت های بیان این آنزیم نوترکیب بود (۱۲).

مهندسی ترکیبات محیط کشت تخمیری می تواند تأثیر بسزایی در افزایش تولید متابولیت های میکروبی داشته باشد. ترکیبات محیط کشت در افزایش بازده تولید آنزیم موثر است، بنابراین بهینه سازی شرایط فرآیند با استفاده از ابزارهای طراحی آزمایش می تواند به توسعه آن کمک کند. یکی از تکنیک های بهینه سازی، روش طراحی کسری از فاکتوریل تاگوچی است. این روش شامل طراحی سیستم، طراحی عامل و طراحی تعادل فرآیند است. در این روش طراحی فرآیندها به صورت مداوم و به صورت بهینه انجام می شود (۱۳ و ١٤). مطالعات بیوانفورماتیکی در شناسایی نقاط مشترک و تفاوت میان آنزیم طبیعی و نوترکیب موثر بوده و موجب شناخت مزیت های آنزیم نوترکیب می شود.

هدف از مطالعه حاضر بررسی ویژگی های بیوانفورماتیکی از جمله ساختار دو بعدی و سه بعدی، نواحی N-گلیکوزیلاسیون آنزیم گلوکز اکسیداز نوترکیب در مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* و نیز بهینه سازی تولید این آنزیم با روش تاگوچی بود.

مواد و روش ها

الف) محیط کشت: ترکیبات محیط کشت YPD (Yeast extract peptone dextrose) شامل ۲۰ گرم در لیتر گلوکز (زر فروکتوز، ایران)، ۲۰ گرم در لیتر پپتون (مرک، آلمان)، ۱۰ گرم در لیتر عصاره مخمر (بیوشاپ، کانادا) و ۰/۰۵ گرم در لیتر تیامین (سیگما آلدریچ، آلمان) می باشد (۸ و ۱۵).

YNB (Yeast Nitrogen Base) بدون لوسین شامل گلوکز (۱۰ گرم بر لیتر) نیتروژن مخمر بدون آمینو اسید (٦/٧ گرم بر لیتر) و مخمر سنتتیک بدون لوسین ۱/٦ گرم بر لیتر) (سیگما آلدریچ، آلمان) می باشد.

ب) به دست آوردن مخمر نوترکیب: سویه مخمر نوترکیب

Archive of SID

www.SID.ir

Y. lipolytica Po1g-GOX که دارای ژن گلوکزاکسیداز قارچ *آسپرژیلوس نایجر* است توسط خدیوی درخشان و همکاران در سال ۲۰۱۷ به شرح زیر به دست آمد. در ابتدا ژنوم قارچ *آسپرژیلوس نایجر* ATCC 9202 با روش روش تغییر یافته مولر (Moller) و همکاران استخراج شد. ژنوم استخراج شده جهت به دست آوردن ژن گلوکزاکسیداز، توسط آنزیم فیوژن (2X Master Mix Phusion U; Thermo Fisher Scientific, USA) و پرایمرهای اختصاصی طراحی شده در جدول ۱ و در شرایط اشاره شده در جدول ۲ و ۳، با روش PCR تکثیر شد. محصول PCR توسط کیت استخراج از ژل (Thermo Fisher Scientific, USA) از ژل آگاروز استخراج و سپس به منظورتوالی یابی به شرکت ژن فناوران ارسال شد. محصول PCR توسط آنزیم های برش دهنده برش داده شد. پلاسمید شاتل وکتور بیانی pINA1296 (تک کپی، وارد شونده، پروموتر

جدول ۱: توالی پرایمرهای اختصاصی طراحی شده ژن گلوکزاکسیداز.

نام پرایمر	توالی پرایمر
fGOSfi	5'-GCCGGCCGTTCTGGCCAGCAATGGCATTGAAGCCAG-3'
rGOKpn	5'-ATCAGGTACCTCACTGCATGGAAGCATAATC-3'

جدول ۲: محتویات واکنش PCR برای واکنش ۵۰ میکرولیتری.

ترکیب	غلظت	حجم (میکرولیتر)
مستر میکس آنزیم فیوژن	2X	۲۵
پرایمر مستقیم	۲۵پیکومول	۱
پرایمر معکوس	۲۵پیکومول	۱
DNA الگو	۵۰ نانوگرم	۱
آب مقطر استریل (بدون نوکلئاز)	-	۲۲

جدول ۳: دوره های حراراتی واکنش PCR.

مرحله	دما (درجه سلیسیوس)	زمان
واسرشتگی اولیه	۹۸	۳۰ ثانیه
واسرشتگی	۹۸	۱۰ ثانیه
اتصال	۵۰	۳۰ ثانیه (در هر چرخه یک درجه سلیسیوس دما بالا رود)
تکثیر	۷۲	۶۰ ثانیه
رفتن به مرحله ۲	تکرار مرحله ۲-۴، ۶ بار	-
واسرشتگی	۹۸	۱۰ ثانیه
اتصال	۵۶	۳۰ ثانیه
تکثیر	۷۲	۶۰ ثانیه
رفتن به مرحله ۶	تکرار مراحل ۶-۸، ۳۰ بار	-
تکثیر نهایی	۷۲	۵ دقیقه

نوترکیب hp4d، سیگنال ترشحی و ترمیناتور (*XPR2*) توسط آنزیم های برش دهنده *Sfi*I و *Kpn*I برش داده شد. محصول برش داده شده توسط آنزیم لیگاز T4 DNA به شاتل وکتور وارد شد. وکتور نوترکیب ابتدا به *اشریشیا کلی* MachI (Invitrogen, USA) ترانسفورم شده و سپس وکتور نوترکیب توسط کیت استخراج پلاسمید (Thermo Fisher Scientific, USA) خالص شد. وکتور نوترکیب توسط آنزیم برش دهنده *Not*I خطی شده و با روش استات لیتیم به مخمر *Y. lipolytica Po1g* وارد شد. مخمر *Y. lipolytica Po1g* (با ویژگی، حذف ژن پروتئاز اسیدی و قلیایی، عدم ترشح پروتئاز خارج سلولی، دارای جهش بزرگ در ژن کد کننده لوسین، مناسب برای پلاسمیدهایی با فرمت pBR322) نوترکیب برای گزینش در محیط کشت YNB بدون لوسین در دمای ۲۹ درجه سلیسیوس کشت داده شد (۱۲).

