

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها  
سال ششم، شماره 22، تابستان 1396، صفحه 59-76  
تاریخ دریافت: 1394/10/14 - تاریخ پذیرش:  
1395/04/13

## بررسی مقایسه‌ای ویژگی‌های ساختاری، عملکردی و دامنه‌میزبانی آنزیم‌ها و پروتئین‌های مؤثر در تولید و تجمع لیپید در منابع بیودیزلی

**نجمه فرمناز:** کارشناس ارشد میکروبیولوژی، علوم و تحقیقات خراسان رضوی، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران، najme.farmanbar@yahoo.com  
**علی‌اکبر حداد مشهد ریزه\*:** استادیار سلولی و مولکولی، گروه سلولی و مولکولی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، a.haddad@um.ac.ir  
**جعفر همت:** استادیار ژنتیک مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی- سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران- تهران- ایران، j.hemmat@gmail.com

### چکیده

**مقدمه:** بیودیزل، سوختی زیستی با قابلیت اشتقاق از اسیدهای چرب انباشته‌شده در سلول‌های جانوری، گیاهی، جلبک‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها، ضمن تجدیدپذیری، زیست‌تخریب‌پذیر است که گوگرد و ترکیبات آروماتیک ندارد. بنابراین راهکارهای گسترده‌ای به منظور توسعه و افزایش راندمان تولید چربی در منابع بیودیزلی در دستور کار است که در این میان فناوری‌های نوین زیستی مبتنی بر کاربری مکانیسم‌های مولکولی مرتبط می‌تواند راهگشا باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش بررسی مکانیسم‌های مولکولی و آنزیم‌های کلیدی دخیل در تولید و تجمع لیپید در منابع بیودیزلی مبتنی بر مرور منابع و داده‌پردازی‌های رایانه‌ای در دستور کار قرار گرفت. بررسی ویژگی‌های ساختاری، عملکردی و دامنه‌میزبانی با استفاده از برنامه‌های 5 InterProScan، Motif scan، Conserved Domain، Protein Blast، Sulfinator، NetPhos، NetNGlyc، GC content calculator، TMHMM، ProtParam و MEGA6 انجام شد.

**نتایج:** تجزیه و تحلیل مکانیسم‌های مولکولی مرتبط منجر به آشکارسازی دی‌آسیل‌گلیسرول‌آسیل‌ترانسفراز (DGAT)، واکس‌استر سنتتاز / دی‌آسیل‌گلیسرول‌آسیل‌ترانسفراز (WS/DGAT)، اولئوسین، MLDP و TadA به‌عنوان آنزیم‌ها و پروتئین‌های مؤثر در تولید و تجمع لیپید در جانداران مطرح بیودیزلی شد. بررسی ویژگی‌های ساختاری ژن‌های مسئول، ضمن آشکارسازی طول و محتوی CG متفاوت، پیوسته‌بودن ساختاری برخی از آنها را نشان داد؛ از سوی دیگر بررسی ویژگی‌های ساختاری آنزیم‌ها و پروتئین‌های ذکر شده با تعیین موقعیت سلولی آنها، حضور دمین‌های عملکردی Oleosin، UPF0089، DAGAT، MBOAT و آپولیپوپروتئین را در این آنزیم‌ها نشان داد. همچنین، قابلیت تأثیرپذیری تمامی آنزیم‌های انتخابی از تغییرات پس از ترجمه در این پژوهش مشخص شد؛ علاوه بر این، آشکارسازی دامنه‌میزبانی آنزیم‌ها و پروتئین‌های ذکر شده، منجر به معرفی گونه‌های *Dunaliella parva*، *Ricinus communis*، *Vernicia fordii*، *Rhodococcus wratislaviensis* و *Rhodococcus imtechensis*، *Saitoella complicata*، *Thalassiosira pseudonana* با قابلیت احتمالی تولید بالای چربی، به‌عنوان منابع نوین بیودیزلی شد.

\* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

**بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از این پژوهش ضمن معرفی دمین‌ها و موتیف‌های عملکردی مؤثر در مسیر سنتز بیودیزل، منجر به آشکارسازی جانداران توانا با قابلیت احتمالی تولید این نوع از سوخت زیستی شد که باید در شرایط آزمایشگاهی مورد آزمون‌های بیشتری قرار گیرند.

**واژه‌های کلیدی:** بیودیزل، جانداران روغنی، DGAT، WS/DGAT، Oleosin، MLDP، TadA

## مقدمه

بر اساس گزارش‌ها سوخت‌های فسیلی موجود در جهان، در آینده نزدیک به طور کلی تمام خواهند شد؛ از طرفی استفاده از این نوع از سوخت‌ها عامل انتشار بیشترین میزان گازهای گلخانه‌ای و گرم شدن زمین است (1). علاوه بر مخاطرات زیست‌محیطی، محدود بودن منابع، تغییرات زیاد قیمت نفت در بازارهای جهانی و چالش‌های ناشی از آن بر اقتصاد جهانی از دیگر مشکلات استفاده از این نوع از سوخت‌ها است (2 و 3)؛ بنابراین نیاز مبرمی به سیاست‌گذاری‌های صحیح و برنامه‌ریزی‌های خرد و کلان در جهت کارهای پژوهشی و ارائه راهکارهای مناسب و جدید به منظور جایگزینی این نوع از سوخت‌ها است. در این راستا، سوخت‌های زیستی یکی از انتخاب‌های کلیدی برای جایگزینی هستند. برخلاف سوخت‌های فسیلی، احتراق این نوع از سوخت‌ها ترکیبات آلوده‌کننده مانند مونوکسید کربن، اکسیدهای گوگرد، ذرات معلق و ترکیبات فرار را تولید نمی‌کند؛ در نتیجه باعث کاهش آلودگی و پایین آمدن سطح  $CO_2$  اتمسفر و به دنبال آن، کاهش گرمی هوا می‌شوند (1)؛ از سوی دیگر، این نوع از سوخت‌ها زیست‌تخریب‌پذیر و تجدیدپذیر است و ضمن رفع آلودگی‌های زیست‌محیطی، محدودیت استفاده نخواهند داشت (1)؛ بنابراین با جایگزین کردن این نوع از سوخت‌ها می‌توان بر مشکلات ناشی از سوخت‌های

فسیلی فائق آمد. بیودیزل، بیواتانول، بیهیدروژن و بیوگاز از جمله سوخت‌های زیستی هستند که امروزه پژوهش‌های بسیار زیادی را به خود اختصاص داده و کارآمدی آنها نیز نشان داده شده است (4). در این میان بیودیزل، سوخت زیستی مشتق شده از اسیدهای چرب سلول‌های گیاهی، جانوری و یا باکتریایی جایگاه ویژه‌ای پیدا کرده است (5). بیودیزل ضمن آنکه ویسکوزیته‌ای مشابه با دیزل نفتی دارد، نقطه اشتعالی بالاتر، خوردگی پایین‌تر و انرژی بسیار بیشتری نسبت به آنها دارد؛ بنابراین ضمن آنکه حمل و نقل و ذخیره‌سازی آن ایمن‌تر است، باعث افزایش عمر مفید موتور و قدرت آن در حجم کم سوخت‌گیری خواهد شد (6). حیوانات، گیاهان، جلبک‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها منابع زیستی تأمین‌کننده بیودیزل هستند (7 و 8). صرف نظر از ناکارآمدی سلول‌های حیوانی به عنوان منبع تولیدکننده بیودیزل (9)، دانه‌های روغنی گیاهان، کارآمدی بالایی در تولید این نوع سوخت زیستی نشان داده‌اند (9). با وجود این، ناپایداری بیودیزل حاصله، سطح زیر کشت بالا، مخاطرات زیست‌محیطی ناشی از کشت و داشت گیاهی و همچنین صرف ذخایر آبی، استفاده از آنها را در بسیاری از کشورها که از نظر آب و زمین با محدودیت‌هایی مواجه‌اند، به چالش کشیده است (10 و 11)؛ بنابراین میکروارگانیسم‌های روغنی مانند ریزجلبک‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها گزینه‌های بسیار

گیاهان، *Phaeodactylum tricornutum* و *Yarrowia lipolytica* از جلبک‌ها، *Dunaliella salina* از مخمرها و *Rhodococcus opacus* از باکتری‌ها بررسی و ژن‌های کلیدی مرتبط شامل *oleosin1*، *DGAT1-1* از *Jatropha curcas*، *DGAT1-2* از *Yarrowia lipolytica*، *MLDP* از *Phaeodactylum tricornutum*، *Tada atf1* از *Dunaliella salina* و *PD630 opacus* انتخاب شدند.

**استحصال توالی‌ها:** توالی نوکلئوتیدی ژن‌های انتخابی با شماره‌های شناسایی EU234462، JQ319812.1 مربوط به *Jatropha curcas*، HQ589265 مربوط به *Phaeodactylum tricornutum*، XM\_504700 مربوط به *Yarrowia lipolytica*، JQ011391 مربوط به *Dunaliella salina*، HM625859، GQ923886 مربوط به *Rhodococcus opacus PD630* و شماره‌های دستیابی پروتئینی AFV61669.1، ABW90148.2 مربوط به *Jatropha curcas*، ADY76581.1 مربوط به *Phaeodactylum tricornutum*، XP\_504700.1 مربوط به *Yarrowia lipolytica*، AEW43285.1 مربوط به *Dunaliella salina*، ACX81314.1، ADK91819.1 مربوط به *Rhodococcus opacus PD630* از پایگاه‌های اطلاعات ژنی و پروتئینی<sup>1</sup> NCBI استحصال شدند.

