

کلونینگ، بیان و تعیین خصوصیات لیپاز کایمیریک باسیلوس ترموکاتنولاتوس در باکتری *Escherichia coli*

سیدحسین خالقی نژاد^۱، علی اصغر کارخانه^{۲*}، غلامرضا مطلب^۱، سعید امین زاده^۲ و باقر یخچالی^۲

^۱ زابل، دانشگاه زابل، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

^۲ تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۲۹

چکیده

لیپازهای باکتریایی عضوی از خانواده α/β هیدرولازها هستند که تری آسیل گلیسرول‌ها را در فاز بین آب - چربی هیدرولیز می‌کنند. لیپاز باکتری باسیلوس ترموکاتنولاتوس (BTL2) در دمای ۷۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۸ تا ۱۰ فعالیت دارد و مناسب استفاده در صنعت شوینده می‌باشد. در این پژوهش لیپاز باسیلوس ترموکاتنولاتوس کایمیریک حاوی توالی توافق شده لیپاز قارچ کاندیداروگوزا ($^{211}\text{Gly-Glu-Ser-Ala-Gly}^{207}$) در ناحیه زانوی هسته دوست، در باکتری *E. coli* کلون و بیان شد. سپس فعالیت آنزیمی لیپاز کایمیریک در حضور سوبستراهای مختلف اندازه‌گیری شد. همچنین اثر عوامل مختلف از قبیل دما، pH، دترجنتها، حلالهای آلی و یونهای فلزی بر روی فعالیت آنزیم بررسی گردید. نتایج نشان داد که آنزیم کایمیریک بیشترین فعالیت را در حضور سوبسترای 4 کربنه، (pH 9.0) و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد دارد. همچنین فعالیت آنزیم در حضور حلالهای آلی N-هگزان، N-هپتان، متانول و کلروفرم و دترجنتهای ترایتون ۱۰۰-X، توین ۲۰، توین ۴۰ افزایش یافته است در حالی که یونهای فلزی عمدتاً اثر کاهشی بر فعالیت آنزیم کایمیریک داشتند.

واژه‌های کلیدی: *E. coli*، لیپاز کایمیریک، BTL2

اختصارات: *Bacillus thermocatenulatus* lipase 1, BTL1 و *Bacillus thermocatenulatus* lipase 2, BTL2

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۴۶۴۹۱۲۹، پست الکترونیکی: Karkhane@Nigeb.ac.ir

مقدمه

چربی کاتالیز می‌کنند (۳ و ۲). باکتری *Bacillus thermocatenulatus* دو نوع لیپاز ۱۶ و ۴۳ کیلودالتون تولید می‌کند که به ترتیب BTL1 و BTL2 نامگذاری شده اند (۲۴). ژن *btl2* از ۲۲۹۳ جفت نوکلئوتید تشکیل شده و زنجیره پلی‌پپتیدی ۴۱۷ اسیدآمینوای را رمز می‌کند که ۲۹ اسیدآمینو ابتدای توالی راهنمای آنزیم را تشکیل می‌دهد. لیپاز بالغ دارای ۳۸۸ اسیدآمینو بوده و وزن مولکولی آن حدود ۳۹-۴۳ کیلو دالتون گزارش شده است (۲۵).

لیپازهای میکروبی به دلیل چندکاره بودن، ویژگیهای کاربردی و تولید آسان آنها، گروه مهمی از آنزیم‌های با

باکتریهای مقاوم به حرارت به واسطه فعالیت در دماهای بالا پتانسیل زیادی برای استفاده از آنها یا محصولاتشان در صنعت و تکنولوژی آنزیمی وجود دارد (۵). باکتریهای ترموفیل آنزیمهای متنوعی از جمله آنزیمها آمیلولایتیک و لیپازها را بیان می‌کنند که ذاتاً دمای بالا را تحمل می‌کنند. ویژگیهای شیمیایی این آنزیمها به آنها اجازه فعالیت در دمای بالا و pH قلیایی را می‌دهد (۷).

لیپازها (تری آسیل گلیسرول هیدرولازها، E.C. 3.1.1.3) بخشی از خانواده هیدرولازها هستند که هیدرولیز تری آسیل گلیسریدهای با زنجیره بلند را در حد فاصل آب-

5-) - پرایمر رفت
GATGGCCATGGCGGCATCCCCACG-3, *Mlu*
KK.F(NI)

5-) - پرایمر برگشت
TGAGCTCATCATCCCTTCATTAAGGC-3, *Sac*
KK.R(I)

برای همسانه سازی ژن لیپاز کایمیریک، پلاسمید *pGEM-5zf* با آنزیم *Eco RV* خطی شد، سپس ژن لیپاز کایمیریک در پلاسمید خطی شده با آنزیم لیگاز قرار داده شد. پس از همسانه سازی پلاسمیدهای حامل ژن کایمیریک لیپاز (پلاسمید *pGKKM.E*) به سلولهای مستعد باکتری *E. coli* سویه *DH5α* منتقل شدند. باکتریها بر روی محیط کشت - LB آگار حاوی X-gal/IPTG و آمپی سیلین $100 \mu\text{g/ml}$ رشد داده شدند. برای اطمینان از ورود قطعه مورد نظر به پلاسمید آزمونهای PCR و هضم آنزیمی با استفاده از آنزیمهای *Mlu* NI و *Sac* I انجام شد. همچنین برای تأیید صحت توالی ژن کایمیریک و وجود جهش در ناحیه زانوی هسته دوست، پلاسمید نوترکیب *pGKKM.E* توالی یابی شد.

