

## مطالعات مولکولی، بیوانفورماتیکی و تعیین ویژگی‌های عملکردی آنزیم کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز از سویه *Aneurinibacillus migulanus* Znu12

ثریا محمدزاده، نسرین احمدپور، زیبا میرزایی و وهب جعفریان\*

ایران، زنجان، دانشگاه زنجان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۸

### چکیده

کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژنازها از آنزیم‌های کلیدی در متابولیسم ترکیبات آروماتیک موجود در باکتری‌های خاک می‌باشند که در زیست‌پالایی نقش بسزایی دارند. هدف از پژوهش حاضر، معرفی آنزیم کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز جدید و همچنین بررسی بیوانفورماتیکی و بیوشیمیایی آن در حضور سوبستراهای گوناگون و بررسی فعالیت در گستره‌ی گوناگون pH در جهت استفاده وسیع از این دسته آنزیم‌ها در صنعت زیست‌پالایی می‌باشد. برای این منظور، توالی رمزکننده آنزیم کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز با روش PCR از سویه *Aneurinibacillus migulanus* Znu12 استخراج، با شماره دسترسی MN197546.1 در NCBI ثبت و درون وکتور pET28a همسانه‌سازی گردید. بررسی صحت همسانه‌سازی و عدم تغییر قالب خوانش با استفاده از تعیین توالی تایید شد. پس از تراریخت نمودن سلول‌های *E. coli* BL21(DE3) بیان پروتئین با روش SDS-PAGE ارزیابی شد. سپس خالص‌سازی، سنجش و بهینه‌سازی فعالیت آنزیم مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج واکنش PCR بر روی ژل آگاروز بیانگر قطعه‌ی ژنومی ۹۱۵ جفت‌بازی معادل ۳۰۴ باقی‌مانده آمینواسیدی می‌باشد. الکتروفورز با SDS-PAGE نیز تاییدکننده آنزیم تخلیص‌شده‌ی ۳۴ کیلودالتونی از ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل آگاروز بود. بررسی عملکرد بیوشیمیایی آنزیم نیز نشان داد آنزیم در pH=۷/۲ دارای ۱۰۰ درصد فعالیت ولی در pH=۷/۴ فقط ۷۰ درصد فعالیت داشت. بررسی ترجیح سوبسترای نشان داد که کتکول سوبسترای مطلوب‌تری نسبت به پیروگالول و فنول برای آنزیم بود. بررسی نتایج بیوانفورماتیکی تأییدکننده این ترجیح به علت نوع و موقعیت باقی‌مانده‌های آمینواسیدی جایگاه فعال آنزیم می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بیوانفورماتیک، زیست‌پالایی، pH بهینه، کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز، همسانه‌سازی.

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۴۳۳۰۵۲۵۳۱، پست الکترونیکی: v.jafarian@znu.ac.ir

### مقدمه

تولوئن، بنزن، آنیلین، فنلات و مشتقات آن به صورت ترکیبات حدواسط شکل می‌گیرد و همچنین سمیت کتکول از فنول بیشتر است و به‌راحتی در آب، خاک و محیط زیست نفوذ می‌کند. بنابراین تهدیدی برای محیط زیست و سلامت انسان محسوب شده و حذف آلاینده‌ی آن از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است (۱۴). کتکول دارای اثرات جهش‌زایی، سرطان‌زایی و اثرات سمی می‌باشد که به راحتی از طریق پوست جذب گردیده و باعث درماتیت

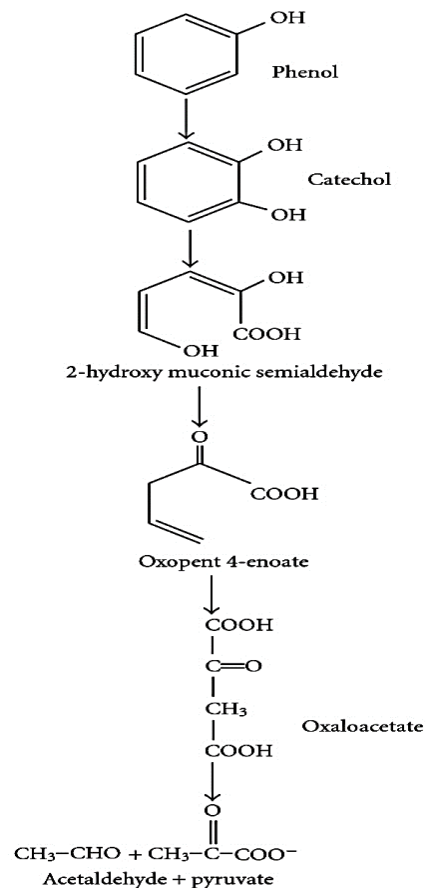
ریزآلاینده‌ها شامل انواع مختلفی از مواد مانند فلزات سنگین و مواد آلی (رنگ‌های نساجی، هورمون‌ها، داروهای متابولیک و آفت‌کش‌ها) می‌باشند که توسط فعالیت‌های انسانی در محیط پخش می‌شوند و سال‌هاست به یک تهدید جهانی تبدیل شده است و سبب ایجاد عوارضی نظیر سمیت حاد، از دست دادن باروری، تولدهای ناقص، تغییر جنسیت و اختلال در غدد درون‌ریز می‌باشد (۴). کتکول از تجزیه بسیاری از ترکیبات آروماتیک نظیر فنول،

کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز حلقه آروماتیک کتکول را در موقعیت متا (۲،۳) می‌شکند، در نهایت کتکول را به ۲- هیدروکسی موکونیک سمی‌آلدهید تبدیل می‌کند (۲). کتکول دی‌اکسیژنازها از آنزیم‌های کلیدی در متابولیسم ترکیبات آروماتیک موجود در باکتری‌های خاک می‌باشند که در زیست‌پالایی نقش بسزایی دارند. کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز به دو گروه آنزیم‌های شکننده اینترادیول و اکسترادیول تقسیم می‌شوند. هر دو نوع آنزیم در جایگاه فعال خود دارای آهن می‌باشند که برای فعالیت آنزیم ضروری هستند. اینترادیول‌ها دارای آهن سه ظرفیتی و اکسترادیول‌ها دارای آهن دو ظرفیتی می‌باشند (۷).

اکسترادیول دی‌اکسیژنازها آنزیم‌های متنوعی هستند که با طیف گسترده‌ای از سوبستراها واکنش می‌دهند و به دو گروه تقسیم می‌شوند: ۱- گروهی که با سوبستراهای تک حلقوی واکنش می‌دهند. ۲- گروهی که با سوبستراهای چند حلقوی واکنش می‌دهند. کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز ترکیبات تک حلقوی را تجزیه می‌کند که دارای دو دمین و اولیگومر می‌باشد و در جایگاه فعال خود دارای آهن دو ظرفیتی یا منگنز دو ظرفیتی می‌باشند. اکسترادیول دی‌اکسیژناز شکستن حلقه ترکیبات آروماتیک را از کربن دارای گروه هیدروکسیل و بدون هیدروکسیل کاتالیز می‌کند. مکانیسم عمل آنزیم با اتصال دو جانبه سوبسترا به عنوان مونوآنیون به آهن دو ظرفیتی در جایگاه فعال و جایگزینی دو مولکول آب به طور همزمان آغاز می‌شود که با اتصال اکسیژن به آهن دو ظرفیتی یک حدواسط سمی کینون- فروس- سوپراکسید شکل می‌گیرد. سپس در مراحل بعدی گروه کربونیل اکسید با دو بار مرکزی و باند اکسیژن- اکسیژن شکافته می‌شود و حدواسط لاکتون شکل می‌گیرد. باند آهن دو ظرفیتی و یون هیدروکسید تشکیل می‌شود در نهایت هیدرولیز لاکتون باعث تشکیل سمی-آلدهید می‌شود (شکل ۲). به دلیل اهمیت کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز در تخریب ترکیبات آروماتیک در دهه‌های گذشته مورد توجه قرار گرفته است و مطالعات زیادی در مورد

می‌شود و همچنین اثرات مسمومیت با کتکول شبیه مسمومیت با فنول می‌باشد (۱۹). کتکول به دلیل سمی بودن می‌تواند باعث سرطان لنفاوی، آسیب به سیستم اعصاب مرکزی و عدم رونویسی DNA شود. بنابراین به عنوان یکی از عوامل سرطان در انسان شناخته شده است (۱۶).