**تجزیه و تحلیل ویژگی‌های ساختاری و عملکردی توالی‌های انتخابی:** پایش توالی‌های نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن‌های انتخابی از نظر اندازه با استفاده از داده‌های موجود در پایگاه اطلاعات ژنی و پروتئینی NCBI انجام شد. در همین راستا، آشکارسازی دامین‌های عملکردی این توالی‌ها با استفاده از برنامه‌های تحت شبکه<sup>2</sup> InterProScan 5<sup>2</sup>، Motif scan<sup>3</sup> و پایگاه<sup>4</sup> Conserved

مطلوب‌تری برای تولید بیودیزل هستند که توجه زیادی را در سراسر جهان به خود جلب کرده‌اند. ریزجلبک‌ها رشد سریع‌تری نسبت به گیاهان دارند و نیازمند زمین‌های زراعی، آب و آفت‌کش‌ها همانند گیاهان نیستند و از سوئی بازده تولید لیپید در آنها بالاتر است (12). مخمرها نیز زمان تکثیر کوتاه، تحمل‌پذیری بیشتر به شرایط آب‌وهوایی نسبت به گیاهان، رشد و گسترش آسان‌تر نسبت به ریزجلبک‌ها (13) و قابلیت تولید لیپید از منابع مختلف کربن (14) را دارند؛ با وجود این، باکتری‌ها برخلاف بازدهی کمتر در تولید لیپید به‌علت سرعت رشد بالا، روش کشت ساده و دست‌ورزی‌های ژنتیکی آسان‌تری بیشتری در تولید بیودیزل نسبت به آنها دارند (8 و 15). صرف‌نظر از قابلیت منابع تولیدکننده بیودیزل، مهندسی ژنتیک و مهندسی متابولیک از جمله راهکارهای افزایش بازده تولید لیپید در سلول‌ها به‌منظور بهینه‌سازی عملکرد آنها در جهت تولید این محصول است (15 و 16) که این مهم مستلزم درک متابولسم لیپید و مکانیسم‌های مولکولی مؤثر در جانداران تولیدکننده بیودیزل است؛ بنابراین بررسی مکانیسم‌های مولکولی و آنزیم‌های مؤثر در فرایند، نظیر ویژگی‌های ساختاری، عملکردی، فیزیکوشیمیایی و نیز تعیین دامنه‌میزبانی، منجر به ارائه راهکارهایی در جهت طراحی سازه‌های نوین ژنی با قابلیت افزایش میزان تولید و تجمع چربی خواهد شد؛ همچنین آشکارسازی منابع نوینی از جانداران روغنی را فراهم خواهد آورد که در این پژوهش در دستور کار قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

**جمع‌آوری داده‌ها:** با هدف آشکارسازی ژن‌های دخیل در تجمع لیپید، مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با این فرایند در جانداران روغنی شامل *Jatropha curcas* از

بررسی ویژگی‌های ساختاری آنزیم دی‌آسیل‌گلیسرول‌آسیل‌ترانسفراز (DGAT) و پروتئین‌تجمعی در جانداران روغنی: نتایج حاصل از پایش ویژگی‌های ساختاری ژن‌های کدگذار آنزیم DGAT جانداران روغنی انتخابی، منجر به آشکارسازی طول متفاوت این ژن‌ها و پیوسته‌بودن آنها به‌جز در *DGAT1-1* شد. در همین راستا محتوی GC این ژن‌ها در محدوده 73 تا 86 تعیین و بررسی تغییرات پس از ترجمه محصول پروتئینی آنها منجر به معرفی حضور جایگاه‌های گلیکوزیلاسیون و فسفوریلاسیون در تمامی موارد و جایگاه سولفوریلایسیون تنها در آنزیم *DGAI* شد (جدول 1).

نتایج حاصل از بررسی ویژگی‌های ساختاری ژن‌های کدگذار پروتئین‌تجمعی جانداران روغنی انتخابی نیز طول متفاوت این ژن‌ها و پیوسته‌بودن آنها را مشخص کرد. در همین راستا محتوی GC این ژن‌ها در محدوده 73 تا 83 تعیین شد و بررسی تغییرات پس از ترجمه محصول پروتئینی آنها منجر به آشکارسازی جایگاه فسفوریلاسیون در تمامی موارد و جایگاه سولفوریلایسیون تنها در پروتئین *Oleosin1* شد (جدول 2).

Domain به‌طور جداگانه انجام شد؛ همچنین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی این توالی‌ها با استفاده از برنامه ProtParam موجود در بانک اطلاعاتی ExPASy<sup>5</sup> تعیین شد. جهت تعیین و پیش‌بینی ویژگی‌های توپولوژی پروتئین‌ها برنامه TMHMM<sup>6</sup> استفاده شد. محتوی GC با استفاده از برنامه GC content calculator<sup>7</sup> تعیین گردید. تغییرات پس از ترجمه شامل گلیکوزیلاسیون، فسفوریلاسیون و سولفوریلایسیون به‌ترتیب با استفاده از برنامه‌های NetPhos<sup>9</sup>، NetNGlyc<sup>8</sup> و Sulfinator<sup>10</sup> انجام شد.

همگون‌یابی و قرابت‌یابی توالی‌ها: تعیین پراکنش دامنه میزبانی توالی آنزیم‌های انتخابی با استفاده از برنامه تحت شبکه Protein Blast<sup>11</sup> مبتنی بر ماتریکس‌های PAM250 و BLUSUM45 انجام شد. نتایج حاصل براساس ارزش E، درصد همسانی و هم‌پوشانی ارزیابی و قرابت توالی‌های انتخابی همگون با استفاده از نسخه 6 برنامه MEGA6 انجام و خوشه‌بندی توالی‌ها براساس الگوریتم Neighbor-Joining انجام شد.

## نتایج

جدول 1- ویژگی‌های ساختاری ژن‌های آنزیم DGAT جانداران روغنی

ردیف	نام ژن	طول ژن (bp)	محتوی %GC	اندازه پروتئین (aa)	PTM		
					گلیکوزیلاسیون	فسفوریلاسیون	سولفوریلایسیون
1	<i>DGAT1-1</i>	1566	73	504	+	+	-
2	<i>DGAT1-2</i>	1695	76	564	+	+	-
3	<i>DGAI</i>	1545	76	514	+	+	+
4	<i>atf1</i>	1389	86	462	+	+	-

جدول 2- ویژگی‌های ساختاری ژن‌های پروتئین‌تجمعی جانداران روغنی

PTM			اندازه پروتئین (aa)	محتوی %GC	طول ژن (bp)	نام ژن	ردیف
سولفوریل‌اسیون	فسفوریل‌اسیون	گلیکوزیل‌اسیون					
+	+	-	147	76	444	<i>Oleosin1</i>	1
-	+	-	282	73	849	<i>MLDP</i>	2
-	+	-	276	83	831	<i>TadA</i>	3

پروتئین تجمعی در جانداران انتخابی نیز منجر به آشکارسازی دامین‌های عملکردی Oleosin در گیاه *Jatropha curcas*، اپولیپوپروتئین در باکتری *Rhodococcus opacus PD630* شد؛ علاوه بر این، بررسی دامین‌ها و جایگاه‌های فعال مستقر در توالی پروتئینی ژن *MLDP* گونه *Dunaliella salina*، حضور دامین‌ها و جایگاه‌های فعال مرتبط با فرایندهای آمیداسیون، گلیکوزیل‌اسیون، فسفوریل‌اسیون و مریستیل‌اسیون را در آنها باعث شد (جدول 4).

بررسی ویژگی‌های عملکردی آنزیم (*DGAT*) و پروتئین تجمعی در جانداران روغنی: پایش ویژگی‌های عملکردی آنزیم *DGAT* در جانداران انتخابی با آشکارسازی دامین‌های مستقر در طول آنها انجام شد. نتایج حاصل از این بررسی منجر به معرفی دامین‌های عملکردی *MBOAT* در *Jatropha curcas* و *Phaeodactylum* و *DAGAT* در *Yarrowia lipolytica* و *UPF0089* در *Rhodococcus opacus PD630* شد (جدول 3). تجزیه و تحلیل ویژگی‌های عملکردی

جدول 3- ویژگی‌های عملکردی آنزیم *DGAT* جانداران روغنی.

