

بررسی ویژگی‌های ساختاری، عملکردی و دامنه میزبانی آنزیم‌های مؤثر در تولید و تجمع لیپید در قارچ‌های روغنی

نجمه فرمانبر¹، علی اکبر حدادمشهدریزه^{2*}، جعفر همت³

1- گروه زیست شناسی، علوم و تحقیقات خراسان رضوی، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور

2- گروه سلولی و مولکولی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

2- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

3- پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران

*مشهد، کد پستی 9177948974

a.haddad@um.ac.ir

(دریافت مقاله: 94/10/6 پذیرش مقاله: 95/7/3)

چکیده - بیودیزل سوختی پاک، تجدیدپذیر، زیست‌تخریب‌پذیر، عاری از گوگرد و ترکیبات آروماتیک با منابع اولیه مشتق از چربی‌های حیوانی، گیاهی، جلبک‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها می‌باشند. در میان این منابع، قارچ‌های روغنی با توجه به قابلیت بالای سنتز و تجمع تری‌آسیل‌گلیسرول، به عنوان منابع بسیار مطلوب تأمین زیست توده بیودیزلی گزارش شده‌اند. لذا به منظور ارائه راه‌کارهایی در برای افزایش راندمان تولید مبتنی بر فناوری‌های نوین زیستی، پایش مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با تولید و تجمع لیپید در این ارگانیسم‌ها می‌تواند راهگشا باشد، که در این تحقیق در دستور کار قرار گرفت. به این منظور واکاوی مکانیسم‌های مولکولی مرتبط منجر به آشکارسازی آنزیم‌های مالیک کد شده از ژن‌های $malic$ ¹، $malic$ ²، $malic$ ³ و $MAE1$ ² به عنوان آنزیم‌های مؤثر در تولید و تجمع لیپید در گونه‌های مختلف قارچ‌های روغنی شد. پایش ویژگی‌های ساختاری این ژن‌ها، ضمن آشکارسازی طول و محتوی CG متفاوت، پیوسته بودن تمامی آنها را آشکار نمود. بررسی ویژگی‌های ساختاری آنزیم‌های مذکور ضمن آشکارسازی موقعیت سلولی آنها، حضور دمین‌های عملکردی $MAO1_MF$ و $Malic_M$ را در تمامی آنها با قابلیت تأثیرپذیری از تغییرات پس از ترجمه را نشان داد. تشابه‌یابی پروتئینی آنزیم‌های مذکور، منجر به معرفی گونه‌های قارچی با قابلیت احتمالی تولید چربی شد. از سویی دیگر مدل‌سازی ساختاری آنزیم‌ها و شبه آنزیم‌های مالیک انتخابی ضمن ایجاد مدل‌های ساختاری مناسب، کیفیت و کارایی مطلوب آنها در اتصال به مالات را آشکار نمود. به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق ضمن معرفی گونه‌های قارچی مناسب در تأمین زیست توده بیودیزلی، منجر به آشکارسازی آنزیم‌های مؤثر با ویژگی‌های خاص شد که می‌تواند در ردیابی سویه‌های توانا در تولید بیودیزل و یا تراریخت‌سازی مفید واقع گردد.

کلیدواژگان: بیودیزل، تری‌آسیل‌گلیسرول، قارچ‌های روغنی، آنزیم مالیک، فناوری‌های نوین زیستی.

1- مقدمه

نگرانی‌های زیست‌محیطی و محدود بودن منابع سوخت‌های فسیلی [1]، دستیابی به منابع سوختی پاک و تجدیدپذیر را در اولویت تحقیقاتی بسیاری از کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه قرار داده است [2,3]. در این راستا، سوخت‌های زیستی یکی از انتخاب‌های کلیدی برای جانشینی سوخت‌های فسیلی می‌باشند [4]. این نوع از سوخت‌ها، نظیر بیواتانول، بیومتان، بیودیزل و بیوهیدروژن که به شکل مایع و یا گاز هستند، از بقایای مواد گیاهی قابل استحصال از محصولات کشاورزی، زباله‌های شهری، کشاورزی و محصولات جنگلی که به آن زیست‌توده گفته می‌شود، بواسطه فرایندهای شیمیایی و تخمیرالکی مشتق می‌شوند [5-7]. بنابراین، سوخت‌های زیستی علاوه بر ویژگی‌های مطلوب سوختی زیست تخریب‌پذیری و زیست‌سازگاری [8]، رونق اقتصاد روستایی را به دنبال خواهند داشت، که استفاده از آن را توجیه‌پذیرتر می‌سازد [9]. در میان سوخت‌های زیستی، بیودیزل سوختی مشتق شده از اسیدهای چرب کریوکسیلیک متصل شده به زنجیره‌های هیدروکربنی بلند، مزایای متعددی دارد [10,11]. این نوع از سوخت‌های زیستی ضمن آنکه ویسکوزیته‌ای مشابه با دیزل نفتی را دارا می‌باشد، نقطه اشتعالی بالاتر، خورنده‌گی پایین‌تر و انرژی بسیار بیشتری نسبت به آن‌ها دارند؛ بنابراین ضمن آنکه حمل و نقل و ذخیره‌سازی آن ایمن‌تر می‌باشد، باعث افزایش عمر مفید موتور و قدرت آن در حجم کم سوخت‌گیری خواهد شد [12]. باوجود آنکه استفاده از منابع زیستی گیاهی در تولید این نوع از سوخت می‌تواند گزینه‌ای مناسب در حوزه‌های زیست محیطی، اقتصادی و اجتماعی باشد، اما محدودیت خاک و منابع آب جایگزینی منبع تأمین‌کننده زیست توده به‌ویژه در کشورهایی همچون ایران را اجتناب‌ناپذیر می‌سازد [13]. در این راستا

میکروارگانیزم‌های روغنی هتروتروف می‌توانند جایگزینی مناسب باشند [14]، که از میان آنها، قارچ‌های روغنی با توجه به قابلیت بالای سنتز و تجمع تری‌آسیل‌گلیسرول، تا 70% وزن زیست توده، به عنوان منابع بسیار مطلوبی گزارش شده‌اند [15]. علاوه بر ظرفیت بالای سنتز و تجمع لیپیدی در قارچ‌های روغنی، کوتاه بودن زمان تکثیر، تحمل‌پذیری بیشتر به شرایط آب و هوایی نسبت به گیاهان، رشد و گسترش آسانتر نسبت به ریزجلبک‌ها، در دسترس بودن آرشیو اطلاعات ژنتیکی و آنزیمی [16]، و نیز قابلیت تولید لیپید از منابع مختلف کربن [17]. از دیگر مزایای این جانداران به‌عنوان منابع تأمین‌کننده زیست توده می‌باشد [18]. در میان قارچ‌های روغنی مخمرهای متعلق به *Candida*، *Rhodotorula*، *Rhizopus*، *Trichosporon* و *Cryptococcus* با قابلیت ذخیره چربی تا 40% بیومس خود و حتی تا 70% در شرایط فقر نیتروژن به عنوان بهترین مخمرهای روغنی شناخته شده‌اند [19]. در همین راستا *Mucorcircinelloides* که قارچی زیگومیستی و به عنوان پاتورنی فرصت‌طلب در بیماران دارای نقص ایمنی مطرح می‌باشند، از جمله تولید کنندگان اصلی چربی بوده [20]، که برای اولین بار در تولید تجاری چربی‌های میکروبی مورد استفاده قرار گرفته است [21]. صرف‌نظر از کارایی متفاوت قارچ‌های روغنی در تولید چربی، پایش مکانیزم‌های مولکولی دخیل در فرایند تولید و تجمع تری‌آسیل‌گلیسرول مبین نقش کلیدی آنزیم مالیک در این فرایند می‌باشد [22]. آنزیم مالیک با دکربوکسیلاسیون برگشت‌ناپذیر مالات به پیرووات و تشکیل NADPH از $NADP^+$ ، تأمین انرژی برای اسید چرب سنتتاز در تجمع چربی را فراهم می‌آورد [23]. این آنزیم نیز دارای چند ایزوform می‌باشد که تنها ایزوform نوع III آن در تشکیل NADPH و فرایند تجمع چربی نقش دارد، به‌طوری‌که مهار و

2-3- پایش 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 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) صورت پذیرفت. در همین راستا آشکارسازی دمن‌های عملکردی این توالی‌ها با استفاده از برنامه‌های تحت شبکه InterProScan 5، Motif scan و پایگاه Conserved Domain به ترتیب با آدرس‌های:

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5/>),

و (<http://www.motifscan.com>)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)

به طور جداگانه انجام شد. همچنین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی این توالی‌ها با استفاده از برنامه ProtParam موجود در بانک اطلاعاتی ExPASy با آدرس (<http://web.expasy.org/protparam>) تعیین گردید. برای تعیین و پیش‌بینی ویژگی‌های توپولوژی پروتئین‌ها برنامه TMHMM با آدرس (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>)

مورد استفاده قرار گرفت. محتوی GC content توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌های انتخابی با استفاده از برنامه GC content calculator با آدرس:

(<http://www.biologicscorp.com/tools/>) تعیین

گردید. تغییرات پس از ترجمه شامل گلیکوزیلاسیون، فسفوریلاسیون و سولفوریلایسیون به ترتیب با استفاده از برنامه‌های NetNGlyc، NetPhos و Sulfinator با آدرس‌های:

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>),

و (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>)

صورت (<http://web.expasy.org/Sulfinator>)

پذیرفت.

