

Research Paper

Increasing the Catalytic Power of the Flavin Reductase DszD Enzyme Using Site-Directed Mutagenesis Method in *Rhodococcus Erythropolis*



Ramin Fallahzadeh¹, Kasra Esfahani², Abbas Akhavan Sepahi¹, Nasrin Kamali², *Bijan Bambai²

1. Department of Microbiology, Tehran North Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Medical Genetics, Institute of Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.



Citation: Fallahzadeh R, Esfahani K, Akhavan Sepahi A, Kamali N, Bambai B. [Increasing the Catalytic Power of the Flavin Reductase DszD Enzyme using Site-Directed Mutagenesis Method in *Rhodococcus Erythropolis* (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2019; 22(5):68-77. <https://doi.org/10.32598/JAMS.22.5.68>

doi <https://doi.org/10.32598/JAMS.22.5.68>



Article Info:

Received: 13 Jun 2019

Accepted: 14 Oct 2019

Available Online: 01 Dec 2019

Key words:

Flavin reductase DszD enzyme, Bacterial desulfurization, Catalytic power

ABSTRACT

Background and Aim The flavin reductase DszD enzyme is a key enzyme for providing required reduction potential in the bacterial desulfurization process. Considering the low speed of desulfurization process because of low catalytic power of this enzyme, it is necessary to increase the catalytic power of flavin reductase for industrial use of this enzyme as biocatalyst.

Methods & Materials The three-dimensional structure of the flavin reductase DszD enzyme was predicted by a CPHmodel server and its amino acid sequence was searched in the protein data bank to identify the homologue molecules. Based on the alignment of the amino acid sequence and the model molecules, the key residues at the flavin mononucleotide substrate were identified. The key residue of asparagine at position 77 was replaced with phenylalanine using the site-directed mutagenesis method.

Ethical Considerations This study with research ethics code IR.NIGEB.EC.1398.6.24 A has been approved by research ethics committee at National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

Results The cloning and expression of each of the wild-type and mutant genes were performed separately. The catalytic power of the produced wild-type and mutant enzymes were compared. The catalytic activity measurements showed that the mutant enzyme had a 2.5 fold increase in catalytic power.

Conclusion Replacing phenylalanine with asparagine at position 77 of flavin reductase DszD enzyme leads to an increase in enzyme catalytic power to increase the speed of bacterial desulfurization process.

Extended Abstract

Introduction

T

he combustion of petroleum compounds, due to the release of sulfur oxides, can cause numerous environmental issues, like air pollution, as well as many cardiac, respiratory, dermatological, and gastroin-

testinal diseases in individuals. Various approaches are applied to reduce the sulfur content of petroleum compounds in the petroleum refinery; chemical desulfurization is the most frequently used method in this respect. The chemical desulfurization is inefficient and requires powerful thermal systems, high pressure, high energy consumption, and costly metal catalysts. The microbial desulfurization method has recently been developed. The microbial desulfurization could remove sulfur in the polycyclic derivatives of petro-

* Corresponding Author:

Bijan Bambai, PhD.

Address: Department of Medical Genetics, Institute of Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

Tel: +98 (21) 22939413

E-mail: bambai@nigeb.ac.ir

leum without breaking the carbon skeleton and reducing fuel energy value along the 4S route. This pathway was first introduced in the gram-negative *Rhodococcus erythropolis* bacteria (*Rhodococcus erythropolis* IGTS8). This bacterium uses sulfur in dibenzothiophene and its derivatives as the sole nutrition source. The active desulfurization reaction is performed in the presence of the flavin reductase DszD enzyme. Naturally, this enzyme has low catalytic power; therefore, it is considered as the primary limiting factor in the desulfurization process rate in the refining industry. The current study aimed to increase the catalytic power of the target enzyme. Thus, the asparagine residue at position 77 was replaced with phenylalanine by targeted mutagenesis. Eventually, the catalytic power of wild and mutated enzymes was compared.

Materials and Methods

The DszD enzyme amino acid sequence is accessible at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database under the code AAC38226.1. To identify homologous molecules with acceptable similarity, the target enzyme sequence was searched in the protein database. Among the identified homologs, those bounded to the FMN

substrate were selected, and their alignment was performed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). The wild-type *dszD* gene was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) using forward and backward primers with cleavage sites for BamHI and EcoRI restriction enzymes, respectively. The *dszD* gene was mutated at position 77 using SOEing-PCR. The mutated wild-type gene of 600 bp length was individually cloned into the pET-23a(+) expression vector, then transferred to *E. coli* BL21 (DE3) cells. Cloning accuracy was assessed using the two restriction enzymes mentioned above and sequencing. Wild and mutated proteins were separately expressed and confirmed by the Western blotting technique. Next, their optical absorption was measured at 340 nm during the oxidation of NADH to NAD per time unit. Protein concentration was determined by the Bradford method with Bovine Serum Albumin (BSA) as the standard protocol.

Results

Searching for the amino acid sequence of the flavin reductase DszD enzyme in the protein database has introduced homologous molecules with distinct crystallographic structure. Homologous molecules with the highest structural

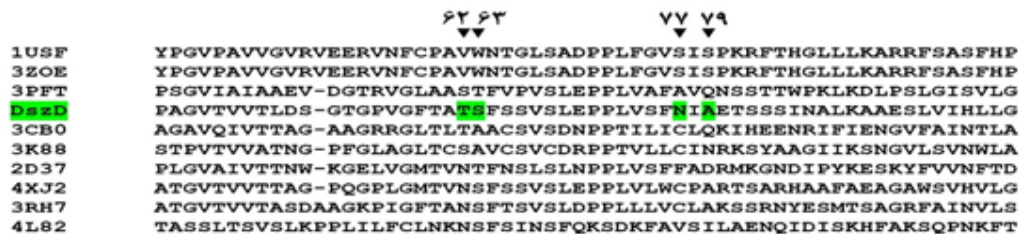


Figure 1. The alignment results of the amino acid sequence of flavin reductase DszD enzyme with homologous enzymes