ارزش E	عملکرد	نام دومین	موقعیت	نام	ردیف
1.5e-67	پروتئین‌های اسیل ترانسفرازی متصل به غشاء	MBOAT	153-474	<i>DGAT1-1</i>	1
1.1e-15	پروتئین‌های اسیل ترانسفرازی متصل به غشاء	MBOAT	275-552	<i>DGAT1-2</i>	2
7.2e-90	دی‌اسیل‌گلیسرول‌اسیل ترانسفراز	DAGAT	244-511/ 95-123	<i>DGA1</i>	3
4.4e-27	دومین اسیل-کوانزیم‌آسیل ترانسفراز-واکس استرسنتاز	UPF0089	15-271	<i>atf1</i>	4
0.0029	دامین متراکم سازی	Condensation	109-139		

جدول 4- ویژگی‌های عملکردی پروتئین تجمعی در جانداران روغنی

ارزش E	عملکرد	نام دومین	موقعیت	نام	ردیف
8.1e-60	پایداری اجسام لیپیدی	Oleosin	24-141	<i>Oleosin1</i>	1
.....	جایگاه امیداسیون	امیداسیون	53-56	<i>MLDP</i>	2
.....	جایگاه N-گلیکوزیل‌اسیون	ASN-گلیکوزیل‌اسیون	269-272		
.....	جایگاه فسفوریل‌اسیون کازئین کیناز 2	CK2-فسفو	102-105/ 270-273		
.....	جایگاه N-مریستیل‌اسیون	میریستیل	191-196	<i>TadA</i>	3
2.5e-12	.....	ALA-RICH	140-276		

0.0024	.....	اپولیپروتئین	4-236		
0.21	دخالته در ایمنی	ITAM	110-130		

نتایج حاصل از ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی توالی پروتئین‌های تجمعی انتخابی، مبین وزن مولکولی آنها در محدوده 15 تا 31 کیلودالتون، PH ایزوالکتریک (pI) 4/91 تا 10/28، آبگریزی منفی 0/355 تا مثبت 0/266، نیمه عمر بیش از 10 ساعت در تمامی موارد و شاخص ناپایداری 33/66 تا 34/77 و نیز شاخص آلیفاتیک آنها بین 84/78 تا 98/91 بود (جدول 5).

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آنزیم‌های DGAT و پروتئین‌های تجمعی در جانداران روغنی: نتایج حاصل از ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی توالی پروتئینی زن‌های آنزیم DGAT انتخابی، مبین وزن مولکولی آنها در محدوده 50 تا 65 کیلودالتون، pH ایزوالکتریک (pI) 8/68 تا 9/29، آبگریزی منفی 0/115 تا مثبت 0/215، نیمه عمر بیش از 10 ساعت در تمامی موارد، شاخص ناپایداری 43/9 تا 46/60 و نیز شاخص آلیفاتیک آنها بین 84/96 تا 99/33 بود (جدول 5). در همین راستا

جدول 5- برخی از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی توالی پروتئینی زن‌های آنزیم DGAT و پروتئین‌های تجمعی

ردیف	نام	وزن مولکولی	pI	آبگریزی	نیمه عمر	شاخص ناپایداری	شاخص آلیفاتیک
1	DGAT1-1	59601.9	8.93	0.215	>10 h	43.90	99.33
2	DGAT1-2	65222.1	9.21	0.097	>10 h	44.27	96.19
3	DGAT1	57789.0	8.68	-0.252	>10 h	44.60	84.96
4	atf1	50705.0	9.29	-0.115	>10 h	46.60	87.49
5	Oleosin1	15581.3	10.28	0.266	>10 h	34.77	98.91
6	MLDP	31171.2	6.05	-0.079	>10 h	33.70	94.11
7	TadA	28484.8	4.91	-0.355	>10 h	33.66	84.78

پروتئین‌های تجمعی انتخابی نیز مبین غشایی بودن همه آنها بود (جدول 6). همان‌طور که در این جدول نشان داده شده است، پروتئین Oleosin1 و TadA دارای یک ناحیه گذرنده از غشاء هستند و MLDP دارای چندین ناحیه گذرنده از غشاء در موقعیت‌های مختلف است.

ویژگی‌های توپولوژی آنزیم‌های DGAT و پروتئین تجمعی در جانداران روغنی: بررسی موقعیت قرارگیری آنزیم‌های DGAT انتخابی، مبین غشایی بودن همه آنها بود (جدول 6). همان‌طور که در این جدول نشان داده شده است، هر یک از این آنزیم‌ها چندین ناحیه گذرنده از غشاء در موقعیت‌های مختلف دارند. بررسی موقعیت قرارگیری

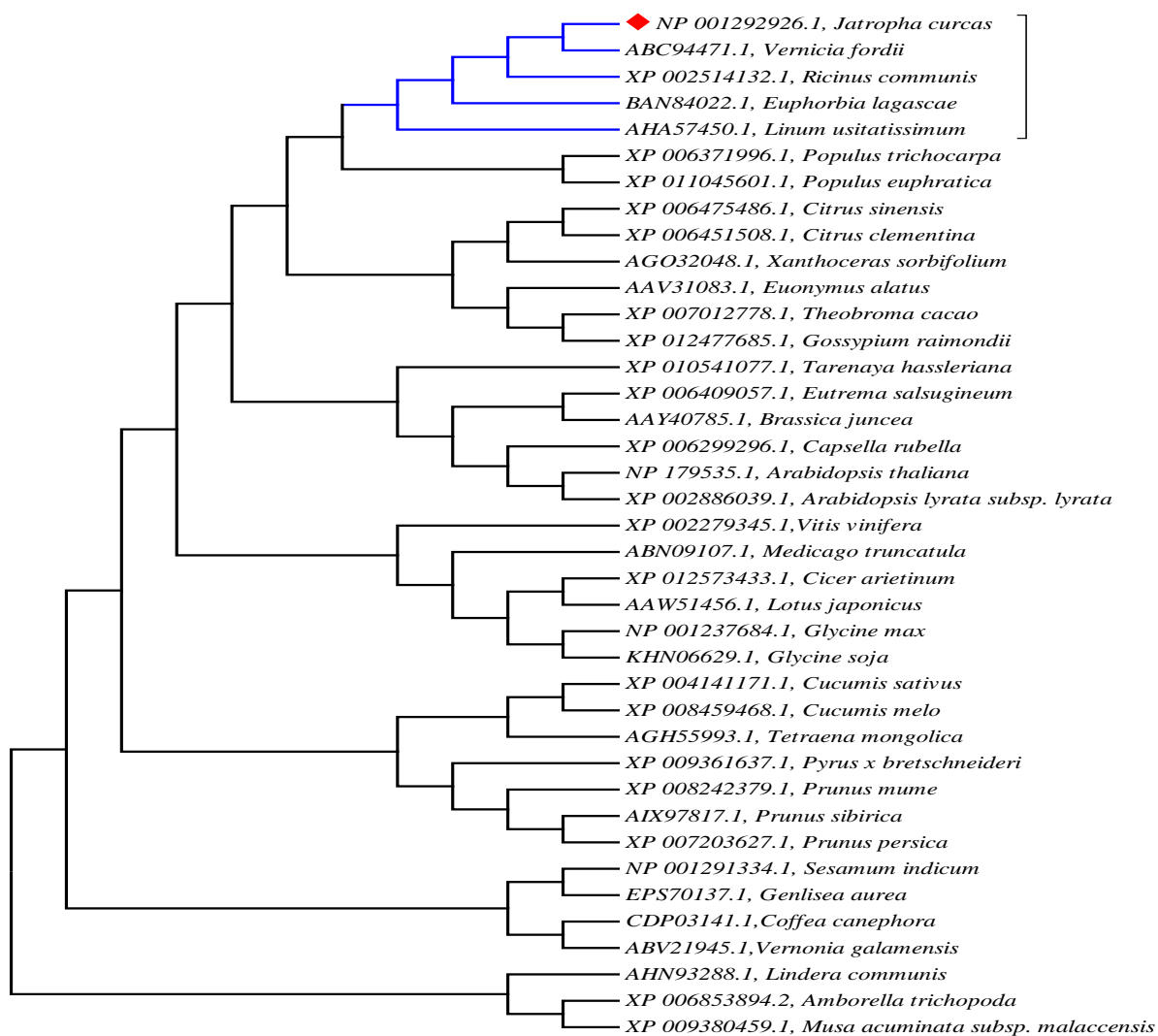
جدول 6- ویژگی‌های توپولوژی آنزیم DGAT و پروتئین‌های تجمعی

ردیف	نام توالی	موقعیت و تعداد دمین‌های گذرنده از غشاء		
1	DGAT1-1	114-254	275-389	398-515
2	DGAT1-2	55-88	138-192	193-310

-	414-462	274-411	233-254	15-168	DGA1	3
338-462	244-289	210-238	43-68	15-33	atf1	4
-	-	-	-	13-113	Oleosin1	5
173-255	110-141	87-104	58-82	17-52	MLDP	6
-	-	-	-	6-39	TadA	7