کلونینگ ژن لیپاز کایمیریک در وکتور بیانی: از پلاسمید *pET-26b(+)* برای بیان لیپاز کایمیریک استفاده شد. برای این کار ابتدا پلاسمید *pGKKM.E* با آنزیمهای *Mlu* NI و *Sac* I برش داده شد و ژن لیپاز کایمیریک از ژل آگارز استخراج گردید. همچنین پلاسمید *pET-26b(+)* نیز با آنزیمهای فوق برش داده شد، سپس ژن لیپاز کایمیریک با استفاده از آنزیم لیگاز در وکتور بیانی *pET-26b(+)* همسانه سازی شد و پلاسمید جدید *pTKKM.E* نامگذاری شد. پلاسمیدهای *pTKKM.E* به باکتریهای مستعد *E. coli* سویه *DH5α* ترانسفورم شدند و روی محیط کشت - LB آگار حاوی کانامایسین ($30 \mu\text{g/ml}$) رشد داده شدند و مدت ۱۶ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس از کلنیهای تشکیل شده پلاسمید استخراج گردید و صحت کلونینگ با PCR و هضم آنزیمی با

ارزش بیوتکنولوژی محسوب می شوند. این گروه از آنزیمها با توجه به ویژگیهای آنزیمی خاص و اختصاصی بودن سویسترایشان برای کاربردهای صنعتی مختلف بسیار مناسب هستند (۸ و ۱۱).

لیپازها در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی، شوینده ها، تولیدات دارویی، چرم، پارچه، لوازم آرایشی، و کاغذ کاربرد دارند (۱۷، ۱۲ و ۱۳). اشریشیاکلی یکی از معروفترین میزبانها در تولید پروتئینها نوترکیب است زیرا ویژگیهای ژنتیکی آن بخوبی شناخته شده است. همچنین اشریشیاکلی به واسطه سهولت ترانسفورماسیون و توانایی تولید فراوان پروتئین و رشد خیلی سریع در مقایسه با سلولهای پستانداران گزینه مناسبی برای تولید پروتئینهای نوترکیب محسوب می شود. بیان بالای ژنهای نوترکیب اغلب منجر به شکل گیری پروتئینهای غیرفعال (اینکلوژن بادی) می شود که در این صورت پروتئینهای کایمیریک فعال توسط فرآیندهای دناتوراسیون و به دنبالش بازآرایی مجدد ساختمان (Refolding) به دست می آید (۴).

با توجه به کاربرد صنعتی و ارزش اقتصادی آنزیمها، کلونینگ، بیان و تغییر خصوصیات آنها با هدف افزایش میزان تولید ضروری است لذا، هدف از این تحقیق، کلونینگ و بیان ژن لیپاز کایمیریک باسیلوس ترموکاتنولانوس در باکتری *E. coli* و تعیین خصوصیات آن می باشد.

مواد و روشها

کلونینگ ژن لیپاز کایمیریک در وکتور کلونینگ: پلاسمید *pKYM.E* نوترکیب حاوی ژن لیپاز کایمیریک (این پلاسمید حاوی ژن لیپاز کایمیریک باسیلوس ترموکاتنولانوس می باشد که قبلاً توسط حسینی و همکارانش در مخمر تهیه شده بود) (۱۲)، به عنوان DNA الگو برای تکثیر ژن لیپاز کایمیریک استفاده گردید. سپس ژن لیپاز کایمیریک با آغازگرهای رفت و برگشت ذیل تکثیر شد:

خالص سازی و تعیین خصوصیات پروتئین کایمیریک: اساس کروماتوگرافی تعویض یونی، تفاوت چشمگیر در علامت و بزرگی شارژ الکتریکی مولکولها در pH فرضی می باشد. ستون آن از یک پلیمر سنتتیک شامل گروههای باردار تشکیل شده است. خالص سازی پروتئین کایمیریک از طریق کروماتوگرافی تعویض یونی با رزین تعویض یونی (DE52 واتمن) در pH 6.8 انجام شد. سپس خصوصیات لیپاز در شرایط متفاوت دمایی و pH های مختلف و نیز در حضور حلالهای آلی، دترجتها و یونهای فلزی در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد و (pH 8.5) بررسی شد، و تمام داده‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS تجزیه و تحلیل گردید.

