بررسی پتانسیل اسیدهای آمینه بعنوان تنها منبع کربن و نیتروژن در رشد استرپتومایسسها

زهرا راستیان[1]، فرشته نعیم پور[2]*
۱- دانشگاه علوم پزشکی بوشهر
۲-دانشکدهٔ مهندسی شیمی دانشگاه علم و صنعت ایران
fnaeim@iust.ac.ir

نهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران

دانشگاه علم و صنعت ایران
۳-۵ آذر ماه ۱۳۸۳

چکیده

در این تحقیق متابولیسم رشد سلول در استفاده از هر یک از اسیدهای آمینه بعنوان تنها منبع کربن، نیتروژن و انرژی در استرپتومایسسها مورد بررسی قرار گرفته شده است. بدین منظور ابتدا شبکهٔ واکنشهای متابولیکی شامل کلیهٔ واکنشهای آنابولیسم و کاتابولیسم سلولی برای این گروه از میکروارگانیسمها جمع آوری و سپس یک مدل استوکیومتری بر اساس موازنه‌های جرمی بدست آورده شده است. این مدل برای حداکثر نمودن تابع هدف رشد از طریق برنامه‌ریزی خطی با استفاده از نرم افزار lingo حل گردیده است. توزیع فلاکسهای متابولیکی در غالب یک نقشهٔ متابولیکی همراه با مقادیر عددی فلاکسها بر اساس نتایج محاسباتی برای یک اسید آمینه ارائه گردیده است. نتایج این محاسبات و نیز اثر تعداد کربن اسیدهای آمینه در رشد در جدول آورده شده است.

کلمات کلیدی: مهندسی متابولیک، آنالیز فلاکسها، متابولیسم، اسید آمینه، منبع کربن و نیتروژن، استرپتومایسس.

مقدمه

بررسی مسیرهای متابولیکی و دستکاری آنها بمنظور ایجاد تغییرات مطلوب پدیدهٔ تازه‌ای نیست. مثالهای برجسته‌ای در این زمینه وجود دارد از جمله بهبود تولید ویتامینها، حلالها، آنتی‌بیوتیکها و اسیدهای آمینه. در ابتدا از موتاسیونهای شیمیایی (که یک پدیدهٔ اتفاقی بود) استفاده می‌شد. پس از آن با توسعهٔ روشهای بیولوژی مولکولی و ایجاد DNA نوترکیب، راه تازه‌ای در دستکاری مسیرهای متابولیکی گشوده شد [۱]. Bailey در سال ۱۹۹۱ مهندسی متابولیک را بهبود جهت داده شده فعالیتهای سلولی از طریق دستکاریهای آنزیمی. انتقال مواد و عملکرد تنظیمی سلول با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب تعریف نمود [۲].

مهندسی متابولیک نیز مانند دیگر رشته‌های مهندسی دربردارندهٔ دو مرحلهٔ تعریف شدهٔ تحلیل و بررسی (analysis) و نیز ساخت (synthesis) می‌باشد. در بعد تحلیل این مهندسی مسائل زیادی مانند تعیین پارامترهای مهم در هر موقعیت فیزیولوژی و استفاده از این اطلاعات برای توضیح سیستم کنترل شبکهٔ متابولیکی و سپس اهداف منطقی اصلاح مورد بحث قرار می‌گیرد [۱]. بدین منظور یک نقشهٔ جامع از متابولیسم سلولی مورد نیاز می‌باشد. بعد از مشخص شدن تغییرات مناسب، تکنیکهای بیولوژی مولکولی در جهت اصلاح گونهٔ میکروبی (بعد ساخت) بکار می‌رود [۱و۳]. مفهوم آنالیز حداکثر قابلیت سلول، بطور موفقیت آمیزی در مورد تعداد زیادی از میکروارگانیسمهای صنعتی مانند اشرشیاکلی [۴و۵] باسیلوس سابتیلیس [۶] باسیلوس لیچنی فرمیس [۷و۸و۹]. و استرپتومایسس [۱۰و۱۱]. بکار برده شده است.