ج) بررسی بیوانفورماتیکی توالی DNA گلوکزاکسیداز نوترکیب: توالی نوکلئوتیدی گلوکزاکسیداز نوترکیب، با نرم افزار v.7.0.5 BioEdit Sequence Alignment Editor مورد ترجمه قرار گرفت. توالی پروتئین برای ساختار دوم از سرور CATH (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk) استفاده شد و مقایسه با گلوکزاکسیداز طبیعی *آسپرژیلوس نایجر* با گلوکزاکسیداز نوترکیب از برنامه SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/) صورت گرفت. ساختار سوم با سرور RaptorX (http://raptorx.uchicago.edu) مورد بررسی قرار گرفت و با نرم افزار Chimera v. 1.11.2 ساختار سوم گلوکزاکسیداز طبیعی *آسپرژیلوس نایجر* مقایسه شد. با استفاده از سرور NetNGlyc 1.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc) نواحی N-گلیکوزیلاسیون در پروتئین نوترکیب شناسایی شد.

د) سنجش رشد مخمر و تولید آنزیم گلوکزاکسیداز نوترکیب: یکی از کلنی های مخمر نوترکیب *یاررووییا لیپولیتیکا* Pog1-GOX در محیط کشت YPD جامد کشت داده شده و در دمای ۲۹ درجه سلیسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. یک کلنی از مخمر نوترکیب به ۲۰ میلی‌لیتر محیط YPD مایع

Archive of SID

www.SID.ir

در شرایط استریل منتقل و درون انکوباتور شیکردار با دمای ۲۹ درجه سلیسیوس و چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. پس از ۲٤ ساعت، مایه تلقیح (مخمر رشد یافته در محیط کشت مایع) آماده شد. سپس به ارلن حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت مایع YPD استریل، ۱ درصد مایه تلقیح اضافه شده و در دمای ۲۹ درجه سلیسیوس چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۹ روز در شیکرانکوباتور قرار داده شد. رشد میکروارگانیسم با روش شمارش لام نئوبار در هر ۲٤ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. هم زمان با اندازه گیری میزان رشد مخمر، هر ۲٤ ساعت نمونه برداری برای سنجش تولید گلوکزاکسیداز نوترکیب نیز انجام شد.

برای سنجش آنزیم نوترکیب با استفاده از آنزیم پراکسیداز، ٤-آمینو آنتی پیرین، فنل و گلوکز استفاده شد. ابتدا از ۱/٤ میلی لیتر بافر ۰/۲ مولار سدیم استات و ۰/۹ میلی لیتر محلول ۰/۱۷ مولار فنل و ٤-آمینو آنتی پیرین ۲/٦ میلی مولار به همراه ۰/۵ میلی لیتر گلوکز ۱۰ درصد و ۰/۱ میلی لیتر آنزیم پراکسیداز پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه در طول موج ۵۱۰ نانومتر جذب نوری آن توسط اسپکتوفتومتر (شیمادزو، ژاپن) اندازه گیری شد. طبق گزارش خدیوی درخشان و همکاران، pH و دمای بهینه این آنزیم نوترکیب به ترتیب، ۵/۵ و ۳۷ درجه سلیسیوس می باشد (۱۲).

ه) بهینه سازی تولید آنزیم نوترکیب گلوکزاکسیداز به روش تاگوچی: به منظور بهینه سازی محیط کشت و افزایش تولید آنزیم گلوکزاکسیداز نوترکیب Pog1-GOX به روش تاگوچی از نرم افزار Qualitek-4 (Nutek Inc., MI) استفاده شد. در این روش، ابتدا عامل و سطوح پیش‌بینی وارد نرم‌افزار شده و پس از وارد شدن نتایج آزمایش حاصل از سه تکرار، نرم‌افزار داده‌ها را با روش میانگین تجزیه کرده و مقدار بهینه را برای عوامل پیشنهاد می‌کند.

عواملی مورد بررسی شامل گلوکز، پپتون، عصاره مخمر و pH در محیط YPD بودند. چهار عامل در چهار سطح متفاوت تعریف شد (جدول ٤) و سپس نرم افزار طبق جدول ۵، ۱٦ آزمایش را طراحی کرد. ترکیبات ۱٦ آزمایش برای ۵۰ میلی لیتر محیط کشت در ارلن ۲۵۰ میلی لیتری تهیه و استریل شد. در شرایط استریل، یک درصد مایه تلقیح از سویه مخمر نوترکیب به تمامی محیط ها اضافه شد. ارلن ها به مدت ۷ روز در دمای ۲۹ درجه سلیسیوس با چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه در انکوباتورشیکردار قرار گرفت و سپس هر ۲٤ ساعت نمونه برداری و سنجش آنزیمی انجام شد. پس از وارد کردن نتایج با سه بار تکرار، نرم افزار داده ها را تحلیل کرده و مقدار بهینه مشخص شد (۱٦ و ۱۷).

جدول ٤: عوامل اصلی و سطوح مورد بررسی (بر اساس گرم در لیتر) توسط نرم افزار تاگوچی.

عامل	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳	سطح ۴
گلوکز	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰
عصاره مخمر	۵	۱۰	۱۵	۲۰
پپتون	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰
pH	٤	۵	٦	۷

جدول ۵: آزمون های طراحی شده به روش تاگوچی (آرایه‌های متعامد M-16) توسط نرم افزار Qualitek-4، برای سطوح مختلف عوامل اصلی گلوکز، عصاره مخمر، پپتون و pH ، اعداد ۱، ۲، ۳ و ٤ نشان دهنده سطوح عوامل اصلی تعریف شده در جدول ٤ است.

شماره آزمایش	گلوکز	عصاره مخمر	پپتون	pH
آزمایش شماره ۱	۱	۱	۱	۱
آزمایش شماره ۲	۱	۲	۲	۲
آزمایش شماره ۳	۱	۳	۳	۳
آزمایش شماره ۴	۱	٤	٤	٤
آزمایش شماره ۵	۲	۱	۲	۳
آزمایش شماره ۶	۲	۲	۱	٤
آزمایش شماره ۷	۲	۳	٤	۱
آزمایش شماره ۸	۲	٤	۳	۲
آزمایش شماره ۹	۳	۱	۳	٤
آزمایش شماره ۱۰	۳	۲	٤	۳
آزمایش شماره ۱۱	۳	۳	۱	۲
آزمایش شماره ۱۲	۳	٤	۲	۱
آزمایش شماره ۱۳	٤	۱	٤	۲
آزمایش شماره ۱۴	٤	۲	۳	۱
آزمایش شماره ۱۵	٤	۳	۲	٤
آزمایش شماره ۱۶	٤	٤	۱	۳

