



## مهندسی آنزیم آزریداکتاز جهت ایجاد تغییرات ساختاری در جایگاه فعال و بهبود تمایل اتصال آن به رنگ‌های آزو

علیرضا ذاکری\*<sup>۱</sup>، مریم یعقوبی<sup>۱</sup>، سعید خلیلی<sup>۱</sup>، زهرا السادات هاشمی<sup>۲</sup>، نوید پورزردشت<sup>۳</sup>

۱- گروه علوم زیستی - دانشکده مهندسی مواد و علوم میان رشته‌ای - دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی - تهران - ایران.  
 ۲- دپارتمان توسعه فناوری درمان‌های نوین - مرکز تحقیقات سرطان پستان - پژوهشکده معتمد - جهاد دانشگاهی تهران - تهران - ایران.  
 ۳- گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۸، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۰۵

### چکیده

**مقدمه:** مقادیر فراوانی از رنگ‌ها از جمله رنگ‌های آزو با پیوند پایدار، از صنایع نساجی و محصولات مشتق شده از نفت به‌طور مستقیم وارد فاضلاب می‌شوند و حذف آنها تنها با زیست پالایی قابل انجام است. در این پژوهش با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی در ساختار آنزیم آزریداکتاز جهت بهبود عملکرد آن در تجزیه این رنگ‌ها از جمله رنگ قرمز متیل تغییراتی ایجاد شده است.

**مواد و روش‌ها:** توالی اسید آمینه آنزیم آزریدوکتاز از پایگاه داده‌ی UniProt به‌دست آمد. با استفاده از ابزارهای مدل‌سازی ساختار سه بعدی پیش‌بینی و ایجاد شد و با استفاده از وب‌افزار Qmean بهترین مدل تعیین گردید. از آنجایی که توالی جایگاه فعال این آنزیم به جایگاه فعال مختص باکتری باسیلوس اسمیتی (*Bacillus Smithii*) نزدیک بود با استفاده از وب‌افزار PyRx، عمل داک سوپسترا (قرمز متیل) با مدل سه‌بعدی جایگاه فعال انجام و پس از تعیین بهترین حالت جفت شدگی آنزیم با سوپسترا، بررسی جهش‌زایی انجام شد. کاندیدهای جهش‌زایی در محل جایگاه فعال با روش هم‌ردیفی توالی مشخص شد و جهش‌ها پس از اعمال از جهت تغییر در انرژی اتصال و شبکه‌ی برهم‌کنشی مورد بررسی قرار گرفت.

**نتایج:** مدل ایجاد شده توسط Robetta برای توالی تحت شناسی Q9X4K2 به‌عنوان بهترین ساختار انتخاب شد. نتایج جهش‌زایی و بررسی انرژی و پلات جهش نشان داد، بهترین جهش تبدیل پرولین ۱۳۳ به سرین بوده و موجب کاهش انرژی اتصال مقدار  $-6/9 \text{ kcal/mol}$  به مقدار  $-7/4 \text{ kcal/mol}$  می‌گردد. به علاوه با بررسی شبکه برهم‌کنشی در پروتئین جهش‌یافته یک پیوند هیدروژنی جدید ایجاد شده است.

**نتیجه‌گیری:** انرژی اتصال پایین‌تر بین آنزیم و قرمز متیل به معنی تمایل بیشتر آنزیم به سوپسترا بوده و بنابراین منجر به بهبود عملکرد آنزیم در تجزیه رنگ‌های آزو خواهد بود.

**واژه‌های کلیدی:** آزریداکتاز، بیوانفورماتیک، رنگ آزو، زیست پالایی.

\*نویسنده مسئول: تهران - دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی - دانشکده مهندسی مواد و علوم بین رشته‌ای - گروه علوم زیستی، تلفن: ۰۹۱۲۲۱۵۵۱۸۴، نمابر: ۰۲۱۲۲۹۷۰۰۴۷، Email: zakeri@sru.ac.ir

**ارجاع:** ذاکری علیرضا، یعقوبی مریم، خلیلی سعید، هاشمی زهرا السادات، پور زردشت نوید. مهندسی آنزیم آزریداکتاز جهت ایجاد تغییرات ساختاری در جایگاه فعال و بهبود تمایل اتصال آن به رنگ‌های آزو. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۲؛ ۱۸(۴): ۳۱-۲۱.



## مقدمه

در دو دهه اخیر رشد کلان صنایع نساجی و رنگرزی، منجر به افزایش قابل توجه مقدار و پیچیدگی پساب‌های رنگی رها شده به محیط زیست شده است و یکی از مهمترین مشکلات زیست محیطی می‌باشد. به نظر می‌رسد، روش‌های زیستی به دلیل هزینه‌های پایین و سازگاری با محیط زیست می‌توانند جایگزین مناسبی به جای روش‌های مرسوم پالایش رنگ‌ها باشند. رنگ‌های آزو بزرگترین و مهمترین دسته رنگ‌ها بوده و به طور وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند. مشخص‌ترین ویژگی این رنگ‌ها داشتن یک یا چند گروه آزو است. حدود ده هزار رنگ مختلف به میزان فراوانی در صنایع نساجی، چاپ، صنایع غذایی، دارویی و آرایشی استفاده می‌شوند. مشکلات آلودگی حاصل از کارخانجات و صنایع نساجی از اساسی‌ترین، مهمترین و بحث برانگیزترین مشکلات محیط زیستی به شمار می‌آیند، تخلیه پساب‌های رنگی به داخل رودخانه‌ها و دریاچه‌ها منجر به کاهش کیفیت آب می‌شود (۱).

به دلیل محدودیت‌ها و مشکلات روش‌های غیرزیستی، تجزیه زیستی، روشی ارزان و مؤثر برای پالایش و آلودگی‌زدایی از فاضلاب‌های آلوده به مواد رنگی است. روش زیست پالایی از میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها استفاده می‌شود. این موجودات تجزیه‌کننده‌هایی با صرفه و سازگار با محیط زیست هستند و کاربرد آنها در رنگ‌زدایی روز به روز در حال گسترش است. با توجه به مطالب فوق روش تجزیه زیستی رنگ‌های آزو منجر به مبارزه مؤثرتر با این نوع از آلاینده‌های مضر برای محیط زیست باشد (۱).

رنگ‌های آزو به سادگی و با هزینه کم قابل تولید و پایدار بوده و می‌توانند تنوع بالایی از رنگ‌ها را تولید کنند (۲). این گونه رنگ‌ها که حداقل یک پیوند آزو در ساختار آنها وجود دارد، به سبب دشواری شکستن پیوند آزو در طبیعت بسیار سرسخت بوده و در مقابل شرایط اسیدی، بازی، دمای بالا و تأثیر نور مقاوم هستند. تخمین زده می‌شود که ۱۰ تا ۱۵ درصد از رنگ‌هایی که در صنعت نساجی استفاده می‌شوند به پارچه متصل نشده و به محیط زیست وارد می‌شوند (۳). این رنگ‌ها برای محیط زیست مضر هستند؛ زیرا بسیاری از رنگ‌های آزو و برخی پیش ماده‌های آنها و نیز برخی متابولیت‌هایی که از طریق شکست آنها تولید می‌شوند (آمین‌های بی‌رنگ) سمی و یا جهش‌زا هستند (۷-۴).