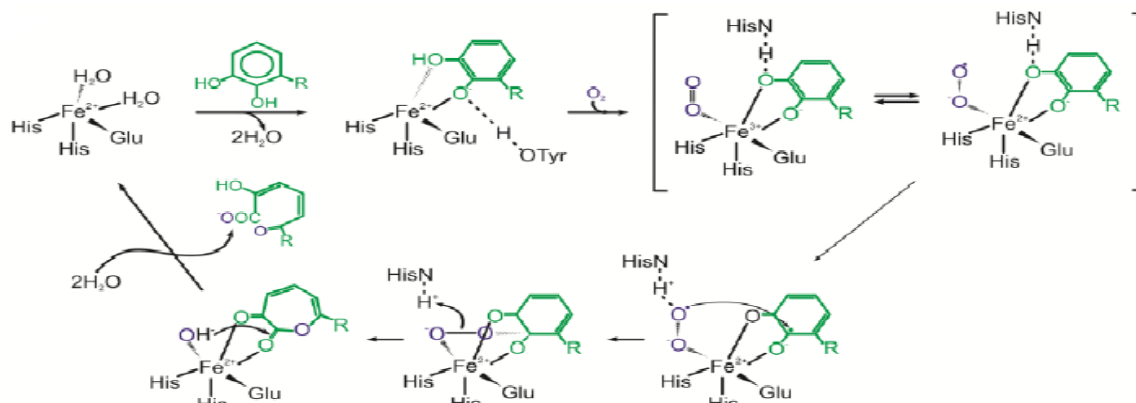
کتکول به دست‌آمده از تجزیه ترکیبات آروماتیک دچار سرنوشت‌های متفاوتی خواهد شد. مسیر ارتو (Ortho pathway) توسط آنزیم کتکول ۲و۱ دی‌اکسیژناز و مسیر متا (Meta pathway) توسط آنزیم کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز را طی کرده و به چرخه تری کربوکسیک اسید ختم می‌شود. شکل ۱ مسیر تجزیه فنول و تبدیل آن به کتکول و سرنوشت کتکول را نشان می‌دهد (۱۸).



شکل ۱- مسیر تجزیه کتکول و ختم آن به چرخه تری کربوکسیلیک-اسید (۱۷).

آروماتیک صورت گرفته است (۱۱).

ساختار مولکولی، ویژگی‌های سوبسترای، عملکرد و انتقال آن‌ها به میکروارگانیسم‌های مختلف برای تجزیه ترکیبات



شکل ۲- مکانیسم عمل اکسترادیول دی‌اکسیژناز (۷).

جمله *Alcaligenes, Bacillus, Planococcus, Variovorax, Stenotrophomonas, Pseudomonas, Sphingomonas* مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۰). مطالعات مختلف جهت بررسی مکانیسم واکنش آنزیمی توسط Shu و همکاران در سال ۱۹۹۵ و Bugg & lin در سال ۲۰۰۱ شکل گرفت و ساختار اولیه کتکول ۲،۳ دی‌اکسیژناز برای اولین بار سال ۱۹۸۳ توسط Nakai و همکاران در *Pseudomonas putida mt2* شناسایی شد و توسط Kita و همکارانش در سال ۱۹۹۹ توضیح داده شد (۱۲).

آلودگی‌های روزافزون زیست محیطی و تهدید سلامت جهانی منجر به روی‌آوری به روش‌های سازگار با محیط از جمله استفاده از باکتری‌های موجود در خاک با توانایی تجزیه ترکیبات آروماتیک، جهت کاهش یا حذف این آلاینده‌ها شده است. کتکول ۲ و ۳ دی‌اکسیژنازها، آنزیم‌های شکننده ترکیبات آروماتیک و تبدیل آن‌ها به مواد بی‌خطر یا کم‌خطر است و مطالعه حاضر در راستای شناسایی، همسانه سازی و تخلیص آنزیم کتکول ۲ و ۳ دی‌اکسیژناز از باکتری *Aneurinibacillus migulanus* Znu12 جدا شده از شیل های نفتی کرمانشاه انجام گردید. تا با مطالعات بیوانفورماتیکی و بیوشیمیایی این آنزیم در حضور

آنزیم کتکول ۲ و ۳ دی‌اکسیژناز (متوپروکتکاز) به اکسیژن و فرم‌های کاهشی آن حساس می‌باشد و به راحتی توسط اکسیدکننده‌های مختلف غیرفعال می‌شود که از این اکسیدکننده‌ها می‌توان هوا یا  $H_2O_2$  را نام برد. این اکسیداسیون در اثر تبدیل آهن دوظرفیتی به آهن سه‌ظرفیتی و آزاد شدن آن از پروتئین می‌باشد که در اثر این اکسیداسیون آنزیم غیرفعال می‌شود و در نهایت می‌توان با انکوباسیون با آهن سه‌ظرفیتی و یک کاهش‌دهنده در شرایط بی‌هوازی دوباره فعال کرد که از غیرفعال شدن آنزیم در حضور کتکول جلوگیری می‌کند، ناگفته نماند که کوفاکتور آهن توسط هالوکتکول نیز غیرفعال می‌شود (۲۰ و ۲۲). در اکثر ساختارهای اکسترادیول دی‌اکسیژنازها، در جایگاه فعال یون آهن دو ظرفیتی با دو باقی‌مانده هیستیدین، یک گلوتامات و یک تیروزین به صورت حفظ شده وجود دارد. نتایج مطالعات قبلی نشان می‌دهد که اکثر اکسترادیول دی‌اکسیژنازها از مکانیسم واحد و شناخته شده‌ای برای اتصال به سوبسترا و شکستن ترکیبات آروماتیک استفاده می‌کنند که این ساختار حفظ شده در آنزیم‌های زیادی مشاهده شده است (۹).

با توجه به کاربرد این آنزیم در حفاظت از محیط زیست، کتکول ۲،۳ دی‌اکسیژناز از میکروارگانیسم‌های مختلفی از

Reverse (5'-TC این صورت بود: مرحله اول: ۹۴°C (۳ دقیقه)، مرحله دوم: ۹۴°C (۱ دقیقه)، ۵۲°C (۱ دقیقه)، ۷۲°C (۱/۵ دقیقه) در ۳۵ چرخه، مرحله آخر: ۷۲°C (۳ دقیقه) انجام شد و محصول PCR روی ژل آگاروز ۱ درصد بارگذاری شد.

**همسانه‌سازی ژن کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز در میزبان پروکاریوتی:** بعد از خالص‌سازی محصول PCR توسط کیت تخلیص محصول PCR، برش توسط آنزیم‌های برشی *XhoI* و *BamHI* به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷°C انجام شد. به منظور همسانه‌سازی و بیان ژن کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز از وکتور بیانی pET28a و جهت جای‌گذاری توالی آنزیم از باکتری *E. coli* DH5α به عنوان میزبان برای انتقال حامل نوترکیب استفاده گردید. پس از برش پلاسمید مورد نظر توسط آنزیم‌های برشی *XhoI*، *BamHI* در دو مرحله به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷°C، آلکالین فسفاتاز به پلاسمید برش یافته اضافه گردید. این واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷°C انجام شد. به منظور غیرفعال کردن آنزیم محصول واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵°C قرار گرفت. سپس واکنش اتصال با حضور آنزیم T4 DNA Ligase به منظور قرارگیری ژن مورد نظر در جایگاه همسانه‌سازی حامل بیانی pET28a به مدت ۲۰-۲۴ ساعت در ۲۲°C صورت گرفت و در نهایت حامل به باکتری مستعد *E. coli* DH5α انتقال یافت.

پس از انجام عمل ترانسفورم، همسانه‌سازی محصول PCR تخلیص شده طی مراحل میزبان پروکاریوتی *E. coli* DH5α انجام گردید. برای تایید عمل ترانسفرم و همسانه‌سازی از روش‌های غربال‌گری با استفاده از کلونی PCR، غربال‌گری با استفاده از هضم آنزیمی و تعیین توالی استفاده شد.

**بیان و تخلیص آنزیم کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز:** استخراج پلاسمید نوترکیب حاوی توالی آنزیم مورد مطالعه از باکتری *E. coli* سویه DH5α توسط کیت استخراج پلاسمید

سویستراهای گوناگون و بررسی فعالیت در گستره pH گامی به سوی استفاده گسترده از این دسته آنزیم‌ها در صنعت زیست‌پالایی برداشته شود.

## مواد و روشها

**مواد شیمیایی و آنزیم‌ها:** محیط کشت Nutrient Broth، محیط کشت Nutrient Agar، کوماسی‌بلو، آگارز، تریپتون، کانامایسین، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، دی پتاسیم فسفات، اسیدآسکوربیک، کتکول، فرسولفات‌هایدراته، نمک‌تریس و سایر مواد شیمیایی که از شرکت مرک (Darmstadt, Germany) تهیه گردید. آنزیم‌های *BamHI* و *XhoI* از شرکت Thermal scientific و T4 DNA Ligase از شرکت Bioneer کره جنوبی تهیه گردید و خدمات سنتز پرایمر و تعیین توالی توسط شرکت تکاپو زیست نماینده Bioneer کره جنوبی انجام گردید.

**تکثیر توالی کد کننده آنزیم کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز:** در این مطالعه از باکتری *Aneurinibacillus migulanus* که پیش‌تر از خاک شیل‌های نفتی مربوط به ارتفاعات منطقه دودان (N ۳۵°۰۱'۳۲" و E ۴۶°۱۱'۸/۶") واقع در غرب استان کرمانشاه جداسازی شده بود استفاده شده است (۱). پس از بررسی‌های مولکولی (شناسایی توالی 16S rDNA) باکتری با عنوان *Aneurinibacillus migulanus* Znu12 نامگذاری گردید. توالی 16SrDNA باکتری *Aneurinibacillus migulanus* Znu12 در NCBI blast بررسی شد و باکتری‌های دارای بیشترین تشابه با جنس و گونه باکتری مورد نظر مشخص گردید و بعد از بررسی آن‌ها باکتری *Aneurinibacillus migulanus* strain DSM 2895 که دارای ژن مربوط به توالی آمینواسیدی آنزیم کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز بود انتخاب شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار GenRunner طراحی پرایمرهای (5'-CGAGGATCCATGAACAGCATTTTGCATCG-3') و Forward (5'-GTGCTCGAGCTATGTTAATGCTTTTGGAAAACGAT

اثر pH بر فعالیت آنزیم: فعالیت نسبی آنزیم در ۳ تکرار در دمای °C ۲۵ در pH های مختلف تعیین گردید. بدین-منظور از بافر مخلوط (حاوی تریس و فسفات) استفاده شد. از محلول‌های سود و اسیدکلریدریک جهت تنظیم و تهیه pH های مختلف (۶-۸/۵) استفاده گردید.