افزایش بیان آن در سلول منجر به کاهش و افزایش تجمع چربی خواهد شد [24]. در این راستا مهار فعالیت این آنزیم در *Mucor circinelloides* منجر به کاهش تجمع لیپید از 25% به 2% زیست‌توده سلولی [25] و افزایش بیان آن، افزایش 2/5 برابری تجمع لیپید را نشان داده است [26]. بنابراین پایش ویژگی‌های ساختاری، عملکردی، فیزیکوشیمیایی و نیز تعیین دامنه میزبانی این آنزیم، ضمن آنکه منجر به ارائه راه‌کارهایی برای طراحی سازه‌ای نوین ژنی با قابلیت افزایش میزبان تولید و تجمع چربی مبتنی بر مهندسی ژنتیک خواهد شد، آشکارسازی منابع نوینی از قارچ‌های روغنی مبتنی بر حضور شبه توالی‌های پروتئینی را فراهم خواهد آورد، که در این تحقیق در دستور کار قرار گرفته است.

2- مواد و روش

1-2- واکاوی داده‌ها

با هدف آشکارسازی ژن‌های دخیل در تجمع لیپید، مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با این فرایند در قارچ‌های روغنی شامل *Mucor*، *Mortierella alpina*، *Lipomyce*، *Umbelopsis isabellina*، *starkeyi* و *Yarrowia lipolytica* بررسی و ژن‌های کلیدی مرتبط شامل $mce1^1$ ، $mce2^1$ ، $mce2^2$ ، $mce2^3$ و $MAE1^1$ و $MAE1^2$ انتخاب شدند.

2-2- استحصال توالی‌ها

توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن‌های انتخابی با شماره‌های شناسایی DQ973624، DQ975377، GU014548، EU286807 و CR382131 و شماره‌های دستیابی ADK56109.1، ABX82699.1، ABM45933.1، ABM30154.1 و CAG79707.1 از پایگاه‌های اطلاعات ژنی و پروتئینی NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) استحصال شدند.

4-2- همگون‌یابی و قرابت‌یابی توالی‌ها

تعیین پراکنش دامنه میزبانی توالی آنزیم‌های انتخابی با استفاده از برنامه تحت شبکه Protein Blast با آدرس <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> مبتنی بر ماتریکس‌های PAM250 و BLUSUM45 انجام شد. نتایج حاصل بر اساس ارزش E، درصد همسانی و همپوشانی ارزیابی و قرابت توالی‌های انتخابی همگون با استفاده از نسخه 6 برنامه MEGA6 انجام و خوشه‌بندی توالی‌ها بر اساس الگوریتم Neighbor-Joining صورت پذیرفت.

5-2- تعیین ساختار سه بعدی و ارزیابی کیفیت

ساختارهای مدل شده

به منظور مدل‌سازی ساختار سه‌بعدی توالی‌های پروتئینی انتخابی، الگوهای مناسب از پایگاه اطلاعاتی Protein Data Bank (PDB) با آدرس <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> و برنامه تحت شبکه ClustalW با آدرس <http://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html> استحصال و با استفاده از نسخه 9.14 برنامه خارج شبکه Modeller مدل شدند. ارزیابی کیفیت ساختارهای مدل شده با برنامه ERRAT با آدرس:

www.mbi.ucla.edu/SAVES/ و برنامه رامچاندرا از نرم‌افزار MOE نسخه 2014 انجام شد. از سویی دیگر Minimize کردن ساختارهای مدل شده نیز با استفاده از نرم‌افزار MOE نسخه 2014 صورت پذیرفت.

6-2- دستیابی به ساختار 3 بعدی ترکیبات شیمیایی

استحصال ساختار 3 بعدی مالات با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی colby و pubchem به ترتیب با آدرس‌های <http://www.colby.edu/chemistry/molecules> و <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> صورت پذیرفت. تبدیل فرمت SDF مولکول‌های استحصال شده به PDB

با برنامه تحت شبکه SMILESTranslator با آدرس <http://cactus.nci.nih.gov/translate> انجام شد.

7-2- ارزیابی میل اتصالی آنزیم‌ها به سوبسترا

ارزیابی توان اتصالی آنزیم‌های مالیک انتخابی به مالات با استفاده از برنامه تحت شبکه PatchDock با آدرس <http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock> صورت پذیرفت. نتایج حاصل از این آزمون براساس انرژی واکنش پذیری اتمی (ACE) در بین 20 راه حل اولیه با بیشترین اعتبار مورد بررسی و مطلوب‌ترین آن در ارتباط با هر یک از آنزیم‌ها انتخاب شدند. آشکارسازی صحت اتصال در موقعیت مناسب با استفاده از نسخه 1 برنامه Pymol صورت پذیرفت. آشکارسازی اسیدهای آمینه جایگاه فعال با استفاده از نرم‌افزار MOE نسخه 2014 انجام گرفت.

3- نتایج

3-1- پایش ویژگی‌های ساختاری آنزیم مالیک

قارچ‌های روغنی

نتایج حاصل از پایش ویژگی‌های ساختاری ژن‌های کدگذار آنزیم مالیک قارچ‌های روغنی انتخابی، منجر به آشکارسازی طول متفاوت این ژن‌ها و پیوسته بودن آنها شد. در همین راستا محتوی GC این ژن‌ها در محدوده 66 تا 90 تعیین و بررسی تغییرات پس از ترجمه محصول پروتئینی آنها منجر به آشکارسازی جایگاه‌های گلیکوزیلاسیون و فسفوریلاسیون در تمامی موارد شد و جایگاه سولفوریلایسیون تنها در آنزیم MAE1¹ شد (جدول 1).

3-2- پایش ویژگی‌های عملکردی آنزیم‌های مالیک انتخابی

پایش ویژگی‌های عملکردی آنزیم‌های مالیک انتخابی با آشکارسازی دمین‌های مستقر در آنها صورت پذیرفت.

نتایج حاصل از این واکاوی منجر به آشکارسازی دمین‌های عملکردی MAO1_MF، Malic_M و malic در تمامی موارد شد (جدول 2).

3-3- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی توالی پروتئینی ژن‌های آنزیم مالیک

نتایج حاصل از ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی

توالی پروتئینی ژن‌های آنزیم مالیک انتخابی، مبین وزن مولکولی آنها در محدوده 63 تا 72 کیلودالتون، بار الکتریکی منفی 11 تا منفی 19، PH ایزوالکتریک (pI) 5/35 تا 6/63، هیدروفوبیستی منفی 0/073 تا 0/226، نیمه عمر بیش از 10 ساعت در تمامی موارد و شاخص ناپایداری 34/09 تا 43/79 و نیز شاخص آلفاتیک آنها بین 90/61 تا 93/66 بود (جدول 3).

جدول 1 پایش ویژگی‌های ساختاری ژن‌های آنزیم مالیک قارچ‌های روغنی.

ردیف	نام ژن	طول ژن (bp)	محتوی %GC	اندازه پروتئین (aa)	گلیکوزیلاسیون	فسفوریلاسیون	PTM سولفوریلاسیون
1	<i>mce2</i> ¹	2010	73	669	+	+	-
2	<i>mce2</i> ²	1863	66	620	+	+	-
3	<i>mce2</i> ³	1767	66	588	+	+	-
4	<i>MAE1</i> ¹	1719	73	572	+	+	+
5	<i>MAE1</i> ²	1890	90	629	+	+	-

جدول 2 پایش ویژگی‌های عملکردی آنزیم‌های مالیک انتخابی.