روش‌هایی نظیر: اسمز معکوس، نانوفیلتراسیون و تخییر چند اثری تا حدودی در حذف رنگ‌های آزو مؤثر هستند، اما این روش‌ها پرهزینه بوده و خود تولیدکننده ضایعاتی هستند که باید مراحل بعدی تجزیه را سپری کنند (۸).

امروزه زیست پالایی روشی ارزان‌تر، منطبق با محیط زیست و با قابلیت تولید ضایعات کمتر را برای حذف رنگ‌های آزو فراهم کرده است که

بیشترین استفاده را در حذف این نوع آلودگی‌ها دارد (۵). میکروارگانیسم‌هایی که قادر به رنگ‌زدایی از رنگ‌های آزو هستند شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها تحت شرایط هوازی و بی‌هوازی هستند. با آن که مولکول‌های رنگ ساختمان‌های بسیار متنوعی دارند اما تجزیه زیستی آنها توسط تعداد معدودی آنزیم انجام می‌شود. این آنزیم‌ها همگی مولکول‌های فعال کاهنده هستند و بنابراین بسترهای بسیار متنوعی دارند (۶).

متابولیسم باکتریایی رنگ‌های آزو در شرایط بی‌هوازی شامل تجزیه رنگ‌های آزو است. این فرآیند توسط نوعی آنزیم سیتوپلاسمی محلول با ویژگی سوبسترا کم، کاتالیز می‌شود که به عنوان آزوریداکتازها شناخته می‌شوند. تحت شرایط آنوکسیک، این آنزیم‌ها الکترون‌ها را از طریق رنگ‌های آزو فلاوین مایع انتقال می‌دهند، سپس احیاء می‌شوند. زائوبان و همکاران نشان دادند که آزوریداکتازهای سیتوپلاسمی همانند ردوکتازهای فلاوین و سایر از اهمیت حیاتی در کاهش (احیاء) ترکیبات آزو سولفوناته در محیط طبیعی برخوردار هستند. احتمال دیگر برای احیاء خارج سلولی ترکیبات آزو در شرایط بی‌هوازی، عمل احیاء ترکیبات آلی تشکیل شده به عنوان محصولات نهایی در برخی از واکنش‌های متابولیسمی باکتریایی کاملاً بی‌هوازی است. آمین‌های تشکیل شده از کانی بیشتر، در شرایط بی‌هوازی امکان‌پذیر نیست. به همین دلیل مطالعات کمی وجود دارد که یک سیستم ترکیبی بی‌هوازی-هوازی را برای حذف رنگ‌ها از فاضلاب‌های دارای ترکیب با لجن پیشنهاد کند. استفاده از این روش مزیت زیادی نسبت به محیط کشت ثابت در رنگ‌های مصنوعی دارد (۹).

تجزیه آنزیمی رنگ‌های آزو توسط آنزیم آزوریدوکتاز است. با توجه به اهمیت این آنزیم در تجزیه زیستی رنگ‌های آزو مطالعات گوناگونی روی سوبه‌های مختلف میکروارگانیسم‌های تولیدکننده آنزیم آزوریداکتاز و اثر آنها در حذف رنگ‌های آزو صورت گرفته است (۷). روش‌های بیوانفورماتیک به طور گسترده‌ای در مطالعات زیستی به کار برده می‌شوند. این روش‌ها امکان مطالعه آنزیم‌های مختلف را بدون نیاز به انجام آزمایش‌های زمان بر و هزینه بر کنونی فراهم می‌آورند. بسیاری از آنزیم‌ها با استفاده از این روش‌ها دچار تغییر و بهبود عملکرد شده‌اند. به نظر می‌رسد استفاده از این روش‌ها برای بهبود عملکرد آنزیم قدمی مؤثر در تولید یک آنزیم با کارایی بالاتر خواهد بود. در مورد آنزیم آزوریداکتاز مطالعات متعددی برای بهبود عملکرد آن صورت گرفته است. این مطالعات در جهت بهبود میزان پایداری دمایی آنزیم (۱۰)، تغییر انتخاب‌پذیری آنزیم نسبت به مواد اولیه مختلف (۱۱)، تغییر PH بهینه‌ی عملکرد آنزیم (۱۲) و شناخت بهتر آنزیم (۱۳) بوده است. در سال‌های اخیر استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک برای بررسی و بهبود عملکرد آنزیم آزوریداکتاز افزایش یافته و مطالعات متعددی در این زمینه صورت پذیرفته است (۱۶-۱۴). در این مطالعه سعی بر این است تا با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک تغییراتی در ساختار آنزیم آزوریداکتاز ایجاد شود تا

تمایل اتصال آن به رنگ‌های آزو بیشتر شده و عملکرد آن در تجزیه رنگ‌هایی مانند methyl red و remazol red بهبود یابد.

### مواد و روش‌ها

باکتری‌های مولد آنزیم آزریدوکتاز از مراجع مختلف تعیین می‌شوند (۱۲). با توجه به شرایط محیطی حاوی رنگ آزو، پنج باکتری در انتخاب اولیه مورد بررسی قرار گرفتند و از بین آنزیم‌های مختلف باکتریایی، آنزیم آزریداکتاز مربوطه باکتری ژئوباسیلوس استراترمو فیلس (Geobacillus Stearothermophilus) انتخاب شد و با اعمال تغییرات در ساختار آنزیم آزریداکتاز و بهبود عملکرد آن در تجزیه رنگ Methyl Red از ابزارهای بیوانفورماتیکی استفاده شده است.

با استفاده از اطلاعات موجود در پایگاه UniProt توالی آمینواسیدی آنزیم آزریداکتاز متعلق به باکتری Geobacillus Stearothermophilus با شماره دسترسی پروتئینی Q9X4K2 به طول ۲۱۱ آمینو اسید و نوکلئوتیدی AB071367.1 به طول جفت باز با ۱,۷,۱,۶ EC: استخراج گردید (۱۷). ساختار اول از پایگاه داده UniProt تعیین شد.

از آنجایی که ساختار سوم در پایگاه‌های داده و مقالات وجود نداشت بنابراین برای تعیین ساختار سوم از نرم‌افزار MODELLER و وب‌افزارهای LOMETS، I-TASSER و Robetta استفاده شد. جهت برآورد کیفیت مدل‌های ساختار پروتئین به علت غربالگری ساختارهای با کیفیت بالا، بهترین مدل از مدل‌های پیشنهادی را با استفاده از وب‌افزار QMEAN، ارزش‌گذاری شد و پس از تعیین بهترین مدل توسط وب‌افزار QMEAN، آن مدل به‌عنوان مدل ترجیحی ساختار سوم انتخاب و در ادامه تحقیقات استفاده شد (۲۶-۱۸).

داده‌های تجربی مدل سه بعدی آزمایشگاهی پروتئین موردنظر تاکنون ثبت نشده است لذا جایگاه فعالی برای این پروتئین گزارش نشده است و به جهت کاهش عدم قطعیت در انجام کار و امکان دسترسی به داده‌های با اعتبار بیشتر، برای تعیین جایگاه فعال در آنزیم‌های مشابه و تعیین میزان تطابق با استفاده از داک کردن در محل جایگاه فعال تعریف شده برای آنزیم‌های مشابه استفاده شد، لذا با بررسی مقاله‌های مربوطه آنزیم‌های مشابه از طریق پروتئین بلست (pBLAST) تعیین شده‌اند، جایگاه فعال این پروتئین پیدا شد (۱۸).