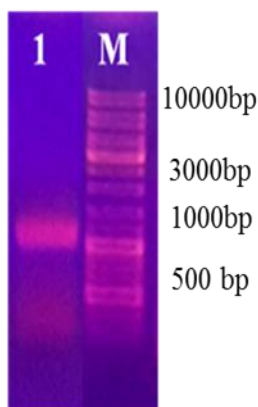
اختصاصیت سوبسترای و بهینه کردن غلظت سوبسترا: مطابق بخش ۲-۵ فعالیت آنزیم در دمای اتاق و  $pH=7/2$  در غلظت‌های مختلف کاتکول (۰/۷۵، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۳، ۰/۰۳۲ میلی‌مولار) مورد سنجش قرار گرفت و در ادامه همچنین جهت بررسی اختصاصیت سوبسترای، فعالیت آنزیم در حضور سوبستراهای مختلف کتکول، فنول و پیروگالول (۱۰ میلی‌مولار) در  $pH=7/2$  و دمای °C ۲۵ (مطابق بخش ۲-۵) مورد سنجش قرار گرفت.

مطالعات بیوانفورماتیکی: ساختار آنزیم کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز در باکتری *Aneurinibacillus migulanus* Znu12 با استفاده از ابزارهای مختلف بیوانفورماتیکی مورد بررسی قرار گرفت. از این رو، توالی‌های پروتئینی مشابه با توالی این آنزیم در NCBI به دست آمد. سپس مشابه‌ترین توالی به پروتئین باکتری مورد نظر گزینش و مدل‌های آن با استفاده از نرم افزار Modeller 9v18 طراحی شد و بهترین مدل با مقایسه‌ی پارامترهای به دست آمده از محاسبات توسط نرم افزارهای ModEval، SAVES، SPdbViewer و PIC Server انتخاب و مورد ارزیابی قرار گرفت. افزون بر این، میانکشی‌های مختلف بین پروتئین الگو با مدل انتخابی بررسی و مقایسه شد که نشان دهنده‌ی انتخاب درست مدل بود. آمینواسیدهای حفظ شده و متصل به اتم آهن توسط سرور ESPript3 شناسایی شدند که نشان-دهنده‌ی شباهت دیگر توالی‌های پروتئینی به دست آمده از NCBI با توالی پروتئین مدل و الگو بود. با توجه به تطبیق مدل و الگو از طریق نرم‌افزارها و سرورها، مدل پروتئین باکتری مورد نظر نیز ساخته شد. افزون بر این، ساختار سه بعدی این پروتئین توسط نرم افزار Chimera رسم گردید

در محیط کشت LB Broth حاوی کانامایسین ۵۰ میلی-مولار صورت گرفت سپس به سویه بیانی BL21 انتقال یافت. جهت القا بیان ژن به محیط کشت حاوی باکتری، IPTG (Isopropyl  $\beta$ -d-1-thiogalactopyranoside) (۱ میلی‌مولار) و سولفات آهن (۱ مولار) اضافه گردید. القا بیان آنزیم به مدت ۱۷ ساعت در دمای °C ۲۵، ۱۸۰ دور بر دقیقه در انکوباتور انجام گردید. محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۲۰ دقیقه با ۵۰۰ دور بر دقیقه در دمای °C ۴ سانتریفیوژ شد. به رسوب باکتری ۳ میلی‌لیتر بافر لیزکننده به صورت سوسپانسیون اضافه گردید. پس از آن سوسپانسیون باکتری تحت سونیکاسیون (شامل ۲۰ مرحله-۲۰ ثانیه) قرار گرفت. برای جلوگیری از تخریب گرمایی تمام مراحل سونیکاسیون در یخ انجام گردید. سلول‌های لیز شده در دمای °C ۴ با ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی برای انجام مراحل بعدی جدا گردید. تخلیص پروتئین با استفاده از ستون کرماتوگرافی نیکل آگاروز انجام شد. سپس از سدیم دو سبیل سولفات پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز SDS-PAGE) با ، درصد ژل بالای الکتروفورز ۵ درصد و ژل پایین ۱۲/۵، برای آنالیز کیفی و تعیین خلوص پروتئین‌ها با استفاده گردید

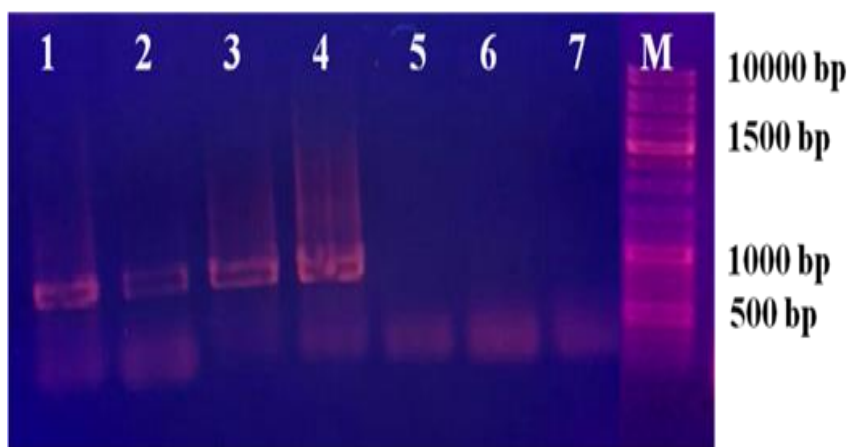
سنجش فعالیت آنزیم: فعالیت آنزیم کتکول ۳و۲ دی-اکسیژناز با واکنشی به حجم دو میلی‌لیتر که حاوی اسیدآسکوربیک ۲ میلی‌مولار، آهن ۱ میلی‌مولار برای جلوگیری از غیرفعال شدن آنزیم، آنزیم کتکول ۳و۲ دی-اکسیژناز (۰/۲ میلی‌گرم)، سوبسترای کتکول (۱۰ میلی‌مولار) و بافر تریس (۵۰ میلی‌مولار) می‌باشد، فعالیت آنزیم کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز در دمای °C ۲۵ در طول موج ۳۷۵ نانومتر که تبدیل کتکول به ۲- هیدروکسی موکونیک سمی آلدید را انجام می‌دهد، توسط دستگاه اسپکتوفتومتر مورد سنجش قرار گرفت (۴). غلظت پروتئین با روش برادفورد سنجش گردید و از استاندارد سرم آلبومین گاوی (BSA) استفاده شد (۱۴).

شده و صحت همسانه سازی با PCR کلونی‌ها (شکل ۴)، هضم آنزیمی (شکل ۵) و تعیین توالی تایید شد.



شکل ۳- محصول PCR، (M) مارکر وزن مولکولی ۱۰۰۰-۱۰۰۰۰ جفت‌باز.

با توجه به نتایج غربال‌گری با استفاده از کلونی PCR، که تمامی کلونی‌های ذکر شده در محیط کشت مایع حاوی کاناماسین رشد کردند و همچنین این کلونی‌ها قبل از کشت، مستقیماً به عنوان الگو در PCR مورد استفاده قرار گرفتند و محصول PCR آن‌ها با ژل آگاروز مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴). همان‌طور که در شکل (۴) نشان داده شده است از ۶ کلونی انتخاب شده کلونی‌های ۱ و ۲ و ۳ مثبت شد که نشان داد این کلونی‌ها حاوی ژن مورد نظر بود. بنابراین کلونی‌های ۱ و ۴ برای ادامه کار انتخاب شدند.



شکل ۴- کلونی PCR ژن کتکول ۳ و ۲ دی‌اکسیژناز در ژل آگاروز ۱ درصد. نمونه‌های ۱ تا ۴ بیانگر نتیجه واکنش PCR انجام شده از کلونی رشد کرده در فرآیند انتقال پلاسمید حاوی ژن کتکول ۳ و ۲ دی‌اکسیژناز به باکتری می‌باشد. نمونه ۷ کنترل منفی بیانگر واکنش PCR انجام شده بدون DNA الگو می‌باشد.

و جایگاه فعال آنزیم متصل به اتم آهن با استفاده از این نرم‌افزار نشان داده شد و شباهت و تفاوت بین ساختارهای سوم پروتئین الگو و مدل نیز مورد بررسی قرار گرفت. تطبیق توالی آنزیم کتکول ۳ و ۲ دی‌اکسیژناز در باکتری‌های *Pseudomonas migulanus* (A.m), *Aneurinibacillus Geobacillus putida* (P.p), *Bacillus bacterium* (B.b), *Quasibacillus thermotolorans* (Q.t), (G.b), *Parageobacillus thermoglucosidasius* (P.t)، با سرور ESPript3 ترسیم شد.