ردیف	نام	موقعیت	نام دومین	عملکرد	ارزش E
1	<i>Mce2</i> ¹	363-621	MAO1_MF	دکربوکسیلاسیون ملات	2.1e-28
			Malic_M	دمین اتصالی NAD آنزیم مالیک	1.9e-119
			Malic	دمین N-ترمینال آنزیم مالیک	1.8e-102
2	<i>Mce2</i> ²	316-575	MAO1_MF	دکربوکسیلاسیون ملات	7.6e-24
			Malic_M	دمین اتصالی NAD آنزیم مالیک	2.7e-92
			Malic	دمین N-ترمینال آنزیم مالیک	4e-79
3	<i>Mce2</i> ³	281-543	MAO1_MF	دکربوکسیلاسیون ملات	2.1e-27
			Malic_M	دمین اتصالی NAD آنزیم مالیک	3e-129
			Malic	دمین N-ترمینال آنزیم مالیک	8e-88
4	<i>MAE1</i> ¹	546-559	MAO1_MF	دکربوکسیلاسیون ملات	3.6e-34
			Malic_M	دمین اتصالی NAD آنزیم مالیک	8.5e-100
			MbtH	دخیل در سنتز آنتی بیوتیک‌ها و سیدروفور	0.00061
			Malic	دمین N-ترمینال آنزیم مالیک	1e-110
5	<i>MAE1</i> ²	324-578	MAO1_MF	دکربوکسیلاسیون ملات	7.2e-36
			Malic_M	دمین اتصالی NAD آنزیم مالیک	4.4e-131
			Malic	دمین N-ترمینال آنزیم مالیک	9.3e-111

3-4- ویژگی‌های توپولوژی پروتئین‌های آنزیم مالیک

بررسی موقعیت قرارگیری آنزیم‌های مالیک انتخابی مبین غشایی بودن همه آنها بود (جدول 4). همان‌طور که در جدول 4 نشان داده شده است، هر یک از این آنزیم‌ها دارای چندین ناحیه گذرنده از غشا در موقعیت مختلف دارند.

3-5- آشکارسازی دامنه میزبانی آنزیم‌های مالیک با

بیشترین محتوی لیپیدی

در بین آنزیم‌های انتخابی، آشکارسازی دامنه میزبانی آنزیم‌های مالیک در جاندارانی با بیشترین محتوی لیپیدی شامل $mce2^2$ و $mce2^3$ به ترتیب با محتوی لیپیدی 85% و 86% صورت پذیرفت. نتایج حاصل از این واکاوی باوجود آنکه در سطح نوکلئوتیدی نتایج مطلوبی را به دنبال نداشت، تشابه‌یابی پروتئینی آنها منجر به آشکارسازی طیف گسترده‌ای از جانداران واجد توالی‌های پروتئینی با همسانی، همپوشانی و ارزش E

معادل با صفر در گونه‌های دور و نزدیک شد. در میان توالی‌های آشکار شده توالی شبه‌پروتئینی $mce2^2$ در گونه‌های قارچی *Mucor ambiguus* و *Parasitella parasitica* (شکل 1)، و توالی شبه‌پروتئینی $mce2^3$ آشکار شده در گونه‌های قارچی *Rhizopus Rhizopus deleamar*، *microsporus Parasitella*، *parasitica*، *Mucor ambiguus* و *Mucor* *circinelloides* قرابت بیشتری با توالی‌های انتخابی را آشکار نمودند (شکل 2).

3-6- مدل‌سازی ساختاری آنزیم‌ها و شبه آنزیم‌های

مالیک انتخابی

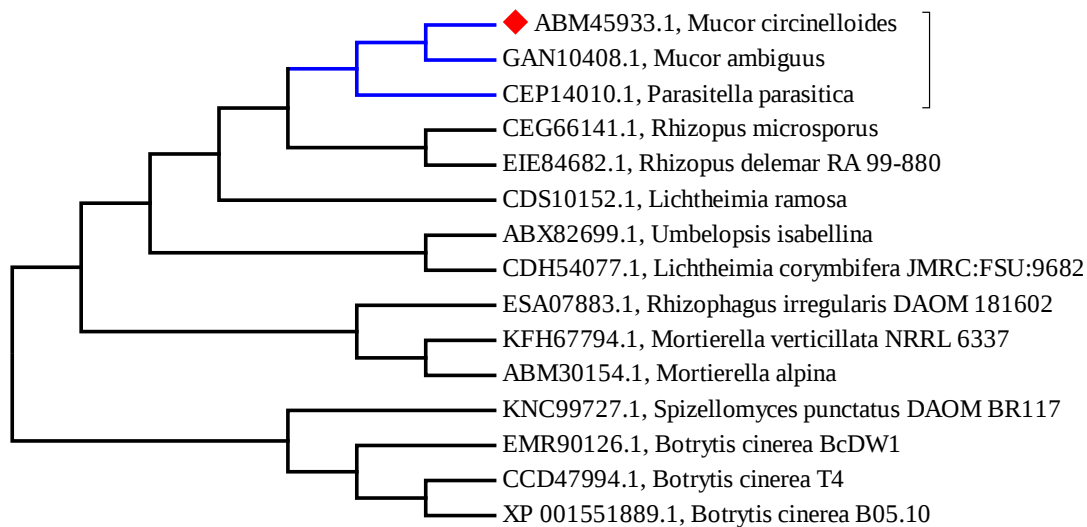
به منظور تعیین ویژگی‌های عملکردی آنزیم‌ها و شبه آنزیم‌های مالیک انتخابی، مدل‌سازی ساختاری آنها منجر به ایجاد ساختارهایی با کیفیت مطلوب‌تر از وضعیت پایه شد.

جدول 3 برخی از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی توالی پروتئینی ژن‌های آنزیم مالیک.

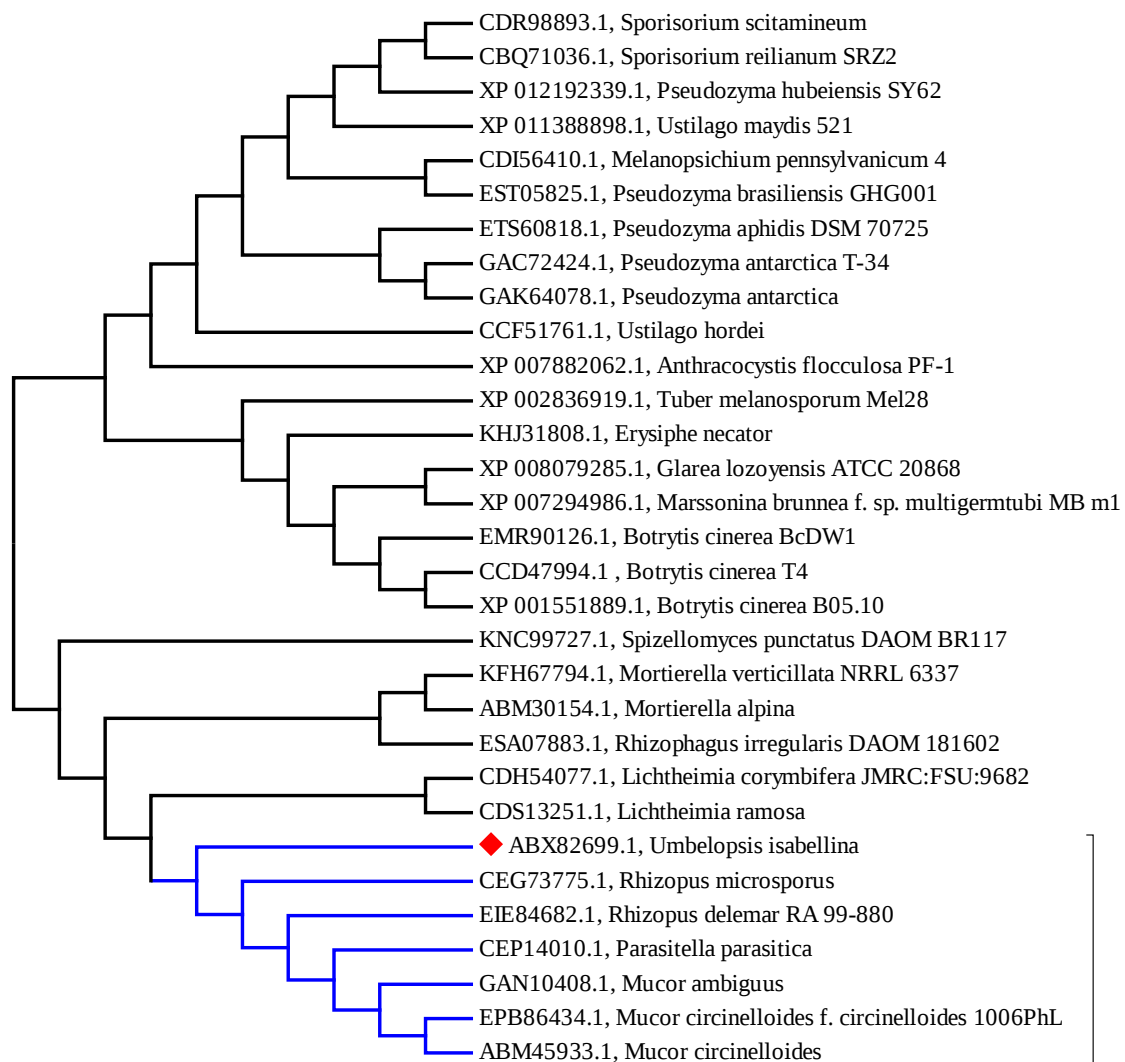
ردیف	نام	وزن ملکولی	بار الکتریکی	pI	هیدروفوبیسیته	نیم عمر	شاخص ناپایداری	شاخص آلفاتیک
1	$mce2^1$	72753.9	-11/0	6/63	-0/073	>10 h	38/62	90/61
2	$mce2^2$	68880.2	-19/0	5/35	-0/225	>10 h	37/31	91/90
3	$mce2^3$	65719.4	-13/0	5/78	-0/164	>10 h	43/79	91/24
4	$MAE1^1$	63571.7	-17/0	5/69	-0/226	>10 h	34/09	92/92
5	$MAE1^2$	69259.3	-13/0	6/11	-0/170	>10 h	35/87	93/66

جدول 4 ویژگی‌های توپولوژی آنزیم مالیک.