استرپتومایسسها از باکتریهای طبقهٔ استرپتومایستها می‌باشند که که از اهمیت زیادی در صنعت از جمله صنعت داروسازی برخوردارند. از آنجائیکه آنها از منابع عمدهٔ تولید آنتی‌بیوتیکها می‌باشند، بیشتر توجهات معطوف مسیرهای تولید محصولات ثانویه و تنظیمات آنزیمی آنها بوده و به مسیرهای متابولیسم اولیه که تولید کنندهٔ پیشسازها می‌باشد توجه کمتری شده است [۱۲]. در این تحقیق به متابولیسم اولیه این گونه‌ها در استفاده از اسیدهای آمینه بعنوان تنها منبع کربن و نیتروژن با استفاده از آنالیز فلاکسها (یکی از ابزارهای مهندسی متابولیکی) پرداخته شده است. روش آنالیز فلاکسها در گونهٔ استرپتومایسس سیلیکالر و لیویدانس تنها با توجه به واکنشهای آنابولیسم در بررسی رشد سلول بکار رفته و اثر شکست و تجزیهٔ مواد واسطه یا واحدهای ساختمانی در نظر گرفته نشده است.

در اینجا با افزوده شدن کل واکنشهای تجزیهٔ اسیدهای آمینه به شبکهٔ متابولیکی، اثر استفادهٔ این مواد بعنوان منبع غذایی سلول مورد آنالیز قرار گرفته شده است.

تئوری و روشها

در این آنالیز ابتدا شبکه واکنشهای بیوشیمیایی مربوط به میکروارگانیسم مورد نظر برای تبدیل منابع کربن و انرژی به اجزا، توده سلولی (متابولیتهای واسطه‌ای، واحدهای ساختمانی ماکرومولکولها و ATP) و نیز تجزیهٔ هر کدام از این اجزا به مواد واسطه‌ای و پیشسازها تشکیل داده شد. با نوشتن موازنه جرمی برای هر متابولیت درون سلولی در حالت پایدار بصورت زیر یک دستگاه معادلات بدست آورده شد.

$S . v = b$

که در آن

S ماتریس ضرایب

b بردار سرعت ویژهٔ خروج مواد از سلول

v بردار فلاکسهای مجهول

(در مورد جذب مواد غذایی از محیط b منفی می‌شود) [۱۳].

از آنجاییکه تعداد واکنشها معمولاً از تعداد متابولیتها بیشتر است، تعداد فلاکسهای مجهول از تعداد معادلات بیشتر شده و در نتیجه یک دستگاه معادلات جبری خطی خواهیم داشت که بینهایت جواب دارد. با تعیین یک تابع هدف و بهینه سازی آن می توان فلاکسهای مجهول را بدست آورد. تابع هدف در آنالیز فلاکسهای متابولیکی می تواند سرعت رشد ویژه، سرعت جذب سوبسترا، یا سرعت تولید محصول باشد. برای حل دستگاه معادلات از نرم افزار برنامه ریزی خطی Lingo7 که می‌تواند مدلهای خطی و غیر خطی را حل نماید استفاده شده است [۱۴].