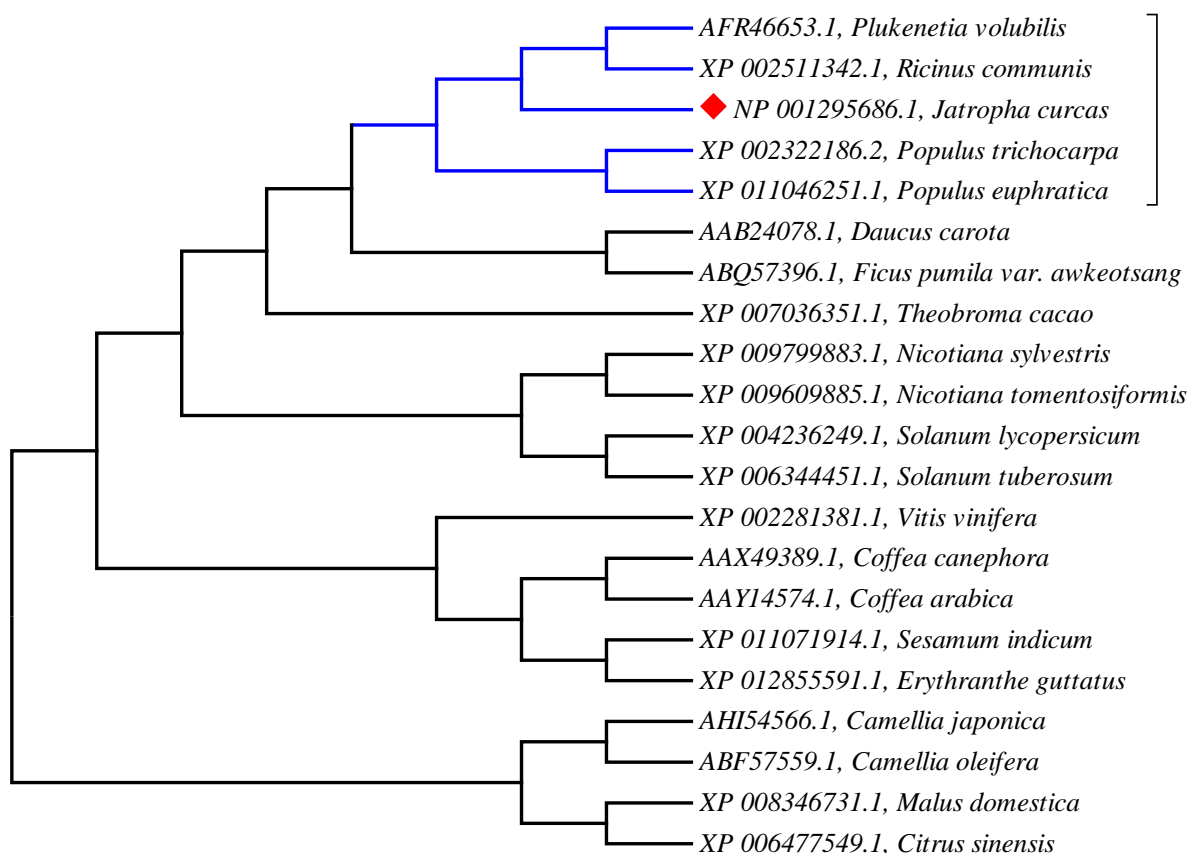
*Euphorbia*، *Ricinus communis*، *fordii*  
*Populus*، *Linum usitatissimum*، *Jagasciae*  
*trichocarpa* (شکل 1)، و توالی شبه پروتئینی  
*Plukenetia volubilis* در گونه‌های گیاهی  
*Populus euphratica*، *Populus trichocarpa*  
و *Ricinus communis* آشکار شدند (شکل 2). با  
وجود این، در بین این گونه‌ها *Vernicia fordii*  
و *Ricinus communis* قرابت بیشتری با توالی‌های  
انتخابی نشان دادند.

آشکارسازی دامنه میزبانی آنزیم *DGAT1-1* و پروتئین  
تجمعی *Oleosin1* در *Jatropha curcas*: نتایج حاصل از  
آشکارسازی دامنه میزبانی *DGAT1-1* و *Oleosin1* در  
سطح نوکلئوتیدی نتایج مطلوبی را به دنبال نداشت. با  
وجود این، تشابه‌یابی پروتئینی آنها منجر به معرفی طیف  
گسترده‌ای از جانداران دارای توالی‌های پروتئینی با  
همسانی، هم‌پوشانی و ارزش E مناسب در گونه‌های دور  
و نزدیک شد. در میان توالی‌های آشکار شده توالی  
شبه پروتئینی *DGAT1-1* در گونه‌های گیاهی *Vernicia*



شکل 1- قرابت توالی‌های پروتئینی شبه DGATI-1 در گونه‌های مختلف گیاهی





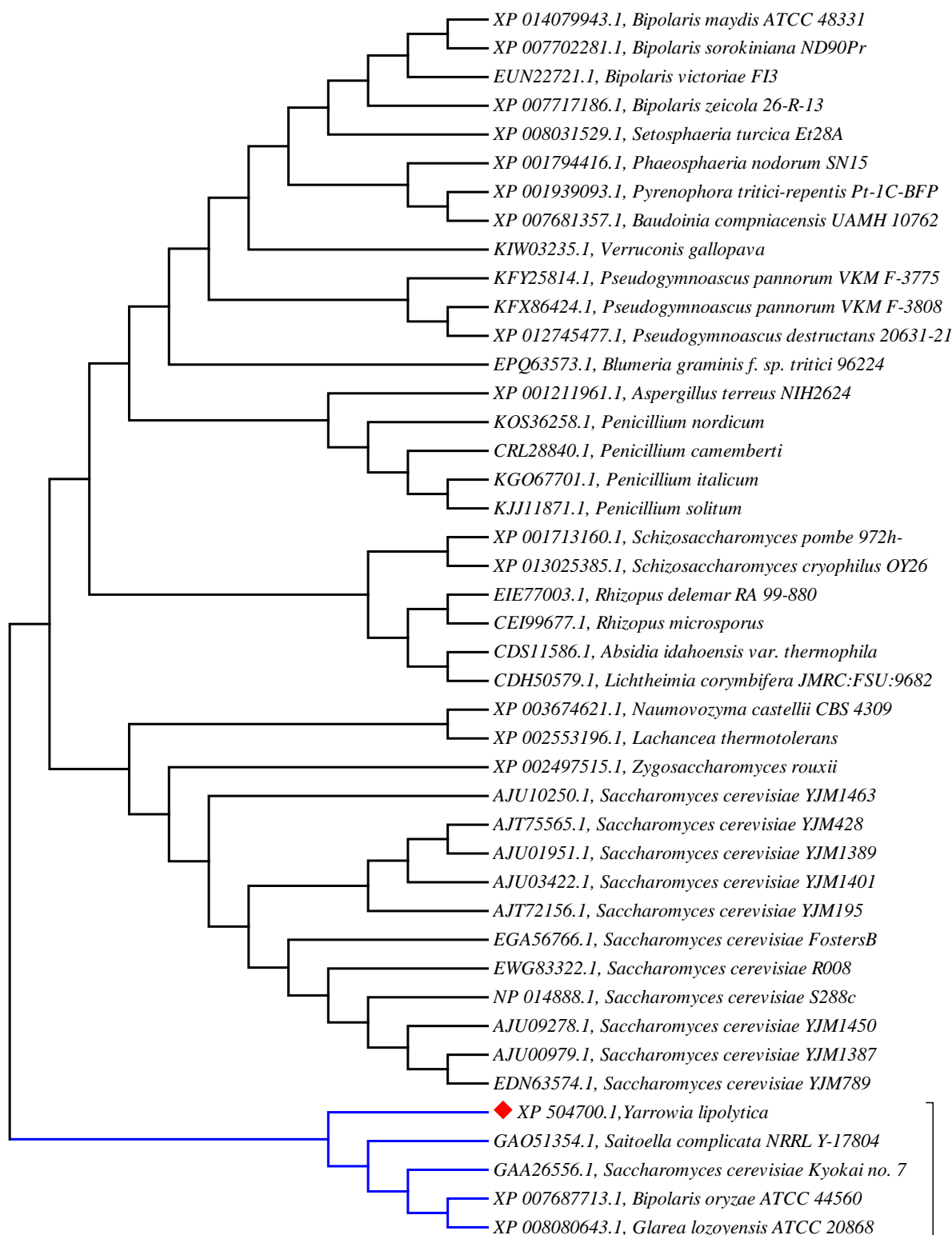
شکل 2- قرابت توالی‌های پروتئینی شبه *Oleosin1* در گونه‌های مختلف گیاهی