ردیف	نام توالی	موقعیت و تعداد دمین‌های گذرنده از غشاء						
1	$mce2^1$	155-174	180-203	241-280	314-339	357-418	459-485	529-58
2	$mce2^2$	45-64	71-92	106-169	203-231	268-291	309-336	345-370
3	$mce2^3$	2-51	71-76	80-134	165-199	275-303	307-336	445-501
4	$MAE1^1$	45-62	69-96	165-197	271-326	458-480	-	-
5	$MAE1^2$	12-35	52-80	122-164	202-250	320-374	505-544	553-578



شکل 1 قرابت توالی‌های پروتئینی شبه $mce2^2$ در گونه‌های مختلف قارچی.



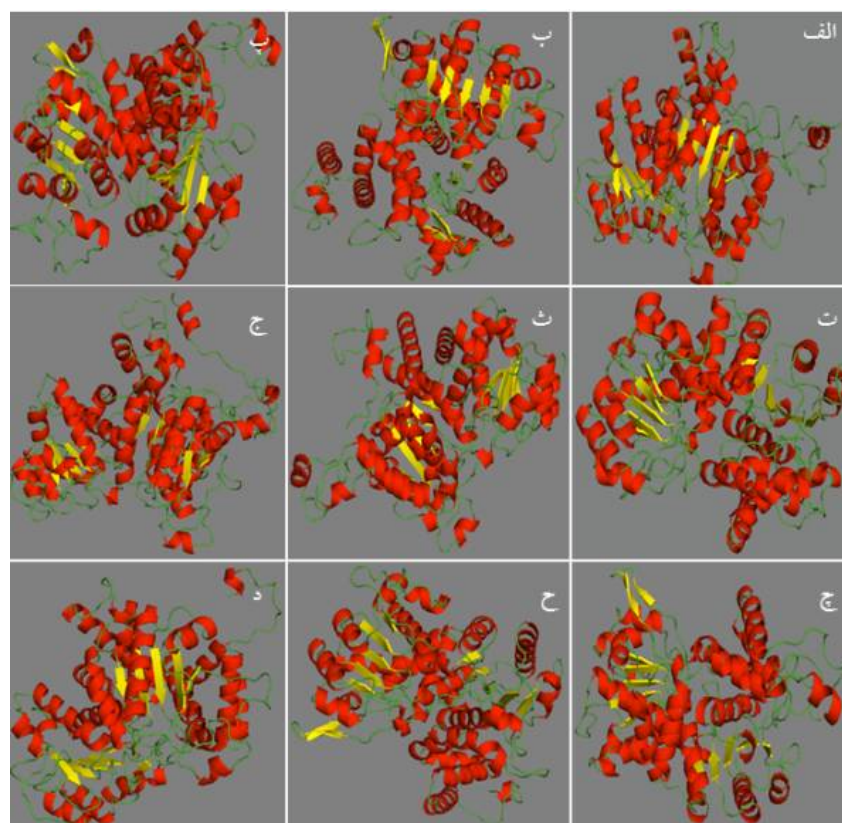
شکل 2 قرابت توالی‌های پروتئینی شبه $mce2^3$ در گونه‌های مختلف قارچی

7-3- ارزیابی کیفیت ساختارهای مدل شده آنزیم‌ها و

شبه آنزیم‌های مالیک

نتایج حاصل از ارزیابی کیفیت محصولات پروتئینی آنزیم‌ها و شبه آنزیم‌های مالیک مبتنی بر آزمون‌های ERRAT و رامچاندرا مین کیفیت مطلوب ساختارهای مدل شده به‌ویژه پس از بهینه‌سازی شد (جدول 5). با این وجود همان‌طور که در جدول 6 نمایش داده شده است، در هر یک از ساختارهای مدل شده تعدادی از اسیدهای آمینه در نواحی غیرمجاز استقرار دارند.

بطوری‌که ساختار آنزیم مالیک در گونه‌های قارچی *Mortierella alpin*، *Mucor circinelloides*، *Lipomyces starkeyi*، *Umbelopsis isabellina*، *Rhizopus*، *Mucor ambiguous*، *Yarrowia lipolytica*، *Rhizopus* و *Parasitella parasitica*، *microsporus* *delemar* به ترتیب از 40% به 72/93، از 39% به 65%، از 39% به 62%، از 37% به 69%، از 39% به 73%، از 39% به 75%، از 40% به 70%، از 39% به 76% و از 42% به 61% افزایش یافت (شکل 3).



شکل 3 مدل‌سازی ساختاری آنزیم‌ها و شبه آنزیم‌های مالیک انتخابی. الف: ساختار سه بعدی آنزیم مالیک سویه *Mortierella alpine*. ب: ساختار سه بعدی آنزیم مالیک سویه *Mucor circinelloides*. پ: ساختار سه بعدی آنزیم مالیک سویه *Umbelopsis isabellina*. ت: ساختار سه بعدی آنزیم مالیک سویه *Lipomyces starkeyi*. ث: ساختار سه بعدی آنزیم مالیک سویه *Yarrowia lipolytica*. ج: ساختار سه بعدی آنزیم مالیک سویه *Mucor ambiguous*. چ: ساختار سه بعدی آنزیم مالیک سویه *Rhizopus microsporus*. ح: ساختار سه بعدی آنزیم مالیک سویه *Parasitella parasitica*. د: ساختار سه بعدی آنزیم مالیک سویه *Rhizopus delemar*.

جدول 5 کیفیت ساختارهای مدل شده گونه‌های مختلف قارچی بر اساس آزمون‌های ERRAT و رامچاندراپس از بهینه‌سازی ساختاری.

ردیف	نام گونه	%ERRAT	% رامچاندراپس
1	<i>Mortierella alpine</i>	72.93	97
2	<i>Mucor circinelloides</i>	65.458	97
3	<i>Umbelopsis isabellina</i>	62.037	96
4	<i>Lipomycesstarkeyi</i>	69.686	98
5	<i>Yarrowialipolytica</i>	73.120	98
6	<i>Mucor ambiguous</i>	75.532	97
7	<i>Rhizopus microsporus</i>	70.600	96
8	<i>Rhizopus delemar</i>	61.368	97
9	<i>Parasitella parasitica</i>	76.331	98

جدول 6 نوع و موقعیت اسیدهای آمینه مستقر در نواحی غیر مجاز ساختارهای مدل شده.