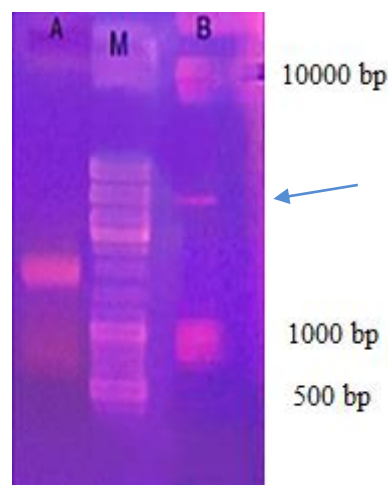
## نتایج

تکثیر توالی آنزیم کتکول ۳ و ۲ دی‌اکسیژناز: نتایج واکنش PCR بر روی ژل آگاروز بیانگر قطعه‌ی ژنومی مربوط به توالی ژنومی آنزیم کتکول ۳ و ۲ دی‌اکسیژناز می‌باشد که در ناحیه ۹۱۵ جفت‌بازی قرار گرفته است و معادل ۳۰۴ باقی-مانده آمینواسیدی در توالی پروتئینی مربوط به آنزیم می-باشد که نشان‌دهنده‌ی صحت انجام واکنش PCR و درستی طراحی پرایمر می‌باشد.

همسانه‌سازی و تعیین توالی ژن کدکننده کتکول ۳ و ۲ دی‌اکسیژناز: محصول PCR برش یافته توسط آنزیم‌های *BamHI* و *XhoI* در ناقل pET28a همسانه سازی

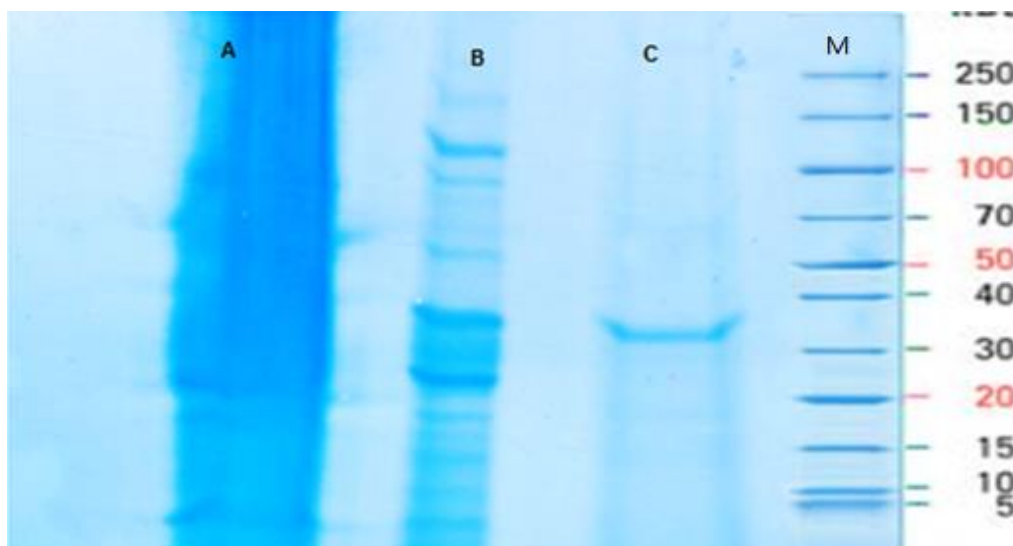
نتایج غربال‌گری با استفاده از هضم آنزیمی تاییدی بر عمل ترنسفرم و همسانه‌سازی بود. هضم آنزیمی وکتور pET28a نوترکیب در یک نمونه (وکتور حاصل از کلونی شماره ۱) جهت تایید واکنش اتصال قطعه موردنظر با حامل با استفاده از آنزیم‌پرشی BamHI انجام گرفت به طوری که قطعه برش‌یافته نسبت به هضم وکتور pET28a غیر نوترکیب سنگین‌تر و دارای وزن بیشتری می‌باشد (شکل ۵).

نتایج غربال‌گری با استفاده از هضم آنزیمی تاییدی بر عمل ترنسفرم و همسانه‌سازی بود. هضم آنزیمی وکتور pET28a نوترکیب در یک نمونه (وکتور حاصل از کلونی شماره ۱) جهت تایید واکنش اتصال قطعه موردنظر با حامل با استفاده از آنزیم‌پرشی BamHI انجام گرفت به طوری که قطعه برش‌یافته نسبت به هضم وکتور pET28a غیر نوترکیب سنگین‌تر و دارای وزن بیشتری می‌باشد (شکل ۵).



شکل ۵- غربال‌گری بر اساس هضم آنزیمی. A- پلاسمید غیر نوترکیب M- مارکر وزن مولکولی ۱۰۰-۱۰۰۰۰ B- پلاسمید نوترکیب حامل ژن همسان سازی شده (مشخص شده با فلش).

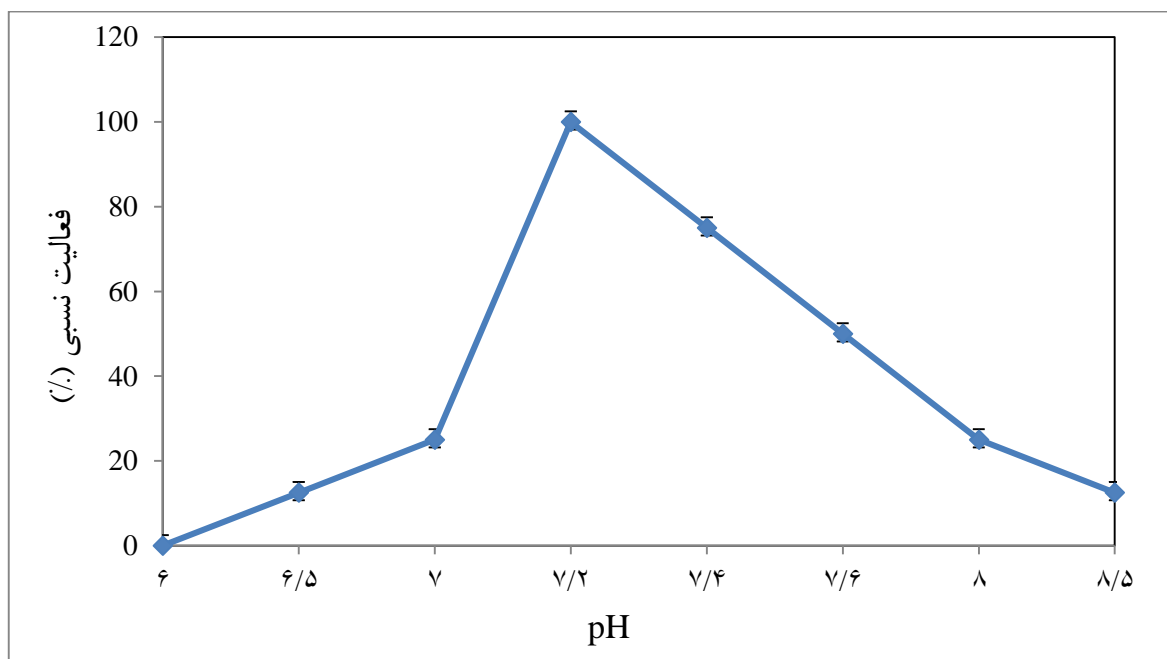
با ۹۹ درصد همسانی بود. **بررسی بیان و تخلیص پروتئین کتکول ۳ و ۲ دی‌اکسیژناز:** نتایج الکتروفورز پروتئین به روش SDS-PAGE احیایی بیان‌گر بیان پروتئین کتکول ۳ و ۲ دی‌اکسیژناز در میزبان بیانی همسان‌سازی شده‌ی *E. coli* BL21 می‌باشد (شکل ۶). نتایج الکتروفورز SDS-PAGE تایید کننده این مسئله می‌باشد که آنزیم کتکول ۳ و ۲ دی‌اکسیژناز تخلیص شده با استفاده از ستون کرماتوگرافی تمایلی نیکل آگاروز دارای درجه خلوص بالای ۹۰ درصد و وزن مولکولی حدود ۳۴ کیلودالتون بدون در نظر گرفتن برچسب هیستیدینی می‌باشد.



شکل ۶- تصویر ژل SDS PAGE آنزیم کتکول ۳ و ۲ دی‌اکسیژناز: A- نتایج الکتروفورز رسوب نمونه بعد از شکست سلولی B- نتایج الکتروفورز محلول رویی سلول‌های القاشده بعد از شکست سلولی C- نتایج الکتروفورز بعد از فرآیند تخلیص با کرماتوگرافی تمایلی نیکل-آگاروز M- مارکر پروتئین با کد PM2600.

شده بهینه pH برای آنزیم کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز در سویه‌های مختلف باکتری ۷-۸/۵ گزارش شده بود (۱۶ و ۱۷) که با نتایج حاصل از تحقیق ما تطابق داشت. با توجه به این مسئله که جایگاه فعال آنزیم کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز دارای دو باقی‌مانده اسید آمینه هیستیدین و یک باقیمانده گلوتامات می‌باشد. به دلیل pKa آمینواسید هیستیدین، پروتئین را دارای قدرت بافری موثری در pH نزدیک خنثی می‌کند.