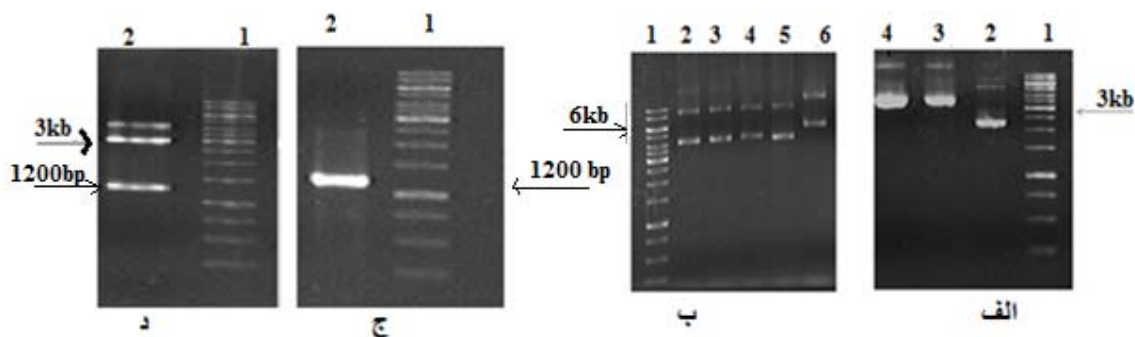
نتایج و بحث

همسانه سازی لیپاز کایمیریک در وکتورهای کلونینگ ویبانی: ژن لیپاز کایمیریک توسط PCR تکثیر گردید و در پلاسمید *pGEM-5zf* همسانه سازی شد (شکل ۱، الف). بعد از تأیید همسانه سازی از طریق آزمونهای PCR (شکل ۱، ج)، هضم آنزیمی (شکل ۱، د) و توالی یابی. ژن کایمیریک در پلاسمید نوترکیب *pGKKM.E* با آنزیمهای محدود اثر *Mlu NI* و *Sac I* برش داده شد، سپس ژن کایمیریک در وکتور ویبانی برش داده شده با همین آنزیمها قرار داده شد (پلاسمید نوترکیب *pTKKM.E*). (شکل ۱، ب).

آنزیمهای *Mlu NI* و *Sac I* انجام شد. پس از تأیید کلونینگ پلاسمید نوترکیب *pTKKM.E* به باکتری مستعد *E. coli* سویه pLys S ترانسفورم شد.

بیان لیپاز کایمیریک در *E. coli*: باکتری *E. coli* سویه PlyS S حاوی پلاسمید کایمیریک *pTKKM.E* در محیط کشت LB مایع (کانامایسین $30 \mu\text{g/ml}$) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۲۰۰ rpm به مدت ۱۶ ساعت کشت داده شد. سپس باکتریها به محیط کشت جدید LB مایع تا غلظت ۵ درصد تلقیح شدند. بعد از رسیدن دانسیته نوری (OD_{600}) محیط کشت به حدود ۰/۴، محیط کشت تا غلظت نهایی ۰/۵ میلی مولار IPTG القاء شد و تمام شب در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی گراد با دور ۱۵۰ rpm قرار داده شد. سپس سلولها با دور ۷۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده و مایع رویی و رسوب آن با SDS-PAGE و تست پارانیتر و فنیل پالمیتات (PNPP) برای تأیید بیان لیپاز کایمیریک مورد بررسی قرار گرفتند (۹).

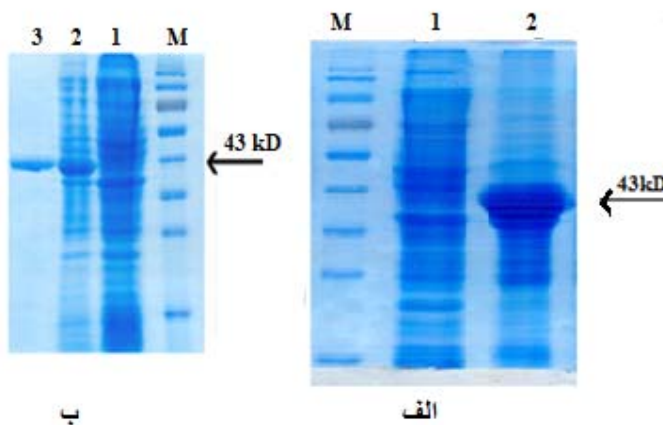
محلول سازی اینکلوژن بادی و بازآرایی ساختمان: با استفاده از روش کلارک و همکارانش (با تغییرات جزئی) محلول سازی پروتئینهای نامحلول (اینکلوژن بادیها) و بازآرایی ساختمان آنها انجام شد (۶). برای این کار ابتدا لیپاز کایمیریک نامحلول در اوره ۸ مولار و بافر فسفات حل شد و سپس ساختمان آنها در بافر ریفولدینگ (تریس ۱۰۰ میلی مولار، نمک طعام ۱۰۰ میلی مولار، گلیسین ۱۰۰ میلی مولار، گلیسرول ۵ درصد، دی تیو تریتول ۵ میلی مولار) بازآرایی گردید.