ردیف	نام گونه	اسیدهای آمینه خارج از محدوده							
		Asp	Lys	Gln	His	Phe	Ser	Glu	Ala
1	<i>Mortierella alpine</i>	-	-	-	-	-	-	-	105
2	<i>Mucor circinelloides</i>	-	-	-	-	-	281	131	98
3	<i>Umbelopsis isabellina</i>	-	-	121	128	123,223	-	-	111
4	<i>Lipomycesstarkeyi</i>	-	-	-	-	-	-	-	121,225
5	<i>Yarrowialipolytica</i>	-	340	-	-	-	-	-	489,224
6	<i>Mucor ambiguous</i>	287	-	-	-	-	-	-	106
7	<i>Rhizopus microsporus</i>	163	-	-	-	-	-	-	102,134,132
8	<i>Rhizopus delemar</i>	-	-	-	-	-	-	-	89
9	<i>Parasitella parasitica</i>	-	-	-	-	-	272	-	104

8-3- آشکارسازی جایگاه‌های فعال و تعیین اسیدهای

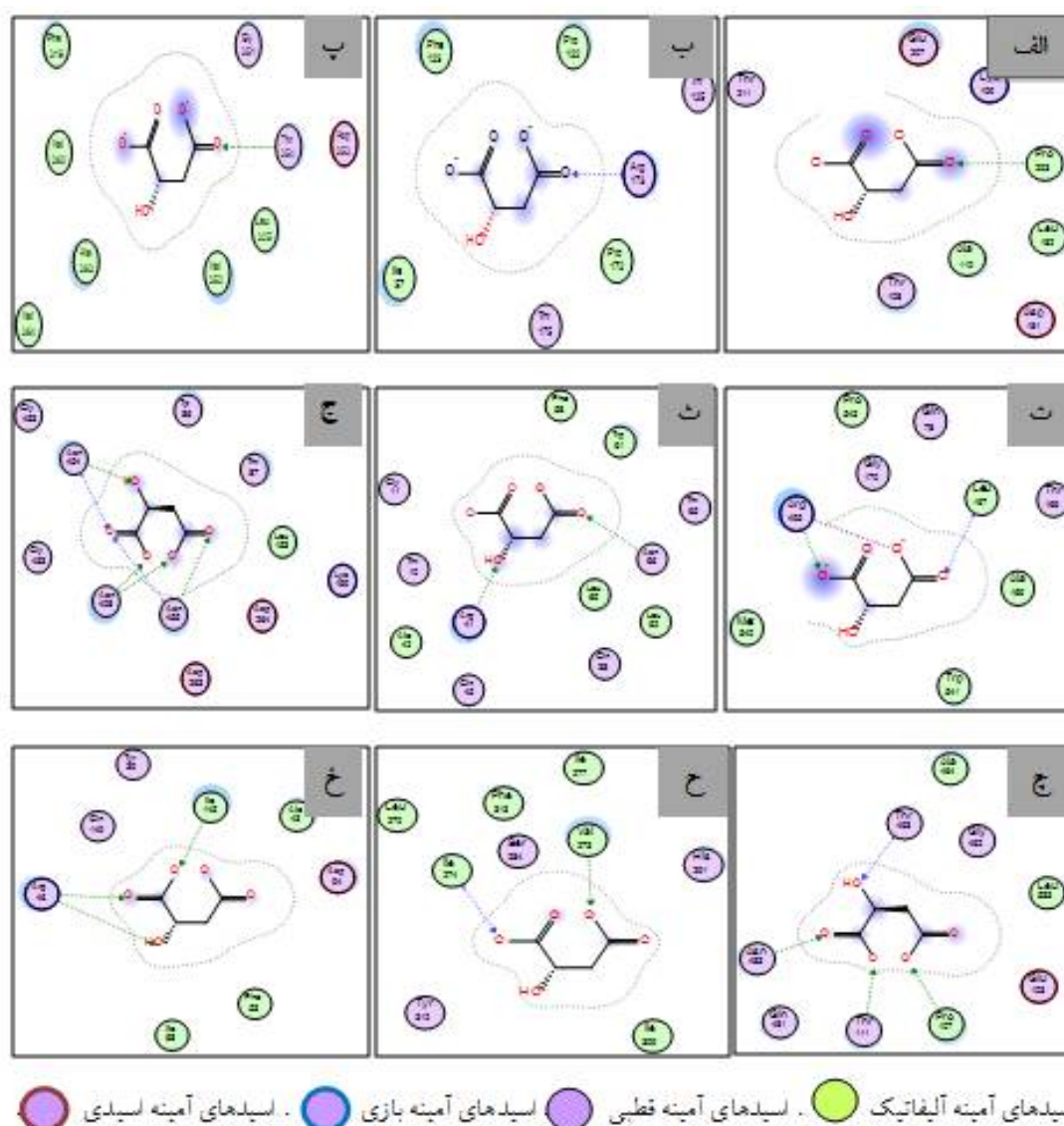
آمینو تشکیل دهنده جایگاه

با هدف آشکارسازی اسیدهای آمینه و ظرفیت جایگاه‌های فعال ساختارهای مالیک مدل شده، آشکارسازی جایگاه‌های فعال آنها صورت پذیرفت (شکل 4). همان‌طور که در جدول 7 نشان داده شده است بیشتر اسیدهای آمینه جایگاه فعال از نوع اسیدهای آمینه آلفاتیک و قطبی می‌باشد و به میزان کمتری اسیدهای آمینه اسیدی و بازی در تشکیل این ساختارها مشارکت دارند. واکنش آنزیم‌های مالیک مدل شده با سوپسترا که مبین محل جایگاه فعال است در شکل 5 نیز نمایش داده شده است.

9-3- ارزیابی قابلیت آنزیمی مبتنی بر میل

اتصال به سوپسترا

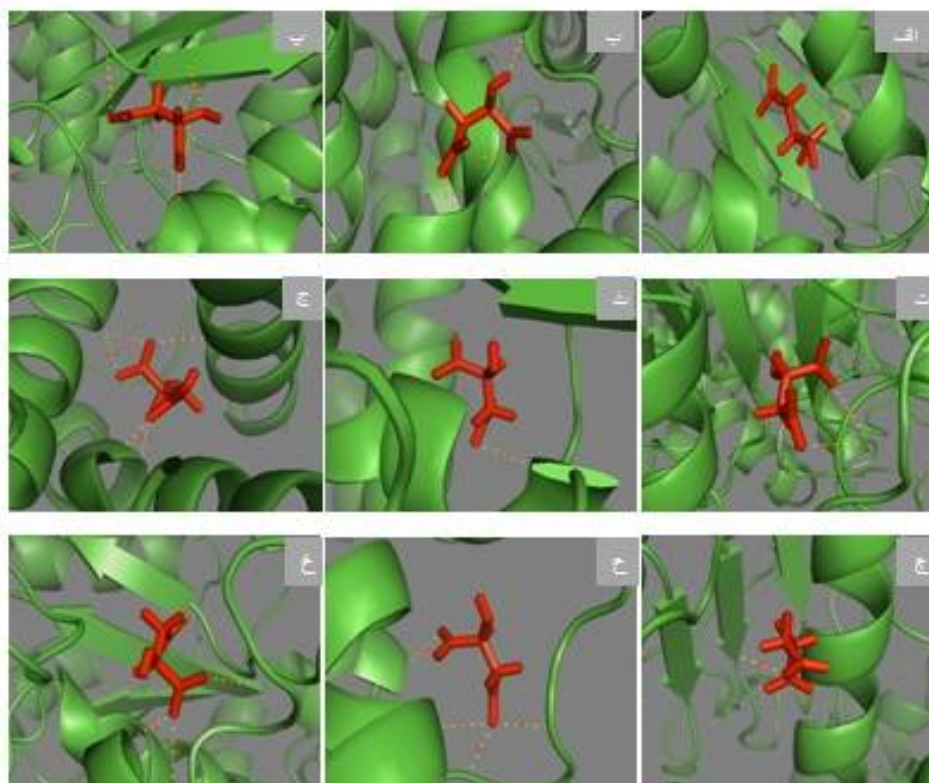
بررسی قابلیت آنزیم‌ها و شبه آنزیم‌های مالیک انتخابی در دکربوکسیلاسیون ملات بر اساس میل اتصال آنها به سوپسترا صورت پذیرفت (شکل 5). نتایج حاصل از این واکنش مبین میل اتصال بالای تمامی آنزیم‌های انتخابی مدل شده به ملات بود، با این وجود همان‌طور که در شکل 6 نمایش داده شده است آنزیم قابل اشتقاق از گونه *Parasitella parasitica* دارای میل اتصال بیشتر نسبت به سایر آنزیم‌های انتخابی است.



