

УДК 577.151

КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОЙ ЛАККАЗЫ ИЗ ПРИРОДНОГО ШТАММА *Bacillus subtilis* OH67¹

© 2020 г. О. Hajjipour^{a,*}, N. Mercan Dogan^a, S. Dincer^b, M. Norizadehazehkand^c^aDepartment of Biology, Faculty of Science and Arts, Pamukkale University, Denizli, 20160 Turkey^bDepartment of Biology, Faculty of Science, Çukurova University, Adana, 01330 Turkey^cDepartment of Pharmaceutical Biotechnology, ZBEU University, Zonguldak, 67600 Turkey

*e-mail: orkideh.hajjipoor88@yahoo.com

Поступила в редакцию 09.12.2019 г.

После доработки 12.02.2020 г.

Принята к публикации 12.02.2020 г.

Бактериальные лакказы сохраняют стабильность при высокой температуре и высоких значениях pH и имеют множество приложений в биотехнологии и промышленности. В этой статье описано клонирование, гетерологичная экспрессия и очистка лакказы из *Bacillus subtilis* AA. Молекулярная масса фермента, определенная при помощи электрофореза в SDS-ПАГ, составила 34 кДа. Активность рекомбинантного фермента подтверждена по способности окислять гваякол. Значения K_M и V_{max} фермента составили, соответственно, 1.1077 мМ и 19.3 мкмоль/мин/мг. Рекомбинантная лакказа эффективно обесцвечивала красители Turquoise blue HF6, Remazol red 106, Remazol brilliant orange 3R и Brilliant blue, то есть обладает свойствами, необходимыми для возможного применения в текстильной и природоохранной отраслях.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, лакказа, клонирование, экспрессия, ферментативная активность, обесцвечивание красителей

DOI: 10.31857/S0026898420040060

ВВЕДЕНИЕ

Лакказа – фермент, который содержит несколько атомов меди и катализирует окисление широкого спектра фенольных и нефенольных ароматических соединений, а также восстанавливает молекулярный кислород [1, 2]. Обычно число атомов меди в активном центре фермента равно четырем, они образуют по одному центру типа I (“голубая” медь) и типа II и два центра типа III [3]. Благодаря широкому спектру молекул, служащих субстратами лакказы, этот фермент уже широко применяется в промышленности и биотехнологии, например, при отбеливании бумаги и целлюлозы, в процессах биодegradации (биоремедиации), для обесцвечивания текстильных красителей и в качестве биосенсоров [4–7]. Кроме того, показано, что лакказа ингибирует пролиферацию клеточной линии гепатокарциномы HuH7 [8–11].

Лакказы широко распространены у грибов, растений и бактерий, включая *Anoxybacillus* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pantoea ananatis* и *B. subtilis* [12–14]. Грибные лакказы, которые чаще всего используют в промышленных процес-

сах, нестабильны при высоких температурах и в щелочных условиях, что ограничивает их практическое применение для очистки сточных вод [15]. Напротив, большинство бактериальных лакказ термически стабильны, в меньшей степени зависят от ионов металлов, менее восприимчивы к ингибирующим агентам и активны в нейтральных или щелочных условиях [16].

Термостабильные бактериальные лакказы CotA в изобии представлены во внешнем слое клеточной стенки *B. subtilis*, их присутствие необходимо для устойчивости спор к перекиси водорода и ультрафиолетовому излучению [17]. Кроме того, CotA участвует в метаболизме коричневого пигмента спор меланина [18]. Ранее показано, что бактериальные и грибные лакказы могут приводить к обесцвечиванию и деградации синтетических красителей [19, 20]. Так, бактериальная лакказа из морского микробного метабенома обесцвечивает два вида антрахинонов и четыре вида азокрасителей [21]. Похожим образом лакказы из *Collybia dryophila* и *Stropharia rugosoannulata*, как и почвенные изоляты, оказались способны обесцвечивать различные красители [22]. Споровая лакказа, которая эффективно обесцвечивает различные синтетические красители в нейтральных

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

или щелочных условиях, может быть применена в ряде промышленных отраслей.

В статье приведены методики клонирования гена лакказы *B. subtilis* в клетках *Escherichia coli* BL21DE3, экспрессии и очистки фермента для дальнейшей характеристики. Показано, что рекомбинантная лакказа обесцвечивает красители Turquoise blue HF6, Remazol red 106, Remazol brilliant orange 3R и Brilliant blue.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе использованы гваякол, синрингальдазин (SGZ) и катехол производства “Sigma Aldrich” (США); набор для выделения бактериальной ДНК, набор для выделения ДНК из геля, Taq ДНК-полимераза, вектор pETb22 и изопропил-β-D-тиогалактозид (IPTG) производства “Novagen” (США); ДНК-полимераза DreamTaq™ Hot Start производства “Thermo Fisher Scientific” (США). Красители Turquoise blue HF6, Remazol red 106, Remazol brilliant orange 3R и Brilliant blue были получены от компании “Dystar Textile Co.” (Турция).