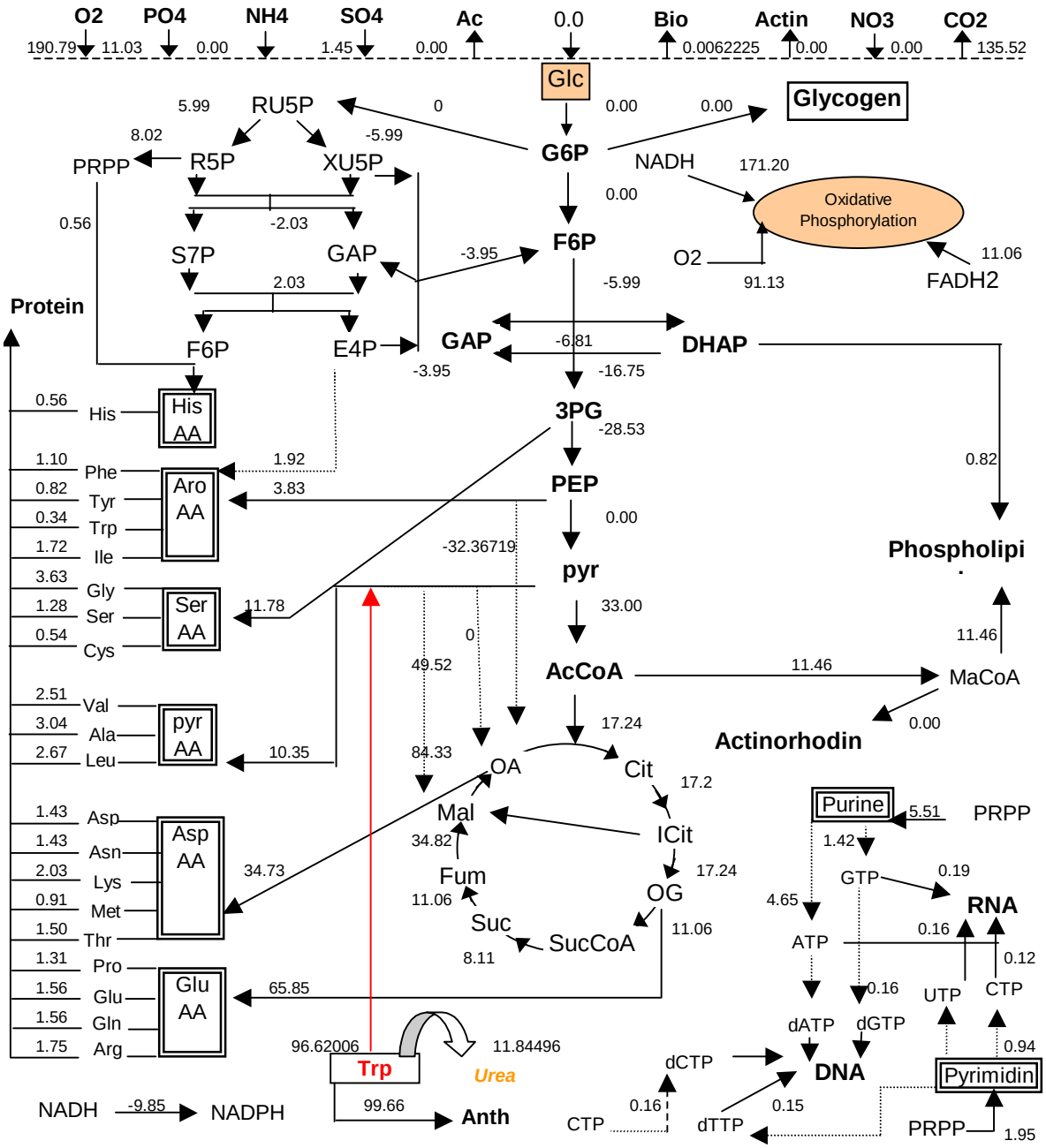
نتایج و بحث

در این شبکه مسیرها و واکنشهای زیر با توجه به متابولیسم استرپتومایسسها در نظر گرفته شده است: مسیر گلیکولیز(Glycolysis) ، گلوکونئوژنس (Gluconeogenesis)، پنتوز فسفات (Pentose phosphate)، چرخه اسید سیتریک (Citric acid cycle)، مسیرگلیوکسیلات (Glyoxylate)، واکنشهای آناپلروتیک (Anaplerotic)، مصرف آمونیوم، نیترات، سولفات، فسفات، تنفس هوازی (Oxidative phosphorhylation)، واکنشهای اسید فولیک (Folic acid)، فعالیت ترنس هیدروژناز (Transhydrogenase)، بیوسنتز اسیدهای آمینه، نوکلئوتیدها، سنتز اسید چرب، بیوسنتز ماکرومولکولهای تشکیل دهنده سلول مانند DNA و RNA، پروتئین، فسفولیپید و گلیکوژن همچنین تجزیهٔ پروتئین، اسیدهای آمینه، اسیدهای نوکلئیک، نوکلئوتیدها، چربیها، اسیدهای چرب و گلیکوژن [۱۹و۱۸و۱۷و۱۶و۱۵و۱۲]. مسیر انتنردودوروف(Entner-Doudoroff) که از مسیرهای شکست گلوکز میباشد در استرپتومایسسها دیده نشده است گیرد [۱۱]. این شبکه دربردارنده حدود ۲۱۶ واکنش بیوشیمیایی میباشد. با موازنه جرمی برای هر متابولیت درون سلولی یک دستگاه با تعداد ۱۳۱ معادله و ۲۱۶ مجهول (فلاکسهای مجهول) حاصل گردید. در محاسبات انجام گرفته نسبت فسفر به اکسیژن (P/O ratio) در اکسیداسیون هوازی در مورد NADH، ۲ و در مورد $FADH_2$، ۱/۳۳ فرض شده است [۱۱]. درصد وزنی هر یک از واحدهای ساختمانی تشکیل دهنده ماکرومولکولها و نیز درصد هر ماکرومولکول در یک گرم از توده زیستی بر مبنای اطلاعات منبع [۲۰] در نظر گرفته شده اند. توده زیستی عمدتا شامل پروتیئن، اسیدهای نوکلئیک، فسفولیپیدها و منابع ذخیره کربنی در نظر گرفته شده است.