توالی آنزیم Geobacillus Stearothermophilus Azoreductase به‌عنوان ورودی وب‌افزار پروتئین بلست در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که وب‌افزار پروتئین بلست (pBLAST) به جستجو در protein (pdb) data bank محدود شده است.

قرمز متیل (Methyl-red) به علت استفاده بسیار زیاد در مقالات و بهترین سوبسترای آنزیم بودن انتخاب شد، ساختار قرمز متیل (Methyl-red) در واقع یک رنگ آزوئی قرمز بوده که شامل یک مولکول متیل است.

ساختار سه بعدی این مولکول از <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methyl-red> استخراج شده و برای داک کردن مورد استفاده قرار گرفت.

جهت انجام عمل داکینگ به دو روش و توسط نرم‌افزارهای Molegro Virtual Docker و PyRx نسخه ۰/۸ انجام شد.

پس از پیدا کردن بهترین حالت داک آنزیم با متیل قرمز، حال باید با توجه به جایگاه‌های پلات رسم شده، درمیان پروتئین‌های طبیعی جستجو شود تا شاید بتوان جهشی یافت که باعث بهبود کاربرد و عملکرد آن شود. برای این کار نیز از وب‌افزار پروتئین بلست (pBLAST) استفاده شد. به این صورت که توالی‌ها در حالت Multiple Alignment زیر هم گذاشته شدند تا آمینواسیدهای موجود در پلات ایجاد شده بررسی شود. و پلات با نرم‌افزار LIGPLOT برای مولکول پروتئین جهش‌یافته پس از جهش رسم شد. پس از جهش، به‌منظور تأیید داده‌های به‌دست آمده، پلات مولکول پروتئین جهش‌یافته پس از جهش توسط نرم‌افزار LIGPLOT رسم شد.

### نتایج

امروزه استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک برای بهبود عملکرد آنزیم در تولید یک آنزیم با کارایی بالاتر بسیار مؤثر است. در این مطالعه برای ایجاد اعمال تغییرات در ساختار آنزیم آزریداکتاز و بهبود عملکرد آن در تجزیه رنگ Methyl Red از ابزارهای بیوانفورماتیکی استفاده شده است.

آنزیم آزریدوکتاز یک پروتئین بنام FMN-dependent NADH:quinone oxidoreductase (Bacillus stearothermophilus) از ارگانیزم Geobacillus stearothermophilus است. عدد EC آن ۱,۷,۱,۶ است. توالی با فرمت FASTA در وب‌گاه UniProt در شکل ۱ نشان داده شده است.

ساختار سوم آنزیم، جهت پیش‌بینی و تعیین ساختار سه بعدی توالی آمینو اسیدی از وب‌افزارهای Robetta، LOMETS، I-TASSER و MODELLER و مدل‌سازی این آنزیم انجام شد. ساختار سه بعدی مدل‌سازی شده با استفاده از وب‌افزار Robetta در شکل ۲ نشان داده شده است.

جهت برآورد کیفیت مدل‌های ساختار پروتئین از بین چهار مدل منتخب تعیین شده توسط وب‌افزارهای Robeta، LOMETS و I-TASSER و همچنین نرم‌افزار MODELLER، بهترین مدل از مدل‌های پیشنهادی را با استفاده از وب‌افزار QMEAN به‌عنوان مدل ترجیحی ساختار سوم انتخاب شد. نتایج ارزش‌گذاری شده توسط وب‌افزار QMEAN برای چهار مدل منتخب تعیین شده توسط وب‌افزارهای Robeta، LOMETS و I-TASSER و همچنین نرم‌افزار MODELLER، در جدول ۱ نشان داده شده است.

جایگاه فعال با استفاده از وب‌افزار پروتئین بلست (pBLAST) استفاده شد و نتایج آن آمینواسیدهای A119', F125', Y127', F105', N104،

آمینواسیدهای موجود در پلات ایجاد شده بررسی شود. به این صورت منتخبین جهش در این جایگاه‌ها پیدا شود.

جهش‌های منتخب یافت شده در این بررسی شامل پرولین ۱۳۲ به سرین، گلايسين ۱۴۹ به سرین، تیروزین ۱۵۱ به فینیل آلانین، فینیل آلانین ۱۷۲ به لوسین و آلانین ۱۸۸ به سرین می‌باشد. برای تمامی پنج جهش منتخب. مراحل عمل داک در PyRx دوباره تکرار شده و مقایسه بهترین انرژی انجام شد. نتایج انرژی جهش پرولین ۱۳۲ به سرین به‌عنوان کمترین انرژی در جدول ۲ آورده شده است.

به‌منظور تأیید داده‌های به‌دست آمده، پلات مولکول پروتئین جهش‌یافته پس از جهش تبدیل پرولین ۱۳۲ به سرین توسط نرم‌افزار LIGPLOT مطابق نمودار ۲ رسم شده است.

'I52', 'W60' و 'F57' به‌عنوان جایگاه فعال آنزیم مشخص شده‌اند. تعیین سطح پروتئین با استفاده از ابزارهای موجود در نرم‌افزار مولگرو (MVD) برای آنزیم و متیل قرمز انجام شد و نتایج آن در شکل ۳ نشان داده شده است.

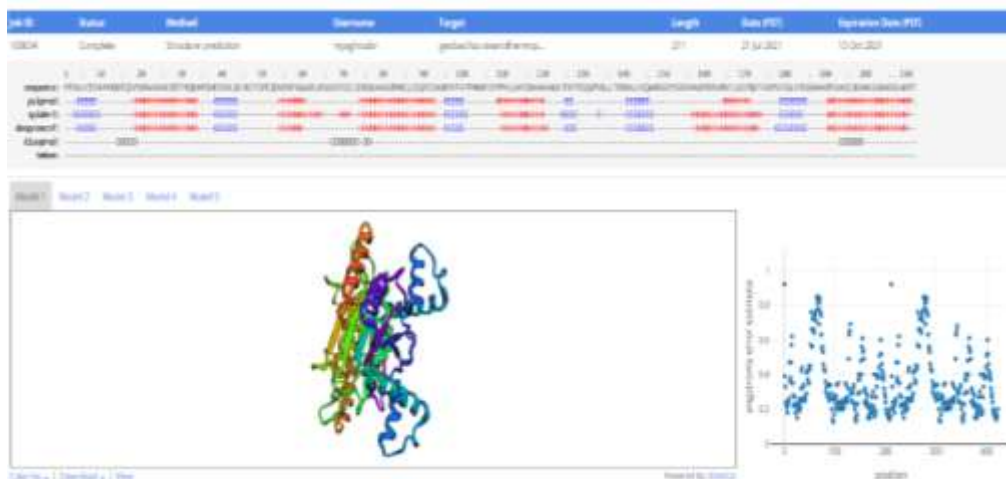
عمل داک توسط نرم‌افزار PyRx پس از اضافه کردن مولکول و متیل قرمز انجام شد و نتایج آن در شکل ۴ ذکر شده است.

سپس بهترین مدل به‌دست آمده از طریق عمل داک با استفاده از نرم‌افزار لیگ پلات (LIGPLOT) که مطابق نمودار ۱ ترسیم شد.