شکل ۱- الف: ستون ۱- مارکر وزن مولکولی DNA (1 kb). ستون ۲- کنترل منفی پلاسمید (pGEM-5zf). ستون ۳ و ۴- پلاسمیدهای نوترکیب pGKKM.E: ستون ۱- مارکر وزن مولکولی DNA (1 kb). ستون ۲- کنترل منفی پلاسمید (+) pET-26b ستون ۳، ۴ و ۵- پلاسمیدهای استخراج شده بدون قطعه (+) pET-26b ستون ۶- پلاسمید نوترکیب pTKKM.E ج: الکتروفورز محصول PCR تأیید صحت کلونینگ: ستون ۱- مارکر وزن مولکولی DNA (1 kb). ستون ۲- محصول PCR کلنی نوترکیب pGKKM.E: الکتروفورز محصول برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pGKKM.E: ستون ۱- مارکر وزن مولکولی DNA (1 kb). ستون ۲- پلاسمید برش خورده با آنزیمهای *Mlu* NI و *Sac* I

حجم بیان در رسوب و به صورت اینکلوژن بادی دیده شد. محلول سازی اینکلوژن بادیها و بازآرایی ساختمان آنها انجام شد (شکل ۲، الف). خالص سازی پروتئین کایمیریک با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی با رزین (DE52 واتمن) انجام شد (شکل ۲، ب).

بیان و خالص سازی لیپاز کایمیریک: برای بیان پروتئین کایمیریک از حامل بیانی pET-26b استفاده شد. پلاسمید نوترکیب pTKKM.E به باکتریهای مستعد *E. coli* سویه pLysS ترانسفورم گردید، سپس بیان پروتئین کایمیریک با استفاده از SDS-PAGE بررسی شد. از آنجایی که بیشترین



شکل ۲- الف: مطالعه بیان لیپاز کایمیریک با استفاده از ژل SDS-PAGE. ستون M- مارکر وزن مولکولی پروتئین. ستون ۱- کنترل منفی (پروتئین تام باکتری). ستون ۲- پروتئینهای نامحلول موجود در رسوب شوک اسمزی بعد از القاء با IPTG. ب: ستون M- مارکر وزن مولکولی پروتئین. ستون ۱- کنترل منفی (پروتئین تام باکتری). ستون ۲- پروتئینهای نامحلول موجود در رسوب شوک اسمزی باکتری. ستون ۳- لیپاز کایمیریک بعد از تخلیص.

۸، ۵ دمای درجه سانتی گراد اندازه‌گیری شد. لیپاز *B. thermocatenulatus* بیشتر پیوند استری بین ناحیه ۱ و ۳ تری گلیسرید را هیدرولیز می‌کند. نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم کایمیریک همانند آنزیم طبیعی در حضور سوبسترای ۴ کربنه (تری بوتیرین) است که توسط سایر محققین نظیر Haki و Rakshit (۲۰۰۳) نیز گزارش شده است (شکل ۳، الف) (۱۴). در فعالیت کاتالیزی لیپازها علاوه بر جایگاه فعال آنزیم بخشی به نام درپوش، که در اکثر لیپازها وجود دارد، نیز مؤثر است و در دسترسی سوبسترا به جایگاه فعال نقش دارد. بخش دیگر که در فعالیت کاتالیزی لیپازها نقش دارد حفره آکسی‌آنیون است

بررسی خصوصیات لیپاز کایمیریک: اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی لیپاز کایمیریک از طریق دستگاه pH-stat (ساخت شرکت متروم) و با سه بار تکرار انجام شد. در مرحله بعد تمام داده‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS در سطح معنی داری ۵ درصد تجزیه و تحلیل گردید. سپس نمودار میانگین فعالیت لیپاز کایمیریک در شرایط مختلف با نرم‌افزار Excel 2013 تهیه گردید.

مطالعه بررسی ویژگی سوبسترای: ویژگی سوبسترای لیپاز کایمیریک در حضور سوبستراهای تری‌آسیل گلیسرولی با زنجیره هیدروکربنی ۴ تا ۱۸ کربنه در pH

بررسی پایداری حرارتی لیپاز کایمیریک: به منظور بررسی پایداری حرارتی، لیپاز کایمیریک به مدت ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس فعالیت باقیمانده لیپازها در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد در حضور سوبسترای ۸ کربنه در pH 9.0 اندازه‌گیری شد. در بررسی پایداری حرارتی مشخص شد که با افزایش زمان انکوباسیون، فعالیت آنزیم کایمیریک کاهش یافت و بعد از گذشت یک ساعت از زمان انکوباسیون آنزیم هنوز بیش از ۵۰ درصد فعالیت خود را حفظ کرده است.

این میزان پایداری احتمالاً ناشی از افزایش پایداری آنزیم بر اثر جهش‌های اعمال شده به دلیل اندرکنش بهتر اسیدآمینه‌های ناحیه زانوی هسته دوست با سایر اسیدآمینه‌ها است (شکل ۳، د).