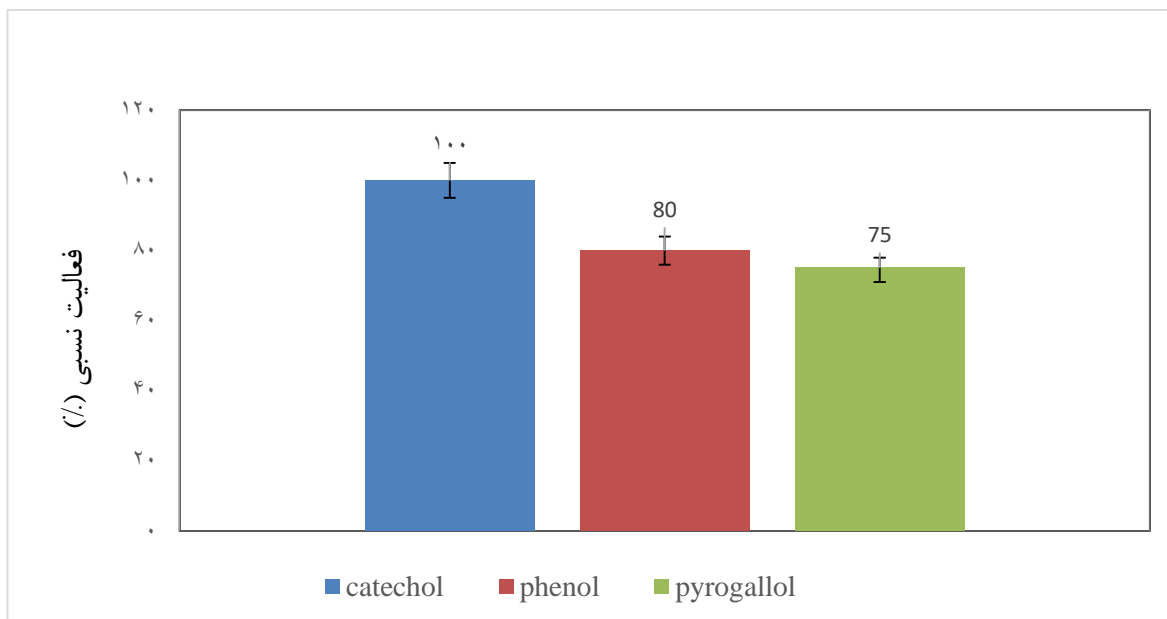
**۳-۴- تاثیر pH بر فعالیت آنزیم کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز:** در این آزمایش آنزیم کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز با بافر مختلط در pH های ۶، ۶/۵، ۷، ۷/۲، ۷/۴، ۷/۶، ۸ و ۸/۵ با سوبسترای کتکول با سه تکرار در سه روز متفاوت سنجیده شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که آنزیم در pH=۷/۲ حداکثر فعالیت را دارا بود. همان‌طور که در نمودار ادیده می‌شود. آنزیم در pH=۷/۲ دارای بیشترین (۱۰۰ درصد) فعالیت می‌باشد. اما در ۷/۴ دارای ۷۰ درصد فعالیت بود. در برخی بررسی‌های انجام



نمودار ۱) بررسی فعالیت آنزیم کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز در pH های مختلف با سه تکرار در سه روز متفاوت.

سوبستراهای دیگر نسبت به کتکول فعالیت کمتری از خود نشان داد که با مطالعات دیگر انجام شده تطابق داشت، به نظر می‌رسد با توجه به جایگاه فعال آنزیم کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز و همچنین ساختار کتکول، که دارای دو گروه هیدروکسیل می‌باشد. کتکول برهمکنش مناسب‌تری نسبت به سایر سوبسترا با جایگاه فعال دارد.

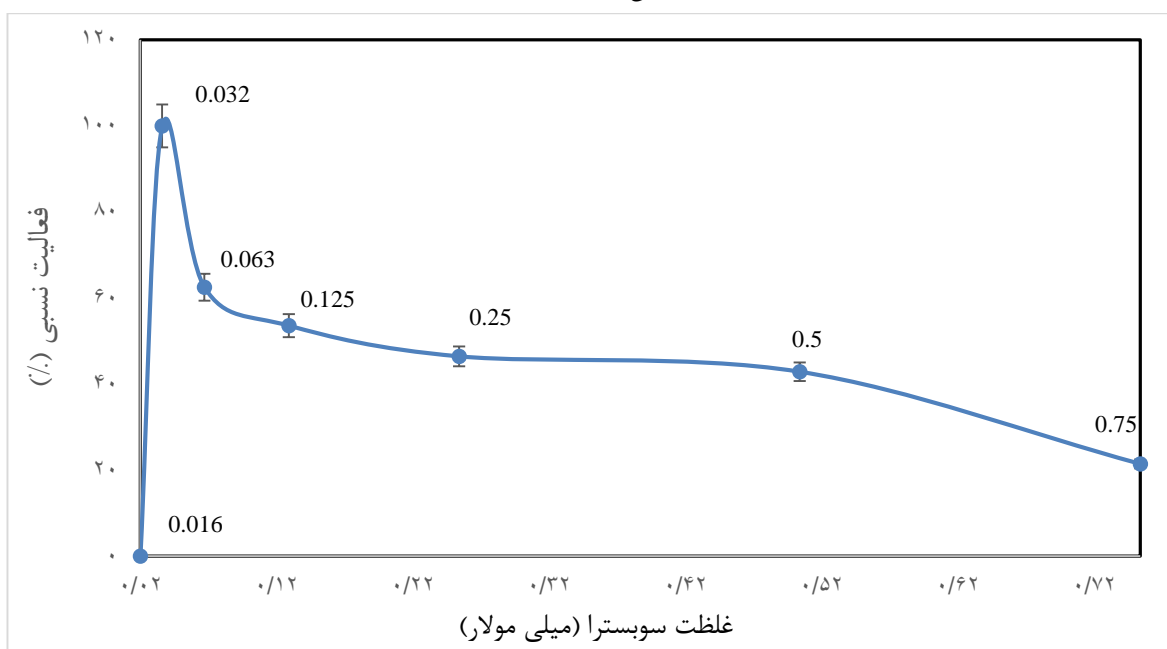
**ترجیح سوبسترای آنزیم کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز:** در این آزمایش میزان فعالیت آنزیم بر روی سه سوبسترای مختلف در بافر تریس ۵۰ میلی مولار pH=۷/۲ با سه تکرار در سه روز متفاوت مورد بررسی قرار گرفت و همان‌طور که نمودار ۲ نشان می‌دهد کتکول به عنوان سوبسترای اصلی آنزیم کتکول ۳و۲ دی‌اکسیژناز می‌باشد که بیشترین فعالیت را روی آن داشت. آنزیم روی



نمودار ۲- بررسی ترجیح سوبسترای آنزیم کتکول ۳ و ۲ دی‌اکسیژناز بر روی سوبستراهای کتکول، فنول و پیروگالول. کلیه آزمایش‌ها با سه تکرار و در سه روز متفاوت انجام شده است.

مولار) کتکول سنجیده شد که آنزیم کتکول ۳ و ۲ دی‌اکسیژناز بیشترین فعالیت را در غلظت ۰/۰۳۲ میلی-مولار کتکول نشان داد (نمودار ۳).

بررسی فعالیت آنزیم کتکول ۳ و ۲ دی‌اکسیژناز در غلظت‌های مختلف سوبسترا: در این پژوهش فعالیت آنزیم کتکول ۳ و ۲ دی‌اکسیژناز بر غلظت‌های مختلف (۰/۷۵، ۰/۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۰۶۳، ۰/۰۳۲، و ۰/۰۱۶ میلی-مولار)



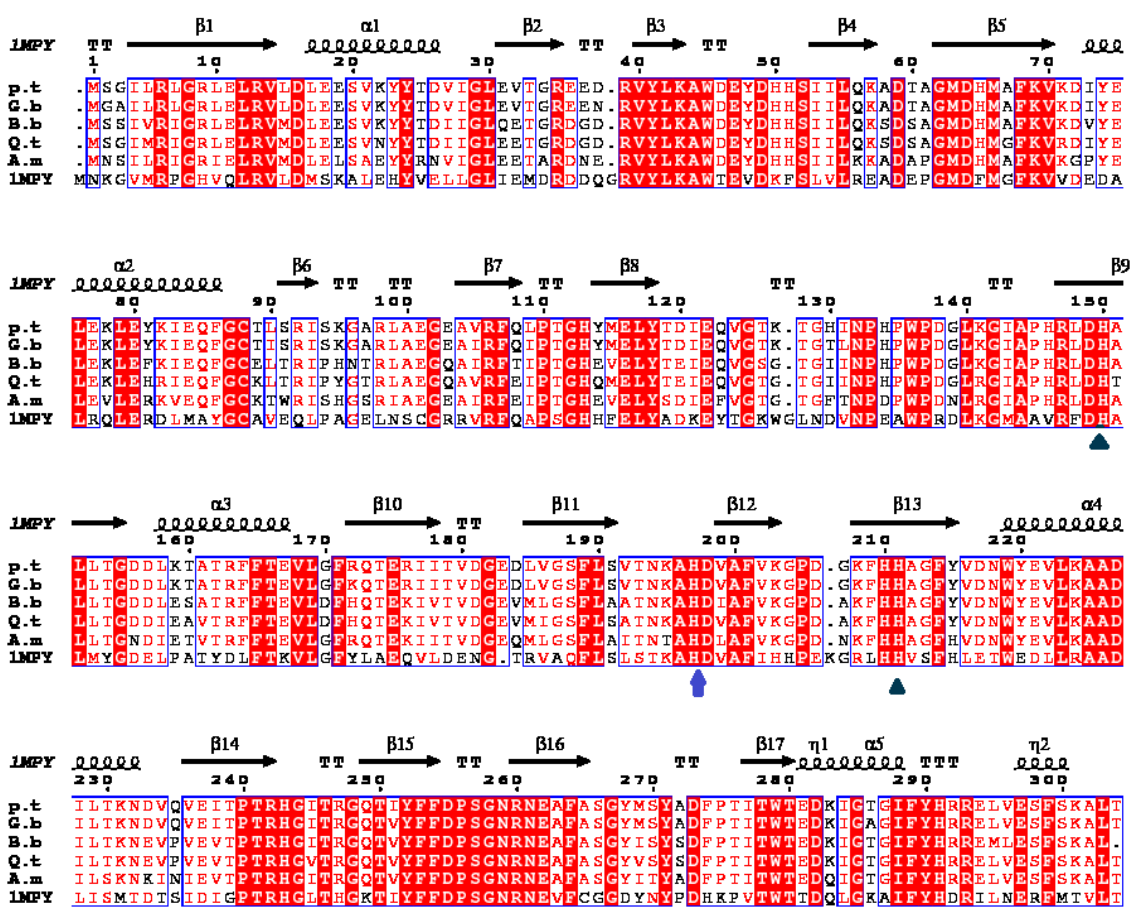
نمودار ۳- بررسی فعالیت آنزیم کتکول ۳ و ۲ دی‌اکسیژناز در غلظت‌های مختلف سوبسترای کتکول.

