کلونینگ، بیان و تعیین خصوصیات لیپاز کایمریک 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 زیست شناسی**

[۲] **تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری**

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

چکیده

لیپازهای باکتریایی عضوی از خانواده α/β هیدرولازها هستند که تری آسیل گلیسرول ها را در فاز بین آب – چربی هیدرولیز می کنند. لیپاز باکتری باسیلوس ترموکاتنولاتوس (BTL2) در دمای ۷۵-۶۰ درجه سانتی گراد و pH برابر ۸ تا ۱۰ فعالیت دارد و مناسب استفاده در صنعت شوینده می باشد. در این پژوهش لیپاز باسیلوس ترموکاتنولاتوس کایمریک حاوی توالی توافق شده لیپاز قارچ کاندیداروگوزا (^{207}Gly-Glu-Ser-Ala-Gly^{211})در ناحیه زانوی هسته دوست، در باکتری *E. coli* کلون و بیان شد. سپس فعالیت آنزیمی لیپاز کایمریک 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 کایمریک بیشترین فعالیت را در حضور سوبسترای 4 کربنه، (pH 9.0) و دمای ۶۰ درجه سانتی گراد دارد. همچنین فعالیت آنزیم در حضور حلالهای آلی N– هگزان، N– هپتان، متانول و کلروفرم و دترجنتهای ترایتون X-۱۰۰ ، توین ۲۰، توین ۴۰ افزایش یافته است در حالی که یونهای فلزی عمدتاً اثر کاهشی بر فعالیت آنزیم کایمریک داشتند.

واژه های کلیدی: *E. coli* ، لیپاز کایمریک، BTL2

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

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

مقدمه

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 می کنند که ذاتاً دمای بالا را تحمل می کنند. ویژگیهای شیمیایی این آنزیمها به آنها اجازه فعالیت در دمای بالا وpH قلیایی را می دهد (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- چربی کاتالیز می کنند (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 پلی پپتیدی ۴۱۷ اسیدآمینه‌ای را رمز می‌کند که ۲۹ اسیدآمینه ابتدای توالی راهنمای آنزیم را تشکیل می‌دهد. لیپاز بالغ دارای ۳۸۸ اسیدآمینه بوده و وزن مولکولی آن حدود ۴۳-۳۹ کیلو دالتون گزارش شده است (۲۵).

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

ارزش بیوتکنولوژی محسوب می شوند. این گروه از آنزیمها با توجه به ویژگیهای آنزیمی خاص و اختصاصی بودن سوبسترایشان 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 کایمریک 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 کایمریک باسیلوس ترموکاتنولاتوس در باکتری *E. coli* و تعیین خصوصیات آن می باشد.

مواد و روشها

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

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

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

برای همسانه سازی ژن لیپاز کایمریک، پلاسمید *pGEM*-5zf با آنزیم*Eco* RV خطی شد، سپس ژن لیپاز کایمریک در پلاسمید خطی شده با آنزیم لیگاز قرار داده شد. پس از همسانه سازی پلاسمیدهای حامل ژن کایمریک لیپاز (پلاسمید *pGKKM*.E) به سلولهای مستعد باکتری *E. coli* سویه DH5α منتقل شدند. باکتریها بر روی محیط کشت – LBآگار حاویX-gal/IPTG و آمپی سیلین ۱۰۰µg/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 کایمریک و وجود جهش در ناحیه زانوی هسته دوست، پلاسمید نوترکیب *pGKKM*.E توالی یابی شد.

کلونینگ ژن لیپاز کایمریک در وکتور بیانی: از پلاسمید(+)*pET*-26b برای بیان لیپاز کایمریک استفاده شد. برای این کار ابتدا پلاسمید *pGKKM*.E با آنزیمهای *Mlu* NI و *Sac* I برش داده شد و ژن لیپاز کایمریک از ژل آگارز استخراج گردید. همچنین پلاسمید (+)*pET*-26b نیز با آنزیمهای فوق برش داده شد، سپس ژن لیپاز کایمریک با استفاده از آنزیم لیگاز در وکتور بیانی (+)*pET*-26b همسانه سازی شد و پلاسمید جدید *pTKKM*.E نامگذاری شد. پلاسمید های *pTKKM*.E به باکتریهای مستعد *E. coli* سویه DH5α ترانسفورم شدند و روی محیط کشت – LBآگار حاوی کانامایسین (30 µg/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

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.