Выделение и идентификация штамма-продуцента лакказы. Бактериальный штамм-продуцент лакказы был выделен из образцов почвы, взятых в Стамбуле (Турция). Для этой цели, природные бактериальные штаммы культивировали на LB-агаре, содержащем синрингальдазин или катехол. Развитие черного, коричневого или розового цвета считалось признаком положительной колонии [23, 24]. После биохимического и морфологического анализа штамм, который продуцировал высокие уровни лакказы, был идентифицирован секвенированием 16S рДНК в компании “Iontek” (Турция). Последовательность 16S рДНК анализировали в программах NCBI-Blast и clustal W, после чего строили филогенетическое дерево в программе Mega7. Кроме того, бактерии идентифицировали при помощи биохимических и морфологических тестов. В результате исследования выявлено, что бактериальные клетки имеют палочковидную форму, формируют споры, грамположительные, несут жгутик, положительные по каталазной реакции, оксидазной реакции, нитратредуктазной реакции, цитрату, инозитолу, крахмалу и негативные по индолу, метиловому красному и уреазе.

Клонирование, экспрессия и очистка лакказы. Последовательности прямого праймера 5'-АТАСАТ ССАТGGАТАСАТАТСАСССАТТСА GTCT-TACCA-3', содержащего последовательность сайта NcoI, и обратного праймера 5'-АТТТТА-AGСТТТСАGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCC TCCTCATTCGGATAAAGGAC-3', содержащего последовательности сайта рестрикции HindIII, His₆-tag и стоп-кодон, были подобраны с использованием программы Oligo 7. Фрагмент, кодиру-

ющий лакказу, амплифицировали с геномной ДНК с использованием ПЦР. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 0.125 мкл ДНК-полимеразы DreamTaq Hot Start, 2.5 мкл 10× ПЦР-буфера, 2 мкл смеси dNTPs (10 мМ), 5 мкл ДНК-матрицы (50 мкг/мл), 2 мкл прямого праймера (10 мкМ), 2 мкл обратного праймера (10 мкМ) и 11.375 мкл деионизированной воды. Условия реакции были следующими: начальная денатурация при 94°C в течение 5 мин, денатурация при 94°C 50 с, отжиг праймеров при 54°C 50 с, элонгация при 72°C 55 с и финальная достройка 72°C 5 мин. Продукты ПЦР и вектор pET22b обрабатывали ферментами рестрикции NcoI и HindIII и лигировали с использованием T4 ДНК-лигазы. Полученным рекомбинантным вектором pET-lac трансформировали компетентные клетки штамма *Escherichia coli* BL21DE3 при помощи теплового шока. Клоны, содержащие вектор pET-lac, отбирали на LB-агаре с ампициллином и методом ПЦР с колоний. Выбранные колонии переносили в жидкую среду LB с ампициллином и инкубировали при 37°C с покачиванием при 200 об./мин. Фазу роста культуры определяли путем измерения оптической плотности при 600 нм (OD₆₀₀). Когда значение OD₆₀₀ культуры достигало 2, в ростовую среду добавляли IPTG (0.1 мМ), чтобы индуцировать экспрессию лакказы. Бактериальную культуру инкубировали при 30°C с непрерывным покачиванием при 150 об./мин в течение 4 ч и затем при 25°C без покачивания в течение 16 ч. Клетки осаждали на 4000 об./мин в течение 15 мин, супернатант удаляли. Осадок клеток ресуспендировали в растворе, содержащем 50 мМ фосфата натрия (рН 8.0) и 0.3 М хлорида натрия. Клетки озвучивали при 10 кГц по 20 с с 30-секундными интервалами, центрифугировали при 15000 × g в течение 15 мин и отбирали супернатант для последующей очистки фермента. Очистку проводили с использованием HIS-Select® HF Nickel Affinity Gel [25]. Уровни экспрессии рекомбинантной лакказы оценивали электрофорезом в денатурирующем полиакриламидном геле (SDS-PAGE) [26]. Молекулярную массу полученного белка определяли по стандартным маркерам молекулярных масс.

Исследование ферментативной активности. Активность выделенной лакказы определяли с использованием гваякола (2 мМ) в качестве субстрата в присутствии 0.5 мМ CuSO₄ в 0.1 М буфере Tris-HCl (рН 7.50) при 37°C. Окисление гваякола детектировали спектрофотометрически по поглощению при 465 нм ($\epsilon = 21.600 \text{ M/cm}$). Единицу активности (U) определяли как количество фермента, окисляющего 1 мкмоль гваякола в 1 мл реакционной смеси за 1 мин, и рассчитывали по уравнению:

$$U = (\text{OD}_{465} \cdot V_{\text{as}} \cdot \text{DF} \times 10^3) / (\epsilon \cdot V_{\text{e}}),$$

где V_{as} – объем анализируемой смеси (0.2 мл), DF – коэффициент разведения, ϵ – молярный коэффициент экстинкции, l – длина пути (1 см), V_e – объем раствора фермента (0.02 мл).

Кроме того, мы исследовали зависимость ферментативной активности лакказы от концентрации субстрата (13.75, 27.5, 55, 110, 220, 440 и 880 мкМ). Константу Михаэлиса–Ментен (K_M) и максимальную скорость реакции (V_{max}) рассчитывали по графику в координатах Лайнуивера–Берка [27, 28].

Электрофорез в полиакриламидном геле и зимография рекомбинантной лакказы. Молекулярную массу выделенных белков определяли методом SDS-PAGE с 5%-ным концентрирующим гелем и 10%-ным разделяющим. После электрофореза гель окрашивали в Coomassie Brilliant Blue R-250 и отмывали смесью метанола, уксусной кислоты и воды. Зимографию проводили методом нативного электрофореза в полиакриламидном геле с окрашиванием в растворе 5 мМ гваякола в 10 мМ ацетате натрия (рН 5.6) при комнатной температуре [29].

