زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 5، شماره 1، بهار و تابستان 1393

تولید زیستی مداوم تریپتوفان توسط سلول‌های تثبیت‌شده اشریشیا کلی با استفاده از ملاس چغندر قند

فروه السادات حسنی[1]، سیده زهرا موسوی نژاد[2*]، جمشید فولادی[3]

1- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه الزهرا، تهران
2- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه الزهرا، تهران
3- استادیار گروه بیوتکنولوژی ، دانشکده علوم، دانشگاه الزهرا، تهران

*** تهران، دانشگاه الزهرا، کد پستی 1993893973**
nejad@ibb.ut.ac.ir

چکیده- ملاس چغندرقند یک منبع کربن شناخته شده، ارزان و در دسترس برای رشد سلول‌های میکروبی است. قند موجود در ملاس به‌عنوان منبع کربن برای رشد میکروب‌ها مصرف می‌شود و ترکیبات غیرقندی آن به‌ویژه ترکیبات نیتروژن‌دار نقش تعیین‌کننده‌ای در بهبود رشد سویه‌های باکتریایی برعهده دارند. از سوی دیگر تثبیت سلول کامل، شامل استقرار سلول دست نخورده و محدود کردن فیزیکی آن در ناحیه ویژه‌ای از فضا با حفظ فعالیت کاتالیتیکی آن است که امکان استفاده مجدد از آن‌ها را فراهم می‌آورد. این روش انجام پیوسته و سریع فرایندهای زیستی را ممکن می‌سازد. همچنین بازده تولید و کیفیت محصول بهبود می‌یابد و بازیافت ساده‌تر آن امکان‌پذیر می‌شود. سلول‌های زنده تثبیت‌شده، به‌عنوان بیوکاتالیزورهای کنترل شده، قادر به انجام واکنش‌های آنزیمی تک مرحله‌ای و فرایندهای تخمیری پیوسته می‌باشند. در بررسی حاضر، سلول‌های اشریشیاکلی در هیدروژل آلژینات کلسیم تثبیت شدند و با استفاده از ملاس چغندر قند به‌عنوان منبع کربن، در واکنش تولید تریپتوفان با دخالت پیش‌سازهای سرین و ایندول مورد استفاده قرار گرفتند. مقایسه تریپتوفان تولیدی توسط کاتالیزور سلولی آزاد و تثبیت‌شده در ژل، بر افزایش 42/9% تولید این اسیدآمینه در بستر آلژینات کلسیم دلالت دارد. هم‌چنین این واکنش تولید در 9 سیکل متوالی پیگیری شد و نتایج نشان دادند سلول‌های *E.coli* تثبیت‌شده در آلژینات، در حضور ملاس چغندرقند قادر به تولید اسیدآمینه تریپتوفان در چندین سیکل سلولی هستند. استفاده از ملاس (محصول جانبی صنایع کشاورزی) برای رشد سلول‌های میکروبی و تولید اسیدآمینه تریپتوفان، سبب کاهش در هزینه تولید و تولید مقرون به‌صرفه تریپتوفان شده است.

کلید واژگان: ملاس چغندرقند، اشریشیاکلی، تثبیت سلول، تریپتوفان، آلژینات کلسیم.

1- مقدمه

تریپتوفان آمینواسید ضروری است که باید در رژیم غذایی انسان وجود داشته باشد. در بدن انسان این اسیدآمینه به‌عنوان واحد ساختمانی سنتز پروتئین عمل می‌کند، همین-