های مشابه در جهت درک بهتر مکانیسم عمل آنزیم الگو با استفاده از آنزیم‌هایی است که اطلاعات ساختاری و

مطالعات بیوانفورماتیک: مطالعات بیوانفورماتیک با اهداف شناسایی، مقایسه توالی و ساختار آنزیم مورد نظر با آنزیم-

عملکردی بیشتر در مورد آن‌ها وجود دارد. و این مطالعات بستر ساز مطالعات آینده با اهداف مهندسی پروتئین در راستای طراحی آنزیم‌هایی با اختصاصیت سوسترایی، پایداری حرارتی، افزایش فعالیت و تغییر pH مطلوب می‌باشد. بررسی‌ها بر روی پروتئین الگو نشان داد که در جایگاه فعال اتم آهن، به ترتیب به باقی‌مانده‌های (His 199) و (Tyr255)، (Glu265.His214.His153) متصل می‌شود که در همه توالی‌های مورد بررسی حفاظت شده بودند. همچنین باقی‌مانده (His199) در جایگاه کاتالیک نیز قرار دارد به صورت حفاظت شده می‌باشد (۲). نتایج تطبیق توالی با سرور ESPript3 تاییدکننده باقیمانده‌های به شدت حفظ شده در آنزیم کتکول ۲ و ۳ دی‌اکسیژناز مورد مطالعه می‌باشد.

عملکردی بیشتر در مورد آن‌ها وجود دارد. و این مطالعات بستر ساز مطالعات آینده با اهداف مهندسی پروتئین در راستای طراحی آنزیم‌هایی با اختصاصیت سوسترایی، پایداری حرارتی، افزایش فعالیت و تغییر pH مطلوب می‌باشد. بررسی‌ها بر روی پروتئین الگو نشان داد که در جایگاه فعال اتم آهن، به ترتیب به باقی‌مانده‌های



شکل ۷- پروتئین کتکول ۲، ۳ دی‌اکسیژناز در باکتری *Aneurinibacillus migulanus* (A.M) توسط سرورهای ClastelW و ESPript3 بر اساس ساختار دوم، *Pesedomonas putid* mt2 (IMPY)، تطبیق داده شد و ساختار دوم توسط  $\alpha$ -Helix ( $\alpha$ )،  $\beta$ -strand ( $\beta$ )، turn ( $\tau$ )،  $\beta$ -strand ( $\beta$ )،  $\alpha$ -Helix ( $\alpha$ )،  $\beta$ -strand ( $\beta$ )،  $\tau$  (turn) و آهن متصل به هم (●) و آهن متصل به هم (▲) و همچنین اکتیوسایت دارای آهن متصل به هم (▲) و هیستیدین ۱۵۳ و ۱۴۱ و ۲۶۵ (▲) متصل تیروزین ۲۵۵ (●) و آهن متصل به هم (▲) و هیستیدین ۱۹۹ و ۲۴۶ (▲) نشان داده شده است که پروتئین کتکول ۲ و ۳ دی‌اکسیژناز در همه باکتریهای *Aneurinibacillurs* *QUASI Bacillus thermotolerans* (Q.T) *parageobacillus* *Pesedomounas putidia* mt2 (IMPY) *migulanus* (A.M) *Geobacillus* (*G.B*) *Bacillaceae Bacterium* (*B.B*) *thermoglucoisidasius* (*P.T*) حفاظت شده می‌باشد.

با توجه به اطلاعات بدست آمده از سرور PoratParam و مقایسه انجام شده بین نمونه پروتئین کتکول ۲ و ۳ دی‌اکسیژناز (1MPY) و کتکول ۲ و ۳ دی‌اکسیژناز (CTD2.3)، دلیل بر صحت مدل ساخته شده برای پروتئین مورد نظر می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج به‌دست آمده از مقایسه پارامترهای مختلف در سرورهای ModEval، SAVES، Protparam و Spdbviewer

|        | ERRAT  | z-DOPE | RMSD | VERYFY3D | pI   | Instability |
|--------|--------|--------|------|----------|------|-------------|
| 1MPY   | ۸۶,۲۸۸ | -۱,۷۹۴ | -    | ۹۹,۲     | ۵,۴۱ | ۲۶,۲۸       |
| CTD2.3 | ۸۳,۱۰۸ | -۰,۹۶۲ | ۰,۴۷ | ۸۹,۸۰    | ۵,۴۷ | ۲۱,۵۶       |

این مساله می‌باشد که این روش‌ها برای حفاظت و تجزیه ترکیبات مضر محیطی کافی نبوده است (۲۱). آنزیم کتکول ۲ و ۳ دی‌اکسیژناز یکی از آنزیم‌های مهم تجزیه‌کننده ترکیبات آروماتیک است و در زیست‌پالایی نقش بسزایی دارد (۳).

با توجه به جدول ۲ می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مقایسه وضعیت تعداد میانکشی‌های آنزیم‌های مورد مطالعه (CTD2.3)، با آنزیم 1MPY نشانگر تفاوت تعداد میانکشی‌های داخلی ساختار دو آنزیم می‌باشد و به نظر می‌رسد این تغییرات در تعداد این میانکشی‌ها، می‌تواند نقش موثری در مکانیسم واکنش آنزیمی و تشکیل حدواسط‌ها داشته باشد از اینرو با مطالعه و بررسی جزئی‌تر این میانکشی‌ها و باقیمانده‌های ایجادکننده این میانکشی‌ها، می‌توان با اعمال جهش‌ها، تغییراتی در گستره فعالیت آنزیم در pH های مختلف، دماهای مختلف و پایداری آنزیم با هدف تجاری سازی آنزیم‌ها و کاربرد آن‌ها در صنعت زیست‌پالایی ایجاد کرد.

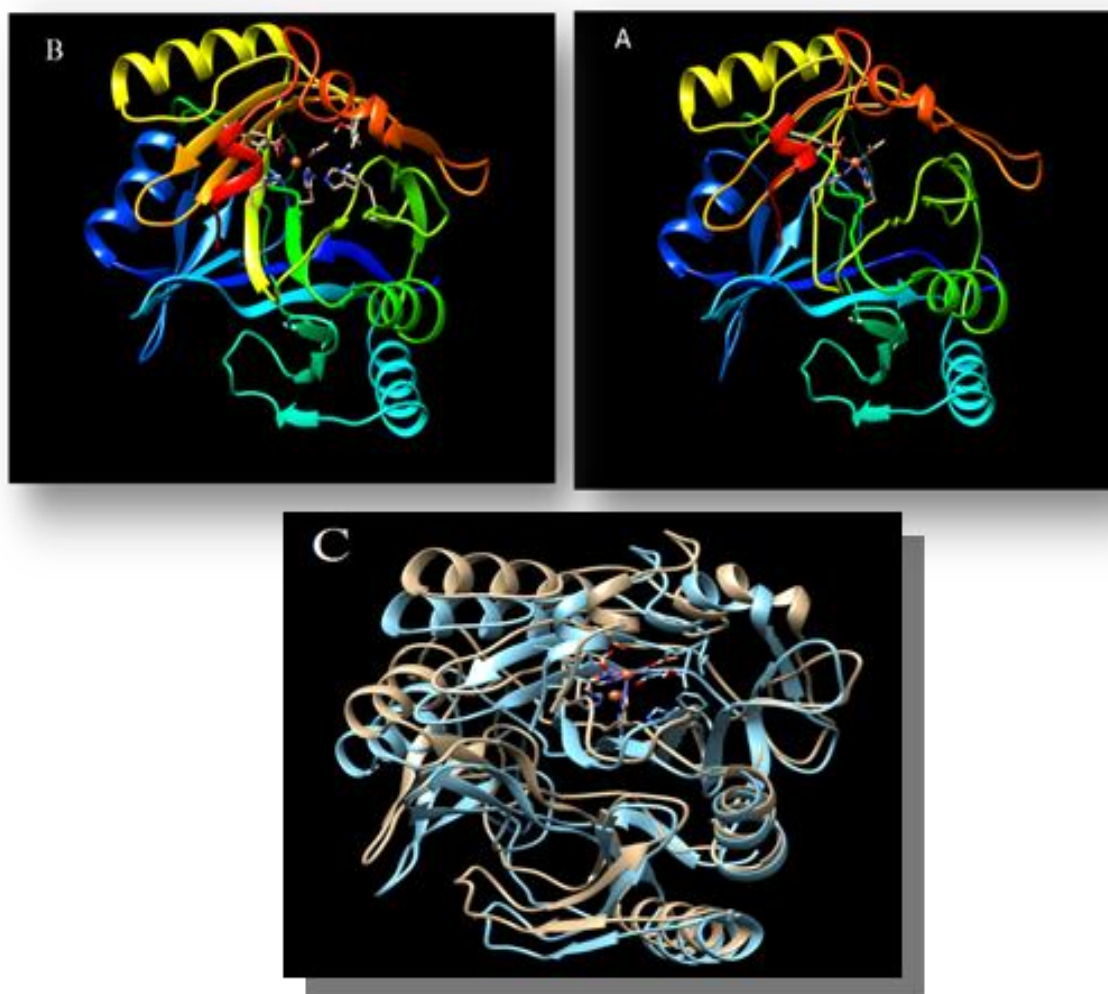
جدول ۲- مقایسه میانکشی‌های داخلی پروتئین کتکول ۲، ۳ دی‌اکسیژناز باکتری *Aneurinibacillus migulanus* Znu12 (CTD2.3) و پروتئین *Pseudomonas putida mt2* (MPY1) با استفاده از PICserver.