Влияние рН на активность и стабильность рекомбинантной лакказы. Ферментативную активность лакказы определяли при различных значениях рН: в 0.1 М цитратном буфере (рН 3.4–5.4), 0.1 М фосфатном буфере (рН 5.8–8.0) и 0.1 М бикарбонат-карбонатном буфере (рН 8.4–10.7).

Влияние рН на стабильность рекомбинантной лакказы исследовали, инкубируя фермент в различных буферных растворах (рН 3.4–10.7) при комнатной температуре в течение 3 ч. Остаточную ферментативную активность измеряли при оптимальном значении рН при 37°C в течение 1 ч [30].

Влияние температуры на активность и стабильность рекомбинантной лакказы. Влияние температуры на активность рекомбинантной лакказы исследовали, измеряя активность фермента в диапазоне температур от 4 до 100°C. Для исследования термостабильности фермент инкубировали при различных температурах (4–100°C) в течение 1 ч. Остаточную ферментативную активность измеряли при оптимальной температуре в течение 1 ч.

Окисление текстильных красителей под действием рекомбинантной лакказы. Способность очищенной лакказы обесцвечивать красители оценивали с использованием четырех промышленных текстильных красителей, включая Turquoise blue HF6 ($\lambda_{max} = 613$ нм), Remazol red 106 ($\lambda_{max} = 590$ нм), Remazol brilliant orange 3R ($\lambda_{max} = 629$ нм) и Brilliant blue ($\lambda_{max} = 629$ нм). Активность лакказы по отношению к красителям определяли в 0.1 М цитрат-фосфатном буфере (рН 6.0) с добавлением красителя (25 м.д.) и $CuSO_4$ (0.1 мМ) и очищенной лакказы (100 ЕА). Смесь инкубировали в течение 6 ч при 50°C при перемешивании со скоростью 40 об./мин. Контролем служила смесь без лакка-

зы. Степень обесцвечивания для каждого красителя определяли спектрофотометрически при соответствующей оптической плотности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Выделение и идентификация штамма-продуцента лакказы

В результате микроскопического и биохимического анализов показано, что природный штамм, продуцирующий лакказу на высоком уровне, относится к виду *Bacillus subtilis*. Биоинформатический анализ выявил сходство последовательности гена 16S рНК изолированного штамма с геном *B. subtilis* на 98.88%. Как можно видеть на рис. 1, филогенетическое дерево, построенное в программе MEGA7, подтверждает результаты анализа. Последовательность гена 16S рНК выделенного штамма, *Bacillus subtilis* ОН67, зарегистрирована в базе данных NCBI под идентификационным номером MK659939.1.

Клонирование рекомбинантной лакказы из штамма B. subtilis ОН67

Ген лакказы был амплифицирован с ДНК выделенного штамма с использованием подобранных генспецифичных праймеров. Размер ПЦР-продукта составил около 850 п.н. Ген лакказы клонировали в экспрессионный вектор рЕТ22b в компетентных клетках *E. coli* штамма BL21(DE3). Клетки, содержащие вектор со вставкой гена лакказы, отбирали на среде с ампициллином при помощи ПЦР с колоний. После секвенирования новая последовательность гена, кодирующего лакказу, была загружена в базу данных NCBI под идентификационным номером MK685357 и проанализирована при помощи биоинформатических инструментов. Анализ показал сходство гена лакказы на 99% с аналогичными последовательностями других штаммов *B. subtilis*, представленных в базах данных NCBI. Последовательность клонированного гена лакказы была зарегистрирована в GenBank под номером MK685357.1.

Электрофоретический анализ и зимография фермента

На основании электрофоретической подвижности в денатурирующем полиакриламидном геле молекулярная масса фермента составляет 34 кДа. Кроме того, по результатам зимографии выявлено наличие ферментативной активности в отношении гваякола в области нативного геля, соответствующей белку этой молекулярной массы (рис. 2).