#### آشکارسازی دامنه‌میزیابی آنزیم *DGAI* مشتق از گونه

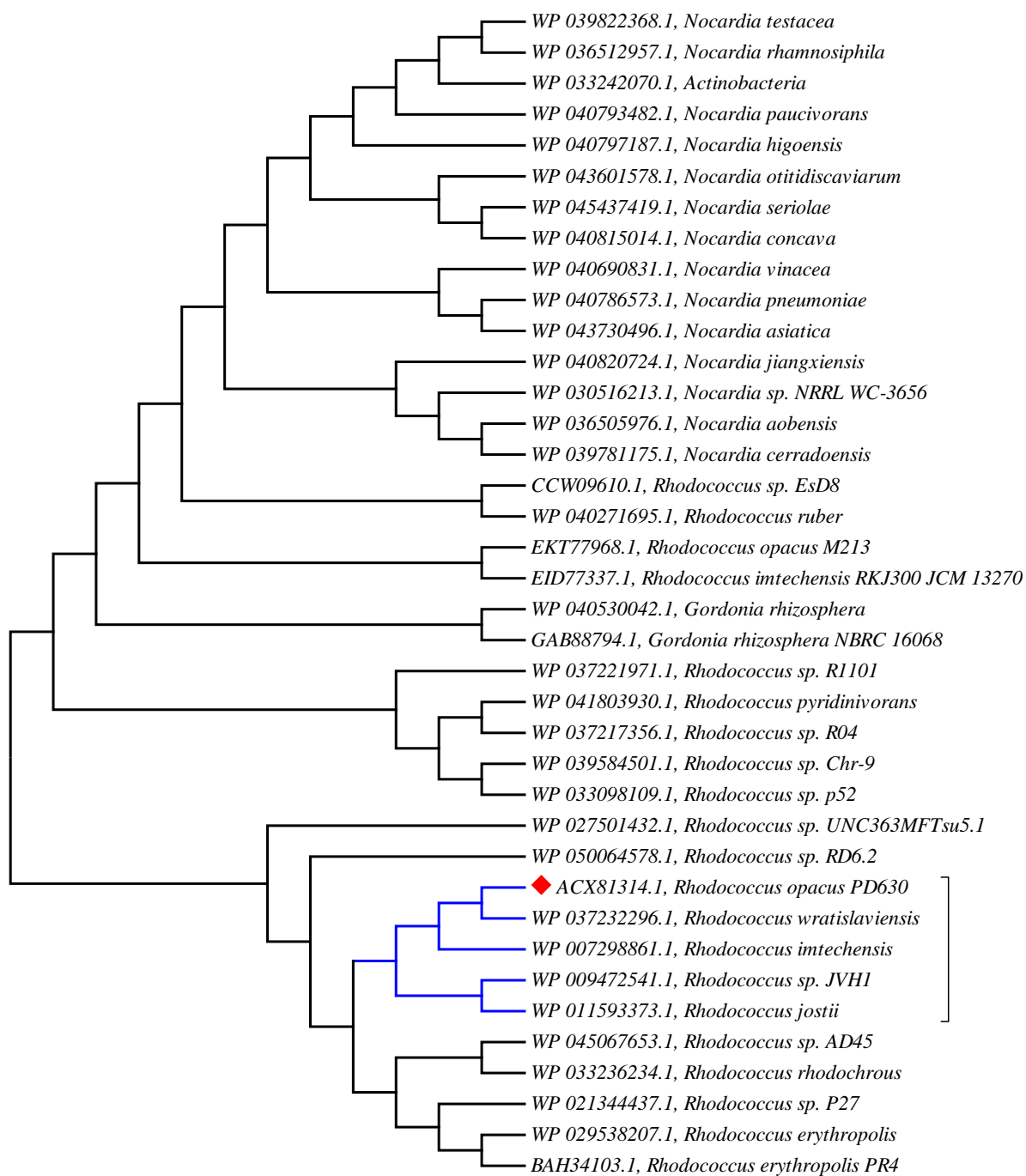
قارچی *Yarrowia lipolytica*: نتایج حاصل از بررسی این آنزیم مانند سایر آنزیم‌های فوق در سطح نوکلئوتیدی نتایج مطلوبی را به دنبال نداشت؛ با وجود این، تشابه‌یابی پروتئینی آن منجر به معرفی طیف گسترده‌ای از جانداران دارای توالی‌های پروتئینی با همسانی، هم‌پوشانی و ارزش E مناسب در گونه‌های دور و نزدیک شد. در میان توالی‌های همگون‌شده، توالی شبه پروتئینی *DGAI* در گونه‌های قارچی *Saitoella cerevisiae complicata* و *Saccharomyces cerevisiae complicata* آشکار شدند (شکل 3) که در بین آنها *Saitoella complicata* قرابت بیشتری با توالی انتخابی نشان داد.

#### آشکارسازی دامنه‌میزیابی آنزیم *DGATI-2* مشتق از

*Phaeodactylum tricornutum* و پروتئین تجمعی *MLDP* از *Dunaliella salina*: نتایج حاصل از همگون‌یابی توالی نوکلئوتیدی آنزیم *DGATI-2* و پروتئین تجمعی *MLDP*، هیچ توالی مشابهی را آشکار نکرد. با وجود این، همگون‌یابی توالی پروتئینی آنزیم *DGATI-2* و پروتئین تجمعی *MLDP* منجر به معرفی تنها یک توالی پروتئینی همگون به ترتیب در گونه جلبکی *Thalassiosira pseudonana* و *Dunaliella parva* با همسانی، هم‌پوشانی و ارزش E مناسب شد.



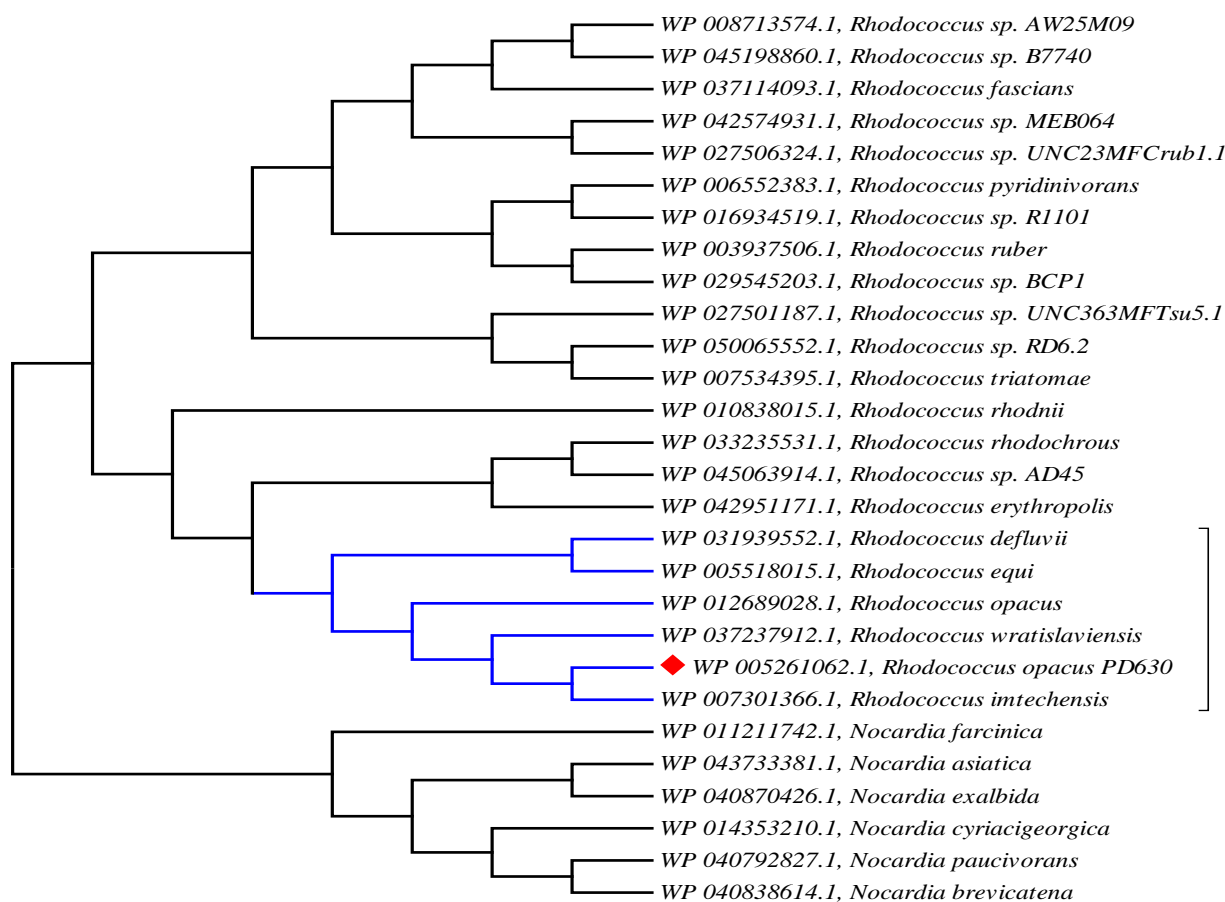
شکل 3- قرابت توالی‌های پروتئینی شبه DGAl در گونه‌های مختلف قارچی



شکل 4- قرابت توالی‌های پروتئینی شبه *atfI* در گونه‌های مختلف باکتریایی

همسانی، هم‌پوشانی و ارزش E مناسب در گونه‌های دور و نزدیک شد. در میان توالی‌های آشکارشده توالی شبه‌پروتئینی *atfI* در گونه‌های باکتریایی *Rhodococcus wratislaviensis*، *Rhodococcus JVH1 imtechensis* sp. و *Rhodococcus Rhodococcus jostii* (شکل 4)، و توالی شبه‌پروتئینی *TadA* آشکارشده در گونه‌های باکتریایی *Rhodococcus Rhodococcus wratislaviensis*، *Rhodococcus defluvii imtechensis*، *Rhodococcus equi* اهمیت بیشتری داشتند (شکل 5). با وجود این، *Rhodococcus wratislaviensis* و *Rhodococcus imtechensis* قرابت بیشتری با توالی‌های انتخابی را نشان دادند.