ساختار آنزیم کتکول ۲، ۳ دی‌اکسیژناز توسط نرم‌افزار کایمرا مورد بررسی قرارگرفت و جایگاه‌های اتصال آهن و رزیدوهای درگیر در این اتصال شناسایی شد. شکل ۸ میزان شباهت این دو آنزیم و اهمیت مطالعه رزیدوهایی که درگیر در میانکشی‌های بین مولکولی هستند را نشان می‌دهد.

| انواع میانکشی‌ها                                  | 1MPY | CTD2.3 |
|---|------|--------|
| Intraprotein Hydrophobic Interactions             | ۲۶۲  | ۲۲۴    |
| Intraprotein Main Chain-Main Chain Hydrogen Bonds | ۳۰۶  | ۳۱۲    |
| Intraprotein Main Chain-Side Chain Hydrogen Bonds | ۹۵   | ۹۹     |
| Intraprotein Side Chain-Side Chain Hydrogen Bonds | ۱۳۸  | ۹۳     |
| Intraprotein Ionic Interactions                   | ۴۹   | ۳۸     |
| Intraprotein Aromatic-Aromatic Interactions       | ۱۵   | ۱۴     |
| Intraprotein Aromatic-Sulphur Interaction         | ۲    | ۴      |
| Intraprotein Cation-Pi Interactions               | ۸    | ۵      |

### بحث و نتیجه‌گیری

امروزه استفاده از مسیرهای متابولیک میکروبی برای پاکسازی آلودگی‌های زیست محیطی مورد توجه قرار گرفته است. با وجود تنوع متابولیسمی میکروارگانیسم‌ها، ما هنوز شاهد آلودگی‌های زیستی هستیم که تاییدکننده



شکل ۸- بررسی تفاوت ساختار سه بعدی پروتئین کتکول ۲،۳ دی‌اکسیژناز (۱MPY) (A) و کتکول ۲،۳ دی‌اکسیژناز (CTD2.3) (B) و مقایسه تطبیق همسانی ساختاری ۱MPY و CTD2.3 (C) با استفاده از نرم افزار Chimera می‌باشد. در این شکل مدل ساختاری به رنگ سفید مربوط به آنزیم الگو (۱MPY) و رنگ آبی مربوط به مدل آنزیم CTD2.3 می‌باشد. در این مدل جایگاه فعال آنزیم در مرکز ساختار مشخص می‌باشد.

شده‌اند و از طرفی دیگر اهمیت زیست‌پالایی و حذف ترکیبات آروماتیک سمی، نیاز به پژوهش‌های بیشتر در این زمینه را آشکار می‌سازد. شناسایی و معرفی آنزیم‌های جدید، بررسی میزان فعالیت، مطالعه ساختار و میان‌کنش‌های بین مولکولی و درون مولکولی آن‌ها، استفاده از تکنیک‌های بیوتکنولوژی جهت معرفی آنزیم با فعالیت بالا در گستره وسیعی از فعالیت در pH و دماهای مختلف، قدم بزرگی در حل مساله زیست‌پالایی می‌باشد.

بررسی مطالعات انجام گرفته قبلی از قبیل Fujita و همکاران در ۱۹۹۱ که آنزیم کتکول ۳ و ۲ دی‌اکسیژناز را به صورت نو ترکیب در باکتری *اشرشیاکلی* تولید کردند و میزان تجزیه کتکول را سنجیدند (۶) و در سال ۱۹۶۱ Kojima و همکاران آنزیم کتکول ۳ و ۲ دی‌اکسیژناز را در باکتری *Bacillus thermoleovorans strain A2* ترمو فیل و در باکتری *اشرشیاکلی* همسانه‌سازی و بیان کردند (۱۳) که این مطالعات می‌تواند نشانگر اهمیت آنزیم کتکول ۳ و ۲ دی‌اکسیژناز باشد. با توجه به اینکه آنزیم‌های موجود در طبیعت با شرایط زیستی فعلی خودشان بهینه

سرور ESPrpt3 نیز بیانگر این جایگاه‌های حفظ شده در آنزیم مورد مطالعه می‌باشد. همچنین مطالعه *Junca* نشان داد که برخی اسیدهای آمینه نتیجه مستقیم بر فعالیت آنزیم ندارند و اکوسیستم بهترین و تکامل یافته‌ترین نوع را در طبیعت انتخاب کرده است. با بررسی‌های ساختاری و توالی آنزیم *Pseudomonas putida mt-2* مشخص شد در جایگاه ۲۰۱ باقیمانده والین و در جایگاه ۲۵۴ باقیمانده لوسین قرار دارد که در مورد آنزیم مورد مطالعه ما نیز در این جایگاه‌ها به ترتیب لوسین و والین قرار گرفته است و با توجه به اینکه ساختارهای حد واسط تشکیل شده بین سوبسترا-آنزیم و میان‌کنش‌های مولکولی که صورت می‌گیرد کاهش و افزایش یک گروه متیل در میزان فعالیت آنزیم و احتمالاً اختصاصیت سوبسترای تغییر ایجاد کند. نتایج بدست آمده در زمینه اختصاصیت سوبسترای آنزیم در میان سوبستراهای مختلف کتکول، پیروگالول و فنول نشان داد که کتکول سوبسترای مطلوب‌تری برای آنزیم می‌باشد که احتمالاً به دلایل ساختار کتکول و میان‌کنش‌های تشکیل شده بین سوبسترا-آنزیم باعث اتصال بهتر آن در جایگاه فعال آنزیم می‌شود. فعالیت ۸۰ درصدی آنزیم در حضور سوبسترای فنول به علت کمتر بودن یک گروه هیدروکسیل نسبت به کتکول قابل توجه می‌باشد. مطالعات انجام گرفته بر روی آنزیم IMPY نیز بیانگر این می‌باشد که جایگاه فعال آنزیم شامل آمینواسیدهای هیدروفوبیک: Val180, Val188, Ala189, Leu298, Ile 204, Phe302, Met 303 می‌باشد. که باقیمانده Phe302 و Met303 به واسطه زنجیره جانبی غیر قطبی‌شان در ناحیه باز صفحه بتا واقع در دومین C-ترمینال باعث پوشش‌دهی و باریک شدن آن ناحیه شده و در نهایت باعث اختصاصی شدن آنزیم به سوبسترای کتکول می‌شود (۲). در آنزیم مورد مطالعه ما نیز در جایگاه‌های ۳۰۳ و ۱۸۹ به ترتیب آمینو اسید سرین و گلایسین قرار گرفته است که احتمالاً این جایگزینی در مورد جایگاه ۳۰۳ می‌تواند با اضافه شدن یک گروه هیدروکسیلی (سرین) و کوتاه شدن زنجیره جانبی، در

در سال ۲۰۱۸ ژن و همکارانش آنزیم کتکول ۳۰۲ دی اکسیژناز را از باکتری *Thauera s K1* تخلیص و خواص زیستی و شیمیایی آن را شناسایی و نشان دادند که آنزیم هموترامر و دارای وزن مولکولی ۱۴۰ کیلودالتون می‌باشد و هر زیرواحد شامل آهن می‌باشد و دارای pH بهینه برابر ۸ و دمای مطلوب °C ۴۵ می‌باشد. مقایسه توالی آمینواسیدی این آنزیم با بیانگر همسانی در باقیمانده‌های آمینواسیدی جایگاه فعال می‌باشد و بررسی تفاوت‌ها و همسانی‌های این خانواده آنزیمی می‌تواند مسیری در جهت الگوگیری با هدف طراحی آنزیم‌هایی با ویژگی‌های عملکردی مناسب در صنعت باشد (۲۳).

آنزیم کتکول ۳۰۲ دی اکسیژناز آنزیمی هموترامر می‌باشد که از دو دایمر تشکیل شده است. دایمرها از جفت شدن پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی تشکیل می‌شود که ۳ باقیمانده Val133 تا Pro135 در تشکیل این پیوند هیدروژنی نقش دارند. هر زیرواحد ۲ دومین (N-ترمینال و C-ترمینال) دارد. N-ترمینال شامل آمینواسیدهای ۱ تا ۱۴۹ بوده که در انتهای پایانی آن از گلایسین ۱۳۰ تا تریپتوفان ۱۳۹ لوپ بلندی تشکیل می‌شود که باعث نزدیکی زیرواحدها در تترامر می‌شود. جایگاه فعال آنزیم در حفره ای بین دومین C-ترمینال قرار دارد (۲۲).