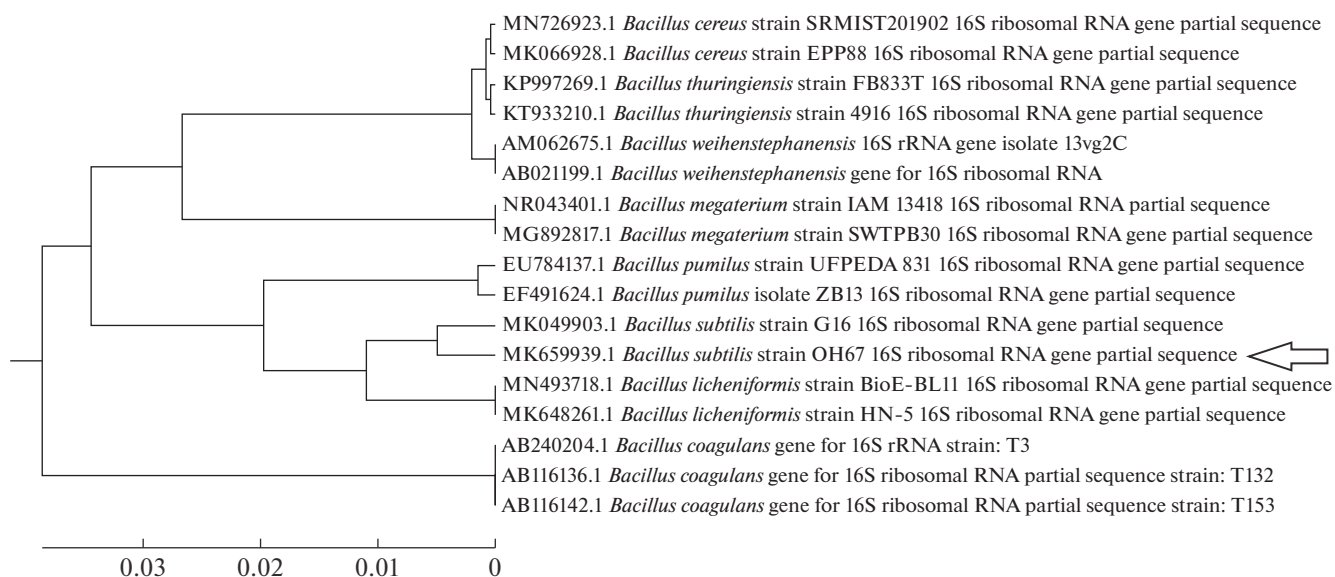


Рис. 1. Филогенетическое дерево выделенного штамма, построенное в программе MEGA 7. Программа показывает родство выделенного штамма *Bacillus subtilis* OH67 с другими штаммами *Bacillus subtilis*.

Оценка ферментативной активности лакказы

Окислительную активность ферментов из семейства лакказ можно детектировать по развитию оранжевой окраски в реакционной смеси, содержащей субстрат фермента гваякол. Как видно из рис. 3, рекомбинантная лакказа подчиняет-

ся кинетике Михаэлиса–Ментен. Значения K_M и V_{max} , вычисленные при помощи графика Лайнуивера–Берка, составили соответственно 1.1077 мМ и 19.30 мкмоль/мин/мг (рис. 3).

Влияние температуры и pH на активность и стабильность рекомбинантной лакказы

В процессе исследования выявлено, что рекомбинантная лакказа из *B. subtilis* окисляет гваякол как в кислых, так и в щелочных условиях, то есть активна в широком диапазоне значений pH. Оптимальное значение pH, при котором лакказная активность максимальна, соответствовало 6.6 (рис. 4a). После предварительной инкубации лакказы в течение 3 ч при pH 3.0, 3.8, 4.6, 5.4, 6.0, 6.6,

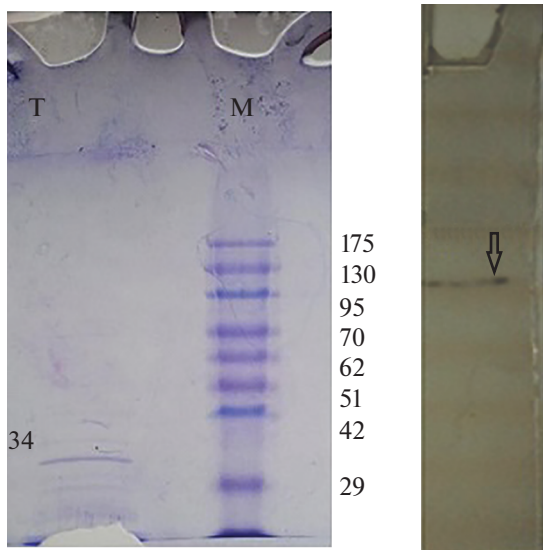


Рис. 2. Электрофоретический и зимографический анализ лакказы. На левом геле (SDS-PAGE) на дорожку М нанесен маркер молекулярных масс, на дорожку Т — препарат очищенного фермента; на фрагменте геля справа (нативный PAGE) отображен результат зимографии очищенного фермента (стрелкой указан результат зимографии очищенного фермента (стрелкой указана полоса, соответствующая M_r лакказы, с ферментативной активностью в отношении гваякола).

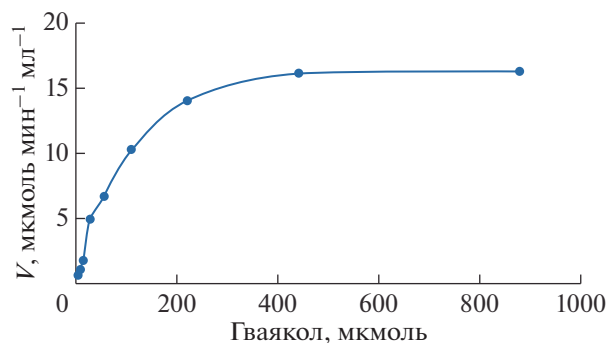


Рис. 3. Концентрационная зависимость скорости ферментативной реакции лакказы с использованием гваякола в качестве субстрата. Как видно из приведенного графика, кинетика реакции удовлетворяет условиям Михаэлиса–Ментен.