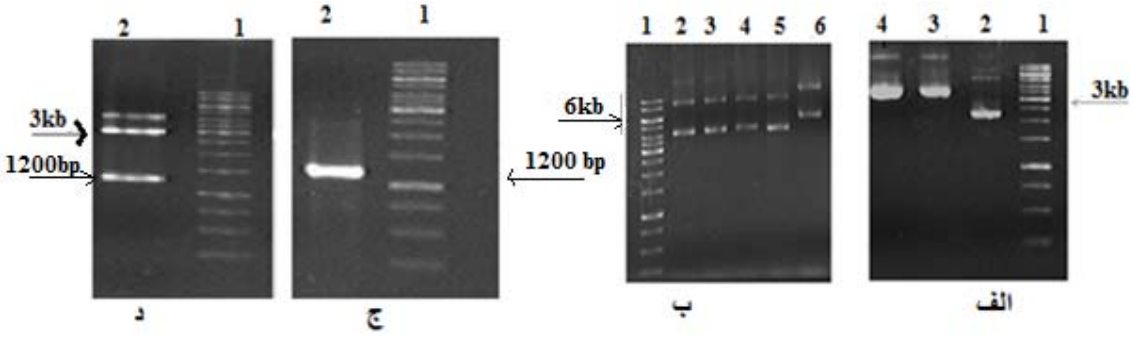
بیان لیپازکایمریک در *E. coli*: باکتری *E. coli* سویه Plys S حاوی پلاسمید کایمریک *pTKKM*.E در محیط کشت LB مایع (کانامایسین ۳۰ µg/ml)در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۲۰۰ rpm به مدت ۱۶ ساعت کشت داده شد. سپس باکتریها به محیط کشت جدید LB مایع تا غلظت ۵ درصد تلقیح شدند. بعد از رسیدن دانسیته نوری (OD_{600}) محیط 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 ۱۰دقیقه رسوب داده و مایع رویی و رسوب آن با SDS-PAGE و تست پارانیترو فنیل پالمیتات (PNPP) برای تأیید بیان لیپاز کایمریک 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 کایمریک 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.

خالص سازی و تعیین خصوصیات پروتئین کایمریک: 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 کایمریک از طریق کروماتوگرافی تعویض یونی با رزین تعویض یونی(DE52 واتمن)در pH6.8 انجام شد. سپس خصوصیات لیپاز در شرایط متفاوت دمایی وpH های مختلف و نیز در حضور حلالهای آلی، دترجنتها 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.

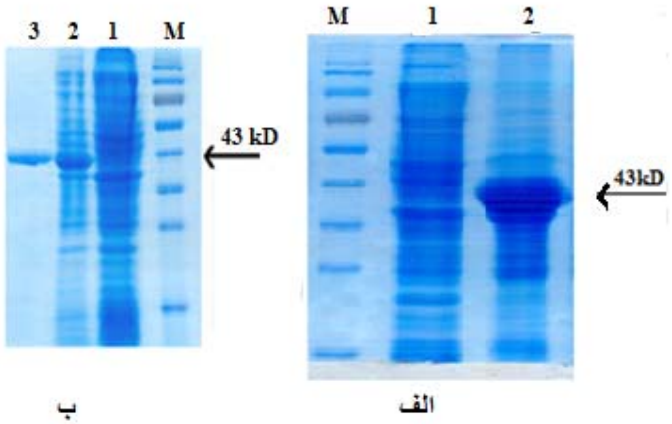
نتایج و بحث

همسانه سازی لیپاز کایمریک در وکتور های کلونینگ وبیانی: ژن لیپاز کایمریک توسط PCR تکثیر گردید و در پلاسمید *pGEM*-5zf همسانه سازی شد(شکل۱، الف). بعد از تأیید همسانه سازی از طریق آزمونهای PCR(شکل۱، ج)، هضم آنزیمی(شکل۱، د) و توالی یابی. ژن کایمریک در پلاسمید نوترکیب *pGKKM*.E با آنزیمهای محدود اثر *Mlu* NI و *Sac* I برش داده شد، سپس ژن کایمریک در وکتور بیانی برش داده شده با همین آنزیمها قرار داده شد (پلاسمید نوترکیب *pTKKM*.E).(شکل۱، ب).