نتایج تعیین توالی و بیان ژن آنزیم مورد مطالعه، بیانگر یک توالی ۹۱۵ جفت بازی (آنزیمی با ۳۰۴ باقی‌مانده آمینواسیدی) و تک باند پروتئینی با وزن مولکولی ۳۴ کیلو دالتون بود. آنزیم کتکول ۳۰۲ دی اکسیژناز ۳۴ کیلو دالتونی مورد مطالعه در دمای °C ۲۵، pH بهینه برابر با ۷/۲ و غلظت بهینه سوبسترا ۰/۰۳۲ بیشترین فعالیت را از خود نشان داده است. در مطالعه‌ای که توسط *Junca* و همکاران انجام گرفت آنزیم کتکول ۳۰۲ دی اکسیژناز را در *Pseudomonas putida mt-2* مطالعه و گزارش کردند که باقیمانده‌های به شدت حفظ شده His199 و Tyr 255 در جایگاه‌های فعال آنزیم می‌باشد (۱۲). نتایج تطبیق توالی با

این مقاله از محل پایان نامه خانم ثریا محمدزاده دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی دانشگاه زنجان و با حمایت معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه زنجان انجام شده است.

اختصاصیت سوبسترای و سرعت واکنش تغییراتی ایجاد کند. این بررسی‌ها ضرورت اهمیت و مطالعه بر روی آنزیم کتکول ۳و۲ دی اکسیژناز را بیشتر می‌کند.

## تقدیر و تشکر

## منابع

۱. ربانی، ف.، جعفریان، و. و آسوده، ا. (۱۳۹۹). غربالگری و جداسازی برخی از باکتری‌های تجزیه‌کننده فنول در خاک‌های حاوی 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* SH1. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(2), 987-992.
۲. Akiko, K., Shin-ichi, k., Ikuhide, F., Koje, I., Tetsuo, I., Kihachiro, H., Mitsuhiko, N. & Kunio, M. (1999). An archetypical extradiol-cleaving catecholic dioxygenase: the crystal structure of catechol 2,3-dioxygenase (metapyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt-2. *Structure*, 25-34.
۳. Brodirek, J. (1999). Catechol dioxygenases. *Essays Biochem*, 34, 173-189.
۴. Celesia, D., Salzman, I., Porto, E.V., Walter, F., Weber, C., Dufresne, R. & Crelier, S. (2017). Production of a Recombinant Catechol 2,3-Dioxygenase for the Degradation of Micropollutants. *Chimia International Journal for Chemistry*, 734-738.
۵. Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., Ali, S., & Cowan, D. (2000). Immobilization of functionally unstable catechol-2, 3-dioxygenase greatly improves operational stability. *Enzyme and microbial technology*, 26(8), 568-573.
۶. Fujita, M., Kamiya, T., Ike, M., Kawagoshi, Y. & Shinohara, N. (1991). Catechol 2, 3-oxygenase production by genetically engineered *Escherichia coli* and its application to catechol determination. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 407-414.
۷. Guo, G., Fang, T., Wang, C., Huang, Y., Tian, F., Cui, Q. & Wang, H. (2015). Isolation and characterization of two novel halotolerant Catechol 2, 3-dioxygenases from a halophilic bacterial consortium. *Scientific reports*, 5(1), 1-13.
۸. Guzik, U., Hupert-Kocurek, K. & Wojcieszynska, D. (2014). Immobilization as a strategy for improving enzyme properties-Application to oxidoreductases. *Molecules*, 8995-9018.
۹. Huang, S.-L., Hsu, Y.-C., Wu, C.-M., Lynn, J. W. & Li, W.-H. (2010). Thermal effects on the activity and structural conformation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* SH1. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(2), 987-992.
۱۰. Hupert-Kocurek, K., Saczyńska, A. & Piotrowska-Seget, Z. (2013). Cadmium increases catechol 2,3-dioxygenase activity in *Variovorax* sp. 12S, a metal-tolerant and phenol-degrading strain. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104(5), 845-853.
۱۱. Hupert-Kocurek, K., Wojcieszynska, D. & Guzik, U. (2014). Activity of a carboxyl-terminal truncated form of catechol 2,3-dioxygenase from *Planococcus* sp. S5. *The Scientific World Journal*, 1-9.
۱۲. Junca, H., Plumeier, I., Hecht, H. J., & Pieper, D. H. (2004). Difference in kinetic behavior of catechol 2,3-dioxygenase variants from a polluted environment. *Microbiology*, 150(12), 4181-4187.
۱۳. Kojima, Y., Itada, N. & Hayaishi, O. (1961). Metapyrocatechase: a New Catechol-cleaving Enzyme. *Journal of biological chemistry*, 236, 2223-2228.
۱۴. Kumar, A., Kumar, S. and Kumar, S. (2005). Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochemical Engineering Journal*, 151-159.
۱۵. Li, S., Qin, K., Li, H., Guo, J., Li, D., Liu, F. & Zhao, H. (2018). Cloning and characterisation of four catA genes located on the chromosome and large plasmid of *Pseudomonas putida* ND6. *Electronic Journal of Biotechnology*, 34, 83-90.
۱۶. Liu, Z., Zhang, Y., Bian, C., Xia, T., Gao, Y., Zhang, X. & Wang, X. (2019). Biosensors and Bioelectronics Highly sensitive microbial biosensor based on recombinant *Escherichia coli* overexpressing catechol 2, 3-dioxygenase for

- reliable detection of catechol. *Biosensors and Bioelectronic*, 126, 51–58.
17. Lucey, K. S. & Leadbetter, J. R. (2014). Catechol 2,3-dioxygenase and other meta-cleavage catabolic pathway genes in the “anaerobic” termite gut spirochete *Treponema primitia*. *Molecular Ecology*, 23(6), 1531–1543.
  18. Mahiudddin, M., Fakhruddin, A. N. M. & Al-Mahin, A. (2012). Degradation of Phenol via Meta Cleavage Pathway by *Pseudomonas fluorescens* PU1. *International Scholarly Research Notices*, 1-6.
  19. Monographs, I., Chem, N. & Reg, S. (1987). *Studies of Cancer in Experimental Animals*. 1319–1323.
  20. Nozaki, M., Ono, K., Nakazawa, T., Kotani, S. & Hayaishi, O. (1968). Metapyrocatechase-The
  - Role of Iron and Sulfhydryl Groups. *The Journal of Biological Chemistry*, 234(10), 2682–2690.
  21. Pieper, D. H., & Reineke, W. (2000). Engineering bacteria for bioremediation. *Current opinion in biotechnology*, 11(3), 262-270.
  22. Wojcieszynska, D., Hupert-Kocurek, K., Jankowska, A. & Guzik, U. (2012). Properties of catechol 2,3-dioxygenase from crude extract of *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 immobilized in calcium alginate hydrogels. *Biochemical Engineering Journal*, 66, 1–7.
  23. Xi, L., Liu, D., Wang, L., Qiao, N., & Liu, J. (2018). Catechol 2,3-dioxygenase from a new phenolic compound degrader *Thauera* sp. K11: purification and biochemical characterization. *Journal of Basic Microbiology*, 58(3), 255–262.

## **Molecular and bioinformatics studies and determination of functional properties of Catechol 2,3-dioxygenase from *Aneurinibacillus migulanus* Znu12**

**Mohammadzadeh S., Ahmadpour N., Mirzaee Z. and Jafarian V.**

**Dept. of Biology, Faculty of Science, University of Zanjan, Zanjan, I.R. of Iran.**

### **Abstract**

Catechol 2,3-dioxygenases play a key role in the metabolism of aromatic molecules in the environment by soil bacteria. The aim of this study is to introduce the new catechol 2,3-dioxygenase and also to survey bioinformatics and biochemical characteristics in the presence of various substrates as well as to study its activity in various pH ranges for the widespread use of such enzymes in bioremediation industry. In this study, the DNA sequences of Catechol 2,3-dioxygenase were separated from *Aneurinibacillus migulanus* Znu12 and recorded with accession number MN197546.1 in NCBI, then it was cloned in plasmid pET28a. The accuracy of cloning and not changing the frame shift was confirmed by sequencing. After transferring of plasmid into *E. coli* BL21 (DE3) cells, protein expression was assessed by SDS-PAGE. Afterwards, the purification, assay and optimization of enzyme activity were evaluated. The results of PCR reaction on agarose gel indicated a sequence of 912 bp, an enzyme with 304 amino acid residues. Results of sequence alignment by ESPript3 server also confirmed highly conserved residues of His199 and Tyr 255 in the enzymes active site. Biochemical characterization of the enzyme showed that the enzyme had the highest (100%) activity at pH 7.2, while it had only 70% activity at pH 7.4. As compared with pyrogallol and phenol, catechol by optimal concentration of 0.032 was the most preferred substrate for the enzyme. Bioinformatics results confirmed also such substrate preference based on the type and position of amino acid residues in the enzyme active site.

**Key words:** Bioinformatic, Bioremediation, Catechol 2,3-dioxygenase, Cloning, Optimal pH.