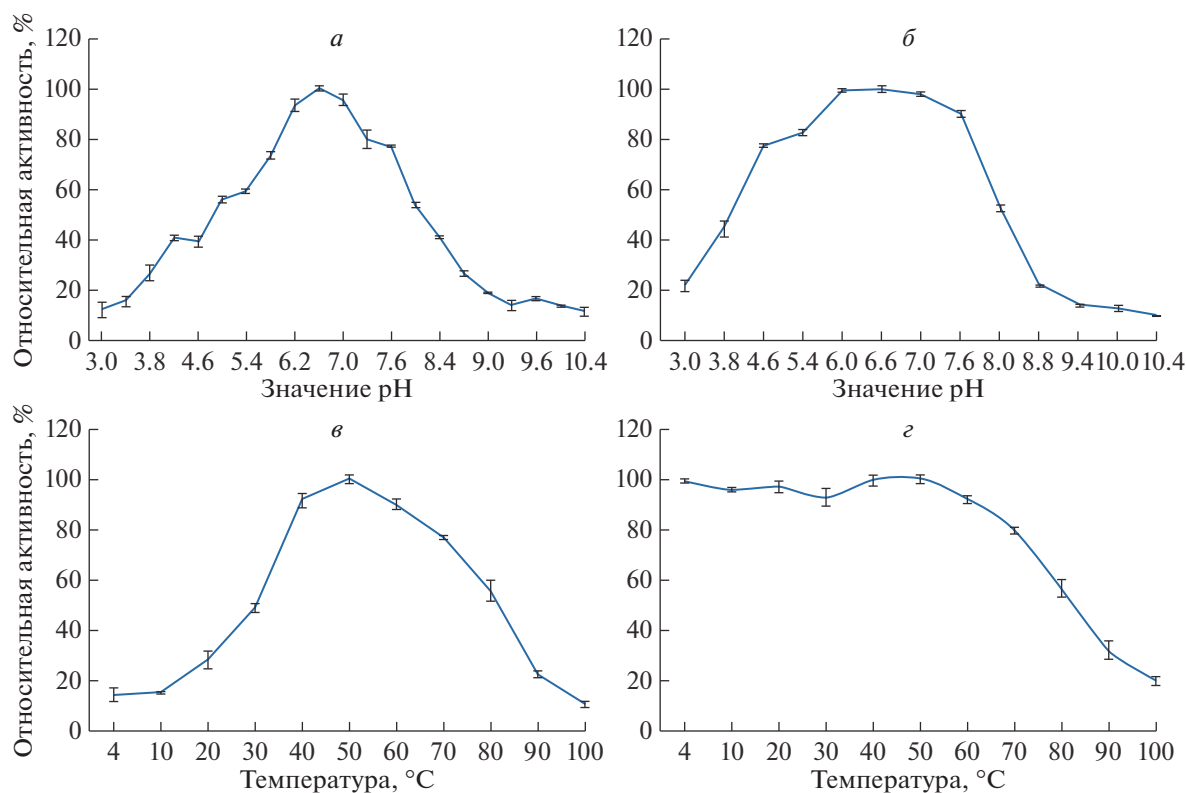


Рис. 4. Влияние различных факторов на ферментативную активность лакказы: pH-зависимость (а), pH-стабильность (б), температурная зависимость (в), термостабильность (г).

7.0, 7.6, 8.0, 8.8, 9.4, 10.0 и 10.4 лакказная активность (при pH 6.6) составляла 21, 53, 77, 83, 99, 100, 98, 90, 52, 21, 14, 12 и 9% от начальной (рис. 4б).

Обнаружено, что рекомбинантная лакказа окисляет гваякол в температурном диапазоне от 20 до 100°C. Температурный оптимум ферментативной активности зарегистрирован при 50°C (рис. 4в). После предварительной инкубации лакказы в течение 1 ч в температурном диапазоне от 10°C до 100°C (с интервалами в 10°C) остаточная активность (при 50°C) составляла: 95, 96, 92, 99, 100, 91, 79, 56, 32 и 20% соответственно (рис. 4г).

Максимум лакказной активности регистрировали при pH 6.6, при повышении pH активность снижалась и при pH 10 составляла только 13% от максимальной. При исследовании pH-стабильности выявлено, что при инкубации лакказы в течение 3 ч в диапазоне pH 6–7 ее активность полностью сохраняется, а при pH > 7.6 ферментативная активность снижалась. Температурный оптимум для лакказной активности зарегистрирован при 50°C, при 80°C активность снижалась вдвое, а при 4°C составляла только 13.95% от максимальной. Фермент сохранял активность после предварительной инкубации в диапазоне температур от 4 до 50°C.

Обесцвечивании текстильных красителей под действием лакказы

Нами проанализирована способность рекомбинантной лакказы обесцвечивать красители, ориентированные на текстильную промышленность: Turquoise blue HF6, Remazol red 106, Remazol brilliant orange 3R и Brilliant blue. Эффективность обесцвечивания различных материалов составила соответственно 30.00, 46.16, 47.15, 54.9% (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Лакказы имеют широкий спектр применения в различных биотехнологических и промышленных приложениях. Лакказы можно обнаружить в растениях, насекомых, грибах и бактериях. В противоположность грибам и растениям, бактерии имеют такие преимущества как быстрое время удвоения, постоянные условия продукции фермента, легкость экстракции и очистки ферментов, а также стабильность ферментов в жестких условиях. Бактериальные лакказы очень активны и гораздо более стабильны при высоких температурах и высоких значениях pH. В настоящее время больше внимания уделяется бактериальным лакказам с целью получения новых биокатализа-