آشکارسازی دامنه میزبانی آنزیم *atfI* و پروتئین. تجمعی *TadA* مشتق از *Rhodococcus opacus PD630* نتایج حاصل از همگون‌یابی توالی نوکلئوتیدی *atfI* منجر به معرفی توالی همگون با هم‌پوشانی و همسانی به ترتیب 100 درصد و 90 درصد و ارزش E معادل با صفر در سویه *Rhodococcus. jostii* RHA1 شد. در همین راستا همگون‌یابی توالی نوکلئوتیدی ژن *TadA* حضور 4 توالی ژنی با هم‌پوشانی و همسانی بالا را مشخص کرد. بررسی جانداران دارای این توالی، مبین حضور آنها در گونه‌های *Rhodococcus sp.R7*، *Rhodococcus Rhodococcus equi*، *Rhodococcus. jostii* RHA1 و *Mycobacterium tuberculosis* بود؛ از سوی دیگر تشابه‌یابی پروتئینی آنها منجر به آشکارسازی طیف گسترده‌ای از جانداران دارای توالی‌های پروتئینی با



شکل 5- قرابت توالی‌های پروتئینی شبه *TadA* در گونه‌های مختلف باکتریایی

## بحث و نتیجه‌گیری

افزایش روزافزون نیاز به انرژی (17)، محدودیت منابع و مخاطرات ناشی از کاربرد سوخت‌های فسیلی، پیدا کردن منابع کافی انرژی برای آینده جهان را به یکی از مخاطرات و چالش‌های جوامع بشری تبدیل کرده که خود ارتباط تنگاتنگی با ثبات جهانی، اقتصاد موفق، رفاه و کیفیت زندگی دارد (18). بر این اساس، مراکز تحقیقاتی و تجاری بسیاری به دنبال یافتن جایگزین‌هایی مناسب، پاک‌تر و تجدیدپذیر برای منابع فعلی انرژی با حداقل آثار زیست‌محیطی و نیز با حداقل صرف هزینه هستند. یکی از فناوری‌های مهم در این زمینه تولید سوخت از منابع توده‌های زیستی شامل گیاهان و میکروارگانیسم‌های روغنی است (3). با این حال، مواد روغنی قابل استحصال از توده‌های زیستی گیاهی، به انرژی زیاد و زمین‌های وسیع برای تولید نیاز دارند (19) و به فاکتورهایی چون آب‌وهوا، اقلیم و حوادث طبیعی وابسته هستند (20)؛ بنابراین امروزه توجه زیادی به تولید سوخت از میکروارگانیسم‌های روغنی شده است؛ اما کاهش هزینه‌های تولید از جمله چالش‌های این روش جایگزین است (20). در این راستا می‌توان با انتخاب میکروارگانیسم‌های توانا و افزایش قابلیت آنها در جهت بالابردن تولید روغن به‌عنوان یکی از راهکارهای کاهش هزینه‌ها اشاره کرد که این مهم مستلزم درک متابولیسم لیپید و مکانیسم‌های مولکولی مؤثر در این فرایند است. در سال‌های اخیر بسیاری از ژن‌های دخیل در بیوسنتز لیپید از جمله در مسیر بیوسنتزی اسیدچرب و تری‌اسیل‌گلیسرول آشکار و استفاده از آنها در جهت بالابردن تولید چربی بررسی شده است (21). مطالعات انجام‌شده نشان‌دهنده بی‌نتیجه بودن بسیاری از تلاش‌ها در جهت افزایش تولید لیپید مبتنی بر بالابردن بیان ژن *Accase*

و سایر ژن‌های مسیر سنتز اسیدهای چرب است (22). در این راستا می‌توان به بیان این ژن در دیاتومه و عدم تأثیرگذاری آن در افزایش تولید چربی در این جاندار اشاره کرد (23). در همین راستا عدم تغییر در محتوای چربی دانه‌های روغن آراییدوبزیس و کلزا پس از بیان ژن مرتبط با آنزیم *KASIII* گزارش شده است (24). با وجود بی‌تأثیر بودن بیان بسیاری از ژن‌های مسیر سنتز اسیدهای چرب، افزایش بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز تری‌اسیل‌گلیسرول قابلیت بالایی در افزایش تولید چربی را نشان داده است (25)؛ بنابراین آنزیم‌های دخیل در این مسیر و به‌ویژه آنزیم *DGAT* که آخرین مرحله بیوسنتز تری‌اسیل‌گلیسرول را کاتالیز می‌کند، نامزدی مناسب با هدف افزایش ذخیره‌سازی محتوای لیپید مبتنی بر فناوری‌های زیستی است (26). *DGAT* آنزیم کلیدی مسیر بیوسنتز TAG در یوکاریوت‌ها با سه ایزوفرم است. در میان ایزوفرم‌های این آنزیم، *DGAT1* نقش اصلی در تجمع روغن در دانه‌ها را داشته و *DGAT2* در تجمع اسیدهای چرب غیرمعمول نقش دارد (27). علاوه بر آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز تری‌اسیل‌گلیسرول، پروتئین‌های ساختاری اجسام لیپیدی در متابولیسم، بیوسنتز و تجمع لیپید نقش کلیدی دارند و اندازه اجسام روغنی را تعیین می‌کنند (28)؛ به همین منظور در این پژوهش ارگانیسم‌های توانا در تولید بیودیزل انتخاب شد و مکانیسم‌های مولکولی مرتبط در آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی مکانیسم‌های مولکولی سنتز لیپید منجر به انتخاب آنزیم کلیدی *دی‌اسیل‌گلیسرول‌آسیل‌ترانسفراز* در یوکاریوت‌ها و آنزیم *واکس استرسنتتازادی‌اسیل‌گلیسرول‌آسیل‌ترانسفراز* در پروکاریوت‌ها و نیز پروتئین‌های کلیدی دخیل در تجمع لیپید در آنها شد؛ بنابراین ژن‌های مرتبط

همولوگ ژن‌های *DGAT2* بود و در سنتز تری‌آسیل گلیسرول مشارکت عمده‌ای دارد (27 و 33). دمین عملکردی این توالی DAGAT متعلق به فوق خانواده LPLAT است که مرحله نهایی تشکیل تری‌آسیل‌گلیسرول توسط آن کاتالیز می‌شود (34). LPLAT، نیز متعلق به فوق خانواده پروتئین‌های MBOAT یعنی اسیل ترانسفرازهای متصل به غشاء است (35). بررسی ساختاری توالی پروتئینی ژن *atf1* در *Rhodococcus opacus* منجر به آشکارسازی دمین متراکم‌سازی و نیز دمین UPF0089 شد. دمین متراکم‌سازی تشکیل پیوندهای پپتیدی در بیوسنتز پپتیدهای غیرریبوزومی را کاتالیز می‌کند (36). دمین UPF0089، واکنش آسیل ترانسفراز و وابسته به کوانزیم آ با الکل‌های چرب را برای تشکیل لیپیدهای خنثی کاتالیز می‌کند (37)؛ از سوی دیگر، تجزیه و تحلیل ساختاری توالی‌های پروتئینی همگون با اولئوسین 1، منجر به آشکارسازی توالی‌های مشابه با این دمین در آنها شد. بررسی دقیق‌تر این توالی حضور 3 ناحیه هیدروفوبیک N-ترمینال، هیدروفوبیک مرکزی و ناحیه آمفی پاتیک C-ترمینال در آنها را آشکار کرد (جدول 4). ناحیه هیدروفوبیک مرکزی برای تشکیل ساختار بتا و واکنش با لیپیدها پیشنهاد می‌شود و تنها ناحیه با ویژگی حفاظتی است (38)؛ علاوه بر این، تجزیه و تحلیل دمین‌ها و جایگاه‌های فعال مستقر در توالی پروتئینی ژن *MLDP* در *Dunaliella salina*، منجر به معرفی دمین‌ها و جایگاه‌های فعال مرتبط با فرایندهای آمیداسیون، گلیکوزیلاسیون، فسفوریلاسیون و مریستیلاسیون در آن شد (جدول 4). این قابلیت‌های ساختاری در توالی‌های پروتئینی دخیل در سنتز تری‌آسیل‌گلیسرول نیز وجود دارد؛ بنابراین حضور این

در *Jatropha curcas* از گیاهان، *Phaeodactylum tricornutum* از جلبک‌ها، *Yarrowia lipolytica* مخمرها و *Rhodococcus opacus* از باکتری‌ها، به عنوان جاندارانی با قابلیت تولید لیپید، انتخاب شدند و مورد بررسی‌های مولکولی قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل ویژگی‌های ساختاری آنزیم‌های *DGAT* انتخابی، تغییرات پس از ترجمه متنوع این آنزیم‌ها از جمله گلیکوزیلاسیون، فسفوریلاسیون، و در یک مورد سولفوریلایسیون آنها را آشکار کرد (جدول 1). در این میان گلیکوزیلاسیون که ممکن است محلولیت، فولدینگ، حساسیت به پروتئولیز، پایداری، اتصال به گیرنده و فعالیت را تحت تأثیر قرار دهد، فراوان‌ترین تغییر پس از ترجمه پروتئین‌ها است که در تمامی سلسله‌های موجودات زنده آشکار شده است (29) و در تمامی آنزیم‌های این پژوهش نیز اعمال می‌شود. پایش ویژگی‌های ساختاری پروتئین‌های تجمعی انتخابی نیز تغییرات پس از ترجمه این پروتئین‌ها از جمله فسفوریلاسیون، و در یک مورد سولفوریلایسیون آنها را نمایان کرد (جدول 2)؛ از سوی دیگر، بررسی عملکردی آنزیم‌های *DGAT* انتخابی، منجر به آشکارسازی دمین‌های عملکردی MBOAT در *Jatropha curcas* و *Phaeodactylum tricornutu* در *Yarrowia lipolytica* و دمین متراکم‌سازی در *Rhodococcus opacus* PD630 شد (جدول 3). براساس گزارش‌ها دو نوع اصلی از ژن‌های *DGAT* به ترتیب *DGAT1* و *DGAT2* در ژنوم بسیاری از گیاهان و حیوانات وجود دارد (32). در ساختار این آنزیم‌ها، MBOAT دمینی کلیدی در مسیر بیوسنتز چربی است (31). ژن مشابه MBOAT در مخمرها *DGAI* نامیده می‌شود که