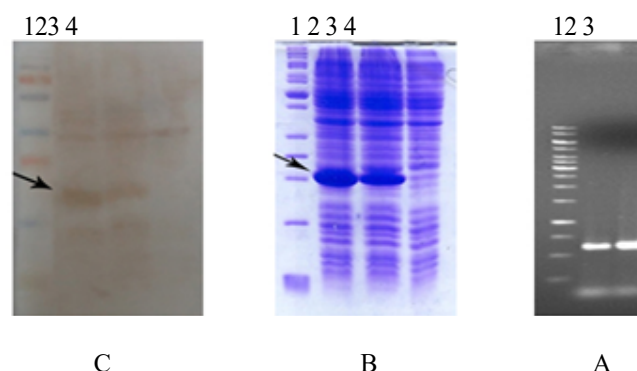


Figure 2. (A) Agarose gel: Column 1: The molecular markers of the type 1 kg base pair. Column 2: *dszD* PCR product lacking a 600 bp mutation. Column 3: SOEing-PCR end product with a mutation in alanine 77 and 600 bp length. B. SDS-PAGE gel: Column 1: Protein molecular marker, Column 2: Wild-type recombinant strain, and Column 3: Recombinant mutant strain. Column 4: Strain containing the non-recombinant plasmid; C. the Western blot results of the study samples (B) i.e. visible in columns 2 and 3 of the flavin reductase DszD enzyme in wild and mutated types, respectively.

similarity were selected as appropriate models for identifying key positions. The alignment of the amino acid sequence of DszD enzyme with the selected homologous molecules revealed that the target enzyme active site includes 4 key positions for binding to the FMN substrate; threonine 62, serine 63, asparagine 77, and alanine 79 (Figure 1).

Wild-type dszD gene amplification was performed applying specific primers (Figure 2a, Column 1). The mutated dszD gene was also obtained at position 77 by a mutant primer (Figure 2a, Column 2). After the enzymatic digestion of the pET-23a(+) vector and the final amplified fragments, each was separately ligated to generate the recombinant plasmid during the binding reaction.

The recombinant plasmids containing the wild- and mutated-type genes were individually transferred to the E.coli BL21 (DE3) expression strain. The experimental results indicated the appropriate expression of the target cloned genes; it had a specific band on the polyacrylamide gel with a molecular weight of 24 kDa (Figure 2b).

Western blotting analysis supported the presence of a significant level of expression of the wild and mutated types of recombinant flavin reductase DszD enzyme (Figure 2c). We compared the mean catalytic power of the wild-type and mutant-type flavin reductase DszD. The obtained data revealed that the mutant enzyme had a catalytic capacity of 392 ± 6 U/mg, suggesting a 2.5-fold increase in activity, compared to the wild-type enzyme (160 ± 4 U/mg).

Conclusion

The achieved data suggested that the target enzyme had an appropriate potential to increase the catalytic power in the 4S route. Thus, the targeted mutation in the flavin reductase DszD enzyme and its activity in recombinant host cells could increase the desulfurization process efficacy, using the bacterial system. It is suggested that different mutant molecules capable of mutation be produced in several key positions, and their catalytic potency be compared with those reported.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study with research ethics code IR.NIGEB. EC.1398.6.24 A has been approved by research ethics committee at National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Authors' contributions

Conceptualization, methodology, investigation, writing-original draft, writing-review & editing: All author.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

افزایش قدرت کاتالیتیکی آنزیم فلاوین ردوکتاز DszD با استفاده از روش جهش‌زایی هدفمند در باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس

رامین فلاح‌زاده^۱، کسری اصفهانی^۲، عباس اخوان سپهری^۱، نسرين کمالی^۲، بیژن بمبئی^۲

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشکده زیست‌فناوری پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: آنزیم فلاوین ردوکتاز DszD به عنوان آنزیم کلیدی جهت تأمین نیروی احیایی لازم در فرایند گوگردزایی باکتریایی محسوب می‌شود. با توجه به اینکه سرعت فرایند گوگردزایی به دلیل پایین بودن قدرت کاتالیتیکی این آنزیم پایین است، بنابراین به منظور بهره‌گیری از آن به عنوان کاتالیزور زیستی تجاری، افزایش قدرت کاتالیتیکی آنزیمی ضروری است.

مواد و روش‌ها: ساختار سه‌بعدی آنزیم فلاوین ردوکتاز DszD توسط سرور CPH-Model، پیش‌گویی و توالی آمینو اسید آن در پایگاه اطلاعات پروتئینی به منظور شناسایی مولکول‌های همولوگ جست‌وجو شد. بر اساس هم‌ترازی توالی آمینو اسیدهای آن با مولکول‌های همولوگ، باقی‌مانده‌های کلیدی در اتصال با سوبسترای فلاوین مونونوکلوئید (FMN) شناسایی شد. باقی‌مانده کلیدی آسپارژین در موقعیت ۷۷ با استفاده از روش جهش‌زایی هدفمند با فنیل آلانین جایگزین شد.

ملاحظات اخلاقی: این مطالعه با کد IR.NIGEB.EC.1398.6.24 A به تأیید کمیته اخلاق پژوهشی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری رسیده است.

یافته‌ها: هم‌سازگی و بیان هر یک از ژن‌های وحشی و جهش‌یافته به طور جداگانه انجام و قدرت کاتالیتیکی آنزیم‌های وحشی و جهش‌یافته تولیدی با یکدیگر مقایسه شد. نتایج سنجش فعالیت آنزیمی نشان داد قدرت کاتالیتیکی آنزیم جهش‌یافته نسبت به آنزیم وحشی به میزان ۲/۵ برابر افزایش یافته است.

نتیجه‌گیری: جایگزین کردن آمینو اسید فنیل آلانین به جای آمینو اسید آسپارژین در موقعیت ۷۷ منجر به افزایش قدرت کاتالیتیکی آنزیمی در راستای افزایش سرعت فرایند گوگردزایی می‌شود.