بررسی اثر یونهای فلزی بر فعالیت لیپاز کایمیریک: فعالیت باقیمانده لیپاز کایمیریک پس از یک ساعت قرار گرفتن در مجاورت غلظت یک میلی‌مولار یونهای فلزی در pH 9.0، دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد (شکل ۳، ح). معمولاً یونهای فلزی فعالیت کاتالیزی آنزیمها را تغییر می‌دهند. بسیاری از آنزیمها برای حفظ ساختمان فعال خود به یونهای فلزی نیاز دارند. به طور کلی فعالیت لیپاز در حضور یونهای فلزات سنگین مثل Hg^{2+} ، Ni^{2+} و Sn^{2+} به میزان قابل توجهی مهار می‌شود در حالی که یونهای فلزی مثل Mg^{2+} و Zn^{2+} اثر بازدارندگی کمی نشان می‌دهند (۱۸). کارخانه و همکارانش نیز کاهش فعالیت لیپاز BTL2 در حضور یون کلسیم و افزایش فعالیت آنزیمی در حضور یونهای Na^{+} و K^{+} را گزارش کردند (۱۹).

نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که کاهش فعالیت آنزیم لیپاز کایمیریک در حضور Fe^{3+} و K^{+} نسبت به یونهای Mg^{2+} و Ca^{2+} بسیار ملموس است. همچنین آنزیم در حضور EDTA حدود ۶۰ درصد فعالیت خود را حفظ کرده است. بیشتر لیپازها با یونهای فلزی مهار می‌شوند همچنین EDTA اثر مهار کننده بر روی لیپاز دارد و یونهای Ca^{2+}

که در پایدار کردن حدواسطهایی که در طی واکنش کاتالیز تشکیل می‌گردند، نقش بسار مهمی دارد (۱۰).

مطالعه اثر pH بر فعالیت لیپاز کایمیریک: تأثیر pH های ۸، ۸.۵، ۹ و ۹.۵ بر فعالیت آنزیم لیپاز کایمیریک در حضور سوبسترای تری‌آسیل گلیسرولی با زنجیره هیدروکربنی ۸ کربنه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد با افزایش pH به سمت pH های قلیایی فعالیت آنزیم نیز افزایش یافت و در pH 9.5 بیشترین فعالیت را از خود نشان می‌دهد (شکل ۳، ب).

داشتن فعالیت و پایداری بهینه در pH های قلیایی از ویژگیهای مهم لیپازهای است که به عنوان افزودنی و کاتالیز شوینده‌ها استفاده می‌شوند. تغییرات pH می‌تواند بر ساختار، عملکرد، پایداری و حلالیت آنزیمها اثر بگذارد. عموماً لیپازها و دیگر آنزیمهای مورد استفاده در فرمولاسیون شوینده‌ها باید به شرایط قلیایی مقاوم باشند به دلیل آنکه معمولاً pH شوینده‌های ماشین لباسشویی در محدوده ۹-۱۱ است (۱).

مطالعه اثر دما بر فعالیت لیپاز کایمیریک: تأثیر دماهای ۴۵ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد بر فعالیت آنزیمی لیپاز کایمیریک در حضور سوبسترای تری‌آسیل گلیسرولی با زنجیره هیدروکربنی ۸ کربنه در pH 9.0 اندازه‌گیری شد. با افزایش دما از ۴۰ به ۶۰ درجه فعالیت لیپاز کایمیریک افزایش و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیم کاهش یافت، افزایش فعالیت در دمای ۶۰ درجه بسیار ملموس بوده، که احتمالاً در نتیجه جهش، تشکیل حفره اکسی‌آنیون تسهیل شده و همین امر سبب افزایش فعال آنزیم شده است. (شکل ۳، ج).

به طور کلی دمای بهینه برای یک آنزیم ثابت نیست و می‌تواند طبق خلوص و سوبسترا، حضور مهارکننده و روش مورد استفاده برای تحلیل متفاوت باشد (۲۳).

حضور سوبسترای ۸ کربنه کربنه در pH 9.0، دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. دترجنتها نیز بر فعالیت لیپازها موثر بوده و قادر به افزایش یا کاهش فعالیت لیپاز هستند. در این پژوهش دترجنت‌های ۱۰۰-X، توین ۲۰، و توین ۴۰ (برای توین ۸۰ افزایش فعالیت معنی‌دار نبود) فعالیت لیپاز کایمیریک را افزایش در حالی که SDS فعالیت آنزیم کایمیریک کاهش داد (شکل ۳، ر).

افزایش فعالیت لیپاز کایمیریک در حضور ترایتون X-۱۰۰ را می‌توان به نقشی که این دترجنت در باز شدن تجمعات لیپاز دارد مرتبط دانست. زیرا لیپاز باسیلوس ترموکاتنولاتوس تمایل زیادی برای تشکیل توده‌های بزرگ دارای فعالیت آنزیمی دارد (۱۶). توین‌ها نیز حلالیت سوبسترا را افزایش داده و از این طریق سبب افزایش فعالیت آنزیم می‌شوند و نیز کاهش فعالیت در حضور SDS احتمالاً ناشی از اثر نامطلوب این دترجنت بر ساختمان دوم و سوم پروتئین می‌باشد (۱۵).