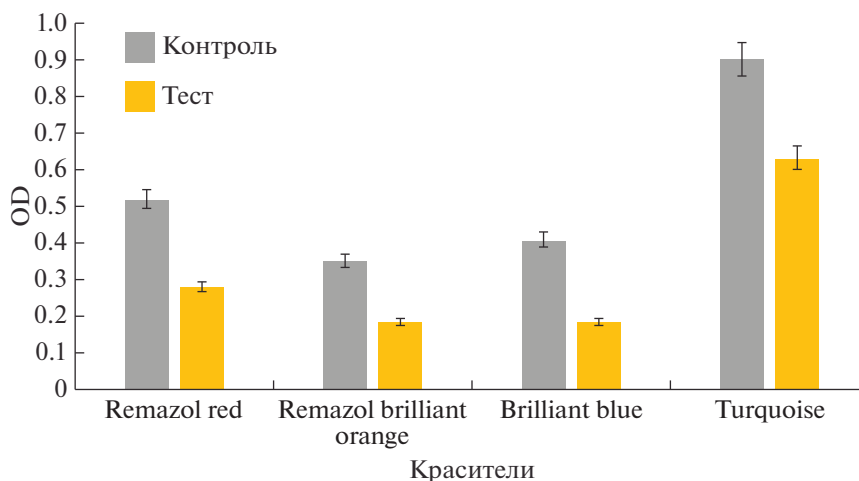


Рис. 5. Обесцвечивание красителей под действием рекомбинантной лакказы. Оптическую плотность измеряли при соответствующих каждому красителю длинах волн: Remazol red 106 (590 нм), Remazol brilliant orange 3R (629 нм), Brilliant blue (629 нм) и Turquoise blue HF6 (613 нм).

торов с потенциалом применения в промышленности.

Вектор pET22b содержит N-концевую лидерную последовательность пектатлиазы В (PelB), состоящую из 22 а.о., массой почти 2.2 кДа, которая направляет белки в периплазматическое пространство клетки-хозяина по Сек-пути. N-концевая аминокислотная последовательность PelB следующая: MKYLLPTAEAGLLLLLAAPQIA. Кроме того, вектор содержит ген устойчивости к ампициллину, который индуцирует устойчивость к ампициллину клетки-хозяина.

Штамм *B. subtilis* выделен нами из загрязненной нефтью почвы, взятой в районе Стамбула (Турция). Для отбора бактериальных штаммов с лакказной активностью был использован метод, ранее описанный Xiao и др. [31].

Сирингальдазин, гваякол и катехол исследованы нами в качестве субстратов лакказ. Выделение штамма *B. subtilis* и клонирование гена *cotA*, кодирующего целевой фермент, повышает доступность рекомбинантной лакказы с биотехнологическим потенциалом [25]. Мы проанализировали последовательность гена клонированной лакказы и сравнили ее с другими аналогичными последовательностями из базы NCBI GenBank. Степень идентичности последовательности клонированной лакказы по отношению к другим лакказам, присутствующим в этой базе данных, составила 99%. Молекулярная масса фермента, определенная по электрофоретической подвижности в SDS-PAG, составила 34 кДа. Фермент состоит из 306 а.о., куда входит последовательность PelB (22 а.о.) с N-конца и 6 остатков His (His₆-tag) с C-конца. Ранее Nguyen с соавт. [32] сообщали, что масса лакказы составляет 27.7 кДа.

По результатам сравнения значений V_{max} и K_M для лакказ из разных организмов можно говорить о том, что их субстратная специфичность сильно различается [33]. Мы можем сравнить результаты проведенного нами исследования с другими работами, в которых использовали гваякол в качестве субстрата. По графику Лайнуивера–Берка рассчитанные значения K_M и V_{max} для рекомбинантной лакказы составили 1.1077 мМ и 19.30 мкмоль/мин/мг соответственно. Опубликованные Ademakinwa и др. [34] значения K_M и V_{max} для очищенной лакказы из *Aureobasidium pullulans* на этом же субстрате составили 1.05 мМ и 12.67 мкмоль/мл/мин соответственно. Таким образом, для полученного нами фермента значение V_{max} выше, чем для лакказы из *Aureobasidium pullulans*, хотя значения K_M практически одинаковы. По данным Chaudhary и др. [35], величины K_M и V_{max} для очищенной лакказы из *Ganoderma lucidum* соответствуют 3.83 мМ и 0.617 мкмоль/мл/мин. Для выделенного нами фермента значение K_M ниже, а V_{max} выше, чем для лакказы *Ganoderma lucidum*. Valeriano и др. [36] рассчитали K_M (13.25 мМ) для очищенной лакказы из *Stereum ostrea*. В исследовании Xiao и др. [31] для лакказы из базидиомицета *Trametes* sp. AN28-2 значение K_M составило 1.249 мМ. Zahidi и соавт. [37] нашли, что для лакказы из *Brassica oleraceae* значение K_M равно 6.43 мМ. По результатам проведенного нами исследования очищенная лакказа из штамма *B. subtilis* OH67 обладает высоким сродством к гваяколу, судя по низкому значению K_M и высокому V_{max} .

Нами определены оптимальные значения pH (6.6) и температуры (50°C) для активности рекомбинантной лакказы из *B. subtilis*, что неплохо согласуется с данными Nguyen с соавт. [32], которые рассчитали оптимальные pH и температуру

для лакказы из разных организмов как 7.0 и 67°C соответственно. Однако Dalfard и др. [24] сообщали о температурном оптимуме 37°C для лакказы, что совсем не согласуется с таковым для полученного нами фермента из *B. subtilis* OH67, который проявляет высокую активность при высокой температуре. Niladevi & Prema [38] сообщали о значениях рН 7.5 и температуре 32°C как оптимальных для лакказы, продуцируемой *Streptomyces psammoticus*. Охарактеризованная нами лакказа наиболее активна при 50°C, что согласуется с данными, опубликованными для фермента из *B. subtilis* wD23 [39]. Для лакказы из *Halobasillus halophilus* выявлена высокая термостабильность и активность при 77°C [32]. Лакказа из *B. subtilis* X1 оказалась близка исследованной нами, будучи стабильной при 50 и 60°C [18], в то время как лакказа из *B. subtilis* VTCC-DVN-12-01 стабильно работала только при 50°C [32].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лакказа из штамма *B. subtilis* OH67 была успешно клонирована, экспрессирована в *E. coli* и очищена. Обнаружено, что этот бактериальный фермент активен при высокой температуре и в широком диапазоне рН, что открывает перспективы для его наработки и использования в промышленном масштабе. Очищенная лакказа эффективно обесцвечивает ряд химических красителей и, таким образом, может найти применение в текстильной и природоохранной отраслях.