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۲۳ خرداد ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: ۰۱ مرداد ۱۳۹۸

تاریخ انتشار: ۱۰ آذر ۱۳۹۸

کلیدواژه‌ها:

آنزیم فلاوین ردوکتاز DszD، فرایند گوگردزایی باکتریایی، قدرت کاتالیتیکی

مقدمه

این فرایند یک واکنش کاتالیتیکی است که در آن گوگرد آلی تحت فشار و دمای بالا با استفاده از گاز هیدروژن در حضور کاتالیزورهای فلزی، احیا شده و به گاز سولفید هیدروژن تبدیل می‌شود. حذف گوگرد به روش شیمیایی از راندمان مناسبی برخوردار نیست و نیاز به سیستم‌های حرارتی پر قدرت، فشار بالا، صرف انرژی بالا و کاتالیست‌های فلزی پرهزینه دارد [۵، ۶]. از سوی دیگر بیش از ۷۰ درصد ترکیبات هتروسیکلیک مانند دی‌بنزوتیوفن و مشتقات آن به این روش مقاوم هستند و گوگرد آن از واکنش حذف نمی‌شود [۷].

با توجه به معایب اشاره‌شده، اخیراً روش‌های گوگردزایی متعددی از جمله روش اکسیداتیو، جاذب و میکروبی توسعه یافته است [۸-۱۰]. روش گوگردزایی میکروبی، قادر است گوگرد موجود در مشتقات پلی‌سیکلیک نفت را بدون شکستن اسکلت کربن و کاهش ارزش انرژی سوخت حذف کند [۱۱، ۱۲]. در

استفاده از سوخت‌های فسیلی و ترکیبات نفتی، سبب افزایش اکسیدهای گوگردی در محیط زیست و بروز مشکلات زیست‌محیطی متعددی از قبیل باران اسیدی، آلودگی هوا و بسیاری از بیماری‌های قلبی، تنفسی، پوستی و گوارشی برای انسان می‌شود [۱، ۲]. نفت و مشتقات آن دارای طیف وسیعی از انواع ترکیبات گوگردی حلقوی و هتروسیکل‌های آروماتیک بر پایه تیوفن هستند. برای کاهش سطح دی‌اکسید گوگرد آزادشده به اتمسفر، کاهش میزان گوگرد در سوخت‌های فسیلی امری ضروری است. روش‌های مختلفی برای کاهش محتوای گوگردی ترکیبات گوگردی حلقوی و هتروسیکل‌های آروماتیک در صنعت تصفیه استفاده می‌شوند که رایج‌ترین آن‌ها استفاده از گوگردزایی به روش شیمیایی است [۳، ۴].

* نویسنده مسئول:

دکتر بیژن بمبئی

نشانی: تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، پژوهشکده زیست‌فناوری پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی.

تلفن: ۲۲۹۳۹۴۱۳ (۲۱) ۹۸+

پست الکترونیکی: bambai@nigeb.ac.ir

دسترسی AAC38226.1 موجود است. به منظور شناسایی مولکول همولوگ با شباهت قابل قبول، توالی آنزیم هدف در پایگاه داده پروتئین جست‌وجو شد [۱۹]. در بین همولوگ‌های شناسایی شده، همولوگ‌های متصل به سوبسترای FMN انتخاب و هم‌ترازی آن‌ها با یکدیگر از طریق ابزار BLAST انجام شد.

مواد شیمیایی، سویه باکتریایی، پلاسمیدها و پرایمرها

DNA ژنومی از سویه باکتریایی رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8 تهیه شد. وکتور کلونینگ pBluescript II KS (+) از فرمنتاز و وکتور بیانی pET-23a (+) از Novagen بودند. DNA پلیمراز، آنزیم‌های برشی BamHI و EcoRI، T4 Ligase و کیت استخراج ژل آگارز (Cat. No. 11696505001) و کیت تخلیص محصول PCR (Cat. No. 11732668001) از شرکت Roche آلمان؛ کیت استخراج DNA (Cat. No. K1014-100) و کیت تخلیص پلاسمید (Cat. No. K2014-100) از شرکت Qiagen و نشانگرهای پروتئینی و آنتی‌بادی T7 tag از شرکت فرمنتاز لیتوانی خریداری شد.

تکثیر و همسانه‌سازی ژن dszD نوع وحشی و جهشیافته

ژن dszD نوع وحشی با استفاده از PCR از طریق پرایمرهای پیشرو و پسرو به ترتیب -ATGGATCCATGTCTGACAAGC- و GTAGAATTCCTACTATTGACCTAACG-CGAATGC و GAGTCCG تکثیر شد که به ترتیب دارای جایگاه برش برای آنزیم‌های محدودکننده BamHI و EcoRI بودند (نوکلئوتیدهایی که زیر آن خط کشیده شده است، جایگاه برش آنزیم‌های محدودکننده را نشان می‌دهد). ژن جهش‌یافته dszD با استفاده از روش SOEing-PCR، ایجاد شد [۲۰]. پرایمرهای پیشرو و پسرو برای ایجاد جهش در موقعیت ۷۷ به ترتیب -5'-CGTCTC-3' /GTTCTTCATCGCGGAG-3 و -5'-CTCCGCGAT-3 /GAAGAACGAGACG-3 بودند. ژن نوع وحشی و جهش‌یافته حاصل به طول ۶۰۰ جفت باز به صورت جداگانه درون وکتور بیانی pET-23a (+) همسانه‌سازی شدند و سپس به سلول‌های E. coli BL21 (DE3) منتقل شدند. صحت همسانه‌سازی با استفاده از دو آنزیم محدودکننده مذکور و همچنین توالی‌یابی انجام شد. روش‌های مولکولی بر اساس پروتکل استاندارد Russel و Sambrook انجام شدند [۲۱].