تمایل لیپاز برای تشکیل توده‌های بزرگ ناشی از اندرکنش بین مولکولی نواحی آب‌گریز لیپاز است. تشکیل این توده‌ها سبب کاهش فعالیت آنزیمی لیپاز می‌گردد. به طور کلی جهش‌های ایجاد شده احتمالاً از طریق تسهیل استقرار سوبسترا در جایگاه فعال، تسهیل تشکیل حفره اکسی‌انیون همچنین افزایش میزان اتصالات بین آنزیم و سوبسترا باعث افزایش فعالیت لیپاز در حضور سوبستراهای مختلف، و افزایش پایداری آنزیم در مقابل عوامل مختلف (دترجنتها، حلالهای آلی، یونهای فلزی)، دما و pH های مختلف شده است.

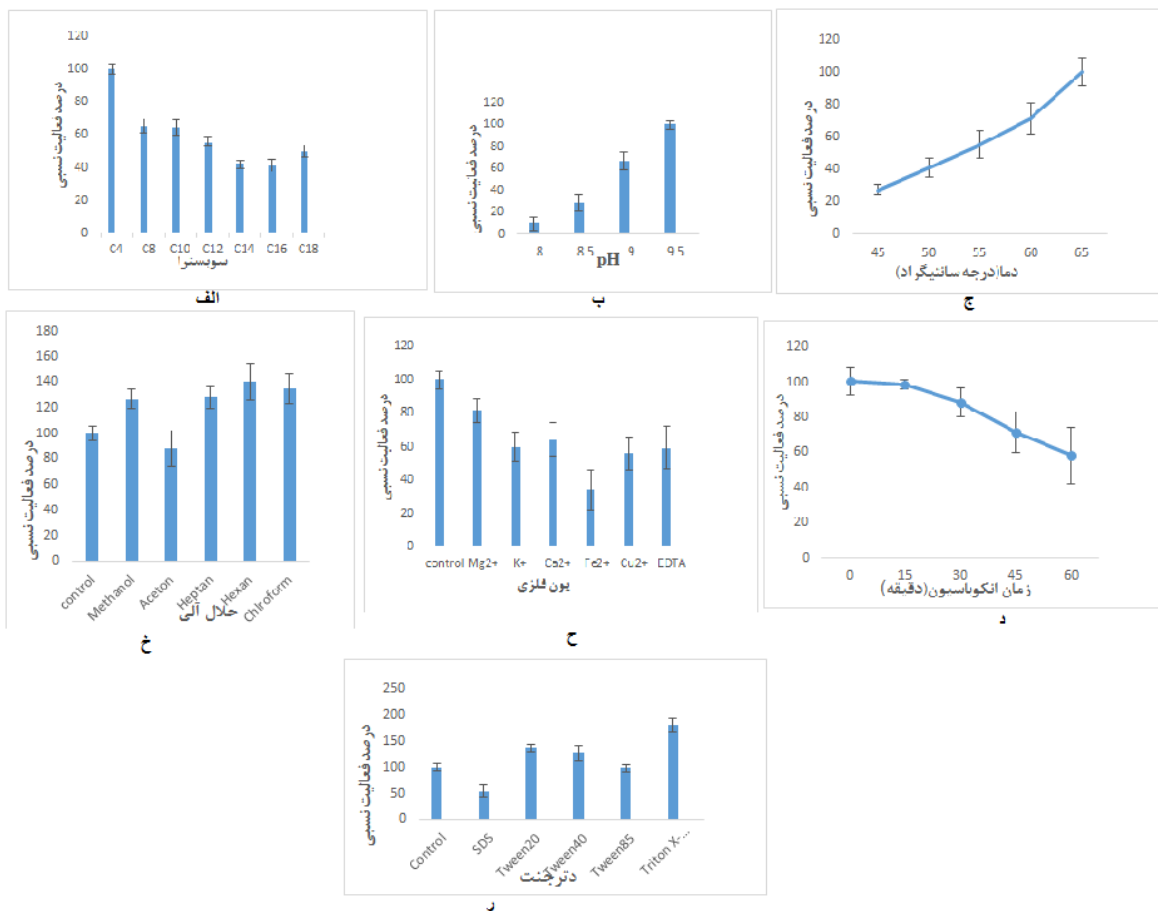
ضمناً تمام نتایج با نرم‌افزار آماری MSTATC بررسی شد. نتایج آماری اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد ($P < 0.01$) را تأیید کرد.

می‌تواند غیر فعال شدن لیپاز با EDTA را مهار کنند (۲۰). به طور کلی یونهای فلزی و نمکها اهمیت ویژه‌ای در پایداری دمایی آنزیم دارند. این یونها به جایگاه‌های اتصال خاصی روی سطح مولکول متصل شده و نقش ساختاری دارند.