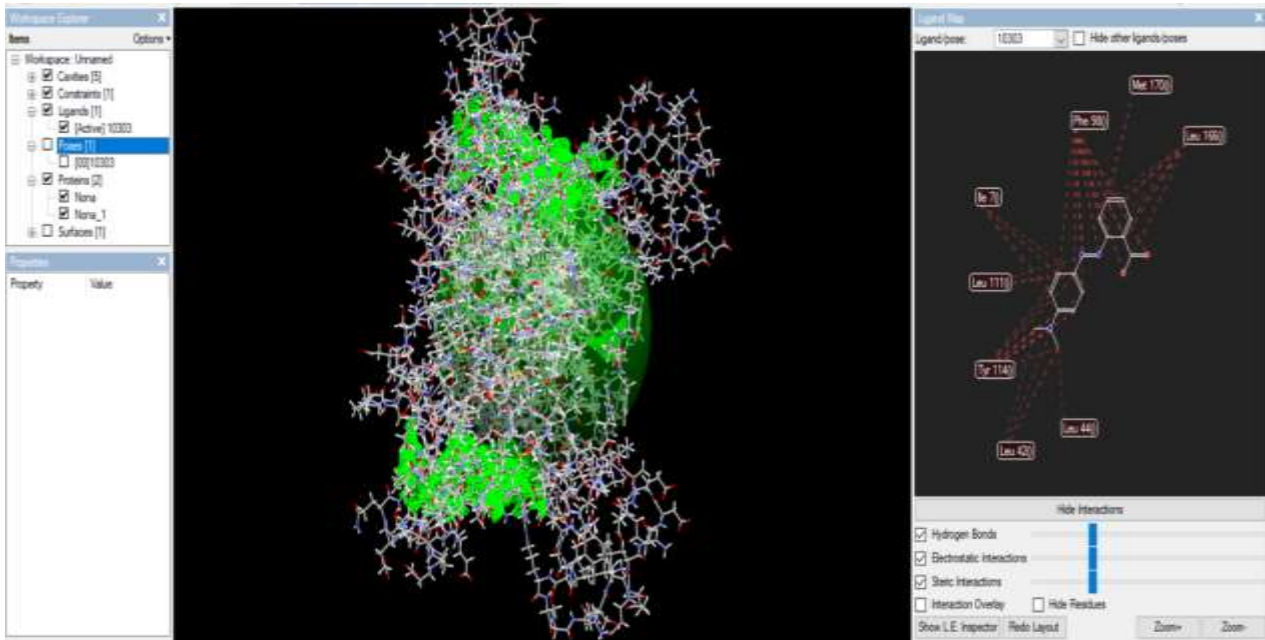
پس از پیدا کردن بهترین حالت داک آنزیم با متیل قرمز، حال باید با توجه به جایگاه‌های پلات رسم شده، در میان پروتئین‌های طبیعی جستجو شود تا شاید بتوان جهشی یافت که باعث بهبود کاربرد و عملکرد آن شود. برای این کار نیز از وب‌افزار پروتئین بلست (pBLAST) استفاده شد. به این صورت که توالی‌ها در حالت Multiple Alignment زیر هم گذاشته شدند تا



شکل ۱- توالی Q9X4K2 با فرمت FASTA در وبگاه UniProt



شکل ۲- ساختار سه بعدی مدل‌سازی شده در Robetta

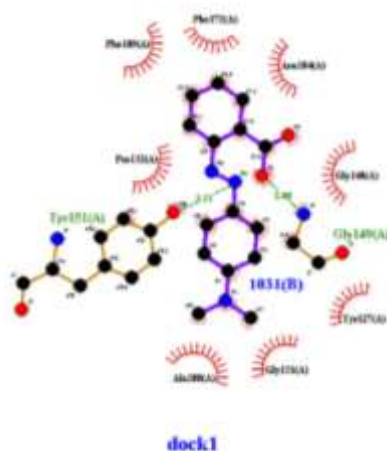


شکل ۳- نتایج عمل داک از طریق نرم افزار مولکرو (MVD)

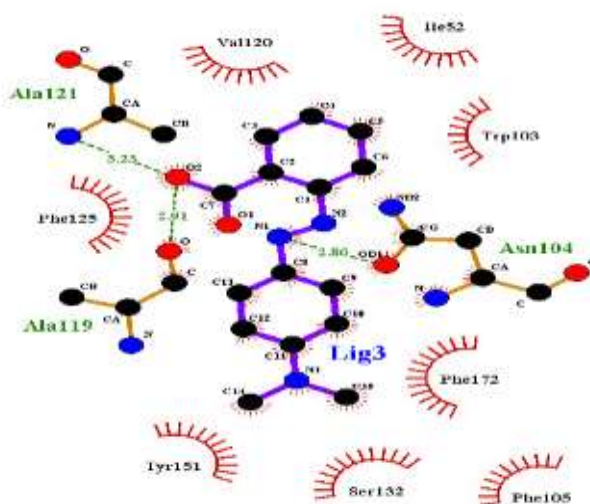
The image shows the PyRX software interface. The top part features a 3D molecular model of a protein in cyan. Below the model is a 'Controls' panel with various tool icons. At the bottom, a table displays the results of docking simulations for a ligand named 'robeta\_methylated'.

Ligand	Binding Affinity (kcal/mol)	Mode	RMSD lower bound	RMSD upper bound
robeta_methylated	-7.2	0	0.0	0.0
robeta_methylated	-7.1	1	36.58	24.078
robeta_methylated	-7.0	2	1.506	2.226
robeta_methylated	-7.0	3	21.552	32.821
robeta_methylated	-6.8	4	33.654	35.909
robeta_methylated	-6.8	5	23.385	36.74
robeta_methylated	-6.6	6	8.421	13.54
robeta_methylated	-6.5	7	21.398	32.591
robeta_methylated	-6.5	8	21.64	32.271

شکل ۴- نتایج عمل داک با استفاده از نرم افزار PyRX



نمودار ۱- نتایج بهترین مدل داک به دست آمده از طریق نرم افزار PyRx با استفاده از نرم افزار LIGPLOT



نمودار ۲- پلات رسم شده با نرم افزار LIGPLOT برای مولکول پروتئین جهش یافته پس از جهش تبدیل پرولین ۱۳۲ به سرین

Ligand	Binding Affinity (kcal/mol)	Mode	RMSD lower bound	RMSD upper bound
F170L_methylated	0.1	0	0.0	0.0
F170L_methylated	-1.0	1	2.761	3.429
F170L_methylated	-6.9	2	7.681	10.129
F170L_methylated	-6.9	3	5.999	9.080
F170L_methylated	-6.7	4	3.671	4.664
F170L_methylated	-6.7	5	2.469	3.179
F170L_methylated	-6.7	6	3.703	3.746
F170L_methylated	-6.6	7	3.090	3.931
F170L_methylated	-6.6	8	0.129	0.202

جدول ۲- نتایج جهش پرولین ۱۳۲ به سرین

جدول ۱- خلاصه نتایج ارزش گذاری توسط وبافزار QMEAN برای چهار

مدل منتخب ساختار سوم

Model	QMEANDisCo Global
Robetta	۰/۸۷±۰/۰۵
Modeller	۰/۸۶±۰/۰۶
Lomets	۰/۵۸±۰/۰۶
Itasser	۰/۸۳±۰/۰۶

### بحث

در این پژوهش آنزیم آزریدوکتاز تولید شده توسط باکتری ژئوباسیلوس استراترموفیلوس برای حذف آلاینده رنگ آزوی متیل قرمز (Methyl Red) که مقادیر زیادی از آن تولید و استفاده می‌شود، به روش زیست پالایی، انتخاب شد. باکتری‌های مولد آنزیم آزریدوکتاز از مراجع مختلف تعیین می‌شوند (۱۲). به منظور بهبود عملکرد رنگ‌زدایی رنگ آزوی متیل قرمز توسط آنزیم آزریدوکتاز ابتدا تعامل این آنزیم با رنگ متیل قرمز مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به وجود پیوند ضعیف بین آنزیم آزریدوکتاز و سوبسترا (متیل قرمز) بر آن شدیم که در صورت امکان ساختار آنزیم را به گونه‌ای تغییر دهیم تا پیوند قوی‌تری بین آنزیم و سوبسترا ایجاد شود و بدین طریق سرعت زیست پالایی، افزایش یابد.