شکل ۱- الف : ستون۱- مارکر وزن مولکولیDNA (1 kb). ستون۲- کنترل منفی پلاسمید(*pGEM*-5zf). ستون ۳و۴- پلاسمیدهای نوترکیب *pGKKM*.E ب: ستون ۱- مارکر وزن مولکولیDNA. ستون۲-کنترل منفی پلاسمید (+) *pET*-26b ستون ۳، ۴ و ۵- پلاسمید های استخراج شده بدون قطعه(+) *pET*-26b ستون۶- 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 د: 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.

بیان و خالص سازی لیپاز کایمریک: برای بیان پروتئن کایمریک از حامل بیانی *pET*-26b استفاده شد. پلاسمید نوترکیب *pTKKM*.E به باکتریهای مستعد *E. coli* سویه pLysS ترانسفورم گردید، سپس بیان پروتئین کایمریک با استفاده ازSDS-PAGE بررسی شد. از آنجایی که بیشترین 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 کایمریک با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی با رزین (DE52واتمن)انجام شد (شکل۲، ب).



شکل ۲- الف: مطالعه بیان لیپاز کایمریک با استفاده از ژل SDS-PAGE. ستونM- مارکر وزن مولکولی پروتئین. ستون 1- کنترل منفی(پروتئین تام باکتری). ستون 2- پروتئینهای نامحلول موجود در رسوب شوک اسمزی بعد از القاء با IPTG . ب: ستونM- مارکر وزن مولکولی پروتئین. ستون1- کنترل منفی(پروتئین تام باکتری). ستون 2- پروتئینهای نامحلول موجود در رسوب شوک اسمزی باکتری. ستون 3- لیپاز کایمریک بعد از تخلیص.

بررسی خصوصیات لیپاز کایمریک: اندازه گیری فعالیت آنزیمی لیپاز کایمریک از طریق دستگاهpH-ststat (ساخت شرکت متروم) و با سه بار تکرار انجام شد. درمرحله بعد تمام دادهها با نرمافزار آماری SPSS در سطح معنی داری ۵ درصد تجزیه و تحلیل گردید. سپس نمودار میانگین فعالیت لیپاز کایمریک در شرایط مختلف با نرمافزار Excel 2013 تهیه گردید.

مطالعه بررسی ویژگی سوبسترایی: ویژگی سوبسترایی لیپاز کایمریک در حضور سوبستراهای تریآسیل گلیسرولی با زنجیره هیدروکربنی ۴ تا ۱۸ کربنه در pH 8.5، دمای ۵۵ درجه سانتی گراد اندازهگیری شد. لیپاز *B. thermocatenulatus* بیشتر پیوند استری بین ناحیه ۱ و ۳ تری گلیسرید را هیدرولیز می کند. نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم کایمریک همانند آنزیم طبیعی در حضور سوبسترای ۴ کربنه (تری بوترین) 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

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

مطالعه اثر pH بر فعالیت لیپاز کایمریک: تأثیر pH های ۸، ۸.۵، ۹ و ۹.۵ بر فعالیت آنزیم لیپاز کایمریک در حضور سوبسترای تری‌آسیل گلیسرولی با زنجیره هیدروکربنی ۸ کربنه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد اندازه گیری 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 می دهد (شکل ۳، ب).

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

مطالعه اثر دما بر فعالیت لیپاز کایمریک: تأثیر دماهای ۴۵ تا ۶۵ درجه سانتی گراد بر فعالیت آنزیمی لیپاز کایمریک 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 کایمریک افزایش و در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد فعالیت آنزیم کاهش یافت، افزایش فعالیت در دمای ۶۰ درجه بسیار ملموس بوده، که احتمالاً در نتیجه جهش، تشکیل حفره اکسی آنیون 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 می تواند طبق خلوص و سوبسترا، حضور مهارکننده و روش مورد استفاده برای تحلیل متفاوت باشد(۲۳).

بررسی پایداری حرارتی لیپاز کایمریک: به منظور بررسی پایداری حرارتی، لیپاز کایمریک به مدت ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس فعالیت باقیمانده لیپازها در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد در حضور سوبسترای ۸ کربنه در pH 9.0 اندازه‌گیری شد. در بررسی پایداری حرارتی مشخص شد که با افزایش زمان انکوباسیون، فعالیت آنزیم کایمریک 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 کایمریک: فعالیت باقیمانده لیپاز کایمریک پس از یک ساعت قرار گرفتن در مجاورت غلظت یک میلی‌مولار یونهای فلزی در pH 9.0، دمای ۵۵ درجه سانتی گراد اندازه‌گیری شد(شکل ۳، ح). معمولاً یونهای فلزی فعالیت کاتالیزی آنزیمها را تغییر می دهند. 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 می شود در حالی که یونهای فلزی مثل Mg^{2+} وZn^{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 کایمریک درحضور Fe^{3+} وK^{+} نسبت به یونهایMg^{2+} وCa^{2+} بسیار ملموس است. همچنین آنزیم در حضور EDTA حدود ۶۰ درصد فعالیت خود را حفظ کرده است. بیشتر لیپاز ها با یونهای فلزی مهار می شوند همچنین EDTA اثر مهار کننده بر روی لیپاز دارد و یونهای Ca^{2+}