بمنظور بررسی استفادهٔ سلول از اسیدهای آمینه بعنوان تنها منبع کربن و نیتروژن در مدل موجود، برای هر اسید آمینه شدت ویژهٔ جذب برابر $\mu mol(g\ DW\ h)^{-1}$ ۱۰۰ در نظر گرفته شده است و حداکثر شدت ویژهٔ

رشد با استفاده از این مدل محاسبه گردیده است. بعنوان نمونه توزیع فلاکسها هنگام استفاده از اسید آمینهٔ تریپتوفان در شکل (۱) آورده شده است. حداکثر رشد ویژهٔ محاسبه شده برای این اسید آمینه ۰/۰۰۶۲۲۲۵ $g(g\ DW\ h)^{-1}$ بوده است در حالیکه حداکثر شدت رشد ویژه تئوری برای مقدار مشابه از مصرف گلوکز و مقدار مورد نیاز از آمونیوم (منبع کربن) ۰/۰۱۱۸۹۹۵ $g(g\ DW\ h)^{-1}$ محاسبه شده است [۲۱]. تریپتوفان عموماً در استرپتومایسسها به فرمات، آلانین و آنترالینات تجزیه می‌شود. بیشتر فرمات تولیدی به دی اکسیدکربن تبدیل میگردد که از سلول خارج شده و آلانین بدست آمده به پیروات و آمونیوم تجزیه می‌شود. در اثر این واکنشهای تجزیه مقداری اوره تولید گردیده که از سلول دفع شده و باعث از دست رفتن مقدار از منبع کربنی و پایین آمدن شدت رشد می‌گردد. تحقیقات تجربی انجام شده بر روی این گونه نشان داده است که تریپتوفان می‌تواند بعنوان منبع کربن و نیتروژن در استرپتومایسسها بکار رود [۱۲] که از اینجا می‌توان به صحت آنالیز انجام شده پی برد.