Archive of SID

www.SID.ir

یافته ها

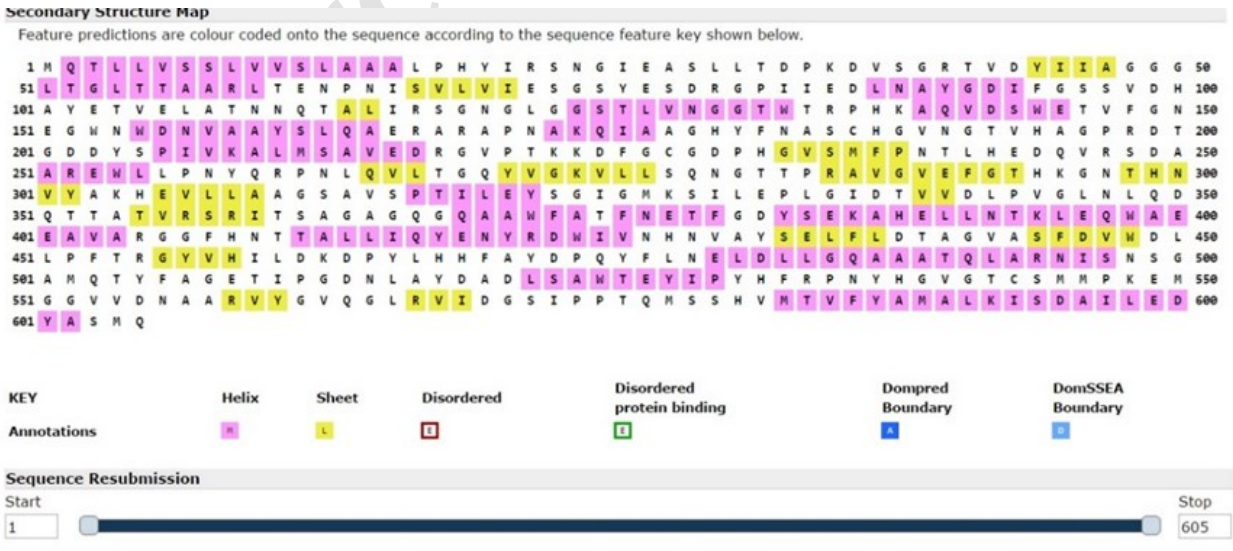
الف) بررسی بیوانفورماتیکی آنزیم گلوکزاکسیداز نوترکیب: توالی اسیدآمینه آنزیم گلوکزاکسیداز نوترکیب توسط نرم افزار BioEdit مشخص شد. این پروتئین نوترکیب دارای ۶۰۵ اسیدآمینه است که با اسیدآمینه متیونین شروع می شود (شکل ۱).

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
    5         15         25         35         45         55
MQTLLVSSLV VSLAAALPHY IRSNGIEASL LTDPKDVSGR TVDYIIAGGG LTGLTTAARL

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   65         75         85         95        105        115
TENPNISVLV IESGSYESDR GPIIEDLNAY GDIFGSSVDH AYETVELATN NQTALIRSGN

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  125        135        145        155        165        175
GLGGSTLVNG GTWTRPHKAQ VDSWETVFGN EGWNWDNVAA YSLQAERARA PNAKQIAAGH

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  185        195        205        215        225        235
YFNASCHGVN GTVHAGPRDT GDDYSPIVKA LMSAVEDRGV PTKKDFGCGD PHGVSMFPNT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  245        255        265        275        285        295
LHEDQVRSDA AREWLLPNYQ RPNLQVLTGQ YVGKVLLSQN GTTPRAVGVE FGTHKGNTHN

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  305        315        325        335        345        355
VYAKHEVLLA AGSAVSPTIL EYSGIGMKSI LEPLGIDTVV DLPVGLNLQD QTTATVRSRI

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  365        375        385        395        405        415
TSAGAGQGQA AWFATFNETF GDYSEKAHEL LNTKLEQWAE EAVARGGFHN TTALLIQYEN

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  425        435        445        455        465        475
YRDWIVNHNV AYSELFLDTA GVASFDVWDL LPFTRGYVHI LDKDPYLHHF AYDPQYFLNE

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  485        495        505        515        525        535
LDLLGQAAAT QLARNISNSG AMQTVFAGET IPGDNLAYDA DLSAWTEYIP YHFRPNYHGV

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  545        555        565        575        585        595
GTCSMMPKEM GGVVDNAARV YGVQGLRVID GSIPPTQMSS HVMTVFYAMA LKISDAILED