القای بیان، الکتروفورز ژل آکرلامید و وسترن بلات

وکتورهای بیانی pET-23a حاوی ژن‌های وحشی و جهش‌یافته، هر کدام به صورت جداگانه به میزبان بیانی (E. coli BL21 (DE3) منتقل شدند. میزبان‌های نوترکیب در محیط کشت LB در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد تا به چگالی نوری ۰/۷ رسیدند. به منظور بررسی بیان میزبان‌های فوق از محیط کشت حاوی IPTG با غلظت نهایی ۰/۱ میلی‌مولار استفاده

راستای توسعه این روش میکروارگانسیم‌های متعددی شناسایی شده‌اند که قادر به حذف اختصاصی گوگرد هستند که از آن جمله می‌توان به رودوکوکوس اریتروپولیس، آگرو باکتریوم، بعضی از کلبسیلاها، نوکاردیاه‌ها و پاپی باسیلوس‌ها اشاره کرد [۱۴، ۱۳].

فرایند گوگردزایی در این میکروارگانسیم‌ها از طریق شکسته‌شدن پیوند بین گوگرد و کربن در مولکول هدف طی مسیری موسوم به مسیر 4S انجام می‌شود. این مسیر اولین بار در باکتری گرم منفی رودوکوکوس اریتروپولیس^۱ با شناسه دسترسی ATCC53968 معرفی گردید. رودوکوکوس اریتروپولیس توانایی حذف اختصاصی گوگرد بدون آسیب به اسکلت کربنی و بدون کاهش در ارزش انرژی سوخت فسیلی را دارد [۱۵]. این باکتری از گوگرد موجود در دیبزنوتیوفن و مشتقات آن به عنوان تنها منبع تغذیه، استفاده مینماید. این باکتری دارای آنزیم‌های DszA، DszB، DszC و DszD است که آنزیم‌های DszA و DszC کدکننده مونواکسیژناز، آنزیم DszB دسولفیناز و آنزیم DszD، یک فلاوین ردوکتاز وابسته به سوبسترای FMN است که FMNH₂ لازم برای فعالیت آنزیم‌های DszA و DszC را فراهم میکند [۱۶، ۱۷].

واکنش فعال گوگردزایی در حضور فلاوین ردوکتاز DszD (gi 2944380) انجام می‌شود. در واقع آنزیم اخیر با ۱۹۲ آمینو اسید و وزن مولکولی حدود ۲۲ کیلو دالتون آنزیم کلیدی این فرایند محسوب میشود. به طور طبیعی، این آنزیم قدرت کاتالیتیکی پایینی دارد و از این رو عامل اصلی محدودکننده سرعت فرایند گوگردزایی در صنعت پالایش شناخته شده است. یکی از عوامل مهم برای افزایش سرعت این فرایند، افزایش قدرت کاتالیتیکی آنزیم DszD است. در مطالعه قبلی ما، افزایش فعالیت آنزیمی از طریق جایگزین نمودن آمینو اسیدهای آلانین و اسپارژین به جای باقیمانده ترئونین در موقعیت ۶۲ گزارش شده بود [۱۸].

در این مطالعه ما علاقه‌مند بودیم با جهش‌زایی در باقی‌مانده کلیدی دیگر در اتصال با سوبسترای FMN قدرت کاتالیتیکی آنزیم را بررسی کنیم. به همین دلیل ابتدا، پیش‌گویی ساختار سه‌بعدی با هدف شناسایی باقی‌مانده‌های کلیدی انجام شد. از بین چهار باقی‌مانده کلیدی شناسایی شده، باقی‌مانده اسپارژین در موقعیت ۷۷ با استفاده از روش جهش‌زایی هدفمند با فنیل آلانین جایگزین شد. در نهایت قدرت کاتالیتیکی آنزیم‌های وحشی و جهش‌یافته مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

شناسایی باقی‌مانده‌های کلیدی آنزیم فلاوین ردوکتاز DszD جهت اتصال به سوبسترا

توالی آمینو اسیدهای آنزیم DszD در پایگاه NCBI با عدد

1. IGTS8 Rhodococcus erythropolis

شامل دی‌آمینوبنزیدین ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و پراکسید هیدروژن ۰/۱ درصد در TBS استفاده شد [۲۲].

سنجش قدرت کاتالیتیکی آنزیم فلاوین ردوکتاز DszD

جهت بررسی قدرت کاتالیتیکی آنزیم DszD، ابتدا پروتئین‌های بیان‌شده در محلول حاوی ۵۰ میلی‌مولار Tris/HCl (pH ۷/۵)، ۱۴۰ میکرومولار NADH و ۲۰ میکرومولار FMN حل شدند. سپس جذب نوری آن‌ها در طول موج ۳۴۰ نانومتر طی اکسیداسیون NADH به NAD در واحد زمان سنجش شد [۱۸]. غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد با BSA به عنوان استاندارد تعیین شد [۲۳].

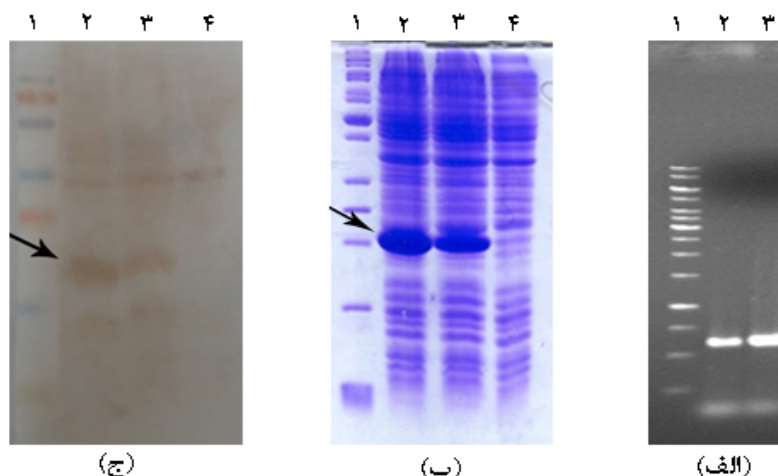
شد. برای لیز سلولی از بافر نمونه حاوی ۸۰ میلی‌مولار (pH ۶/۸) Tris-HCl سدیم دو دسیل سولفات ۲ درصد، گلیسرول ۱۰ درصد و معرف برموفنول آبی ۰/۲ درصد استفاده شد.