بررسی اثر حلالهای آلی بر فعالیت لیپاز کایمیریک: لیپاز کایمیریک به مدت یک ساعت در مجاورت محلولهای ۳۰ درصد استون، N-هگزان، N-هپتان، متانول و کلروفرم قرار داده شد. سپس فعالیت باقیمانده لیپاز در حضور سوبسترای ۸ کربنه در pH 9.0، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد (شکل ۳، خ). از عوامل مؤثر بر فعالیت لیپازها حلالهای آلی هستند. افزایش فعالیت لیپاز در محیط حلال آلی نسبت به محیط آبی به علت تشکیل فرم باز یا فعال آنزیم است که سبب به دام افتادن سوبسترا در جایگاه فعال آنزیم می‌گردد (۲۲).

Quyen گزارش کرد که متانول و ۲- پروپانول به طور جزئی و استون به میزان بیشتری فعالیت لیپاز باسلوس ترموکاتنولاتوس را کاهش می‌دهد (۲۲). همچنین Luisa و همکارانش گزارش کردند که افزایش متانول و استون با غلظت ۳۰ درصد به لیپاز BTL2 باعث کاهش جزئی فعالیت آنزیم شده است اما چنانچه زمان انکوباسیون به بیش از یک ساعت افزایش یابد میزان این کاهش قابل توجه خواهد بود (۲۱). در این تحقیق نیز نتایج نشان داد که همه حلالهای آلی، N-هگزان، N-هپتان، متانول و کلروفرم به استثنای استون سبب افزایش فعالیت آنزیمی، لیپاز کایمیریک شدند.

بررسی اثر دترجنتها بر فعالیت لیپاز کایمیریک: لیپاز کایمیریک به مدت یک ساعت در مجاورت غلظت یک درصد دترجنت‌های توین ۲۰، توین ۴۰، توین ۸۰ و SDS و ترایتون X-۱۰۰ قرار داده شد. سپس فعالیت لیپاز در



شکل ۳- الف: میانگین فعالیت لیپاز کایمریک در حضور سوبستراهای مختلف. ب: میانگین فعالیت آنزیم لیپاز کایمریک در pH های مختلف. ج: میانگین فعالیت لیپاز کایمریک در دماهای مختلف. د: میانگین فعالیت لیپازهای نوترکیب کایمریک در حضور حلالهای مختلف. ه: میانگین فعالیت لیپاز کایمریک در حضور یونهای فلزی مختلف. ز: میانگین فعالیت لیپاز کایمریک در مدت زمانهای مختلف. ح: میانگین فعالیت لیپاز کایمریک در حضور دترجنتهای مختلف. ضمناً فعالیتهای آنزیمی با دستگاه PH-Stat در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد و pH برابر با ۹ اندازه گیری شد و نتایج آماری اختلاف معنی دار در سطح یک درصد را تأیید کرد.

کاندید مناسب برای استفاده در صنایع شوینده و حتی صنایع چرم می باشد.

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و پایداری این آنزیم در حضور عوامل مختلف نظیر pH، حلال آلی، دترجنت و یونهای فلزی و همچنین تحمل دمای مناسب، این آنزیم

منابع

1. Annamalai, N., Elayaraja, S., Vijayalakshmi, S. and Balasubramanian, T. (2011). Thermostable, alkaline tolerant lipase from *Bacillus licheniformis* using peanut oil cake as a substrate. *AJF Biochemistry Research* Vol. 5(6), pp. 176-181.
2. Bornscheuer, U.T. et al., (2002). Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotechnology*, 20(10), pp.433-437.
3. Carrasco-Lopez, C. et al., (2008). Activation of Bacterial Thermoalkalophilic Lipases Is Spurred by Dramatic Structural Rearrangements. *Journal of Biological Chemistry*. 284 (7), pp. 4365-4372.
4. Choi, J.H. and Lee, S.Y. (2004). "Secretory and extracellular production of recombinant proteins