....|....| .
  605
YASMQ.....
```

شکل ۱: توالی اسیدآمینه آنزیم گلوکزاکسیداز نوترکیب.

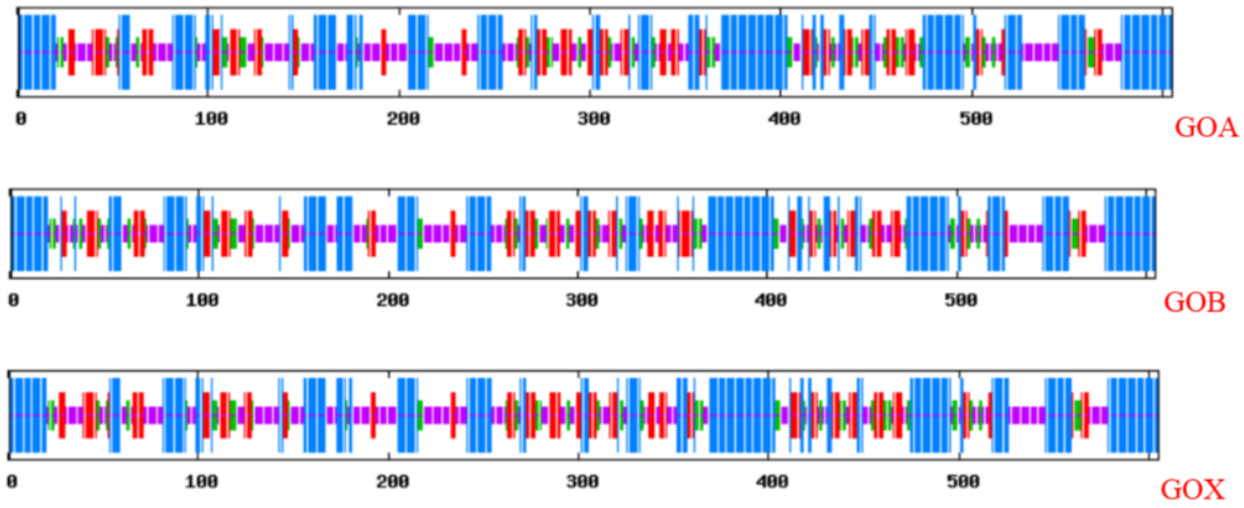
ساختار دوم در سرور UCL Structural and Molecular به آدرس http://bioinf.cs.ucl.ac.uk مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در شکل ۲ نشان داده شده است. این پروتئین نوترکیب دارای ۱۷ مارپیچ آلفا (۲۹ درصد)، ۱۶ صفحه بتا (۱۶ درصد) و ۵۴ درصد کویل است.

مقایسه ساختار دوم دو پروتئین گلوکزاکسیداز طبیعی EC 1.1.3.4 (GOA) و KC333175.1 (GOB) با گلوکزاکسیداز نوترکیب GOX در شکل ۳ مشاهده می شود. ساختار سوم در سرور raptorx (http://raptorx.uchicago.edu) مورد بررسی قرار گرفت. این آنزیم در ساختار سوم دارای یک دومین است (شکل ٤). ساختار سوم گلوکزاکسیداز طبیعی *آسپرژیلوس نایجر* و گلوکزاکسیداز نوترکیب در نرم افزار Chimera بررسی شده و در نهایت توسط این نرم افزار ساختار هردو مقایسه شد. شکل ۵، ساختار سوم هر دو آنزیم و مقایسه آنها را نشان



شکل ۲: ساختار دوم پروتئین نوترکیب گلوکزاکسیداز. ۱۷ مارپیچ آلفا به رنگ صورتی و ۱۶ صفحه بتا به رنگ زرد برای آنزیم نوترکیب گلوکزاکسیداز وجود دارد.

www.SID.ir

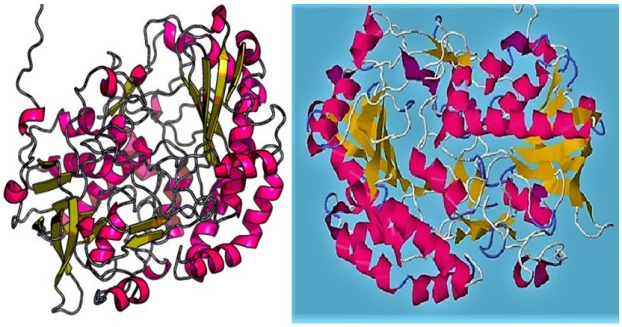


شکل ۳: مقایسه ساختار گلوکزاکسیداز طبیعی دو سویه متفاوت *آسپرژیلوس نایجر* GOA و GOB با ساختار دوم گلوکزاکسیداز نوترکیب GOX.

می دهد. هشت جایگاه N–گلیکوزیلاسیون در موقعیت های ٦٥، ١١١، ١٨٣، ١٩٠، ٢٨٠، ٣٧٧، ٤١٠ و ٤٩٥ پروتئین نوترکیب گلوکزاکسیداز وجود دارد (شکل ٦).

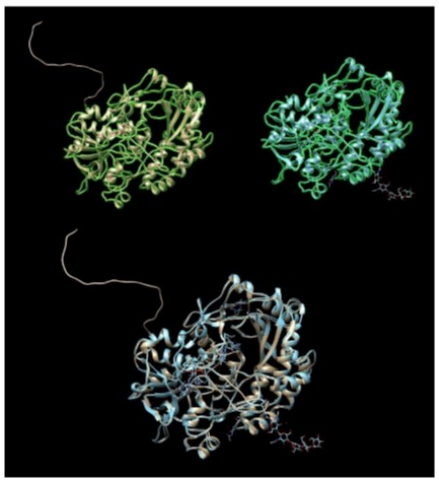
ب) بهینه سازی تولید آنزیم گلوکزاکسیداز نوترکیب با روش تاگوچی: سنجش تولید آنزیم گلوکزاکسیداز نوترکیب و شمارش تعداد مخمرها با لام نئوبار در محیط کشت YPD به مدت ۹ روز صورت گرفت. بیشینه تولید خارج سلولی آنزیم نوترکیب به میزان U/L ٤٦٠ در روز هفتم سنجیده شد و در روز سوم بیشترین تعداد مخمر مشاهده گردید (نمودار ۱– الف و ب).

برای بهینه سازی تولید آنزیم گلوکزاکسیداز نوترکیب با روش



شکل ٤: ساختار سوم پروتئین گلوکزاکسیداز نوترکیب. مارپیچ های آلفا به رنگ صورتی، صفحات بتا به رنگ زرد و نواحی کویل به رنگ طوسی مشخص شده است.

تاگوچی، پس از گذشت ۷ روز از تلقیح سنجش فعالیت صورت گرفت. میزان تولید آنزیم گلوکز اکسیداز در آزمون های پیشنهادی با استفاده از روش تاگوچی در نمودار ۲ قابل مشاهده است. سپس نتایج حاصل از آن توسط نرم افزار تجزیه و تحلیل شد. همان طور که در شکل ۷ مشخص شده است سطح چهار گلوکز (۳۰ گرم در لیتر)، سطح سه عصاره مخمر (۱۵ گرم در لیتر)، سطح دو پپتون (۱۵ گرم در لیتر) و سطح



شکل ٥: ساختار سوم و مقایسه آن ها توسط Chimera: ساختار سوم گلوکزاکسیداز طبیعی *آسپرژیلوس نایجر* (رنگ آبی، بالا سمت راست)، گلوکزاکسیداز نوترکیب (رنگ سبز و طلایی، بالا سمت چپ). تصویر زیرین مقایسه ساختار سوم گلوکزاکسیداز طبیعی با نوترکیب (قسمت های ناهمسان تک رنگ دیده می شوند).

www.SID.ir

```
Name:  Sequence          Length:  605
MQTLLVSSLVVSLAAALPHYIRSNGIEASLLTDPKDVSGRTVDYIIAGGGLTGLTTAARLTENPNISVLVIESGSYESDR    80
GPIIEDLNAYGDIFGSSVDHAYETVELATNNQTALIRSGNGLGGSTLVNGGTWTRPHKAQVDSWETVFGNEGWNWDNVAA   160
YSLQAERARAPNAKQIAAGHYFNASCHGVNGTVHAGPRDTGDDYSPIVKALMSAVEDRGVPTKKDFGCGDPHGVSMFPNT   240
LHEDQVRSDAAREWLLPNYQRPNLQVLTGQYVGKVLLSQNGTTPRAVGVEFGTHKGNTHNVYAKHEVLLAAGSAVSPTIL   320
EYSGIGMKSILEPLGIDTVVDLPVGLNLQDQTTATVRSRITSAGAGQGQAAWFATFNETFGDYSEKAHELLNTKLEQWAE   400
EAVARGGFHNTTALLIQYENYRDWIVNHNVAYSELFLDTAGVASFDVWDLLPFTRGYVHILDKDPYLHHFAYDPQYFLNE   480
LDLLGQAAATQLARNISNSGAMQTYFAGETIPGDNLAYDADLSAWTEYIPYHFRPNYHGVGTCSMMPKEMGGVVDNAARV   560
YGVQGLRVIDGSIPPTQMSSHVMTVFYAMALKISDAILEDYASMQ
.....................................................................N.....   80
.............................N.......................................   160
.....................N......N.......................................   240
.........................................N.............................   320
................................................................................   400
.........N.....................................................................   480
............N...................................................................   560
.....................................                                          640