*Vernicia fordii* همان درخت تونگ است که از دانه‌های این درخت روغن تونگ مشتق می‌شود. این روغن که به آن روغن چوب چینی یا روغن گردو نیز گفته می‌شود، در گذشته در لامپ‌ها به کار برده می‌شده و امروزه به‌عنوان یک عنصر در رنگ، لاک الکل و آب‌بندی و بتونه‌کاری و همچنین پس از پردازش به‌عنوان سوخت موتور استفاده می‌شود (44)؛ از سوی دیگر همگون‌یابی توالی پروتئینی ژن *Oleosin1* نیز منجر به معرفی طیف گسترده‌ای از جانداران دارای توالی همگون با آن شد. نتیجه حاصل از قرابت‌یابی آن منجر به نزدیکی *Ricinus communis* شد (شکل 2). *Ricinus communis* با توجه به ویژگی‌های متعدد به‌عنوان یک منبع بالقوه بیودیزلی شناخته شده است (45). این گیاه که از خانواده یوفوریاسه است، درخت کوچک چوبی است که در سراسر مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری رشد می‌کند (46). این گیاه در مقایسه با دیگر منابع بالقوه بیودیزلی مزایای مضاعفی همچون دوره رشد کوتاه‌تری نسبت به *Jatropha* دارد (47)؛ از سوی دیگر، روغن آن به‌دلیل داشتن پیوندهای غیراشباع، وزن مولکولی بالا (298)، نقطه ذوب پایین (5 درجه سانتیگراد)، نقطه انجماد بسیار پایین (12 تا 18 درجه سانتیگراد) و بیش از همه بالاترین و پایدارترین ویسکوزیته را نسبت به دیگر روغن‌های گیاهی با کاربری‌های مناسب صنعتی دارد (47)؛ به همین دلیل در ساخت تعدادی از مواد شیمیایی صنعتی و آرایشی مانند سورفاکتانت، گریس، روان‌کننده‌ها، صابون‌های خاص، پوشش‌های سطحی، مواد آرایشی، دارو و غیره کاربرد دارد (47). همچنین این گیاه مقاومت بیشتری به خشکسالی دارد و می‌تواند برای مقابله با بیابان‌زدایی استفاده شود. علاوه بر ویژگی‌های گفته‌شده دانه‌های

دمین‌ها و جایگاه‌های فعال در تمامی توالی‌های پروتئین‌های مؤثر در آسیله و تجمع لیپیدی می‌تواند دلالت بر اهمیت آنها باشد و در فرایندهای مهندسی ژنتیک مبتنی بر طراحی سازه مورد توجه قرار گیرند. برخلاف سایر پروتئین‌های مسیر سنتز و تجمع تری‌آسیل گلیسرول، بررسی ساختاری توالی پروتئینی ژن *Tada* منجر به آشکارسازی منطقه غنی از آلانین، دمین‌های آپولیوپروتئینی و ITAM در آن شد (جدول 4). در این راستا قابلیت منطقه غنی از آلانین به‌عنوان توالی راهنما (39)، دمین‌های آپولیوپروتئینی در پایداری و حلالیت لیپیدهای آزاد (40)، و ITAM در اتصال و فعالیت Lyn و Syk تیروزین‌کیناز نشان داده شده است (41). بررسی خصوصیات بیوشیمیایی DGAT (جدول 5) ناپایداری آنها را آشکار کرد. با توجه به اینکه پروتئین‌هایی با شاخص کمتر از 40، جزء پروتئین‌های پایدار تقسیم‌بندی می‌شوند (42)، پروتئین‌های تجمعی انتخابی، جزء پروتئین‌های پایدار طبقه‌بندی می‌شوند (جدول 5). همچنین بررسی شاخص آلیفاتیک که به‌عنوان یک عامل مهم به‌منظور برآورد مقاومت پروتئین‌ها در برابر حرارت است (43)، نشان‌دهنده مقاومت بودن حرارتی تمامی آنزیم‌ها و پروتئین‌های انتخابی بود. از سوی دیگر بررسی ویژگی‌های توپولوژی آنزیم‌های DGAT و پروتئین‌های تجمعی مبین غشایی بودن همه آنها بود (جدول 6) که این موضوع هم‌راستا با سایر گزارش‌ها است (31)؛ علاوه بر این، نتایج حاصل از فرایند همگون‌یابی توالی پروتئینی ژن *DGAT1* در *Jatropha curcas* منجر به معرفی طیف گسترده‌ای از جانداران دارای توالی پروتئینی همگون با آن شد که در این میان توالی پروتئینی DGAT در *Vernicia fordii* نزدیک‌ترین توالی به *Jatropha curcas* بود (شکل 1).

انتخاب آنزیم واکس استرسنتاز/دی‌آسیل‌گلیسرول‌آسیل‌ترانسفراز (WS/DGAT) در باکتری *Rhodococcus opacus* PD630 به‌عنوان میکروارگانیسم باکتریایی روغنی شد. معرفی میکروارگانیسم‌های دارای این توالی مبتنی بر همگون‌یابی پروتئینی، منجر به جداسازی گونه‌های متفاوت با قرابت نزدیک به‌ویژه *Rhodococcus wratislaviensis* با آن شد (شکل 4). این جاندار، سوبه‌ای توانا در تجزیه ترکیبات نیتروآروماتیک است که می‌تواند در زیست‌تخریب‌پذیری آلودگی‌های محیطی استفاده شود (51)؛ بنابراین با آنکه محتوی لیپیدی سایر گونه‌های *Rhodococcus* کمتر از آپاکوس بود، حضور توالی همگون در آنها مهم است و باید مورد توجه قرار گیرد. قابلیت *Rhodococcus opacus* نیز می‌تواند در زیست‌تخریب‌پذیری آلاینده‌های نیتروز مورد توجه قرار گیرد، که کمتر به آن توجه شده است. در همین راستا، نتایج حاصل از همگون‌یابی توالی پروتئینی ژن *TadA* منجر به آشکارسازی قرابت نزدیک *Rhodococcus imtechensis* به *Rhodococcus opacus* شد (شکل 5).

نتایج حاصل از این پژوهش ضمن معرفی زمین‌ها و موتیف‌های عملکردی مؤثر در مسیر سنتز بیودیزل، منجر به آشکارسازی جانداران توانا با قابلیت احتمالی تولید بیودیزل شد که باید در شرایط آزمایشگاهی مورد آزمون‌های بیشتری قرار گیرند.

## References

- (1) Demirbaş A. Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey. *Energy conversion and Management* 2003; 44(13): 2093-2109.

کرچک حاوی 30-35 درصد روغن هستند و محتوای بالای (بیش از 85 درصد) اسید ریسینولئیک دارند (47)؛ در نتیجه همگون‌یابی توالی نوکلئوتیدی ژن *DGAT1* از *Phaeodactylum tricornutum* هیچ توالی مشابهی آشکار نشد که این ممکن است ناشی از این باشد که توالی‌های همگون تاکنون در بانک‌های اطلاعاتی ثبت نشده‌اند؛ با وجود این، نتایج همگون‌یابی پروتئینی آن منجر به معرفی *Thalassiosira pseudonana* به‌عنوان میکروارگانیسمی با توالی همسان و هم‌پوشانی مناسب شد. این جاندار مانند *Phaeodactylum tricornutum* یک دیاتومه دریایی است که محتوی لیپید آن 20/6 درصد براساس وزن خشک سلولی است و بسیاری از مطالعات مربوط به دیاتومه‌ها محدود به این دو گونه است (48). همچنین همگون‌یابی توالی پروتئینی ژن *MLDP* از *Dunaliella salina* منجر به معرفی *Dunaliella parva* به‌عنوان میکروارگانیسمی با توالی همسان و هم‌پوشان مناسب شد. *Dunaliella parva*، جلبکی تک‌سلولی و نمک‌دوست است که در فشار اسمزی بالا یافت می‌شود. این میکروارگانیسم دیواره سلولی محکم ندارد و نسبت به ساکارز و اینولین و حتی فسفات نفوذپذیر است و در طی فتوسنتز، آنها را به گلیسرول تبدیل می‌کند (49)؛ بنابراین نداشتن دیواره سلولی محکم در این گونه جلبکی قابلیت استخراج کارآمد لیپید در آنها را نیز توجیه‌پذیرتر می‌کند. همگون‌یابی توالی نوکلئوتیدی ژن *DGAI* از *Yarrowia lipolytica*، منجر به آشکارساز شدن نزدیکی آن با *Saitoella complicata* شد (شکل 3). *Saitoella complicate*، قارچ نادری است که خویشاوندی نزدیکی به *Saitoella pombe* دارد (50)؛ علاوه بر این، نتایج حاصل از بررسی داده‌ها منجر به