Авторы благодарят за финансовую поддержку Университет Памуккале, Фонд финансирования научно-исследовательских проектов (Pamukkale University, Scientific Research Project Funding (PAUBAP), Project number 2016FEVE043).

Статья не содержит экспериментов, включающих людей или животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Giardina P., Faraco V., Pezzella C., Piscitelli A., Vanhulle S., Sannia G. (2010) Laccases: a never-ending story. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 369–385.
- Singh G., Bhalla A., Kaur P., Capalash N., Sharma P. (2011) Laccase from prokaryotes: a new source for an old enzyme. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **10**, 309–326.
- Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E. (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* **96**, 2563–2606.
- Abari A.H., Emtiazi G., Ghasemi S.M. (2012) The role of exopolysaccharide, biosurfactant and peroxidase enzymes on toluene degradation by bacteria isolated from marine and wastewater environments. *Jundishapur J. Microbiol.* **5**, 479–485.
- Baldrian P. (2006) Fungal laccases—occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 215–242.
- Mayer A.M., Staples R.C. (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. **60**, 551–565.
- Vianello F., Ragusa S., Cambria M.T., Rigo A. (2006) A high sensitivity amperometric biosensor using laccase as biorecognition element. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 2155–2160.
- Bolli A., Galluzzo P., Ascenzi P., Del Pozzo G., Manco I., Vietri M.T. Mita L., Altucci L., Mita D.G., Marino M. (2008) Laccase treatment impairs bisphenol A-induced cancer cell proliferation affecting estrogen receptor α -dependent rapid signals. *IUBMB Life*. **60**, 843–852.
- Aswini L., Mukherjee S., Arunagirinathan N. (2016) Molecular characterization and anticancer activity of laccase from fusant strain of *Pleurotus ostreatus* against HuH7 hepatocarcinoma cell line. *Int. J. Innovative Res. Develop.* **5**, 79–84.
- Matuszewska A., Karp M., Jaszek M., Janusz G., Osińska-Jaroszuk M., Sulej J., Stefaniuk D., Tomczak W., Giannopoulos K. (2016) Laccase purified from *Cerrena unicolor* exerts antitumor activity against leukemic cells. *Oncol. Lett.* **11**, 2009–(2018)
- Lakshmi R.J., siva Mallika Donepudi, Jeevan Amos Seelam, Kasturi Kondapalli (2015) Novel approach for treating cancer by using laccases from marine fungi. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **34**, 124–129.
- Al-Kahem Al-Balawi T.H., Wood A.L., Solis A., Cooper T., Barabote R.D. (2017) *Anoxybacillus* sp. strain UARK-01, a new thermophilic soil bacterium with hyperthermostable alkaline laccase activity. *Curr. Microbiol.* **74**, 762–771.
- Galai S., Limam F., Marzouki M.N. (2009) A new *Stenotrophomonas maltophilia* strain producing laccase. Use in decolorization of synthetic dyes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **158**, 416–431.
- Muthukumarasamy N.P., Jackson B., Raj A.J., Sevanan M. (2015) Production of extracellular laccase from *Bacillus subtilis* MTCC 2414 using agroresidues as a potential substrate. *Biochem. Res. Int.* **2015**, 765190.
- Sondhi S., Sharma P., George N., Chauhan P.S., Puri N., Gupta N. (2015) An extracellular thermo-alkali-stable laccase from *Bacillus tequilensis* SN4, with a potential to biobleach softwood pulp. *J. Biotech.* **5**, 175–185.
- Sharma P., Goel R., Capalash N. (2007) Bacterial laccases. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 823–832.
- Enguita F.J., Marçal D., Martins L.O., Grenha R., Henriques A.O., Lindley P.F. (2004) Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **279**, 23472–23476.
- Guan Z.B., Zhang N., Song Ch.M., Zhou W., Zhou L.X., Zhao H. (2014) Molecular cloning, characterization, and dye-decolorizing ability of a temperature- and pH-stable laccase from *Bacillus subtilis* X1. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **172**, 1147–1157.
- Kaushik G., Thakur I. (2013) Purification, characterization and usage of thermotolerant laccase from *Bacillus* sp. for biodegradation of synthetic dyes. *Appl. Biochem. Microbiol.* **49**, 352–359.
- Yan J., Chen D., Yang E., Niu J., Chen Y., Chagan I. (2014) Purification and characterization of a thermotolerant laccase isoform in *Trametes trogii* strain and its potential in dye decolorization. *Int. Biodeter. Biodegr.* **93**, 186–194.