(Threshold=0.5)
```

شکل ٦: جایگاه های N–گلیکوزیلاسیون در پروتئین نوترکیب گلوکزاکسیداز. هشت جایگاه گلیکوزیلاسیون گلوکزاکسیداز نوترکیب در موقعیت های ٦٥، ١١١، ١٨٣، ١٩٠، ٢٨٠، ٣٧٧، ٤١٠ و ٤٩٥ مشخص شده است.

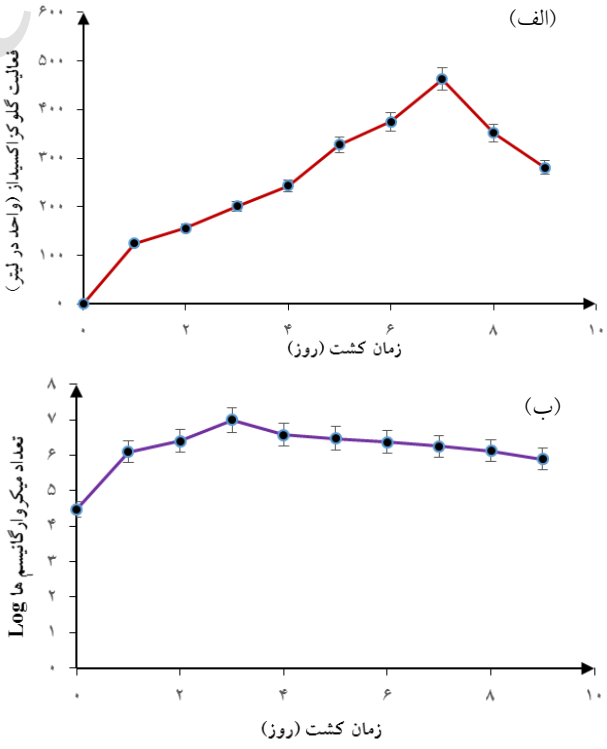
چهار pH برابر با ۷ به عنوان سطوح مناسب برای چهار عامل مورد نظر در بهبود تولید آنزیم گلوکز اکسیداز معرفی شدند.

بحث

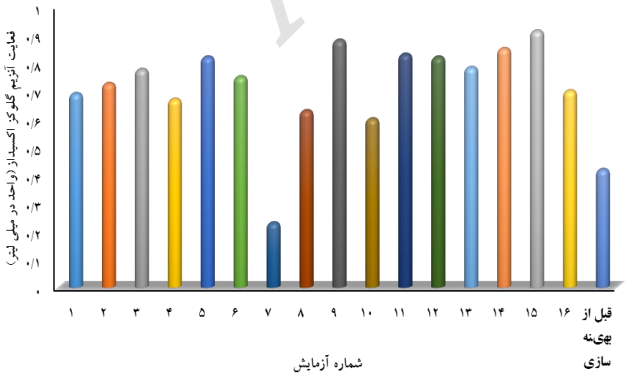
گلوکزاکسیداز تولید شده توسط *آسپرژیلوس نایجر* به صورت متصل به دیواره تولید می‌شود در نتیجه در موارد استفاده در پزشکی و صنایع غذایی می تواند دارای خواص آلرژی زا باشد. از طرف دیگر تولید تجاری در این گونه به خاطر آلودگی هم زمان با سایر آنزیم های درون سلولی مانند کاتالاز، سلولاز و آمیلاز پر هزینه می‌باشد (۱، ۲ و ۱۸).

جداسازی و همسانه سازی(کلون سازی) آنزیم گلوکزاکسیداز *آسپرژیلوس نایجر* در میزبان های مختلف مخمری مانند *ساکارومیسس سرویزیه*، *هانسونلا پلی مورفا*، *کلیورومایسس مارکسیانوس* و *پیکیا پاستوریس* صورت گرفته است که هرکدام دارای مزایا و معایبی هستند (۷، ۲۱-۱۹).

یاررووویا لیپولیتیکا مخمری است که از نظر تشابه کدونی بسیار به قارچ *آسپرژیلوس* نزدیک است و نیازی به استفاده از cDNA به منظور به دست آوردن توالی آنزیم گلوکز اکسیداز ندارد.

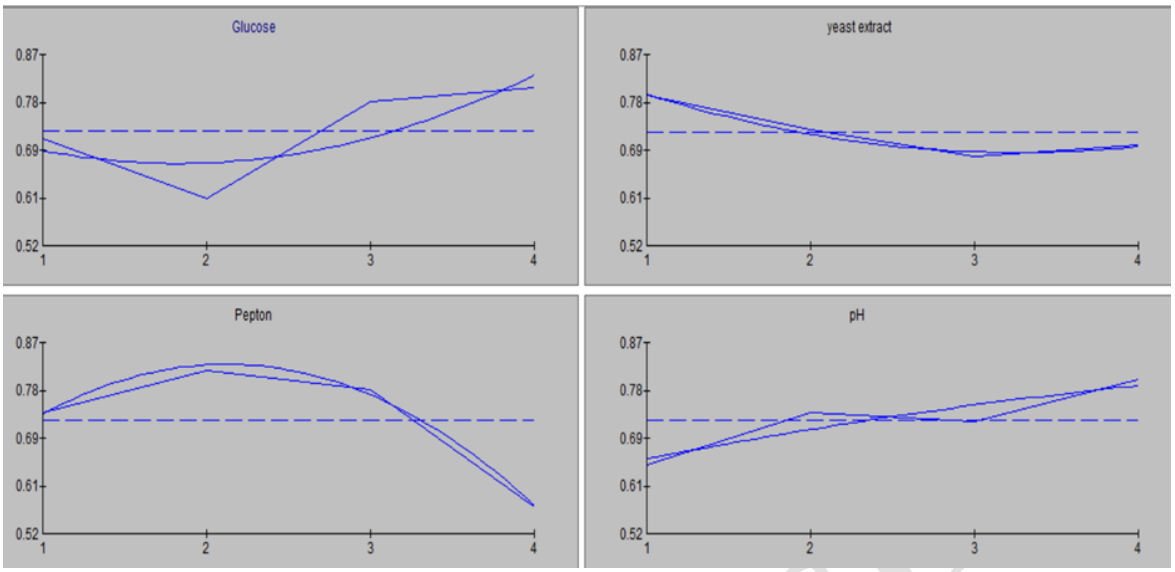


نمودار ۱: (الف) تولید آنزیم گلوکزاکسیداز نوترکیب Po1g-GOX در محیط کشت YPD؛ (ب) منحنی رشد مخمر نوترکیب Po1g-GOX در محیط کشت YPD.



نمودار ۲: تولید گلوکزاکسیداز برای شانزده آزمون طراحی‌شده به روش تاگوچی در محیط YPD در روز هفتم.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۷: تجزیه و تحلیل سطوح چهار عامل گلوکز، عصاره مخمر، پپتون و pH توسط نرم افزار Qualitek-4.

جدول ٦: تأثیر برهم کنش چهار عامل مختلف مورد بررسی در تولید آنزیم گلوکز اکسیداز.

ردیف	عوامل برهمکنش	ستون	درصد اهمیت
۱	گلوکز X pH	٤ x ۱	۱۱/۲۵
۲	پپتون x pH	٤ x ۳	۸۵/۱۸
۳	عصاره مخمر x pH	٤ x ۲	۳٤/۱۷
۴	عصاره مخمر x پپتون	۳ x ۲	۰٦/۱۲
۵	گلوکز x عصاره مخمر	۲ x ۱	۰٤/۹
۶	گلوکز x پپتون	۳ x ۱	۰۱/۳

همچنین به دلیل تشابه کدونی بالا با *آسپرژیلوس نایجر* در ترجمه بهره وری زیادی دارد (۲۲).

ژن گلوکزاکسیداز *آسپرژیلوس نایجر* توسط خدیوی درخشان و همکاران در حامل بیانی-ترشحی pINA1296 با پروموتر نوترکیب hp4d، سیگنال ترشحی *XPR2* و ترمیناتور *XPR2* در *یاروویا لیپولیتیکا* سویه Po1g به صورت خالص بیان شده و آنزیم ترشح شده از نظر وزنی تطابق بالایی با آنزیم طبیعی داشت. در پژوهش حاضر، ساختار آنزیم گلوکزاکسیداز نوترکیب و بهینه سازی تولید آن بررسی شد. توالی اسیدآمینه گلوکزاکسیداز نوترکیب دارای ٦۰۵ اسیدآمینه است که دارای ۲۹ درصد مارپیچ آلفا، ۱٦ درصد صفحه بتا و ٥٤ درصد کویل است. این نتایج با ساختار دوم توالی اسیدآمینه ژن های گلوکزاکسیداز طبیعی دو سویه مختلف *آسپرژیلوس نایجر* (ثبت شده در سرور NCBI) که از ٦۰۵ اسیدآمینه تشکیل شده است مورد مقایسه قرار گرفت که با گلوکزاکسیداز طبیعی EC 1.1.3.4 که دارای ۲۹ درصد مارپیچ آلفا، ۱۷ درصد صفحات بتا و ۵۳ درصد کویل، تشابه زیادی نشان داد. گلوکزاکسیداز *پنیسیلیوم آماگاساکنسی* دارای ۳٤/۰۵ مارپیچ آلفا، ۱٦/۳٦ درصد صفحات بتا و ٤۳/٤۷ درصد کویل است و گلوکزاکسیداز *پنیسیلیوم واریبل* شامل ۳۰/۰۸ درصد مارپیچ آلفا، ۱٦/۸٦ درصد صفحات بتا و ٤٦/٦۱ درصد کویل نیز تشابه دارد (۲۵-۲۳).

در بررسی ساختار سوم، گلوکزاکسیداز طبیعی *آسپرژیلوس نایجر* و گلوکزاکسیداز نوترکیب، هر دو دارای یک دومین هستند. همان طور که در شکل ۵ مشاهده می شود از لحاظ ساختار شباهت بالایی به یکدیگر داشته و قسمت های نظیر مارپیچ آلفا و صفحات بتا شبیه به یکدیگر هستند (۲٦). بررسی گلیکوزیلاسیون پروتئین نوترکیب بیانگر شباهت بالای گلیکوزیلاسیون گلوکزاکسیداز نوترکیب با گلوکزاکسیداز طبیعی را نشان می دهد که مزیت مهم این گلوکزاکسیداز نوترکیب محسوب می شود. در گلوکزاکسیداز طبیعی هشت ناحیه گلیکوزیلاسیون وجود دارد که در پروتئین نوترکیب نیز هشت ناحیه گلیکوزیلاسیون در موقعیت های ٦۵، ۱۱۱، ۱۸۳، ۱۹۰،

Archive of SID
www.SID.ir

۲۸۰، ۳۷۷، ٤١٠ و ٤٩٥ مشاهده گردید. این در حالی است که هایپرگلیکوزیلاسیون گلوکزاکسیداز هترولوگ در مخمرهای *ساکارومایسس* و *هانسونلا* یک مشکل عمده در تولید گلوکزاکسیداز نوترکیب و کاربرد درمانی است (٤، ٥، ۲۳ و ۲٥).