در این کار پژوهشی با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی در ساختار آنزیم آزریدوکتاز تغییراتی ایجاد شد و پس از اعمال این تغییرات عملکرد آن در تجزیه رنگ قرمز متیل بهبود یافت.

با استفاده از اطلاعات موجود در پایگاه UniProt توالی آمینواسیدی آنزیم آزریدوکتاز متعلق به باکتری Geobacillus Stearothermophilus با شماره دسترسی پروتئینی Q9X4K2 به طول ۲۱۱ آمینو اسید و نوکلئوتیدی AB071367.1 به طول جفت باز با EC: ۱,۷,۱,۶ استخراج گردید (۱۹). ساختار اول از پایگاه داده UniProt تعیین شد. با بررسی پایگاه داده UniProt و سایر مراجع علمی مشخص شد که ساختار بلورشناسی و فعالیت آزمایشگاهی برای شکل سه‌بعدی این آنزیم (ساختار سوم)، در دسترس

نیست. بنا بر این برای پیش‌بینی و تعیین ساختار سه بعدی توالی آمینو اسیدی، مدل‌سازی با استفاده از ابزارهای در دسترس شامل وب‌افزارهای Robetta، LOMETS و I-TASSER و نرم‌افزار MODELLER، چهار مدل منتخب تعیین و سپس برای انتخاب بهترین مدل از مدل‌های پیشنهادی از وب‌افزار Qmean برای ارزش‌گذاری و انتخاب مدل ترجیحی استفاده شد.

نرم‌افزار MODELLER برای مدل‌سازی همولوژی و یا مدل‌سازی مقایسه‌ای ساختارهای سه بعدی پروتئین و همچنین برای مدل‌سازی لوپ‌ها در ساختارهای پروتئینی به کار رفت. بهینه‌سازی مدل‌های مختلف از ساختار پروتئین با توجه به انعطاف‌پذیری تعریف شده، هم ردیفی‌های چندتایی توالی‌های پروتئینی و یا ساختارهای آن، خوشه‌بندی، جستجوی توالی از پایگاه داده‌ها، مقایسه ساختارهای پروتئینی و غیره انجام گرفت (۱۹). در این روش نخست ساختارهای سه بعدی الگوی شناخته شده با دنباله موردنظر برای مدل‌سازی هم راستا شد. سپس، ویژگی‌های فضایی، مانند فاصله‌های Ca-Ca، پیوندهای هیدروژنی، زاویه‌های زنجیره اصلی و زنجیره جانبی، از الگوها به هدف منتقل شد. بنابراین، تعدادی محدودیت فضایی در ساختار آن به‌دست آمد. در آخر، مدل سه بعدی با ارضاء همه قیدها به بهترین شکل ممکن به‌دست آمد.

وب‌افزار LOMETS برای پیش‌بینی ساختار پروتئین و تفسیر عملکرد آن، با رتبه‌بندی و انتخاب مدل‌ها از چندین برنامه پیشرفته استفاده می‌کند (۲۰-۲۲). وب‌افزار LOMETS دو مزیت عمده نسبت به سایر سرورهای پیش‌بینی ساختار پروتئین دارد. نخست این‌که، LOMETS می‌تواند به سرعت نتایج را به کاربران ارائه دهد. دوم این‌که، کیفیت مدل‌های ساختاری پیش‌بینی شده توسط LOMETS بالا است، اگرچه نسبت به I-TASSER کمی بدتر هستند.

در مواردی که هیچ الگوی مناسبی توسط LOMETS شناسایی نشود I-TASSER با مدل‌سازی ab initio همه ساختارها را می‌سازد. حالت‌های انرژی آزاد پایین‌تر توسط SPICKER تشخیص داده می‌شوند. در مرحله سوم، شبیه‌سازی سرهم‌بندی قطعه دوباره از طریق نقاط مرکزی خوشه

تعریف شده استفاده شده است. بنابراین از وبافزار پروتئین بلست (pBLAST) جهت تعیین جایگاه فعال استفاده شد و توالی آنزیم *Geobacillus Stearothermophilus Azoreductase* به عنوان ورودی این وبافزار در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که وب افزار پروتئین بلست (pBLAST) به جستجو در *protein data bank proteins (pdb)* محدود شده است. پایگاه داده *pdb* در واقع شامل پروتئین‌هایی است که فعالیت‌های آزمایشگاهی بر روی آنها انجام شده و ساختار بلورشناسی مشخص دارند. از این رو نتایج حاصل بیشتر قابل اطمینان هستند. به این ترتیب، میزان خطای محاسبات بر اساس مدل‌سازی بیوانفورماتیک کاهش داده شده و جایگاه فعال به دست آمده برای آنزیم به واقعیت نزدیک‌تر خواهد بود. نتایج وبافزار پروتئین بلست (pBLAST) برای *Geobacillus Stearothermophilus Azoreductase* تا  $Evalue=1e-50$  مورد بررسی قرار گرفته‌اند؛ زیرا تا این مقدار پروتئین‌ها تطابق بسیار زیادی را نشان می‌دهند. بهترین جایگاه فعال مربوط به باکتری *Bacillus Smithii* در مقاله ارایه شده توسط یوندا کازانری و همکاران گزارش شده است (۳۷). داده‌های این آنزیم تطابق  $82/46\%$  و پوشش  $100\%$  با آنزیم را نشان می‌دهند. علاوه بر این  $Evalue$  آن نیز  $2e-130$  است که نشان‌دهنده تطابق بسیار زیاد و کمینه عدم قطعیت است.

بنابراین بهترین جایگاه فعال مختص باکتری *Bacillus Smithii* است. براساس نتایج گزارش شده در مقاله یوندا کازانری و همکاران آمینواسیدهای N104, F105, Y127', Y172', F125', A119', I52', W60', and F57' به عنوان جایگاه فعال آنزیم *Bacillus Smithii* معرفی شده‌اند (۳۷). این آمینواسیدها در پروتئین *Geobacillus Stearothermophilus Azoreductase* نیز در همان جایگاه‌ها وجود دارند. این تطابق نشان‌دهنده شباهت بالای عملکردی بین این دو نوع آنزیم می‌باشد. این شباهت ساختاری با توجه به میزان بالای شباهت توالی بین این دو آنزیم دور از ذهن نمی‌باشد. هر چند تفاوت‌های در بین اسید آمینه‌های موجود در جایگاه فعال این دو آنزیم وجود دارد ولی به نظر می‌رسد اسید آمینه‌های اصلی که در فرآیند تخریب رنگ دخیل می‌باشند در هر دو آنزیم در طی تکامل به میزان بیشتری حفظ شده است. اسید آمینه‌های دیگری که در جایگاه فعال حضور دارند نقش کم رنگ‌تری در عملکردی آنزیمی داشته و به نظر بیشتر عملکرد حمایتی و حفاظتی دارند.