می تواند غیر فعال شدن لیپاز با EDTA را مهار کنند (۲۰). به طور کلی یونهای فلزی و نمکها اهمیت ویژه ای در پایداری دمایی آنزیم دارند. این یونها به جایگاه های اتصالی خاصی روی سطح مولکول متصل شده و نقش ساختاری دارند.

بررسی اثر حلالهای آلی بر فعالیت لیپاز کایمریک: لیپاز کایمریک 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 سانتی گراد 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 می گردد (۲۲).

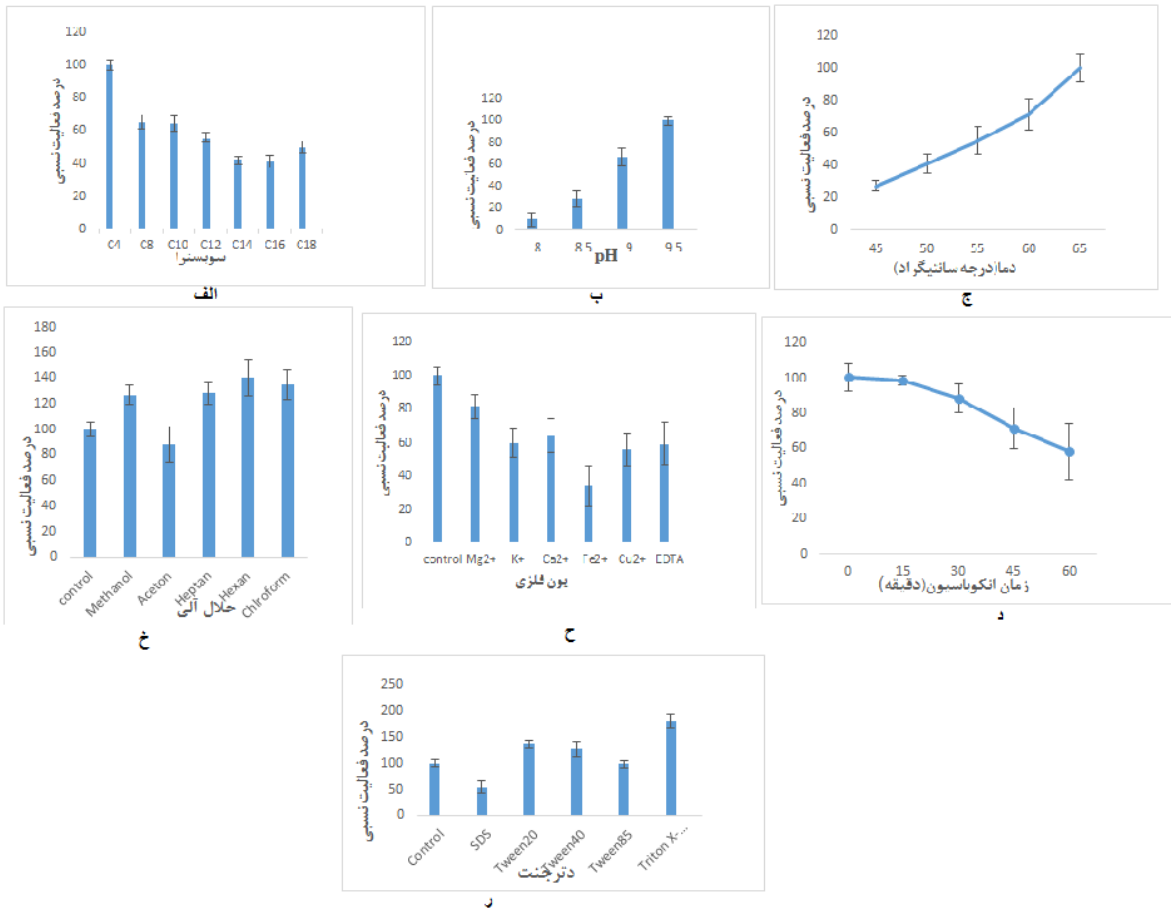
Quyen گزارش کرد که متانول و ۲- پروپانول به طور جزئی و استون به میزان بیشتری فعالیت لیپاز باسلوس ترموکاتنولاتوس را کاهش می دهد(۲۲). همچنین Luisa و همکارانش گزارش کردند که افزایش متانول و استون با غلظت ۳۰ درصد به لیپاز BTL2 باعث کاهش جزئی فعالیت آنزیم شده است اما چنانچه زمان انکوباسیون به بیش از یک ساعت 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 کایمریک شدند.