پروموتر نوترکیب hp4d در محیط های کشت متنوع فعالیت کرده و می تواند بیان خوبی داشته باشد که از این نظر برای استفاده در تولید صنعتی بسیار مناسب است (۸ و ۱۱). در پژوهش حاضر با بهینه سازی رشد مخمر در محیط YPD دارای تیامین به روش تاگوچی، افزایش تقریبا دو برابری تولید آنزیم از ٤٦٠ واحد در لیتر به ۹۰۳ واحد در لیتر را در پی داشت. بر اساس نتیجه جدول ٦ برهمکنش میان گلوکز و pH بیشترین تاثیر را بر رشد مخمر نوترکیب داشته که به دلیل افزایش تعداد مخمر نسبت به شرایط غیربهینه، میزان تولید افزایش یافته است. برهمکنش بین گلوکز و pH با ۲٥/۱۱ درصد، در مرحله بعد برهمکنش بین پپتون و pH ۱۸/۸٥ درصد سپس برهمکنش بین عصاره مخمر و pH با ۱۷/۳٤ بر تولید گلوکز اکسیداز مؤثر است. میانکنش گلوکز و پپتون با ۳/۰۱ درصد کمترین نقش را در افزایش تولید گلوکز اکسیداز دارا است. سپس نرم افزار با تحلیل نتایج به دست آمده آزمایشی را پیشنهاد می کند که بیشترین تولید گلوکز اکسیداز را داشته باشد که در این آزمایش سطح چهار گلوکز (۳۰ گرم در لیتر)، سطح یک عصاره مخمر (٥ گرم در لیتر)، سطح دو پپتون (۱٥ گرم در لیتر) و سطح چهار (pH ۷) را به عنوان بهترین سطوح برای چهار عامل مورد مطالعه پیشنهاد کرد. میزان تولید آنزیم گلوکز اکسیداز با بهینه سازی با روش تاگوچی به ۹۰۳ واحد در لیتر افزایش یافت که این میزان تقریباً دو برابر آنزیم تولید شده در حالت غیر بهینه است. شربنی و همکاران در سال ۲۰۰۹ با استفاده از گلوکز به عنوان سوبسترا و بهینه سازی غلظت سوبسترا، دما و pH در ارلن میزان تولید گلوکز اکسیداز را در قارچ *آسپرژیلوس نایجر* به ۱۸ واحد در میلی لیتر افزایش دادند (۲۷).

حمید (Hamid) و همکاران در سال ۲۰۰۳ مقدار ۳/٤۲ واحد در میلی لیتر گلوکز اکسیداز را با بهینه سازی شرایط مانند سطوح اوره، کربنات کلسیم، سولفات منیزیم، KH_2Po_4، pH و سوبسترا (باقی مانده کاه برنج) با فرآیند تخمیر غوطه ور پس از ۳٦ ساعت با استفاده از قارچ *آسپرژیلوس نایجر* به دست آوردند (۲۸).

در پژوهش مشابهی که توسط خورشید (Khorshid) و همکاران در سال ۲۰۰۹ با استفاده از تخمیر غوطه ور و قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و گلوکز به عنوان سوبسترا صورت گرفت پس از ٤۸ ساعت مقدار تولید گلوکز اکسیداز را ۲/۰۱ واحد در میلی لیتر گزارش کردند (۲۹).

پروموتر hp4d استفاده شده برای آنزیم گلوکزاکسیداز نوترکیب، یک پروموتر صنعتی است که در مقیاس فرمنتور افزایش تولید بیشتری را از خود بروز می دهد. تجربه نشان داده است که این پروموتر در شرایط فرمنتور قدرت تولید چندین برابری نسبت به شرایط ارلن دارد. به عنوان نمونه تولید لاکاز (Laccase) نوترکیب در ارلن با شرایط بهینه به میزان ۰/۳۹ واحد در میلی لیتر گزارش شد، اما زمانی که از ملاس به عنوان منبع کربن استفاده شده و در فرمنتور در شرایط بهینه قرار گرفت، توانایی تولید به ۳/۷ واحد در میلی لیتر حدود ۹/٥ برابر رسید. این مساله بیانگر توانایی این پروموتر در استفاده از محیط ارزان قیمت و نیز کارایی آن در مقیاس های صنعتی است. همچنین در تولید لاکاز نوترکیب توسط این مخمر، بیشینه تولید در ارلن در شرایط بهینه روز ششم به دست آمد، اما همین روال در فرمنتور در شرایط بهینه تا ۲ روز کاهش یافت که این خود تاییدی بر صنعتی بودن این پروموتر است (۳۰). امید است با به کارگیری شرایط بهینه به دست آمده در تحقیق حاضر و در آینده، با ایجاد شرایط تولید در فرمنتور، آنزیم گلوکزاکسیداز نوترکیب تولید بالاتر در زمان کوتاه تر نشان دهد.

نتیجه گیری

گلوکزاکسیداز آنزیم پرکاربرد در عرصه پزشکی، دارویی و صنایع مختلف است. تولید این آنزیم نوترکیب در مخمر با حفظ کیفیت، یکی از روش های به دست آوردن گلوکزاکسیداز ارزان و کاربردی است. آنالیز بیوانفورماتیک نشان داد که

Archive of SID

www.SID.ir

گلوکزاکسیداز نوترکیب *یاروویا لیپولیتیکا* با دارا بودن ۶۰۵ اسید آمینه، ساختار دوم، سوم و گلیکوزیلاسیون شباهت به گلوکزاکسیداز طبیعی *آسپرژیلوس نایجر* دارد. تشابه بالای ساختاری و گلیکوزیلاسیونی آنزیم نوترکیب با آنزیم طبیعی، کارآیی بالای این آنزیم را در صنایع داروسازی مهیا می کند. در بهینه سازی تولید این آنزیم نوترکیب با روش تاگوچی توسط مخمر نوترکیب *یاروویا لیپولیتیکا* سویه Po1g-GOX، بر اساس تحلیل نتایج، عامل گلوکز و pH به عنوان عوامل تاثیر گذار بر فرایند تولید شناخته شده و نیز پپتون از نظر تاثیرگذاری در رتبه بعدی قرار گرفت. پیشنهاد می شود با به کارگیری شرایط بهینه به دست آمده، تولید با فرمانتور مورد بررسی قرار گیرد. به دلیل پروموتر هیبریدی گلوکزاکسیداز نوترکیب *یاروویا*، امید است فرایند تولید آن در فرمانتور افزایش چشمگیری داشته باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج و دانشگاه مراغه به دلیل حمایت های مادی و معنوی کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Bankar SB, Bule MV, Singhal RS, Ananthanarayan L. Glucose oxidase, An overview. Biotechnol Adv. 2009; 27(4): 489-501.
2. Wong CM, Wong KH, Chen XD. Glucose oxidase: Natural occurrence, function, properties and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol. 2008; 78(6): 927-938.