با استفاده از PyRx، که قابلیت جستجوی جایگاه (Search Grid) به صورت دستی را دارد، داک کردن سوبسترا (قرمز متیل) با مدل سه بعدی *Robetta* انجام شده است. سپس پلات بهترین مدل داک شده با لیگ پلات ترسیم شده و نشان می‌دهد این داک تطابق خیلی زیادی با جایگاه فعال دارد و دو آمینواسید آن نیز دارای پیوند هیدروژنی هستند. این تطابق نشان می‌دهد که رنگ قرمز متیل با جهت‌گیری درست و در محل درستی در جایگاه فعال قرار گرفته است. این جهت‌گیری درست تضمین‌کننده شباهت این برهم کنش با چیزی است که در واقعیت اتفاق می‌افتد. در صورت نادرست بودن

انجام می‌شود که محدودیت‌های فضایی جمع‌آوری شده از نمونه‌های LOMETS و ساختارهای PDB به وسیله TM-Align برای راهنمایی شبیه‌سازی‌ها به کار برده می‌شود. در این تحقیق حذف تصادم فضایی و همچنین تصحیح توپولوژی سراسری نقاط مرکزی، طعمه‌های ایجاد شده در شبیه‌سازی دوم خوشه‌بندی شد و ساختارهای با کم‌ترین سطح انرژی انتخاب شد. مدل‌های نهایی اتمی کامل توسط REMO به دست می‌آیند که جزئیات اتمی را از طعمه‌های انتخاب شده I-TASSER از طریق بهینه کردن شبکه پیوند هیدروژنی می‌سازد.

برای پیش‌بینی عملکرد زیستی پروتئین از اجماع مطابقت‌های ساختاری برتر با نمرات عملکردی محاسبه شده بر اساس نمره اطمینان از مدل‌های ساختاری I-TASSER، شباهت ساختاری بین مدل و الگوها که توسط نمره TM ارزیابی شده، و نیز یکسانی توالی در نواحی همتراز شده ساختاری ارزیابی شدند (۲۶-۲۴).

وبافزار *Robetta* یک سرور پیش‌بینی ساختار پروتئین است که توسط آزمایشگاه Baker در دانشگاه واشنگتن توسعه داده شده است و یکی از با ثبات‌ترین سرورهای عمومی با عملکرد بالا بوده و هست (۳۰-۲۷).

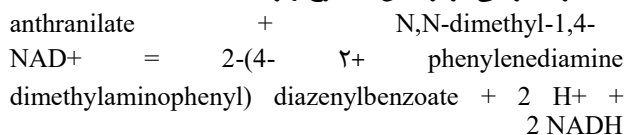
برآورد کیفیت مدل یکی از اجزای اساسی پیش‌بینی ساختار پروتئین است، زیرا در نهایت دقت یک مدل، سودمندی آن را برای کاربردهای خاص تعیین می‌کند. معمولاً در جریان پیش‌بینی ساختار پروتئین، مجموعه‌ای از مدل‌های جایگزین تولید می‌شود که متعاقباً دقیق‌ترین مدل باید انتخاب شود. در این تحقیق، تابع امتیازدهی کامپوزیت QMEAN، که برآورد کیفیتی را بر اساس تجزیه و تحلیل هندسی مدل‌های منفرد و تابع امتیازدهی مبتنی بر خوشه بندی QMEANclust که یک تخمین کیفیت جهانی (یعنی برای کل ساختار) و محلی (یعنی هر مقدار مانده) است را محاسبه می‌کند. تمام مدل‌های ارایه شده مقایسه گردیدند و بهترین مدل انتخاب شد. در وبافزار QMEAN، هم مدل‌های مجزا و هم مجموعه مدل‌های ارسالی به صورت بایگانی tar.gz قابل تحلیل هستند (۳۱، ۳۸ و ۳۹). نتایج ارزش‌گذاری مقدار در QMEANDisCo به عنوان یک تابع امتیازدهی ترکیبی، بر اساس یک مدل واحد، برآورد کیفیت مطلق برای چهار مدل منتخب ساختار سوم تعیین شده در جدول ۱ نشان داد، مدل حاصل از وبافزار *Robetta* با بیشترین مقدار به عنوان مدل منتخب برگزیده شد. بنابراین این مدل به عنوان ساختار سوم آنزیم آزوریداکتاز در نظر گرفته شده و تحقیقات بر روی این مدل انجام شد.

با توجه به اینکه داده‌های تجربی مدل سه‌بعدی آزمایشگاهی پروتئین مورد نظر یافت نشد، جایگاه فعال این پروتئین نیز مشخص نبود. لذا برای تعیین جایگاه فعال، به منظور کاهش عدم قطعیت در انجام کار و امکان دسترسی به داده‌های با اعتبار بیشتر از راهکار پیدا کردن جایگاه فعال در آنزیم‌های مشابه و تعیین میزان تطابق با استفاده از داک کردن در محل



تخریب آن خواهد بود. ضمناً این آنزیم جهش یافته در رقابت با مولکول‌هایی که تمایل به اتصال به جایگاه فعال دارند و حتی می‌توانند به‌عنوان ممانعت‌کننده عملکرد آن را مختل کنند موفق‌تر عمل کرده و قرمز متیل را تجزیه می‌کند.

تجزیه آنزیمی قرمز متیل به شرح زیر است:



این معادله نشان می‌دهد که با عملکرد آنزیم پس از حذف رنگ، فراورده‌های حاصل نیز سمیت کمتری برای محیط زیست خواهد داشت. با تغییر آمینو اسید پرولین به سرین، پیوند جدیدی ساخته شد و جایگاه فعال بهبود یافت، علت آن، کوچک‌تر شدن گروه عاملی، که به معنی قرارگیری بهتر و راحت‌تر سوبسترا در جایگاه فعال است، همچنین گروه آمین که باردار می‌شود نیز حذف می‌شود و تداخل با اتصال گروه غیرقطبی معمول در رنگ‌های آزو از بین می‌رود، بدین ترتیب با ایجاد یک پیوند غیرقطبی جدید می‌توان این تغییر انرژی فعال‌سازی را شرح داد.

به نظر می‌رسد استفاده از ابزارهای بیوانفوماتیک قادر به باز کردن افق‌های جدید در زمینه‌ی مهندسی آنزیم‌های مرتبط با زیست پالایی است. این ابزارها با صرف هزینه و زمان کمتر می‌توانند منجر به بهینه شدن عملکرد زیست پالایی آنزیم‌ها گردند.

### تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان‌نامه کارشناسی ارشد با عنوان "بررسی بیوانفورماتیک آنزیم آزروریداکتاز جهت بهبود عملکرد آنزیمی آن در حذف رنگ‌های آزو" استخراج شده است. این مطالعه توسط دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی پشتیبانی شده است. تیم تحقیقاتی از دانشگاه و همه کسانی که در انجام این مطالعه شرکت کردند تشکر می‌کنند.