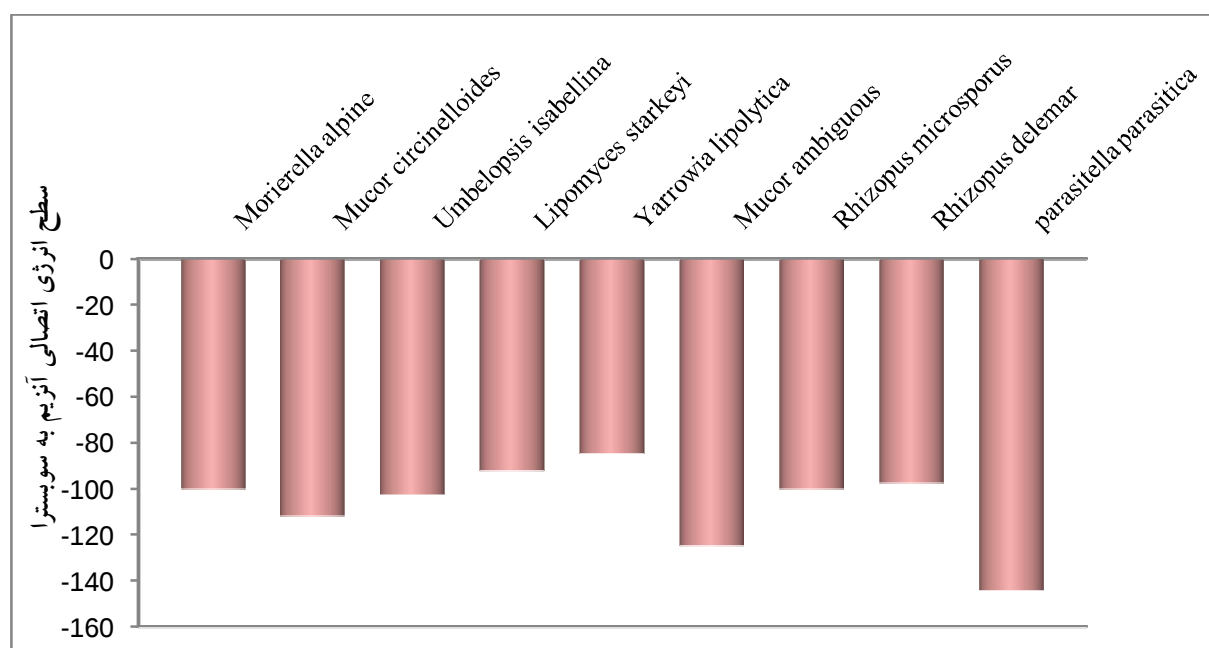
شکل 4 اسیدهای آمینه جایگاه فعال به ترتیب در گونه‌های الف: *Mucor circinelloides* ب: *Umbelopsis isabellina* پ: *Lipomyces starkeyi* ت: *Yarrowialipolytica* ث: *Mortierella alpine* ج: *Mucor ambiguous* ح: *Parasitella parasitica* خ: *Rhizopus microsporus* د: *Rhizopus delemar*

جدول 7 تعداد و انواع اسیدهای آمینه دخیل در تشکیل جایگاه فعال آنزیم‌ها و شبه آنزیم‌های مالیک انتخابی.

تعداد اسیدهای آمینه جایگاه فعال					ردیف
بازی	اسیدی	آلیفاتیک	قطبی	نام گونه	
1	-	5	6	<i>Mortierella alpine</i>	1
1	1	3	3	<i>Mucor circinelloides</i>	2
1	-	4	2	<i>Umbelopsis isabellina</i>	3
-	1	6	2	<i>Lipomyces starkeyi</i>	4
1	-	5	3	<i>Yarrowialipolytica</i>	5
-	2	1	8	<i>Mucor ambiguous</i>	6
-	-	6	3	<i>Rhizopus microsporus</i>	7
1	1	4	2	<i>Rhizopus delemar</i>	8
-	1	3	5	<i>Parasitella parasitica</i>	9



شکل 5 برهمکنش مولکولی آنزیم‌ها و شبه آنزیم‌های مالیک انتخابی با سویسترای ملات به ترتیب در گونه‌های، الف: *Mortierella alpine*، ب: *Mucor circinelloides*، پ: *Umbelopsis isabellina*، ت: *Lipomyces starkeyi*، ث: *Yarrowia lipolytica*، ج: *Mucor ambiguous*، چ: *Rhizopus microsporus*، ح: *Parasitella parasitica*، خ: *Rhizopus delemar*.



شکل 6 مقایسه قابلیت میل اتصال آنزیم به سویسترا براساس سطح انرژی اتصال.

4- بحث و نتیجه‌گیری

امروزه چربی‌های حیوانی و نیز روغن‌های گیاهی متنوع مانند روغن سویا، کلزا، خرما و روغن‌های پخت‌وپز به عنوان مواد اولیه و خام برای تولید بیودیزل استفاده می‌شود [28,27]. با این وجود، با توجه به افزایش تقاضا برای تولید این نوع از سوخت زیستی، منابع روغنی دیگری به ویژه روغن‌های غیرخوراکی برای این منظور مورد نیاز است. لذا در سال‌های اخیر توجه زیادی به اکتشاف روغن‌های میکروبی شده است که می‌تواند به یکی از منابع بالقوه برای تولید بیودیزل در آینده تبدیل شود. این نوع از روغن‌های میکروبی با نام روغن‌های تک‌سلولی به وسیله برخی میکروارگانیسم‌های روغنی مانند مخمرها، قارچ‌ها، باکتری‌ها و ریزجلبک‌ها تولید می‌شود [29]. در این میان قارچ‌ها به ویژه مخمرها با توجه به کشت و دستکاری ژنتیکی آسان و نیز پتانسیل تجمعی بالا، میکروارگانیسم‌های مناسبی برای تولید بیودیزل می‌باشند. بنابراین واکاوی مکانیسم‌های مولکولی دخیل در فرایند و آشکارسازی ویژگی‌های ساختاری و عملکردی ژن‌های درگیر در متابولیسم و ذخیره‌سازی لیپید در این نوع از میکروارگانیسم‌ها راه را برای دستکاری در جهت تجمع و ترکیب لیپید در این نوع از گونه‌ها مبتنی بر مهندسی ژنتیک فراهم ساخته است [31,30]. بنابراین انتظار می‌رود این نوع از میکروارگانیسم‌ها در آینده به‌طور صنعتی برای تولید سوخت‌های زیستی از جمله بیودیزل استفاده شود. با این حال، هزینه‌های مربوط به چربی‌های میکروبی در رقابت با روغن‌های گیاهی جهت تولید بیودیزل هنوز بسیار بالا می‌باشد. با این وجود استفاده از منابع کربنی ارزان قیمت برای کشت، اکتشاف تنوع زیستی طبیعی به منظور تعیین گونه‌های روغنی جدید و مهندسی متابولیک روش‌های بسیار مطلوب و نوید بخش برای کاهش هزینه‌های تولید در قارچ‌ها می‌باشد [15]. لذا مطالعاتی

به منظورافزایش تولید بیودیزل مبتنی بر درک متابولیسم لیپید و مکانیسم‌های مولکولی مؤثر در این نوع از میکروارگانیسم‌ها صورت پذیرفته است [19]، که در این تحقیق مبتنی بر آزمون‌های مجازی نیز در دستور کار قرار گرفته است. در این راستا پایش مکانیسم‌های مولکولی مؤثر در فرایند منجر به آشکارسازی آنزیم مالیک به عنوان آنزیم مؤثر در تولید لیپید شد. این آنزیم از طریق دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو ملات به پیروات، NADPH که برای بیوستز اسیدچرب حیاتی است را فراهم می‌آورد. در همین راستا آنزیم‌های دیگری نظیر گلوکز 6- فسفات دهیدروژناز و 6- فسفوجلوکونات دهیدروژناز قابلیت تولید NADPH را دارا می‌باشند، با این وجود این آنزیم‌ها در واکنش‌های ابتدایی چرخه پنتوزفسفات درگیر بوده و فعالیت آنها به شروع ذخیره‌سازی لیپید یا پایان آن بستگی ندارد و تنها آنزیم مالیک ارتباط نزدیکی با ذخیره‌سازی لیپید دارد، به‌طوری‌که با توقف فعالیت این آنزیم ذخیره‌سازی لیپید در حدود 25% وزن خشک سلول در *Mucor* و در حدود 40% در *Mortierella* کاهش می‌یابد [22]. پایش ویژگی‌های ساختاری آنزیم‌های مالیک انتخابی تغییرات پس از ترجمه متنوع این آنزیم‌ها از جمله گلیکوزیلاسیون، فسفوریلاسیون، و در یک مورد سولفوریلایسیون آنها را آشکار نمود (جدول 1). در این راستا بسیاری از پروتئین‌ها دستخوش تغییرات پس از ترجمه، مثل حذف سیگنال پپتیدها، فسفوریلاسیون و گلیکوزیلاسیون می‌شوند که این تغییرات نهایتاً برای فعالیت پروتئین‌ها و تعیین محل درون سلولی آنها نیز مهم است [32]. در این میان گلیکوزیلاسیون که ممکن است محلولیت، فولدینگ، حساسیت به پروتئولیز، پایداری، اتصال به رسپتور و فعالیت را تحت تأثیر قرار دهد، فراوان‌ترین تغییر پس از ترجمه است که در تمامی سلسله‌های موجودات زنده