3. Shaikh Sumaiya A, Trived R. A review on glucose oxidase. Int J Curr Microbiol App Sci. 2015; 4: 636-642.
4. Frederick KR, Tung J, Emerick RS, Masiarz FR, Chamberlain SH, Vasavada A, Rosenberg S, Chakraborty S, Schopfer LM. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. J Biol Chem. 1990; 265(7): 3793-3802.
5. Cox H, Mead D, Sudbery P, Eland RM, Mannazzu I, Evans L. Constitutive expression of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* using the PMA1 promoter. Yeast. 2000; 16(13): 1191-1203.
6. Malherbe DF, Toit Md, Cordero Otero RR, van Rensburg P, Pretorius IS. Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production. Appl Microbiol Biotechnol. 2003;61(5-6):502-511.
7. Rocha SN, Abrahão-Neto J, Cerdán ME, González-Siso MI, Gombert AK. Heterologous expression of glucose oxidase in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. Microb Cell Fact. 2010; 9(1): 4-15.
8. Madzak C, Beckerich JM. Heterologous protein expression and secretion in *Yarrowia lipolytica*. in *Yarrowia lipolytica*: Biotechnological applications. Edited by Barth G. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg; 2013. pp. 1-76.
9. Madzak C, Gaillardin C, Beckerich JM. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: A review. J Biotechnol. 2004; 109(1-2): 63-81.
10. Darvishi Harzevili F: *Yarrowia lipolytica*: An overview. in Biotechnological Applications of the Yeast *Yarrowia lipolytica*. Cham, Springer International Publishing; 2014. pp. 1-16.
11. Madzak C. *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. Appl Microbiol Biotechnol. 2015; 99: 4559-4577.

Archive of SID
www.SID.ir

12. Khadivi Derakshan F, Darvishi F, Dezfulian M, Madzak C. Expression and characterization of glucose oxidase from *Aspergillus niger* in *Yarrowia lipolytica*. Mol Biotechnol. 2017; 59(8): 307-314.

13. Khuri AI, Mukhopadhyay S. Response surface methodology. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics. 2010; 2: 128-149.

14. Barton RR. Response surface methodology. In: Encyclopedia of operations research and management science. Edited by Gass SI, Fu MC. Boston, MA, Springer US; 2013. pp. 1307-1313.

15. Madzak C, Otterbein L, Chamkha M, Moukha S, Asther M, Gaillardin C, Beckerich JM. Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. FEMS Yeast Res. 2005; 5(6-7): 635-646.

16. Tsui KL. An overview of Taguchi method and newly developed statistical methods for Robust design. IIE Transactions. 1992; 24: 44-57.

17. Karna SK, Sahai R. An overview on Taguchi method. Int J Eng sci. 2012;1:1-7.

18. Hodgkins M, Mead D, Ballance DJ, Goodey A, Sudbery P. Expression of the glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* in *Hansenula polymorpha* and its use as a reporter gene to isolate regulatory mutations. Yeast. 1993; 9(6): 625-635.

19. Park EH, Shin YM, Lim YY, Kwon TH, Kim DH, Yang MS. Expression of glucose oxidase by using recombinant yeast. J Biotechnol. 2000; 81: 35-44.

20. Zhanjun Q, Yuanfang G, Xiaoming B, Jianrong H, Gaoying S, Bingyin P, Wenxiang B. Expression of *Aspergillus niger* glucose oxidase in yeast *Pichia pastoris* SMD1168. Biotechnol Biotechnol Equip. 2016; 30(5): 998-1005.

21. Zhou YF, Zhang XE, Liu H, Zhang CG, Cass AE. Cloning and expression of *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in methylotrophic yeast. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2001; 17(4): 400-405.

22. Darvishi Harzevili F. *Yarrowia lipolytica* in biotechnological applications. In: Biotechnological applications of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Cham, Springer International Publishing; 2014; pp. 17-74.

23. Pulci V, D'Ovidio R, Petruccioli M, Federici F. The glucose oxidase of *Penicillium variabile* P16: gene cloning, sequencing and expression. Lett Appl Microbiol. 2004; 38(3): 223-238.

24. Kiess M, Hecht HJ, Kalisz HM. Glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. Primary structure and comparison with other glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductases. Eur J Biochem. 1998; 15: 90-99.