### ملاحظات اخلاقی

به سبب ماهیت محاسباتی مطالعه، ملاحظات اخلاقی در این مطالعه مطرح نبوده است.

### تعارض منافع

تعارض منافی برای گزارش توسط هیچ یک از نویسندگان وجود ندارد.

### مشارکت نویسندگان

کلیه نویسندگان در طراحی علمی، اجرای روش‌ها، تحلیل و بررسی نتایج، نگارش پیش‌نویس مقاله و مطالعه و تأیید شکل نهایی مقاله مشارکت یکسان داشته‌اند.

### حمایت مالی

حمایت مالی برای گزارش وجود ندارد.

داک اولیه رنگ به‌صورت نادرستی در جایگاه قرار می‌گیرد و شکست و بست پیوندها به درستی صورت نمی‌گیرد و در نهایت فعالیت آنزیمی دچار اختلال می‌شود. موفقیت در این مرحله تضمین‌کننده‌ی صحت دستکاری و جهش‌زایی در آنزیم خواهیم بود.

پس از پیدا کردن بهترین حالت جفت شدگی آنزیم با سوبسترا، با توجه به جایگاه‌های نمودار رسم شده، در میان پروتئین‌های طبیعی جستجو شد تا در صورت امکان جهشی یافت که باعث بهبود کاربرد و عملکرد آن شود. برای این کار نیز از پروتئین بلست (pBLAST) استفاده شده است. بار دیگر پروتئین بلست با استفاده از گزینه Non-redundant protein sequences(nr) انجام شد. زیرا دیگر نیاز به ساختار تعیین شده نیست و فقط به توالی آنها نیاز است توالی‌ها در Multiple Alignment زیر هم گذاشته شد و آمینواسیدهای موجود در پلات ایجاد شده بررسی شده است و منتخبین جهش شامل پرولین ۱۳۲ به سرین، گلایسین ۱۴۹ به سرین، تیروزین ۱۵۱ به فنیل آلانین، فنیل آلانین ۱۷۲ به لوسین، آلانین ۱۸۸ به سرین در این جایگاه‌ها تعیین شده‌اند. این جهش‌ها در واقع استفاده از روند تکامل برای بهبود عملکرد آنزیم است. بدین معنی که در هر آنزیمی که در مجموعه‌ای از گونه‌ها یافت می‌شود برخی الگوهای حفظ‌شده‌ی اسید آمینه‌ای وجود دارد. برخی از اسید آمینه‌ها در تعداد بالای از گونه‌ها به‌صورت حفظ شده وجود دارند. این حفظ شدگی را می‌توان به اهمیت و تناسب دقیق آن اسید آمینه برای آن محل تفسیر کرد. بدین معنی که حضور آن اسید آمینه در آن محل می‌تواند بهترین بازده عملکردی را داشته باشد و به همین سبب در طی تکامل حفظ شده است. در بررسی صورت گرفته از این منطق برای معرفی جهش‌های ممکن استفاده شد. هر اسید آمینه‌ای جایگاه فعال که طبق داده بلست اسید آمینه‌ی معادل حفظ شده‌تری داشت کاندید جهش گردید.

نتایج جهش‌زایی و بررسی انرژی و پلات جهش نشان داد (جدول ۲) تنها جهش عامل کاهش انرژی اتصال، جهش تبدیل پرولین ۱۳۲ به سرین بود که باعث کاهش انرژی فعال‌سازی از مقدار  $6/9 \text{ kcal/mol}$  به مقدار  $7/4 \text{ kcal/mol}$  شد. پلات توسط نرم‌افزار LIGPLOT مولکول پروتئین جهش‌یافته پس از جهش تبدیل پرولین ۱۳۲ به سرین یک پیوند هیدروژنی جدید به‌دست آمده را نشان می‌دهد که انرژی اتصال و بهبود عملکرد آنزیم را تأیید می‌کند. تطابق بین داده‌های انرژی و شبکه‌ی برهم‌کنشی نشان‌دهنده‌ی احتمال بالای این جهش در بهبود برهم‌کنش بین آنزیم و قرمز متیل است. بالاتر بودن انرژی اتصال و برهم‌کنش‌های بهتر با جایگاه فعال نشان می‌دهند که آنزیم جهش‌یافته در شرایط یکسان نسبت به آنزیم وحشی قدرت بالاتری در اتصال به رنگ را داشته و در غلظت‌های پایین‌تر از رنگ نیز قادر به شناسایی آن و