در جدول (۱) نتایج بدست آمده از شکست ۱۰۰ $\mu mol(g\ DW\ h)^{-1}$ از هر یک ازاسیدهای آمینه بعنوان تنها منبع کربن و نیتروژن مقایسه شده اند. همانطور که مشاهده می‌شود طبق تحلیل و بررسیهای انجام شده لایزین سوبسترای بهتری برای رشد می‌تواند باشد. لایزین ۶ کربن دارد و درصد قابل توجهی از پروتئین سلولی از لایزین تشکیل شده است که خود در سرعت ویژهٔ رشد مؤثر است. پس از آن لوسین، ایزولوسین و تایروزین اثر مشابهی دارند. لوسین و ایزولوسین هر دو ۶ کربن دارند در حالیکه تایروزین حاوی ۹ کربن می‌باشد. تایروزین درصد بسیار کمتری از پروتئین سلولی در مقایسه با آن دو اسیدآمینه دارد همچنین مقدار بسیار زیادی از آن بصورت آنترالینات در سلول تجمع می‌یابد. گلوتامات و گلوتامین و پرولین نیز یک اندازه در رشد این گونه اثر می‌گذارند. گلوتامات و گلوتامین هر دو ۵ کربن دارند در حالیکه پرولین ۶ کربنه است ولی این اسید آمینه درصد کمتری از پروتئین سلولی را در مقایسه با آن دو اسید تشکیل می‌دهد. با اینکه درصد بسیار بالایی از پروتئین سلولی از آلانین تشکیل شده ولی بازدهٔ رشد پائینی نسبت به بقیه دارد که البته می‌تواند بدلیل کم بودن مقدار کربن آن باشد.گلیسین کمترین اثر را در رشد آن داشته است که البته پائینترین مقدار کربن را درمیان اسیدهای آمینه دارد. از آنجائیکه تعداد کربن در اسیدهای آمینه متفاوت است. سرعت ویژهٔ رشد بازای واحد کربن در هر اسید آمینه مشخص شده است در این تحقیق شدت ویژهٔ مول مصرفی سوبسترا در مورد همهٔ اسیدهای آمینه ثابت و ۱۰۰ میکرومول بر گرم جرم خشک سلول بر ساعت بوده که منجر به ورود تعداد کربن متفاوت در هر حالت شده است. ارزیابی انجام شده نشان می‌دهد که یک واحد کربن ترئونین بیشترین اثر را در رشد استرپتومایسس نسبت به بقیهٔ اسیدهای آمینه داشته است ولی در کل از لحاظ ایجاد رشد بیشتر رتبهٔ پنجم را در بین اسیدهای آمینه دارد . با نگاه به جدول (۱) متوجه می‌شویم که اسیدهای آمینهٔ مذکور تعداد کربن بیشتری دارند که در نتیجه در کل، رشد بیشتری را سبب می‌شوند. تریپتوفان با توجه به اینکه ۱۱ کربنه بوده است نسبت به تعداد کربن خود کمترین رشد را برای این گونه سبب شده است. همانطور که در بالا توضیح داده شده است بیشتر کربن تریپتوفان بصورت آنترالینات در سلول تجمع می‌یابد.



شکل (۱): نقشهٔ متابولیکی استرپتومایسس برای حداکثر رشد در حالتیکه تنها منبع کربنی و نیتروژن، تریپتوفان می‌باشد. (شدت ویژهٔ مصرف تریپتوفان $\mu mol(g\ DW\ h)^{-1}$ ۱۰۰ می‌باشد).

جدول (۱): نتایج حاصل از رشد استرپتومایسس با استفاده از یک اسید آمینه بعنوان تنها منبع کربن و نیتروژن.

اسید أمینه	سرعت رشد ویژه g (g DW h)$^{-1}$	تعداد کربن	سرعت رشد ویژه بازای واحد کربن g (g DW hC)$^{-1}$
لایزین	۰/۰۰۹۱۵۰۰	۶	۰/۰۰۱۵۲۵۰
تایروزین	۰/۰۰۸۱۱۸۴	۹	۰/۰۰۰۹۰۲۰
لوسین	۰/۰۰۸۱۱۸۴	۶	۰/۰۰۱۳۵۳۰
ایزولوسین	۰/۰۰۸۱۱۸۴	۶	۰/۰۰۱۳۵۳۰
والین	۰/۰۰۷۶۵۶۸	۵	۰/۰۰۱۳۵۱۳
گلوتامین	۰/۰۰۷۴۲۷۰	۵	۰/۰۰۱۴۸۶۰
گلوتامات	۰/۰۰۷۴۲۷۰	۵	۰/۰۰۱۴۸۶۰
پرولین	۰/۰۰۷۴۲۷۰	۶	۰/۰۰۱۲۳۸۳
ترئونین	۰/۰۰۷۳۸۴۶	۴	۰/۰۰۱۸۴۶۱
آرژینین	۰/۰۰۶۸۸۳۰	۶	۰/۰۰۱۱۴۷۱
تریپتوفان	۰/۰۰۶۲۲۲۵	۱۱	۰/۰۰۰۵۶۵۶
آلانین	۰/۰۰۵۱۵۴۱	۳	۰/۰۰۱۷۱۸۰
آسپارتات	۰/۰۰۴۳۸۸۰	۴	۰/۰۰۱۰۹۷۰
سرین	۰/۰۰۴۱۹۷۰	۳	۰/۰۰۱۳۹۹۰
آسپارژین	۰/۰۰۴۱۶۵۷	۴	۰/۰۰۱۰۴۱۴
گلیسین	۰/۰۰۱۶۷۷۸	۲	۰/۰۰۰۸۳۸۹