جهت مشاهده الگوی پروتئینی، نمونه‌ها بر روی ژل پلی‌آکرلامید (۱۲/۵ درصد) الکتروفورز و توسط محلول کوماسی بلورنگ آمیزی شدند. به منظور اجرای وسترن بلات، پروتئین‌های تفکیک‌شده بر روی ژل در مجاورت با غشای PVDF با شدت جریان ۲۰۰ میلی‌آمپر قرار گرفتند. بعد از اتمام انتقال پروتئین‌ها، غشا در محلول BSA غوطه‌ور شد. سپس غشا به داخل محلول آنتی‌بادی T7 tag و بافر TBS به نسبت ۱ به ۱۰۰۰ قرار گرفت. پس از شست‌وشو با بافر فوق، غشا به مدت یک ساعت در محلول حاوی آنتی‌بادی ضد T7 tag (HRP) و بافر TBS به نسبت ۱ به ۲۵۰۰ قرار داده شد. در نهایت جهت آشکارسازی پروتئین‌های منتقل‌شده بر روی غشا از محلول سوبسترای آنزیم پراکسیداز

	۶۲ ۶۳	۷۷ ۷۹																																																									
	▼▼	▼▼																																																									
1USF	Y	P	G	V	P	A	V	G	V	R	V	E	E	R	V	N	F	C	P	A	V	W	N	T	G	L	S	A	D	P	P	L	F	G	V	S	I	S	P	K	R	F	T	H	G	L	L	L	K	A	R	R	F	S	A	S	F	H	P
3ZOE	Y	P	G	V	P	A	V	G	V	R	V	E	E	R	V	N	F	C	P	A	V	W	N	T	G	L	S	A	D	P	P	L	F	G	V	S	I	S	P	K	R	F	T	H	G	L	L	L	K	A	R	R	F	S	A	S	F	H	P
3PFT	P	S	G	V	I	A	I	A	E	V	-	D	G	T	R	V	G	L	A	A	S	T	F	V	P	S	L	E	P	P	L	V	A	F	A	V	Q	N	S	S	T	T	W	P	K	L	K	D	L	P	S	L	G	I	S	V	L	G	
DszD	P	A	G	V	T	V	T	L	D	S	-	G	T	G	P	V	G	F	T	A	T	S	F	S	S	V	S	L	E	P	P	L	V	S	F	N	I	A	E	T	S	S	I	N	A	L	K	A	E	S	L	V	I	H	L	L	G		
3CB0	A	G	A	V	Q	I	V	T	T	A	G	-	A	A	G	R	R	G	L	T	L	T	A	A	C	S	V	S	D	N	P	P	T	I	L	I	C	L	Q	K	I	H	E	E	N	R	I	F	I	E	N	G	V	F	A	I	N	T	L
3K88	S	T	P	V	T	V	V	A	T	N	G	-	P	F	G	L	A	G	L	T	C	S	A	V	C	S	V	C	D	R	P	P	T	V	L	L	C	I	N	R	K	S	Y	A	A	G	I	I	K	S	N	G	V	L	S	V	N	W	L
2D37	P	L	G	V	A	I	V	T	T	N	W	-	K	G	E	L	V	G	M	T	V	N	T	F	N	S	L	S	L	N	P	P	L	V	S	F	F	A	D	R	M	K	G	N	D	I	P	Y	K	E	S	K	Y	F	V	V	N	F	T
4XJ2	A	T	G	V	T	V	T	T	A	G	-	P	Q	G	P	L	G	M	T	V	N	S	F	S	S	V	S	L	E	P	P	L	V	L	W	C	P	A	R	T	S	A	R	H	A	A	F	A	E	A	G	A	W	S	V	H	V	L	G
3RH7	A	T	G	V	T	V	T	A	S	D	A	A	G	K	P	I	G	F	T	A	N	S	F	T	S	V	S	L	D	P	P	L	L	L	V	C	L	A	K	S	S	R	N	Y	E	S	M	T	S	A	G	R	F	A	I	N	V	L	S
4L82	T	A	S	L	T	S	V	S	L	K	P	P	L	I	L	F	C	L	N	K	N	S	F	S	I	N	S	F	Q	K	S	D	K	F	A	V	S	I	L	A	E	N	Q	I	D	I	S	K	H	F	A	K	S	Q	P	N	K	F	T



تصویر ۱. نتایج هم‌ترازی توالی آمینو اسیدهای آنزیم فلاوین ردوکتاز DszD با آنزیم‌های همولوگ



تصویر ۲. الف. ژل آگارز: ستون ۱: نشانگر مولکولی نوع یک کیلو جفت باز، ستون ۲: محصول RCP ژن Dszd فاقد جهش به طول ۶۰۰ جفت باز و ستون ۳: محصول نهایی RCP-gniEOS واجد جهش در موقعیت آلانین ۷۷ به طول ۶۰۰ جفت باز. ب. ژل EGAP-SDS: ستون ۱: نشانگر مولکولی پروتئین، ستون ۲: سویه نوترکیب نوع وحشی و ستون ۳: سویه نوترکیب جهش‌یافته. ستون ۴: سویه حاوی پلاسمید غیرنوترکیب، ج. نتایج وسترن بلات نمونه‌های تصویر ب که در ستون ۲ و ۳ باند مربوط به آنزیم فلاوین ردوکتاز DszD به ترتیب نوع وحشی و جهش‌یافته قابل رؤیت است.

یافته‌ها

استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک جهت حذف اختصاصی گوگرد از سوخت‌های فسیلی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. تاکنون در این راستا پیشرفت‌های قابل توجهی حاصل شده است، به‌ویژه آنکه در رابطه با بررسی و ارزیابی مکانیسم‌های گوگردزدایی باکتریایی دستاوردهای مهمی نیز کسب شده است [۲۴]. اگرچه در اغلب تحقیقاتی که تاکنون انجام شده است، کوشش‌ها مبتنی بر استفاده از روش‌های میکروبیولوژی و بیوشیمیایی بوده است، آنچه که بیش از همه جلب توجه کرده است، مسیر متابولیکی و بسیار اختصاصی 4S در میکروارگانیزم هوازی رودوکوکوس اریتروپولیس سویه IGTS8 است که بدون آسیب به شبکه کربنی، قادر به حذف گوگرد از ترکیبات نفتی است [۲۵].