21. Fang Z., Li T., Wang Q., Zhang X., Peng H., Fang W. (2011) A bacterial laccase from marine microbial metagenome exhibiting chloride tolerance and dye decolorization ability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 1103–1110.
22. Baldrian P., Šnajdr J. (2006) Production of ligninolytic enzymes by litter-decomposing fungi and their ability to decolorize synthetic dyes. *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 1023–1029.
23. Dalfard A.B., Khajeh K., Soudi M.R., Naderi-Manesh H., Ranjbar B., Sajedi R.H., (2006) Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium. *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 1409–1416.
24. Sambasiva Rao K.R., Tripathy N.K., Mahalaxmi Y., Prakasham R.S. (2012) Laccase-and peroxidase-free tyrosinase production by isolated microbial strain. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 207–214.
25. Barkhordari F., Sohrabi N., Davami F., Mahboudi F., Talebkhan Garoosi Y. (2019) Cloning, expression and characterization of a HER2- α luffin fusion protein in *Escherichia coli*. *Prep. Biochem. Biotech.* **49**, 759–766.
26. Sen S.K., Raut S., Satpathy S., Rout P.R., Bandyopadhyay B., Das Mohapatra P.K. (2014) Characterizing novel thermophilic amylase producing bacteria from Taptapani hot spring, Odisha, India. *Jundishapur J. Microbiol.* **7**, 12.
27. Rathinasamy P., Palvannan Thayumanavan (2018) Identification of efficient dye decolorizing laccase producing fungi from Kolli Hills. *Indian J. Biotechnol.* **17**, 33–43.
28. Valipour E., Arikan B. (2016) Increased production of tyrosinase from *Bacillus megaterium* strain m36 by the response surface method. *Arch. Biol. Sci.* **68**, 659–668.
29. Tavakoli M., Bouzari S., Siadat S.D., Najar Peerayeh S., Jafari A. (2015) Prokaryotic high-level expression system in producing adhesin recombinant protein E of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Jundishapur J. Microbiol.* **8**(4), e16377.
30. Coelho G.D., Ballaminut N., Thomaz D.V., Gomes Machado K.M. (2019) Characterization of a thermostable *Deconica castanella* laccase and application toward pentachlorophenol degradation. *Prep. Biochem. Biotech.* **49**, 908–915.
31. Xiao Y.Z., Chen Q., Hang J., Shi Y.Y., Xiao Y.Z., Wu J., Hong Y.Z., Wang Y.P. (2004) Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2. *Mycologia.* **96**, 26–35.
32. Nguyen T.T., Quyen T.D., Le H.T. (2013) Cloning and enhancing production of a detergent-and organic-solvent-resistant nattokinase from *Bacillus subtilis* VTCC-DVN-12-01 by using an eight-protease-gene-deficient *Bacillus subtilis* WB800. *Microb. Cell Fact.* **12**, 79.
33. Kiiskinen L.L. (2004) Characterization and heterologous production of a novel laccase from *Melanocarpus albomyces*. *Dissertation for the degree of Doctor of Science in Technology*, Espoo 2004, Vtt Publication 556, 94p. <https://www.vtt.fi/inf/pdf/publications/2004/P556.pdf>
34. Ademakinwa A.N., Agboola F.K. (2016) Biochemical characterization and kinetic studies on a purified yellow laccase from newly isolated *Aureobasidium pullulans* NAC8 obtained from soil containing decayed plant matter. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **14**, 143–151.
35. Chaudhary R., Hooda S., Beniwal S., Sindha A. (2016) Partial purification and immobilization of laccase isolated from medicinal mushroom (*Ganoderma lucidum*). *Indian J. Chem. Technol.* **23**, 313–317.
36. Valeriano V.S., Silva A.M., Santiago M.F., Bara M.T., Garcia T.A. (2009) Production of laccase by *Pynocarpus sanguineus* using 2,5-xylidine and ethanol. *Braz. J. Microbiol.* **40**, 790–794.
37. Zahidi T., Lekchiri A., Zahidi T., Lekchiri W., Berrichi A., Mimouni M., Halouani H. (2018) Extraction and comparison of two new peroxidases from leaves and roots of *Brassica oleracea* var. *ramose*. *J. Mater. Environ. Sci.* **9**(5), 1398–1404.
38. Niladevi K., Prema P. (2008) Effect of inducers and process parameters on laccase production by *Streptomyces psammoticus* and its application in dye decolorization. *Bioresour. Technol.* **99**, 4583–4589.
39. Wang Ch.L., Zhao M., Lu L., Wei X.D., Li T. (2011) Characterization of spore laccase from *Bacillus subtilis* WD23 and its use in dye decolorization. *African J. Biotechnol.* **10**, 2186–2192.

CLONING, EXPRESSION, AND CHARACTERIZATION OF NOVEL LACCASE ENZYME FROM NATIVE *Bacillus subtilis* STRAIN OH67

O. Hajipour^{1,*}, N. Mercan Dogan¹, S. Dincer², and M. Norizadehazehkand³

¹Department of Biology, Faculty of Science and Arts, Pamukkale University, Denizli, 20160 Turkey

²Department of Biology, Faculty of Science, Çukurova University, Adana, 01330 Turkey

³Department of pharmaceutical Biotechnology, ZBEU University, Zonguldak, 67600 Turkey

*e-mail: orkideh.hajipoor88@yahoo.com

Bacterial laccases are very stable at high temperature and high pH values, and have many biotechnological and industrial applications. Here we describe how we cloned, expressed and purified the laccase from *Bacillus subtilis*. The enzyme molecular weight has been determined as 34 kDa in SDS PAGE analysis. The activity of the recombinant enzyme has been proved by guaiacol oxidation. The K_M and V_{max} values of the enzyme were at 1.1077 mM and at 19.3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, respectively. The recombinant laccase was effective in the decolorization of Turquoise blue HF6, Remazol red 106, Remazol brilliant orange 3R, and Brilliant blue, thus, possessing the characteristics necessary for its possible application in textile and environmental industries.

Keywords: *Bacillus subtilis*, laccase, cloning, expression, decolorization