- using *Escherichia coli*", Appl. Microbiol. Biotechnol., 64 : 625-635.
5. Demiorijan, D.C., F. Moris-Varas and C.S. Cassidy. (2001). Enzymes from extremophiles. Curr. Opin. Chem. Biol., 5: 144-151.
 6. De Bernardes Clark E. Refolding of recombinant proteins. Curr Opin Biotechnol. (1998);9:157-163. doi: 10.1016/S0958-1669(98)80109-2.
 7. Emmanuel Leveque, a,b., Stefan Janecek, c., Bernard Haye, a., Abdel Belarbi, b. (2000). Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. Review Enzyme and Microbial Technology 26 (3-14).
 8. Gandhi, N.N. (1997). Applications of lipase. Journal of the American Oil Chemists' Society, 74(6), pp.621-634.
 9. Gupta N, Rathi P, Gupta R. (2002). Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. Anal Biochem. 1;311(1):98-9.
 10. Gupta, R., Gupta, N. & Rathi, P., (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. Applied Microbiology and Biotechnology, 64, pp.763-781.
 11. Houde, A., Kademi, A., and Leblanc, D. (2004). Lipases and their industrial applications. Applied biochemistry and biotechnology. 118(1), pp.155-170.
 12. Hosseini, M., Karkhane, A.A., Yakhchali, B., Shamsara, M., Aminzadeh, S., Morshedi, D., Haghbeen, K., Torktaz, I., Karimi, E., Safari, Z. (2013). In silico and experimental characterization of chimeric *Bacillus thermocatenulatus* lipase with the complete conserved pentapeptide of *Candida rugosa* lipase. Appl Biochem. Biotechnol. 9(3):773-85.
 13. Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. Enzyme Microbial Technol. 39: 235-251.
 14. Haki, G.D., Rakshit, S.K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresour Technol. (1):17-34.
 15. Hernández-Rodríguez, B. *et al.*, 2009. Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 61(3-4), pp.136-142.
 16. Hermoso, J., Pignol, D., Kerfelec, B., Crenon, I., Chapus, C., Fontecilla-Camps, J.C. 1996. Lipase activation by nonionic detergents. The crystal structure of the porcine lipase-colipase-tetraethylene glycol mono-octyl ether complex. J Biol Chem. 26;271(30):18007-16.
 17. Ito, S., Kobayashi, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai S., Hatada, Y. (1998). Alkaline detergent enzymes from Alkaliphiles: Enzymatic Properties, Genetics and Structures. Extremophiles. 2: 185 -190.
 18. Jack Brown, W., Belmonte, A.A. & Melius, P., (1977). Effects of divalent cations and sodium taurocholate on pancreatic lipase activity with gum arabic-emulsified tributyrin glycerol substrates. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, 486(2), pp.313-321.
 19. Karkhane, A.A., Yakhchali, B., Rastgar Jazii, F., Bambai, B. (2009). The effect of substitution of Phe181 and Phe182 with Ala on activity, substrate specificity and stabilization of substrate at the active site of *Bacillus thermocatenulatus* lipase. J Mol Cat B: Enzym. 61:162-167.
 20. Kim, H.K. *et al.*, 1998. Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 62(1), pp.66-71.
 21. Luisa Rúa, M. *et al.*, 1997. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*: Large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. Journal of biotechnology, 56(2), pp.89-102.
 22. Quyen, D.T., Schmidt-Dannert, C. & Schmid, R. D. (2003). High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase. Protein Expression and Purification, 28(1), pp.102-110.
 23. Rashid, N., Shimada, Y., Ezaki, S., Atomi, H., Imanaka, T. (2001). Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. Appl Environ Microbiol. 67(9):4064-9.
 24. Schmidt-Dannert, C., Rúa, M.L. and Schmid, R D. (1997a). Two novel lipases from thermophile *Bacillus thermocatenulatus*: screening, purification, cloning, overexpression, and

- properties. *Methods in Enzymology*, 284, pp.194-220.
25. Schmidt-Dannert, Claudia, Luisa Rúa, M. and Schmid, Rolf D. (1997). [11] Two novel lipases from thermophile *Bacillus thermocatenulatus*: Screening, purification, cloning, overexpression, and properties. In *Lipases, Part A: Biotechnology*. Academic Press, pp. 194-220.

Cloning, expression and characterization of chimeric *Bacillus Thermocatenulatus* Lipase in *E. coli*.

Khaleghinejad S.H¹, Karkhane A.A*,², Motalleb G.R¹, Aminzadeh S², and Yakhchali B²

¹University of Zabol, Faculty of Science, Department of Biology.

²Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB).

Abstract

Bacterial lipases are members of α/β hydrolase family that hydrolyzed triacylglycerol at the water- lipid interface. *Bacillus thermocatenulatus* lipase 2 (BTL2) is a thermoalkalophilic lipase that shows optimal activity at 60–75 °C and pH 8–10. BTL2 is an important research target because of its potential industrial applications. At the present study chimeric *Bacillus thermocatenulatus* lipase contain the consensus sequence of *Candida rugosa* lipase (207Gly-Glu-Ser-Ala-Gly211) at the nucleophilic elbow region was cloned and expressed in *E. coli* as secretion protein. Finally, Catalytic activity of chimeric lipases was evaluated at presence of various triglycerides as substrates and the effects of different parameters such as temperature, pH, detergents, organic solvents and metal ions were evaluated on chimeric enzyme activity using a pH-stat assay. The results showed that the chimeric enzyme is most active to C4 substrate, (pH 9.0) and 60 °C. As well as enzyme activity has increased in the presence of organic solvents, N-Hexane, N-heptane, methanol, chloroform and detergents such as Triton X - 100, Tween 20, Tween 40. Also, metal ions, respectively decreased general effect on the enzyme activity in chimeric lipase.

Key words: *E. coli*, BTL2, chimeric lipase, cloning