- (2) Najafi G., Ghobadian B., Tavakoli T. & Yusuf T. Potential of bioethanol production from agricultural wastes in Iran. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2009; 13(6): 1418-1427.
- (3) Gao Y., Gregor C., Liang Y., Tang D & Tweed C. Algae biodiesel feasibility report. *Chemistry Central Journal* 2012; 6(Suppl 1): S1.
- (4) Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E & Isambert A. Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering* 2006; 101(2): 87-96.
- (5) Knothe G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel processing technology* 2005; 86(10): 1059-1070.
- (6) Hill J., Nelson E., Tilman D., Polasky S & Tiffany D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; 103(30): 11206-11210.
- (7) Alvarez H., Kalscheuer R., Steinbüchel A. Accumulation and mobilization of storage lipids by *Rhodococcus opacus* PD630 and *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126. *Applied microbiology and biotechnology* 2000; 54(2): 218-223.
- (8) Alvarez H., Steinbüchel A. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology* 2002; 60(4): 367-376.
- (9) Murphy D. Storage lipid bodies in plants and other organisms. *Progress in lipid research* 1990; 29(4): 299-324.
- (10) Chisti Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in biotechnology* 2008; 26(3): 126-131.
- (11) Searchinger T., Heimlich R., Houghton RA., Dong F., Elobeid A., Fabiosa J., Tokgoz S., Hayes D., Yu T.-H. Use of US croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change. *Science* 2008; 319(5867): 1238-1240.
- (12) Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances* 2007; 25(3): 294-306.
- (13) Henry SA., Kohlwein SD., Carman GM. Metabolism and regulation of glycerolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2012; 190(2): 317-349.
- (14) Li Q., Du W., Liu D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008; 80(5): 749-756.
- (15) Liu T., Khosla C. Genetic engineering of *Escherichia coli* for biofuel production. *Annual review of genetics* 2010; 44: 53-69.
- (16) Rosenberg JN., Oyler GA., Wilkinson L., Betenbaugh MJ. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current opinion in biotechnology* 2008; 19(5): 430-436.
- (17) Rösch C., Skarka J. The European biofuels policy and sustainability. *International Association for Energy Economics* 2009; 18: 31-35.
- (18) Posten C., Schaub G. Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels: a process view. *Journal of Biotechnology* 2009; 142(1): 64-69.
- (19) Van Gerpen J. *Business management for biodiesel producers*. Colorado: National Renewable Energy Laboratory Golden; 2004.
- (20) Leman J. Oleaginous microorganisms: an assessment of the potential. *Advances in applied Microbiology* 1997; 43: 195-243.
- (21) Ohlrogge JB., Jaworski JG. Regulation of fatty acid synthesis. *Annual review of plant biology* 1997; 48(1): 109-136.
- (22) Radakovits R., Jinkerson R. E., Darzins A, Posewitz M. C. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryot Cell* 2010; 9(4): 486-501.
- (23) Sheehan J., Dunahay T., Benemann J., Roessler P. *A look back at the US*

- Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae.* Colorado: National Renewable Energy Laboratory Golden; 1998.
- (24) Dehesh K., Tai H., Edwards P., Byrne J., Jaworski JG. Overexpression of 3-ketoacyl-acyl-carrier protein synthase IIIs in plants reduces the rate of lipid synthesis. *Plant physiology* 2001; 125(2): 1103-1114.
- (25) Vigeolas H., Waldeck P., Zank T., Geigenberger P. Increasing seed oil content in oil-seed rape (*Brassica napus* L.) by over-expression of a yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase under the control of a seed-specific promoter. *Plant Biotechnology Journal* 2007; 5(3): 431-441.
- (26) Siloto RM., Truksa M., Brownfield D., Good AG., Weselake RJ. Directed evolution of acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase: development and characterization of *Brassica napus* DGAT1 mutagenized libraries. *Plant Physiology and Biochemistry* 2009; 47(6): 456-461.
- (27) Li R., Yu K., Hildebrand DF. DGAT1, DGAT2 and PDAT expression in seeds and other tissues of epoxy and hydroxy fatty acid accumulating plants. *Lipids* 2010; 45(2): 145-157.
- (28) Rossi M., Amaretti A., Raimondi S., Leonardi A. *Getting lipids for biodiesel production from oleaginous fungi*. 2nd ed. Italy: University of Modena and Reggio Emilia; 2011.
- (29) Dixon B. Glycosylation Enhances Stability. *Nature biotechnology* 1991; 9(5): 418-418.
- (30) Larkin A., Imperiali B. The expanding horizons of asparagine-linked glycosylation. *Biochemistry* 2011; 50(21): 4411-4426.
- (31) Schmoldt A., Benthe H., Haberland G. Digitoxin metabolism by rat liver microsomes. *Biochemical pharmacology* 1975; 24(17): 1639-1641.
- (32) Lung SC., Weselake RJ. Diacylglycerol acyltransferase: a key mediator of plant triacylglycerol synthesis. *Lipids* 2006; 41(12): 1073-1088.
- (33) Shockey JM., Gidda SK., Chapital DC., Kuan JC., Dhanoa PK., Bland JM., Rothstein SJ., Mullen RT., Dyer JM. Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* 2006; 18(9): 2294-2313.
- (34) Oelkers P., Cromley D., Padamsee M., Billheimer JT., Sturley SL. The DGA1 gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(11): 8877-8881.
- (35) Hofmann KA. superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling. *Trends in biochemical sciences* 2000; 25(3): 111-112.
- (36) Stachelhaus T., Mootz HD., Bergendahl V., Marahiel MA. Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis catalytic role of the condensation domain. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(35): 22773-22781.
- (37) Kalscheuer R., Steinbuchel A. A novel bifunctional wax ester synthase/acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase mediates wax ester and triacylglycerol biosynthesis in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1. *The Journal of Biological chemistry* 2003; 278(10): 8075-8082.
- (38) Tzen J., Lie G., Huang A. Characterization of the charged components and their topology on the surface of plant seed oil bodies. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267(22): 15626-15634.
- (39) Holt RG., Raju L. Signal sequence and alanine-rich region of streptococcal protein antigen A of *Streptococcus sobrinus* can direct localization of alkaline phosphatase to the periplasm of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 2000; 184(1): 17-21.
- (40) Davidson WS., Hazlett T., Mantulin WW., Jonas A. The role of apolipoprotein AI domains in lipid binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996; 93(24): 13605-13610.
- (41) Johnson SA., Pleiman CM., Pao L.,

- Schneringer J., Hippen K., Cambier JC. Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases. *The Journal of Immunology* 1995; 155(10): 4596-4603.
- (42) Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Wilkins MR., Appel RD., Bairoch A. *The Proteomics Protocols Handbook*. 2nd ed. New York: Humana Press; 2005.
- (43) Kim YJ., Shim JS., Krishna PR., Kim SY., In JG., Kim MK., Yang DC. Isolation and characterization of a glutaredoxin gene from *Panax ginseng* CA Meyer. *Plant molecular biology reporter* 2008; 26(4): 335-349.
- (44) Brown K., Keeler W. The history of tung oil. *Wildland weeds* 2005; 9(1): 4-24.
- (45) Okechukwu R., Ogukwe C., Okereke J., Njoku M. Production and Characterization of Biodiesel from *Jatropha Curcas* Seeds. *International Journal of Biotechnology & Biochemistry* 2011; 7(3).
- (46) Ferraz AC., Angelucci MEM., Da Costa ML., Batista IR., De Oliveira BH., Da Cunha C. Pharmacological evaluation of ricinine, a central nervous system stimulant isolated from *Ricinus communis*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1999; 63(3): 367-375.
- (47) Shirame HY., Panwar N., Bamniya B. Bio diesel from castor oil—a green energy option. *Low Carbon Economy* 2011; 2(01): 1.
- (48) Saade A., Bowler C. Molecular tools for discovering the secrets of diatoms. *BioScience* 2009; 59(9): 757-765.
- (49) Ben-Amotz A., Avron M. Photosynthetic activities of the halophilic alga *Dunaliella parva*. *Plant physiology* 1972; 49(2): 240-243.
- (50) Nishida H., Hamamoto M., Sugiyama J. Draft genome sequencing of the enigmatic yeast *Saitoella complicata*. *The Journal of general and applied microbiology* 2011; 57(4): 243-246.
- (51) Navrátilová J., Trzozová L., Durnová E., Spröer C., Sedláček I., Neča J., Němec M. Characterization of *Rhodococcus wratislaviensis* strain J3 that degrades 4-nitrocatechol and other nitroaromatic compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2005; 87(2): 149-153.

---

<sup>1</sup> - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<sup>2</sup> - <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5/>

<sup>3</sup> - <http://www.motif scan>

<sup>4</sup> - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>

<sup>5</sup> - <http://web.expasy.org/protparam/>

<sup>6</sup> - <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>

<sup>7</sup> - <http://www.biologicscorp.com/tools/>

<sup>8</sup> - <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>

<sup>9</sup> - <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

<sup>10</sup> - <http://web.expasy.org/Sulfinator/>

<sup>11</sup> - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>