طور به‌عنوان پیش‌ساز بیوشیمیایی در تولید سروتونین، ملاتونین [1] و نیاسین [2] عمل می‌کند. بنابراین عدم دسترسی به تریپتوفان سبب افسردگی، پرخاشگری [3]، چاقی [4] و افزایش فشار خون می‌شود، همچنین این اسیدآمینه در درمان بی‌خوابی به‌کار برده می‌شود [5]. بنابراین اغلب به‌عنوان ماده اولیه در سنتز شیمیایی داروها مورد استفاده قرار می‌گیرد [6]. به‌دنبال افزایش جمعیت و با رشد بازار فروش برای این اسیدآمینه، روش‌های جدید در تولید کارا و مقرون به‌صرفه این ترکیب با ارزش به منظور برآوردن نیاز درحال رشد به آن اهمیت می‌یابد [7]. یکی از روش های مورد توجه، تولید زیستی این اسیدآمینه توسط باکتری‌های تثبیت شده در بسترهایی مانند پلیمر اسیدآلژینیک [8] است. در واقع فرایند تثبیت سلول کامل عبارتست از محدود کردن فیزیکی و یا استقرار سلول دست‌نخورده در ناحیه ویژه‌ای از فضا با حفظ فعالیت کاتالیتیکی مطلوب آن که امکان استفاده مجدد از این سلول‌ها را فراهم می‌آورد [9]. همچنین تسریع در فرایند زیستی از مزایای دیگر تثبیت سلول‌ها محسوب می‌شود. سلول‌های زنده تثبیت شده ساکن به‌عنوان بیوکاتالیزور کنترل‌شده، انجام واکنش‌های آنزیمی تک‌مرحله‌ای و فرایندهای تخمیری پیوسته را امکان‌پذیر می‌سازند [10]. یکی از مسائل مورد بررسی در استفاده صنعتی از این بیوکاتالیزورها، کاهش هزینه تولید از طریق استفاده از محصولات جانبی ارزان قیمت صنایع دیگر به‌عنوان منبع کربن باکتری های تثبیت شده است. ملاس چغندرقند مقادیری از دو ترکیب سرین و ایندول و یا پیش‌سازهایی از این دو ترکیب را دارد، زیرا بدون اضافه کردن این ترکیبات و تنها در حضور ملاس و سولفات آمونیوم تولید تریپتوفان دیده شد [11]. در بررسی حاضر امکان تولید اسیدآمینه تریپتوفان توسط سلول‌های سویه استاندارد اشریشیاکلی که درون شبکه آلژینات کلسیم تثبیت شده‌اند با استفاده از ملاس چغندرقند به‌عنوان منبع ارزان کربن و به‌عنوان منبعی از سرین و ایندول و مقادیر محدودی از کوفاکتور پیریدوکسال فسفات مطالعه شده است.

2- مواد و روش‌ها

2-1- میکروارگانیسم و محیط کشت

سلول *E.coli* (ATCC 11303) با توانایی فعالیت تولید تریپتوفان مورد استفاده قرار گرفت [12]. محیط‌کشت مورد استفاده برای رشد سلول‌های باکتریایی، محیط حداقل نمکی غنی‌شده با تریپتوفان (0/002g/l)، محتوی 2 g/l اسید سیتریک یک‌آبه، 0/2 g/l سولفات منیزیم هفت آبه، 13/09 g/l دی پتاسیم هیدروژن فسفات سه آبه، 3/5 g/l آمونیوم دی هیدروژن فسفات و 10g/l ملاس می‌باشد.

2-2- مواد و دستگاه‌ها

ملاس چغندر قند به‌عنوان محصول جانبی کارخانه قند ارومیه مورد استفاده قرار گرفت. ویژگی‌های این ترکیب در جدول 1 آورده شده‌است. مواد شیمیایی مختلف محصول شرکت Merck در این پژوهش استفاده شدند. دستگاه‌های مورد استفاده شامل فرمانتور مدل (Major Science) MS-F1 و سیستم کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای آنالیز تریپتوفان با استفاده از پمپ (MD-420) و آشکارگر اسپکتروفلوئوریمتر (SMF-25) و همچنین اسپکتروفتومتر مدل CECIL CE7250 بوده است.

جدول 1 آنالیز ملاس چغندر قند (a: درصد ماده خشک (w/w)، b: میزان قند (گرم بر 100 میلی‌لیتر ملاس) c: درصد خلوص [12])

$^{o}Bx(\%)^{a}$	77/3
$Pol(\%)^{b}$	46/2
$Q(\%)^{c}$	59/8
pH	6/4

2-3- تثبیت

سلول‌های *E.coli* رشد یافته در محیط حداقل (37°C و 180rpm)، در انتهای فاز رشد لگاریتمی در 12000rpm به‌مدت 30 دقیقه سانتریفیوژ شدند، بیوماس سلولی حاصل پس از سه مرحله شستشو با سرم فیزیولوژی استریل، با آلژینات سدیم استریل سوسپانسه شد. دانه‌های آلژینات کلسیم با چکاندن سوسپانسه حاصل، از طریق سرنگ، به درون محلول 0/2 مولار کلسیم کلراید در دمای 4°C تشکیل شدند.