آشکار شده است [34,33] و در تمامی آنزیم‌های این تحقیق نیز اعمال می‌شود. از سوی دیگر پایش عملکردی آنزیم‌های مالیک انتخابی، آشکارسازی دمین‌های عملکردی MAO1_MF، Malic_M و malic را در تمامی آنزیم‌های مورد بررسی آشکار نمود (جدول 2). از این میان، دمین Malic_M عضوی از خانواده دمینی دهیدروژنازی بوده که دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو L-مالات به پیروات را در حضور کاتیون‌های منگنز یا منیزیم انجام داده و منجر به احیاء مولکول‌های NAD⁺ یا NADP⁺ می‌شود [36,35]. علاوه بر این دمین MAO1_MF آشکار شده در این آنزیم‌ها نیز قابلیت دکربوکسیلاسیون مالات به پیروات را در حضور کاتیون‌های منگنز یا منیزیم دارا می‌باشد [38,37]. بررسی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم‌ها و شبه آنزیم‌های مالیک انتخابی (جدول 3)، پایداری آنها را آشکار نمود [39]. به جز آنزیم مالیک مشتق شده از گونه *Umbelopsis isabellina* که با شاخص ناپایداری 43/79 جزء پروتئین‌های ناپایدار محسوب می‌شود. همچنین بررسی شاخص آلفاتیک که به عنوان یک عامل مهم به منظور برآورد مقاومت پروتئین‌ها در برابر حرارت می‌باشد [40]. نشان‌دهنده مقاوم بودن حرارتی تمامی آنزیم‌های مالیک انتخابی بود. از سوی دیگر بررسی ویژگی‌های توپولوژی آنزیم مالیک مبین غشایی بودن همه آنها بود (جدول 4). به‌طور کلی محل قرارگیری آنزیم مالیک بر اساس گزارش‌ها سیتوزول، میتوکندری و هیدروژنوزوم است [41]. در همین راستا محل سلولی آنزیم مالیک قارچ‌های انتخابی این تحقیق در گونه *Yarrowia lipolytica* در میتوکندری و در *Lipomyces starkeyi* در سیتوزول ذکر شده است [42]. که این مهم می‌تواند در مورد *Yarrowia lipolytica* استقرار آنزیم در محل غشای میتوکندری مبتنی بر تحقیقات ما را نشان دهد. با این وجود جایگاه دقیق بسیاری از آنزیم‌های

مالیک گروه *Mucoromycotina* که شامل *Mortierella alpina*، *Mucor circinelloides* و *Umbelopsis isabellina* می‌باشند، به‌وضوح مشخص نشده است [36]. علاوه بر این، نتایج حاصل از همگون‌یابی توالی پروتئینی ژن *mce2* منجر به آشکار شدن طیف گسترده‌ای از جانداران واجد توالی پروتئینی همگون شد، که در این میان توالی پروتئینی *mce* گونه *Mucor ambiguus* نزدیکترین توالی به *Mucor circinelloides* بود (شکل 1). در این رابطه گونه *Mucor ambiguus* برای تولید اسید چرب غیراشباع γ -لینولنیک اسید (GLA) به کار می‌رود که جزء اسیدهای چرب ضروری است و بدن قادر به سنتز آن نمی‌باشد و باید در رژیم غذایی وجود داشته باشد [43]. این اسیدچرب پیش‌ساز مهم پروستاگلاندین‌ها می‌باشد و همچنین برای بیمارانی که از دیابت، سرطان، پیری و روماتیسم رنج می‌برند، لازم است. علاوه بر این اسید چرب باعث کاهش فشارخون و کلسترول شده و از تشکیل لخته و تجمع پلاکت‌ها جلوگیری می‌کند [43]. از سوی دیگر GLA اسید چرب اشباع نشده‌ای است که علاوه بر قارچ‌های راسته *Mucorales* [44]، در دانه‌های گیاهی و در جلبک‌ها نیز سنتز می‌شود [45]. در همین‌راستا همگون‌یابی توالی پروتئینی ژن *mce2* نیز منجر به آشکار شدن طیف گسترده‌ای از جانداران واجد توالی پروتئینی همگون شد، که در این میان توالی پروتئینی *mce* گونه *Rhizopus microsporus* نزدیکترین توالی به *Umbelopsis isabellina* بود (شکل 2). در همین رابطه باید اشاره نمود که گونه *Rhizopus microsporus* برای تولید بیودیزل با سنتز استرهای اتیلی با استفاده از لیپازها در تخمیر جامد به کاربرده می‌شود [46]. و از زیست‌توده آن نیز بهره‌های اقتصادی متنوعی برده شده است [47]. از سوی دیگر این میکروارگانیسم قادر است سطح بالایی از α -امیلاز و گلوکوآمیلاز را با رشد بر

می‌باشد. علاوه بر این بررسی قابلیت آنزیم‌ها و شبه‌آنزیم‌های مالیک انتخابی در دکربوکسیلاسیون ملات بر اساس میل اتصالی آنها مبین قابلیت تمامی آنزیم‌های انتخابی مدل شده به‌ویژه آنزیم مالیک قابل اشتقاق از گونه *Parasitella parasitica* به ملات بود (شکل‌های 4 و 5)، که در سایر گزارش‌ها به سوبسترا بودن این ترکیب برای آنزیم مالیک نیز اشاره شده است [51].

5- سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از خانم دکتر زینب امیری طهرانی به منظور راهنمایی در مدل‌سازی‌های پروتئینی قدردانی می‌نمایند.

6- منابع

- [1] Li, X., Xu, H. & Wu, Q. (2007). Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnology and bioengineering*. 98(4), 764-771.
- [2] Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*. 101(2), 87-96.
- [3] Van Gerpen, J. (2004). Business management for biodiesel producers. *Report from Iowa State University for the National Renewable Energy Laboratory, NREL/SR-510-36242*.
- [4] Demirbaş, A. (2003). Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey. *Energy conversion and Management* 44(13), 2093-2109.
- [5] Demirbas, A. (2004). Bioenergy, global warming, and environmental impacts. *Energy Sources* 2, 236-225.
- [6] Xiaohua, W. & Zhenmin, F. (2004). Biofuel use and its emission of noxious gases in rural China. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 8(2), 183-192.
- [7] Demirbas, A. (2008). Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats. *Energy*

روی بقایای کشاورزی مانند سبوس، گندم، تغال نیشکر، کاه برنج و چوب ذرت خشک شده به عنوان منبع کربن تولید کند [48]. از سوی دیگر ارزیابی قابلیت آنزیم‌ها و شبه‌آنزیم‌های مالیک انتخابی با تعیین ساختار 3 بعدی و میل اتصالی آنها با سوبسترا تعیین شد. نتایج حاصل از این آزمون‌ها منجر به مدل‌سازی‌های ساختاری با کیفیت مطلوب براساس آزمون ERRAT و نمودار رامچاندرا شد (جدول 5)، که بر اساس گزارش‌ها مورد قبول می‌باشد [49]. با این وجود ارزیابی کیفیت ساختارهای مدل شده آنزیم‌ها و شبه‌آنزیم‌های مالیک انتخابی ضمن آشکارسازی مارپیچ‌های α و صفحات β در ساختارهای مدل شده، مبین حضور برخی از اسیدهای آمینه در موقعیت‌های غیرمجاز هر یک از ساختارهای مدل شده بود (جدول 7). به طور کلی آنزیم مالیک دارای ساختار β/α است. هسته ساختار این آنزیم شامل سه لایه $\alpha/\beta/\alpha$ و صفحات β است و به چهار دمین A، B، C و D تقسیم می‌شود [50]. جایگاه فعال آنزیم مالیک در شکاف عمیق در حد فاصل بین دمین B و C هر یک از مولکول به همراه چند بخش از دمین A واقع شده است. در همین راستا موقعیت اسیدهای آمینه و نوع آنها که در تشکیل جایگاه فعال دخالت دارند مورد پایش قرار گرفت (جدول 7). نتایج حاصل از این ارزیابی مبین دخالت حداقلی 4 نوع از اسیدهای آمینه در تشکیل جایگاه فعال بود، که بیشترین آنها از نوع اسیدهای آمینه آلِفَاتیک و قطبی هستند. به طور کلی بخش‌های اسیدهای آمینه در منطقه جایگاه فعال در بین آنزیم‌های مالیک بسیار حفاظت شده می‌باشند و اهمیت آن‌ها در اتصال به سوبسترا و/یا کاتالیزورها تعیین می‌شود [51]. در همین راستا گزارش شده است که انواع اسیدهای آمینه متصل به سوبسترا شامل اسیدهای آمینه ترئونین، پرولین، والین، آرژنین، ایزولوسین، لوسین و آسپارژین می‌باشد [51]، که همسو با نتایج حاصل از این تحقیق