## References

- Fu Y, Viraraghavan T. Fungal decolorization of dye wastewater: a review. *Bioresour Technol* 2001;9:251-62. doi:10.1016/S0960-8524(01)00028-1
- Zöllinger H. *Color chemistry: syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments*. John Wiley & Sons; 2003 .
- Asad S, Amoozegar MA, Pourbabaee AA, Sarbolouki MN, Dastgheib SM. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. *Bioresour Technol* 2007;98:2082-8. doi: 10.1016/j.biortech.2006.08.020
- Xu H, Heinze TM, Chen S, Cerniglia CE., Chen, H. Anaerobic metabolism of 1-amino-2-naphthol-based azo dyes (Sudan dyes) by human intestinal microflora. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:7759-62. doi: 10.1128/AEM.01410-07
- Chen H. Recent advances in azo dye degrading enzyme research. *Curr Protein Peptide Sci* 2006;7:101-11. doi: 10.2174/138920306776359786
- Talarposhti AM, Donnelly T, Anderson GK. Color removal from a simulated dye wastewater using a two-phase anaerobic packed bed reactor. *Water Res* 2001;35:425-32. doi: 10.1016/S0043-1354(00)00280-3
- Singh RL, Singh PK, Singh RP. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes—A review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2015;104:21-31. doi:10.1016/j.ibiod.2015.04.027
- Shah K. Biodegradation of azo dye compounds. *Int Res J Biochem Biotechnol* 2014;1:5-13.
- Shah MP, Industrial Waste Water Research Lab, Division of Applied & Environmental Microbiology, Ankleshwar, India *Bioremediation of Azo* CHAPTER 6. 2019.
- Amin KA, Abdel Hameid H, Abdelsttar AH. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology* 2010;48:2994-9. doi: 10.1016/j.fct.2010.07.039
- Brissos V, Goncalves N, Melo EP, Martins LO. Improving kinetic or thermodynamic stability of an azoreductase by directed evolution. *PLoS One* 2014;9:87209. doi: 10.1371/journal.pone.0087209
- Ito K, Nakanishi M, Lee WC, Zhi Y, Sasaki H, Zenno S, Saigo K, Kitade Y, Tanokura M. Expansion of substrate specificity and catalytic mechanism of azoreductase by x-ray crystallography and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 2008;283:13889-96. doi:10.1074/jbc.M710070200
- Liu G, Zhou J, Wang J, Yan B, Li J, Lu H, et al. Site-directed mutagenesis of substrate binding sites of azoreductase from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnol Lett* 2008;30:869-75. doi: 10.1007/s10529-007-9627-8
- Feng J, Kweon O, Xu H, Cerniglia CE, Chen H. Probing the NADH- and methyl red-binding site of a FMN-dependent azoreductase (AzoA) from *Enterococcus faecalis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2012;520:99-107. doi: 10.1016/j.abb.2012.02.010
- Srinivasan S, Shanmugam G, Surwase SV, Jadhav JP, Sadasivam SK. In silico analysis of bacterial systems for textile azo dye decolorization and affirmation with wetlab studies. *CLEAN—Soil, Air, Water* 2017;45:1600734. doi:10.1002/clen.201600734
- Dehghanian F, Kay M, Kahrizi D. A novel recombinant AzrC protein proposed by molecular docking and in silico analyses to improve azo dye's binding affinity. *Gene* 2015;569:233-8. doi: 10.1016/j.gene.2015.05.063
- Ramanathan K, Shanthi V, Sethumadhavan R. In silico identification of catalytic residues in azobenzenereductase from *Bacillus subtilis* and its docking studies with azo dyes. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences* 2009;1:290-7. doi: 10.1007/s12539-009-0035-8
- The UniProt Consortium, UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research* 2021;49:480-89. doi: 10.1093/nar/gkaa1100 .
- Šali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 1993;234:779-815. doi: 10.1006/jmbi.1993.1626
- Zheng W, Hussain A, Wuyun Q, Pearce R, Li Y, Zhang Y. LOMETS3: Integrating deep-learning and profile-alignment for advanced protein template recognition and function annotation, in preparation 2020.
- Zheng W, Zhang C, Wuyun Q, Pearce R, Li Y, Zhang Y. LOMETS2: improved meta-threading server for fold-recognition and structure-based function annotation for distant-homology proteins. *Nucleic Acids Research* 2019;47:429-36.
- Wu S, Zhang Y. LOMETS: A local meta-threading-server for protein structure prediction. *Nucleic Acids Research* 2007;35:3375-82.
- Yang J, Roy A, Zhang Y. BioLiP: a semi-manually curated database for biologically relevant ligand-protein interactions. *Nucleic Acids Research* 2013;41:1096-103. doi: 10.1093/nar/gks966
- Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods* 2015;12:7-8 doi: 10.1038/nmeth.3213
- Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* 2010;5:725-38 .doi:10.1038/nprot.2010.5
- Y Zhang. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 2008;9:40. doi: /10.1186/1471-2105-9-40
- Källberg M, Wang H, Wang S, Peng J, Wang Z, Lu H, et al. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols* 2012;7, 1511-1522.
- Söding J. Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics* 2005;21:951-60. doi:10.1093/bioinformatics/bti125.
- Yuedong Yang, EshelFaraggi, Huiying Zhao, Yaoqi Zhou. Improving protein fold recognition and template-based modeling by employing probabilistic-based matching between predicted one-dimensional structural properties of the query and corresponding native properties of templates. *Bioinformatics* 2011;27:2076-82. doi: 10.1093/bioinformatics/btr350
- Ovchinnikov S, Park H, Varghese N, Huang P., Pavlopoulos GA, Kim DE, et al. Protein Structure Determination using Metagenome sequence data. *Science* 2017;355:294-8. doi: 10.1126/science.aah4043
- W510-W514 *Nucleic Acids Research*, 2009, Vol. 37, Web Server issue Published online 2009. doi: 10.1093/nar/gkp322
- Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx. Dallakyan S, Olson AJ. *Methods Mol Biol* 2015;1263:243-50.
- Gabriela Bitencourt-Ferreira/Gabriela, Walter Filgueira De Azevedo Jr. Molegro Virtual Docker for Docking, *Methods in Molecular Biology* 2019;2053,149-67. doi: 10.1007/978-1-4939-9752-7\_10
- Lobo I. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). *Nature Education* 2008;1.
- Dassault Systèmes BIOVIA, *Discovery Studio Modeling Environment*, Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes, 2016.
- Roman A, Laskowski and mark B. Swindells diagrams for drug discovery. *J Chem Inf Model* 2011;51:2778-86.
- K. Yoneda, M. Yoshioka, H. Sakuraba, T. Araki, and T. Ohshima, I tructural and biochemical characterization of an extremely thermostable FMN-dependent NADH-indigo reductase from *Bacillus smithiint*. *J Biol Macromol* 2020;164:3259. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.197
- Hashemi ZS, Zarei M, Karami Fath M, Ganji M, Shahrabi Farahani M, Afshamouri F, et al. In silico Approaches for the Design and Optimization of Interfering Peptides Against Protein-Protein Interactions. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2021.8:p. 282.
- Khalili S, Jahangiri A, Hashemi ZS, Khalesi B, Mard-Soltani M, Amani J. Structural pierce into molecular mechanism underlying *Clostridium perfringens* Epsilon toxin function. *Toxicon* 2017;127:90-99



## Azoridactase Enzyme Engineering to Induce Structural Changes in the Active Site and Improve Its Affinity for Azo Dyes

Alireza Zakeri (Ph.D.)<sup>\*1</sup>, Maryam Yaghobi (M.Sc.)<sup>1</sup>, Saeed Khalili (Ph.D.)<sup>1</sup>, Zahra Sadat Hashemi (Ph.D.)<sup>2</sup>, Navid Pourzardost (Ph.D.)<sup>3</sup>

1- Dept. of Biological Sciences, School of Materials Engineering & Interdisciplinary Science, Shahid Rajaei Teacher Training University, Tehran, Iran.

2- ATMP Dept., Breast Cancer Research Center, Motamed Cancer Institute, ACECR, Tehran, Iran.

3- Dep. of Biochemistry, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

Received: 9 November 2021, Accepted: 26 December 2021

### Abstract:

**Introduction:** Large quantities of dyes, including refractory azo dyes, are discharged directly into wastewater from the textile and petroleum industries and can be removed by bioremediation. In this study, bioinformatics tools were used to modify the structure of the enzyme azoridactase to improve its performance in degrading these dyes, including methyl red.

**Methods:** The amino acid sequence of the azoridactase enzyme was obtained from the UniProt database. The three-dimensional structure of the enzyme was predicted using modeling tools, and the best model was determined using Qmean web software. Due to the close proximity of the active site of this enzyme to that of *Bacillus Smithii*, the substrate (methyl red) was docked to a three-dimensional model of the active site using the PyRx program. Potential mutations at the active site were identified through sequence alignment. The exerted mutations were examined regarding the changes in binding energy and the interaction network.

**Results:** The structure generated by Robetta was chosen as the best model for the Q9X4K2 sequence. The mutagenesis results, in terms of binding energy and interaction plot, indicated that the optimal mutation involves changing proline 132 to serine. This mutation reduces the binding energy between methyl red and azoridactase from -6.9 kcal/mol to -7.4 kcal/mol. Furthermore, an examination of the interaction network in the mutant protein revealed the formation of a new hydrogen bond.

**Conclusion:** The reduced binding energy between the enzyme and methyl red suggests that the enzyme is more favorably positioned towards the substrate, thereby enhancing the enzyme's efficacy in degrading azo dyes.

**Keywords:** Azoridactase, Bioinformatics, Azo dye, Bioremediation.

Conflict of Interest: No

\*Corresponding author: A. Zakeri, Email: zakeri@sru.ac.ir

**Citation:** Zakeri A, Yaghobi M, Khalili S, Hashemi ZS, Navid P. Azoridactase enzyme engineering to induce structural changes in the active site and improve its affinity for azo dyes. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2024;18(4):21-31.