در فرایند 4S، آنزیم فلاوین ردوکتاز DszD به سهم خود یک آنزیم محدودکننده سرعت فرایند گوگردزدایی است و به عنوان آنزیم کلیدی نقش اصلی را به عهده داشته و میزان قدرت آن بر سرعت انتقال اکسیداتیو اثر مستقیم دارد. با توجه به اینکه در صنعت، هدف این است که با صرف انرژی کمتر و زمان کوتاه‌تر بتوان به راندمان مناسب دست یافت، بنابراین می‌توان به آنزیم فلاوین ردوکتاز DszD به عنوان یکی از عوامل کاتالیتیکی مؤثر در زنجیره حذف گوگرد روی آورد. اما از آنجا که قدرت این کاتالیزور زیستی در شرایط عادی پایین است [۲۶]، از طریق ایجاد جهش هدفمند و منطقی در کیفیت آمینو اسیدهای متصل به سوپسترا و مؤثر در کاتالیز که در جایگاه فعال آنزیمی قرار گرفته باشند، می‌توان به مولکول زیستی با ویژگی‌های مطلوب و قابلیت‌های مورد انتظار دست یافت [۲۷].

چن و همکاران مولکول جهش‌یافته جدیدی از آنزیم ایزوپنتیل دی فسفات ایزومراز به وسیله روش ترکیبی جهش‌زایی هدفمند و جهش‌زایی تصادفی ایجاد کردند. در این آنزیم، آمینو اسیدهای تیروزین ۱۹۵، تربیتوفان ۲۵۶ و لیزین ۱۴۱ به ترتیب با آمینو اسیدهای فنیل آلانین، سیستئین و هیستیدین جایگزین شدند. نتایج این مطالعه افزایش فعالیت کاتالیتیک آنزیم جهش‌یافته نسبت آنزیم نوع وحشی به میزان ۲/۱ برابر را نشان داد. علاوه بر آن افزایش پایداری در pH، ارتقای پایداری دمایی و نیمه عمر طولانی‌تر به عنوان اثرات دیگر جهش‌یافته‌ی گزارش شد [۲۸].

دوان و همکاران نیز مولکول‌های موتانت متعددی از آنزیم پولولاناز ایجاد کردند که فعالیت کاتالیتیکی، پایداری دمایی و قدرت اتصال به سوپسترا در آن‌ها نسبت به آنزیم نوع وحشی بهبود یافته بود [۲۹]. در مطالعه قبلی ما، ترئونین موجود در موقعیت ۶۲ آنزیم با آمینو اسید اسپارژین جایگزین شد و به دلیل نزدیک شدن آمینو اسید اسپارژین به حلقه ایزوالکسازین در سوپسترای FMN نسبت به ترئونین، افزایش در سرعت انتقال الکترون و در نتیجه افزایش فعالیت آنزیم فلاوین ردوکتاز DszD گزارش شد [۱۸].

در این مطالعه، فعالیت آنزیمی بعد از ایجاد جهش هدفمند

جست‌وجوی توالی آمینو اسید آنزیم فلاوین ردوکتاز DszD در پایگاه داده پروتئینی، مولکول‌های همولوگ با ساختمان کریستالوگرافی مشخص را معرفی کرد. مولکول‌های همولوگ با بالاترین شباهت ساختاری به آنزیم هدف و متصل به سوپسترای FMN، به عنوان الگوی مناسب جهت شناسایی موقعیت‌های کلیدی، انتخاب شدند. نتایج هم‌ترازی توالی آمینو اسیدهای آنزیم DszD با مولکول‌های همولوگ انتخاب شده، نشان داد جایگاه فعال آنزیم هدف دارای چهار موقعیت کلیدی جهت اتصال به سوپسترای FMN است که عبارت‌اند از: ترئونین ۶۲، سرین ۶۳، اسپارژین ۷۷ و آلانین ۷۹ (تصویر شماره ۱).

تکثیر ژن dszD نوع وحشی و جهش‌یافته و همسانه‌سازی آن

تکثیر ژن dszD نوع وحشی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی DszD-F و DszD-R انجام شد (تصویر شماره ۲). (الف) ستون ۱). همچنین ژن dszD جهش‌یافته در موقعیت ۷۷ با استفاده از پرایمر جهش‌زا حاصل شد. برای این منظور قطعات آمپلیکون حاصل از PCRهای اول و دوم، تخلیص و به عنوان الگو برای PCR سوم قرار گرفتند (تصویر شماره ۲). (الف) ستون ۲). پس از هضم آنزیمی و کتور PET-23a (+) و قطعات تکثیر شده نهایی، هر کدام به صورت جداگانه به منظور تولید پلاسمید نو ترکیب طی واکنش اتصال به هم متصل شدند. نتایج توالی‌یابی صحت همسانه‌سازی را تأیید کرد.

پلاسمیدهای نو ترکیب حاوی ژن نوع وحشی و جهش‌یافته هر کدام به صورت جداگانه به سویه بیانی E.coli BL21 (DE3) منتقل شدند. نتایج آزمایشگاهی بیان مناسب ژن‌های همسانه‌سازی شده مدنظر را نشان داد که دارای باند مشخص بر روی ژل پلی‌آکریلامید با وزن مولکولی ۲۴ کیلو دالتون هستند (تصویر شماره ۲). "ب". آنالیز وسترن بلات، حضور سطح معنی‌دار بیان آنزیم فلاوین ردوکتاز DszD نو ترکیب وحشی و جهش‌یافته را تأیید کرد (تصویر شماره ۲). "ج".