منابع و مراجع

1. Stephanopoulos G., Aristidou AA. and Nielsen J., Metabolic Engineering: Principles and Metodologies, Academic Press, SanDiego, London, 1998.
2. Bailey JE., Toward a science of metabolic engineering. Science, Vol. 252, (1668-1675), 1991
3. Nielsen J., Metabolic engineering: techniques for analysis of targets for genetic manipulations, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 58, (125-132), 1998.
4. Varma A. and Palsson BO., Metabolic capabilities of Esherichia coli:I. Synthesis of biosynthetic precursors and cofactors, J. Theor. Biol., Vol. 165, (477-502), 1993.
5. Varma A. and Palsson BO., Metabolic capabilities of Esherichia coli:II. Optimal growth patterns, J. Theor. Biol., Vol. 165, (477-502), 1993.
6. Saure U., Hatzimanikatis V., Bailey JE., Hochui M., Szyperski T. and Wuthrich K., Metabolic fluxes in riboflavin-producing Bacillus subtillis. Nature Biotechnology, Vol. 15, (448-452), 1997.
7. Calik P. and Ozdmar T., Mass balance-based model and metabolic pathway engineering analysis for serine alkanine protease synthesis by Bacillus licheniformis. Enzyme and Microbial Technology, Vol. 24, (621-635), 1999.
8. Calik P. Taka S., Calik G. and Ozdmar T., Serine alkanine protease overproduction capacity of Bacillus licheniformis, Enzyme and Microbial Technology, 2000.
9. Calik P. Tomlin G., Oliver S. and Ozdmar T., Overexpression of a serine alkanine protease gene in Bacillus licheniformis and its impact on the metabolic reacion network, Enzyme and Microbiology, Vol. 32, (706-720), 2003.
10. Naeimpoor F. Mavtvituna F., Metabolic flux in Streptomyces coelicolor under various nutrient limitation. Metabolic Engineering. Vol. 2, (1-9), 2000.
11. Daae E. and Ison A. P. Classification and Sensitivy Analysis of Proposed Primary Metabolic Reaction Network for Streptomyces Lividans, Metabolic Engineering. Vol. 1, (153-156), 1999.
12. Hodgson D. A., Primary Metabolism and its Control in Streptomyces: A Most Unusal Group of Bacteria, Advances in Microbial Physiology, Vol. 42, (47-238), 2000.
13. Savinell JM. and Palson BO. Network Analysis of Intermediary Metabolism Using Linear Optimization. I., Development of Matematical Formalism, Theor. Biol., Vol. 154, (421-454), 1992.
14. Bazaraa M. Javaris S. and Sherili H. D., Linear Programing and Network Flows, 2th Ed., John Wiley & Sons, Singapore, 1990.
15. Mandelstom J. McQuillen K. and Dawes, Biochemistry of Bacterial Growth, 3rd Ed., Blackwell Scientific Publication, 1982.
16. Stryer L., Biochemistry, W. H. Freeman and Company, 4th, New York, 1995.
17. Voet D. Voet J. G. and Prrat C. W., Fundamentas of Biochemistry, John Wiley & Sons, USA, 1998.
18. Zubay G., Biochemistry, 4th Ed., Macmillian, USA, 1998.
19. WWW. Genome.ad.jp/kegg.
20. Ingraham J.Maalo O. and Neidhardt F. C., Growht of The bacterial Cell, Sinauer Associates Inc., USA, 1983.
21. Rastian Z. Flux Analysis in Streptomyces. M.Sc. Thesis. IUST. Tehran. 2004.