25. Kriechbaum M, Heilmann HJ, Wientjes FJ, Hahn M, Jany KD, Gassen HG, Sharif F, Alaeddinoglu G. Cloning and DNA sequence analysis of the glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* NRRL-3. FEBS Lett. 1989; 225(1): 62-66.

26. Hatzinikolaou DG, Hansen OC, Macris BJ, Tingey A, Kekos D, Goodenough P, Stougaard P. A new glucose oxidase from *Aspergillus niger*: characterization and regulation studies of enzyme and gene. Appl Microbiol Biotechnol. 1996; 46(4): 371-381.

27. El-Sherbeny G, Shindia A, Sheriff Y. Optimization of various factors affecting glucose oxidase activity produced by *Aspergillus niger*. Int J Agr Biol Eng. 2005; 7: 953-958.

Archive of SID

www.SID.ir

28. Hamid HM, Zia M, Asgher M. Optimization of various parameters for the production of glucose oxidase from rice polishing using *Aspergillus niger*. Biotechnol (Pakistan). 2003; 2: 1-7.

29. Khurshid S, Kashmiri MA, Quershi Z, Ahmad W. Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger.* Afr J Biotechnol. 2011; 10(9): 1674-1678.

30. Darvishi F, Moradi M, Madzak C, Jolivalt C. Production of laccase by recombinant *Yarrowia lipolytica* from molasses: Bioprocess development using statistical modeling and increase productivity in shake-flask and bioreactor cultures. Appl Biochem Biotechnol. 2017; 181: 1228-1239.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 11, No. 3, September 2018

Original Article

Bioinformatics study of recombinant glucose oxidase expressed in *Yarrowia lipolytica* and optimization of its production by Taguchi experiment design method

Fatemeh Khadivi Derakhshan[1], Farshad Darvishi[2], Mehruz Dezfulian[3], Catherine Madzak[4]

[1]Ph.D. student, Azad University, Karaj Branch, Faculty of Science, Department of Microbiology. [2]Associated Professor, University of Maragheh, Faculty of Science, Department of Microbiology. [3]Assistant Professor, Azad University, Karaj Branch, Faculty of Science, Department of Microbiology. [4]Professor, Universite´ Paris-Saclay, AgroParisTech.

Abstract

Background & Objectives: Glucose oxidase has a wide range of application in medical, pharmaceutical, food, textile, and environmental industries. Heterologous expression of the enzyme has been investigated in yeast hosts due to several industrial-scale limitations in enzyme production by *Aspergillus niger*. The present study aimed to investigate bioinformatics characteristics of recombinant glucose oxidase in *Yarrowia lipolytica* Po1g-GOX and to optimize the production conditions of the enzyme by Taguchi experimental design method.

Materials & Methods: Protein sequence, primary, secondary and tertiary structures and glycosylation rate of recombinant glucose oxidase enzyme were studied via bioinformatics tools. Optimization of recombinant glucose oxidase for glucose, peptone, yeast extract and pH at four levels in YPD media with thiamine were defined to Qualitek-4 software. The level of enzyme production was measured and analyzed by the software.

Results: Recombinant glucose oxidase had 605 amino acids, with 29% α-helix, 16% β sheet and 54% coil in its secondary structure showing similarity to that of native glucose oxidase of *A. niger*. Eight glycosylation sites have been located in this recombinant protein, and the tertiary structure had one domain showing high similarity to native glucose oxidase. The highest level of recombinant glucose oxidase production was obtained in medium containing 30 g/L glucose, 5 g/L yeast extract, 15 g/L peptone, and pH 7.

Conclusion: Recombinant glucose oxidase produced in *Yarrowia* has a suitable potential to be used in pharmaceutical and food industries due to high similarity to native glucose oxidase.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*, Glucose oxidase, Bioinformatics, Taguchi.

Correspondence to: Farshad Darvishi

Tel: +98 9148746846

E-mail: f.darvishi@ymail.com

Journal of Microbial World 2018, 11(3): 217-229.

Archive of SID

www.SID.ir