بررسی اثر دترجنتها بر فعالیت لیپاز کایمریک: لیپاز کایمریک به مدت یک ساعت در مجاورت غلظت یک درصد دترجنت‌های توین ۲۰، توین ۴۰، توین ۸۰، SDS و ترایتون X-۱۰۰ قرار داده شد. سپس فعالیت لیپاز در حضور سوبسترای ۸ کربنه در pH 9.0، دمای ۵۵ درجه سانتی گراد اندازه‌گیری شد. دترجنتها نیز بر فعالیت لیپازها موثر بوده و قادر به افزایش یا کاهش فعالیت لیپاز هستند. در این پژوهش دترجنت ترایتون X-۱۰۰، توین ۲۰، و توین ۴۰ (برای توین ۸۰ افزایش فعالیت معنی دار نبود) فعالیت لیپاز کایمریک را افزایش در حالی که SDS فعالیت آنزیم کایمریک کاهش داد(شکل ۳، ر).

افزایش فعالیت لیپاز کایمریک در حضور ترایتون X-۱۰۰ را می توان به نقشی که این دترجنت در باز شدن تجمعات لیپاز دارد مرتبط دانست. زیرا لیپاز باسیلوس ترموکاتنولاتوس تمایل زیادی برای تشکیل توده های بزرگ دارای فعالیت آنزیمی دارد(۱۶). توین ها نیز حلالیت سوبسترا را افزایش داده و از این طریق سبب افزایش فعالیت آنزیم می شوند و نیز کاهش فعالیت در حضور SDS احتمالاً ناشی از اثر نامطلوب این دترجنت بر ساختمان دوم و سوم پروتئین می باشد(۱۵).

تمایل لیپاز برای تشکیل توده‌های بزرگ ناشی از اندرکنش بین مولکولی نواحی آب گریز 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 اکسی انیون 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.

ضمنا تمام نتایج با نرم افزار آماری MSTATC بررسی شد. نتایج آماری اختلاف معنی دار در سطح یک درصد ($P<0.01$)را تأیید کرد.



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. ح: میانگین فعالیت لیپاز کایمریک در حضور یونهای فلزی مختلف. خ: میانگین فعالیت باقیمانده لیپاز کایمریک در مدت زمانهای مختلف. ر: میانگین فعالیت لیپاز کایمریک در حضور دترجنتهای مختلف. ضمناً فعالیتهای آنزیمی با دستگاه PH-Stat در دمای ۵۵ درجه سانتی گرادو pH برابر با ۹ اندازه گیری شد و نتایج آماری اختلاف معنی دار در سطح یک درصد را تأیید کرد.

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

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 Bernardez Clark E. Refolding of recombinant proteins. CurrOpinBiotechnol. (1998);9:157–163. doi: 10.1016/S0958-1669(98)80109-2.

7. Emmanuel Leveque, a,b.,StefanJanecek, c., BernardHaye, a., Abdel Belarbi, b.(2000). Thermophilicarchae alamylolytic 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-nitrophenylpalmitate 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). Insilico 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 monooctyl ether complex.J Biol Chem. 26;271(30):18007-16.

17. Ito, S., Kobayashi, T., Ara, K., Ozaki, K, Kawai S., Hatada, Y. (1998). Alkalindetergent enzymes from Alkalophiles: 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 tributyrylglycerol substrates.BiochimicaetBiophysicaActa (BBA) - Lipidsand 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 thermocatenulatuslipase. 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 Pichiapastoris 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.H[1], Karkhane A.A*,[2], Motalleb G.R[1],Aminzadeh S[2], and Yakhchali B[2]

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

[2]Department 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 ^{o}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 ^{o}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