- [19] Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribealarea, J. L., Molina-Jouve, C. & Nicaud, J. M. (2009). *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog Lipid Res* 48(6), 375-387.
- [20] Li, C. H., Cervantes, M., Springer, D. J., Boekhout, T., Ruiz-Vazquez, R. M., Torres-Martinez, S. R., Heitman, J. & Lee, S. C. (2011). Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathog* 7(6), e1002086.
- [21] Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* 86(11), 807-815.
- [22] Wynn, J. P., bin Abdul Hamid, A. & Ratledge, C. (1999a). The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi. *Microbiology* 145(8), 1911-1917.
- [23] Wynn, J. P., bin Abdul Hamid, A. & Ratledge, C. (1999b). The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi. *Microbiology* 145 (Pt 8): 1911-1917.
- [24] Li, Y., Adams, I. P., Wynn, J. P. & Ratledge, C. (2005). Cloning and characterization of a gene encoding a malic enzyme involved in anaerobic growth in *Mucor circinelloides*. *Mycol Res* 109(Pt 4), 461-468.
- [25] Wynn, J. P., Kendrick, A. & Ratledge, C. (1997). Sesamol as an inhibitor of growth and lipid metabolism in *Mucor circinelloides* via its action on malic enzyme. *Lipids* 32(6), 605-610.
- [26] Zhang, Y., Adams, I. P. & Ratledge, C. (2007). Malic enzyme: the controlling activity for lipid production? Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5-fold increase in lipid accumulation. *Microbiology* 153(7), 2013-2025.
- [27] Felizardo, P., Neiva Correia, M. J., Raposo, I., Mendes, J. F., Berkemeier, R. & Bordado, J. M. (2006). Production of biodiesel from waste frying oils. *Waste management* 26(5), 487-494.
- [28] Kulkarni, M. G. & Dalai, A. K. (2006). Waste cooking oil an economical source for biodiesel: a review. *Industrial & engineering chemistry research* 45(9), 2901-2913.
- [29] Ma, Y. (2006). Microbial oils and its research advance. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering* 4(4), 7-11.
- [30] Oelkers, P., Cromley, D., Padamsee, M., *conversion and Management* 49(1), 125-130.
- [8] Pappan, D. (2002). Environmental evaluation of biofuels. *Social and Management Sciences* 10(1), 95-116.
- [9] Demirbas, M. & Balat, M. (2006). Recent advances on the production and utilization trends of bio-fuels: a global perspective. *Energy conversion and Management* 47(15), 2371-2381.
- [10] Knothe, G. (2005). Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel processing technology* 86(10), 1059-1070.
- [11] Fuga, J. & Collier, V. (2013). Genetic and metabolic engineering of *Escherichia coli* for biofuel production as an alternative fuel source.
- [12] Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S. & Tiffany, D. (2006). Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(30), 11206-11210.
- [13] Searchinger, T., Heimlich, R., Houghton, R. A., Dong, F., Elobeid, A., Fabiosa, J., Tokgoz, S., Hayes, D. & Yu, T.-H. (2008). Use of US croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change. *Science* 319(5867), 1238-1240.
- [14] Azocar, L., Ciudad, G., Heipieper, H. J. & Navia, R. (2010). Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils. *Appl Microbiol Biotechnol* 88(3), 621-636.
- [15] Rossi, M., Amaretti, A., Raimondi, S. & Leonardi, A. (2011). Getting lipids for biodiesel production from oleaginous fungi. *Feedstocks and Processing Technologies*.
- [16] Henry, S. A., Kohlwein, S. D. & Carman, G. M. (2012). Metabolism and regulation of glycerolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190(2), 317-349.
- [17] Li, Q., Du, W. & Liu, D. (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 756-749(5)80.
- [18] Iassonova, D. R., Hammond, E. G. & Beattie, S. E. (2008). Oxidative stability of polyunsaturated triacylglycerols encapsulated in oleaginous yeast. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85(8), 711-716.

- Meyer. *Plant molecular biology reporter* 26(4), 335-349.
- [41] Van Der Giezen, M., Rechinger, K. B., Svendsen, I., Durand, R., Hirt, R. P., Fevre, M., Embley, T. M. & Prins, R. A. (1997). A mitochondrial-like targeting signal on the hydrogenosomal malic enzyme from the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*: support for the hypothesis that hydrogenosomes are modified mitochondria. *Molecular microbiology* 23(1), 11-21.
- [42] Tang, W., Zhang, S., Tan, H. & Zhao, Z. K. (2010). Molecular cloning and characterization of a malic enzyme gene from the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Molecular biotechnology* 45(2), 121-128.
- [43] Odabasi, Z., Paetznick, V. L., Rodriguez, J. R., Chen, E. & Ostrosky-Zeichner, L. (2004). In vitro activity of anidulafungin against selected clinically important mold isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48(5), 1912-1915.
- [44] Somashekar, D., Venkateshwaran, G., Sambaiah, K. & Lokesh, B. (2003). Effect of culture conditions on lipid and gamma-linolenic acid production by mucoraceous fungi. *Process Biochemistry* 38(12), 1719-1724.
- [45] De, B., Chaudhury, S. & Bhattacharyya, D. (1999). Effect of nitrogen sources on γ -linolenic acid accumulation in *Spirulina platensis*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76(1), 153-156.
- [46] Zago, E., Botton, V., Alberton, D., Córdova, J. s., Yamamoto, C. I., Cocco, L. C., Mitchell, D. A. & Krieger, N. (2014). Synthesis of ethylic esters for biodiesel purposes using lipases naturally immobilized in a fermented solid produced using *Rhizopus microsporus*. *Energy & Fuels* 28(8), 5197-5203.
- [47] Van Leeuwen, J., Khanal, S. K., Pometto, A. L., Rasmussen, M. L. & Mitra, D. (2013). Fungi cultivation on alcohol fermentation stillage for useful products and energy savings. Google Patents.
- [48] Peixoto-Nogueira, S., Sandrim, V., Guimaraes, L., Jorge, J., Terenzi, H. & Polizeli, M. (2008). Evidence of thermostable amylolytic activity from *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* using wheat bran and corn cob as alternative carbon source. *Bioprocess and biosystems engineering* 31(4), 329-334.
- Billheimer, J. T. & Sturley, S. L. (2002). The DGA1 gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast. *J Biol Chem* 277(11), 8877-8881.
- [31] Sandager, L., Gustavsson, M. H., Ståhl, U., Dahlqvist, A., Wiberg, E., Banas, A., Lenman, M., Ronne, H. & Stymne, S. (2002). Storage lipid synthesis is non-essential in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 277(8), 6478-6482.
- [32] Yan, S., Tang, Z., Su, W. & Sun, W. (2005). Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *PROTEOMICS* 5(1), 235-244.
- [33] Dixon, B. (1991). Glycosylation Enhances Stability. *Nature biotechnology* 9(5), 418-418
- [34] Larkin, A. & Imperiali, B. (2011). The expanding horizons of asparagine-linked glycosylation. *Biochemistry* 50(21), 4411-4426.
- [35] Coleman, D. E., Rao, G. J., Goldsmith, E., Cook, P. F. & Harris, B. G. (2002). Crystal structure of the malic enzyme from *Ascaris suum* complexed with nicotinamide adenine dinucleotide at 2.3 Å resolution. *Biochemistry* 41(22), 6928-6938.
- [36] Vorapreeda, T., Thammarongtham, C., Cheevadhanarak, S. & Laoteng, K. (2013). Repertoire of malic enzymes in yeast and fungi: insight into their evolutionary functional and structural significance. *Microbiology* 159(Pt 12), 2548-2557.
- [37] Long, J. J., Wang, J.-L. & Berry, J. O. (1994). Cloning and analysis of the C4 photosynthetic NAD-dependent malic enzyme of amaranth mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 269(4), 2827-2833.
- [38] Loeber, G., Infante, A., Maurer-Fogy, I., Krystek, E. & Dworkin, M. (1991). Human NAD (+)-dependent mitochondrial malic enzyme. cDNA cloning, primary structure, and expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 266(5), 3016-3021.
- [39] Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2005). *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server*. Springer.
- [40] Kim, Y.-J., Shim, J.-S., Krishna, P. R., Kim, S.-Y., In, J.-G., Kim, M.-K. & Yang, D.-C. (2008). Isolation and characterization of a glutaredoxin gene from *Panax ginseng* CA

- mitochondrial NAD (P)⁺-dependent malic enzyme: a new class of oxidative decarboxylases. *Structure* 7(8), 877-889.
- [51] Chang, G.-G. & Tong, L. (2003). Structure and function of malic enzymes, a new class of oxidative decarboxylases. *Biochemistry* 42(44), 12721-12733.
- [49] Colovos, C. & Yeates, T. O. (1993). Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein science: a publication of the Protein Society* 2(9), 1511.
- [50] Xu, Y., Bhargava, G., Wu, H., Loeber, G. & Tong, L. (1999). Crystal structure of human