بررسی قدرت کاتالیتیکی آنزیم فلاوین ردوکتاز DszD نوع وحشی و جهش‌یافته

نتایج مقایسه میانگین قدرت کاتالیتیکی آنزیم فلاوین ردوکتاز DszD نوع وحشی و جهش‌یافته نشان داد آنزیم جهش‌یافته دارای قدرت کاتالیتیکی به میزان 392 ± 6 یونیت بر میلی گرم است که نسبت به آنزیم نوع وحشی (160 ± 4) یونیت بر میلی گرم) به میزان ۲/۵ برابر افزایش فعالیت دارد.

بحث

امروزه به دلیل تصویب قوانین سخت‌گیرانه زیست‌محیطی،

حامی مالی

این مطالعه بدون هرگونه حمایت مالی صورت گرفته است.

مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی، تحقیق و بررسی، ویراستاری و نهایی‌سازی نوشته: کلیه نویسندگان.

تعارض منافع

نویسندگان تصریح می‌کنند هیچ‌گونه تضاد منافی در این پژوهش وجود ندارد.

در آمینو اسید اسپارژین موقعیت ۷۷ به عنوان یکی از باقی‌مانده‌های کلیدی دیگر در جایگاه فعال آنزیم بررسی شد. نتایج آزمایشگاهی نشان داد که آنزیم جهش‌یافته در مقایسه با آنزیم نوع وحشی از قدرت کاتالیتیکی بالاتری برخوردار است. در آنزیم جهش‌یافته مدنظر، زنجیره جانبی قطبی موجود در اسپارژین که دارای گروه آمین و کربنیل است، جایگزین گروه غیرقطبی حلقه بنزنی شده است و توالی آمینو اسیدی Phe76-Asn77-Ile78 در آنزیم تیپ وحشی به Phe76-Asn77-Ile78 در آنزیم جهش‌یافته تغییر یافته است.

نتایج سنجش فعالیت بیولوژیک نشان داد فعالیت آنزیم جهش‌یافته در مقایسه با فعالیت آنزیم نوع وحشی به میزان ۲/۵ برابر افزایش یافته است. با توجه به اینکه آمینو اسید فنیل آلانین، غیرقطبی و فاقد هرگونه بار اسیدی و بازی است، بنابراین نمی‌توان مستقیماً برای آن در اتصال به سوبسترا نقشی قائل شد. از طرفی قرار گرفتن دو آمینو اسید حجیم فنیل آلانین در مجاورت یکدیگر، منجر به تاخوردگی آن‌ها به سمت داخل مولکول شده و می‌تواند احتمال در معرض قرار گرفتن آمینو اسیدهای قطبی مجاور آن‌ها را افزایش دهد و با ایجاد فضای بازتر در جایگاه فعال آنزیم به جای‌گیری مناسب و سریع‌تر FMN قطبی کمک کند. از آنجا که منابع متعدد، موقعیت ترئونین ۶۲ را با اهمیت و دارای نقش کلیدی در انتقال مستقیم هیدرید جهت انجام فعالیت اکسیدوردوکتازی آنزیم معرفی کرده‌اند [۱۷، ۱۸]، این فرضیه ایجاد می‌شود که با در معرض قرار گرفتن بیشتر آمینو اسیدهای قطبی، امکان اتصال مناسب‌تر سوبسترا در جایگاه فعال فراهم شده و در نتیجه فعالیت اکسیدوردوکتازی آنزیم افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان می‌دهد که آنزیم مدنظر، پتانسیل مناسبی جهت افزایش قدرت کاتالیتیکی در مسیر 4S دارد. بنابراین، جهش هدفمند در آنزیم فلاوین ردوکتاز DszD و فعالیت آن در سلول‌های میزبان نوترکیب می‌تواند باعث افزایش راندمان فرایند گوگردزایی با استفاده از سیستم باکتریایی شود. پیشنهاد می‌شود که مولکول جهش‌یافته واجد جهش در چندین موقعیت کلیدی، تولید شود و قدرت کاتالیتیکی آن با جهش‌یافته‌های گزارش‌شده، مقایسه شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه با کد IR.NIGEB.EC.1398.6.24 A به تأیید کمیته اخلاق پژوهشی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری رسیده است. این مطالعه فاقد نمونه انسانی و هرگونه شرکت‌کننده است؛ بنابراین نیازی به رضایت‌نامه نبود. مطالعه صرفاً بر روی آنزیم صنعتی انجام شده است.

References

- [1] Etemadi N, Sepahy AA, Mohebal G, Yazdian F, Omid M. Enhancement of bio-desulfurization capability of a newly isolated thermophilic bacterium using starch/iron nanoparticles in a controlled system. *Int J biol macromol*. 2018; 120:1801-9. [DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.110] [PMID]
- [2] Kilbane II JJ. Microbial biocatalyst developments to upgrade fossil fuels. *Curr Opin Biotechnol*. 2006; 17(3):305-14. [DOI:10.1016/j.copbio.2006.04.005] [PMID]
- [3] Chen S, Zhao C, Liu Q, Zang M, Liu C, Zhang Y. Thermophilic biodesulfurization and its application in oil desulfurization. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018; 102(21):9089-103. [DOI:10.1007/s00253-018-9342-5] [PMID]
- [4] Nuhu AA. Bio-catalytic desulfurization of fossil fuels: A mini review. *Rev in Envir Sci Bio/Technol*. 2013; 12(1):9-23. [DOI:10.1007/s11157-012-9267-x]
- [5] Morrison E, Kantz A, Gassner GT, Sazinsky MH. Structure and mechanism of styrene monooxygenase reductase: New insight into the FAD-transfer reaction. *Biochem*. 2013; 52(35):6063-75. [DOI:10.1021/bi400763h] [PMID] [PMCID]
- [6] Gupta N, Roychoudhury P, Deb J. Biotechnology of desulfurization of diesel: Prospects and challenges. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005; 66(4):356-66. [DOI:10.1007/s00253-004-1755-7] [PMID]
- [7] Davoodi-Dehaghani F, Vosoughi M, Ziaee AA. Biodesulfurization of dibenzothiophene by a newly isolated *Rhodococcus erythropolis* strain. *Bioresour Technol*. 2010; 101(3):1102-5. [DOI:10.1016/j.biortech.2009.08.058] [PMID]
- [8] Zhang M, Zhu W, Xun S, Li H, Gu Q, Zhao Z, et al. Deep oxidative desulfurization of dibenzothiophene with POM-based hybrid materials in ionic liquids. *Chem engineer J*. 2013; 220:328-36. [DOI:10.1016/j.cej.2012.11.138]
- [9] Xiao J, Wang X, Fujii M, Yang Q, Song C. A novel approach for ultra-deep adsorptive desulfurization of diesel fuel over $\text{TiO}_2\text{-CeO}_2\text{/MCM-48}$ under ambient conditions. *AIChE J*. 2013; 59(5):1441-5. [DOI:10.1002/aic.14085]
- [10] Borzenkova N, Veselova I, Shekhovtsova T. Biochemical methods of crude hydrocarbon desulfurization. *Biol Bull Rev*. 2013; 3(4):296-311. [DOI:10.1134/S2079086413040026]
- [11] Sucharitakul J, Tinikul R, Chaiyen P. Mechanisms of reduced flavin transfer in the two-component flavin-dependent monooxygenases. *Arch biochem biophys*. 2014; 555-556:33-46. [DOI:10.1016/j.abb.2014.05.009] [PMID]
- [12] Nazari F, Kefayati M, Raheb J. The study of biological technologies for the removal of sulfur compounds. *J Sci, Islam Repub Iran*. 2017; 28(3):205-19.
- [13] Karimi E, Yazdian F, Rasekh B, Jeffryes C, Rashedi H, Akhavan Sepah A, et al. DBT desulfurization by decorating bacteria using modified carbon nanotube. *Fuel*. 2018; 216:787-95. [DOI:10.1016/j.fuel.2017.10.030]
- [14] Khosravina S, Mahdavi MA, Gheshlaghi R, Dehghani H, Rasekh B. Construction and characterization of a new recombinant vector to remove sulfate repression of dsz promoter transcription in biodesulfurization of dibenzothiophene. *Frontiers Microbiol*. 2018; 9(1578):1-9. [DOI:10.3389/fmicb.2018.01578] [PMID] [PMCID]
- [15] Martínez I, Mohamed ME-S, Santos VE, García JL, García-Ochoa F, Díaz E. Metabolic and process engineering for biodesulfurization in Gram-negative bacteria. *J biotechnol*. 2017; 262:47-55. [DOI:10.1016/j.jbiotec.2017.09.004] [PMID]
- [16] Sousa SrF, Sousa JF, Barbosa AC, Ferreira CE, Neves RP, Ribeiro AJ, et al. Improving the biodesulfurization of crude oil and derivatives: A QM/MM investigation of the catalytic mechanism of NADH-FMN oxidoreductase (DszD). *J Physical Chem*. 2016; 120(27):5300-6. [DOI:10.1021/acs.jpca.6b01536] [PMID]
- [17] Ferreira P, Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ. Improving the catalytic power of the DszD enzyme for the biodesulfurization of crude oil and derivatives. *Chem Eur J*. 2017; 23(68):17231-41. [DOI:10.1002/chem.201786864] [PMID]
- [18] Kamali N, Tavallaie M, Bambai B, Karkhane AA, Miri M. Site-directed mutagenesis enhances the activity of NADH-FMN oxidoreductase (DszD) activity of *Rhodococcus erythropolis*. *Biotechnol Letters*. 2010; 32(7):921-7. [DOI:10.1007/s10529-010-0254-4] [PMID]
- [19] Magrane M, Consortium U. UniProt knowledgebase: A hub of integrated protein data. *Nat Prec*. 2010. [DOI:10.1038/npre.2010.5092]
- [20] Young L, Smith HO, Gibson DG. In vitro recombination method. San Diego: Google Patents; 2017.
- [21] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- [22] Schägger H. Tricine-sds-page. *Nat Protoc*. 2006; 1(1):16-22. [DOI:10.1038/nprot.2006.4] [PMID]
- [23] Kruger NJ. *The Bradford method for protein quantitation. The protein protocols handbook*. Berlin: Springer; 2002. [DOI:10.1385/1-59259-169-8:15]
- [24] Wang J, Butler III RR, Wu F, Pombert JF, Kilbane II JJ, Stark BC. Enhancement of microbial biodesulfurization via genetic engineering and adaptive evolution. *PLoS One*. 2017; 12(1):e0168833. [DOI:10.1371/journal.pone.0168833] [PMID] [PMCID]
- [25] Akhtar N, Ghauri MA, Akhtar K. Dibenzothiophene desulfurization capability and evolutionary divergence of newly isolated bacteria. *Arch Microbiol*. 2016; 198(6):509-19. [DOI:10.1007/s00203-016-1209-5] [PMID]
- [26] Rangra S, Kabra M, Gupta V, Srivastava P. Improved conversion of Dibenzothiophene into sulfone by surface display of Dibenzothiophene monooxygenase (DszC) in recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. 2018; 287:59-67. [DOI:10.1016/j.jbiotec.2018.10.004] [PMID]
- [27] Vollhardt KPC, Schore NE. *Organic chemistry; Palgrave version: Structure and function: Macmillan international higher education*. New York: W H Freeman; 2014. [DOI:10.1007/978-1-319-19197-9_2]
- [28] Chen H, Li M, Liu C, Zhang H, Xian M, Liu H. Enhancement of the catalytic activity of Isopentenyl Diphosphate Isomerase (IDI) from *Saccharomyces cerevisiae* through random and site-directed mutagenesis. *Microbial Cell Factories*. 2018; 17(1):1-14. [DOI:10.1186/s12934-018-0913-z] [PMID] [PMCID]
- [29] Duan X, Chen J, Wu J. Improving the thermostability and catalytic efficiency of *Bacillus deramificans* pullulanase by site-directed mutagenesis. *Appl Environ Microbiol*. 2013; 79(13):4072-7. [DOI:10.1128/AEM.00457-13] [PMID] [PMCID]

This Page Intentionally Left Blank