2-4- واکنش تبدیل زیستی

واکنش تولید تریپتوفان در محیط تولید شامل پیش‌سازهای ایندول و سرین، به‌ترتیب به میزان 0/2% و 0/35%، کوفاکتور پیریدوکسال فسفات 0/005% و مقادیر 0/5% سولفات آمونیوم و 3/5% ملاس چغندر قند صورت گرفت. شروع این واکنش تبدیل زیستی با اضافه کردن بیوماس به‌صورت تثبیت شده (دانه‌های آلژینات کلسیم) به محیط تولید بوده است.

2-5- سنجش میزان تولید تریپتوفان

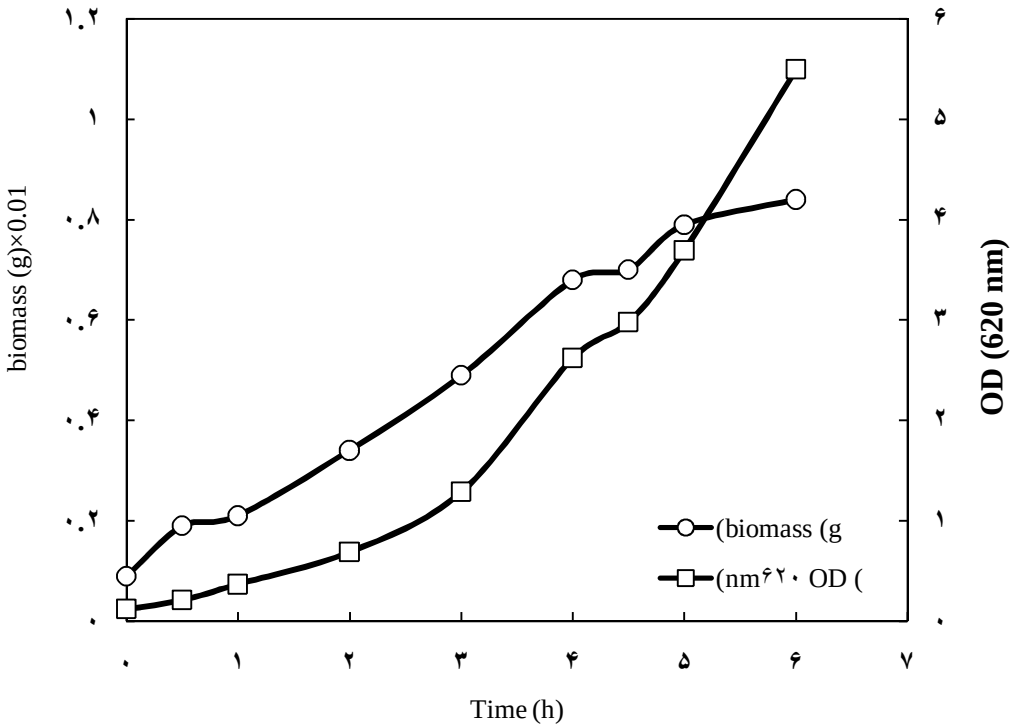
سنجش میزان تولید تریپتوفان با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) در دمای 32°C و با استفاده از ستون تجزیه‌ای ODS-2 S5(25×0.40cm, 5µ) صورت گرفت. 20µl از نمونه‌ها به ستون تزریق شد و تریپتوفان در طول موج‌های 280nm و 340nm به‌ترتیب برای جذب و نشر مورد شناسایی قرار گرفت. زمان بازداری (RT) مربوط به پیک اسیدآمینه تریپتوفان در دقیقه 4/333 بوده است. آماده‌سازی فاز متحرک با استفاده از استونیتریل و آب با نسبت حجمی (استونیتریل:آب (v/v) 25:75) محتوی 0/1% تری فلوئورواستیک اسید صورت گرفت و سرعت جریان فاز متحرک 1 ml/min بوده است [11].

3- یافته‌ها

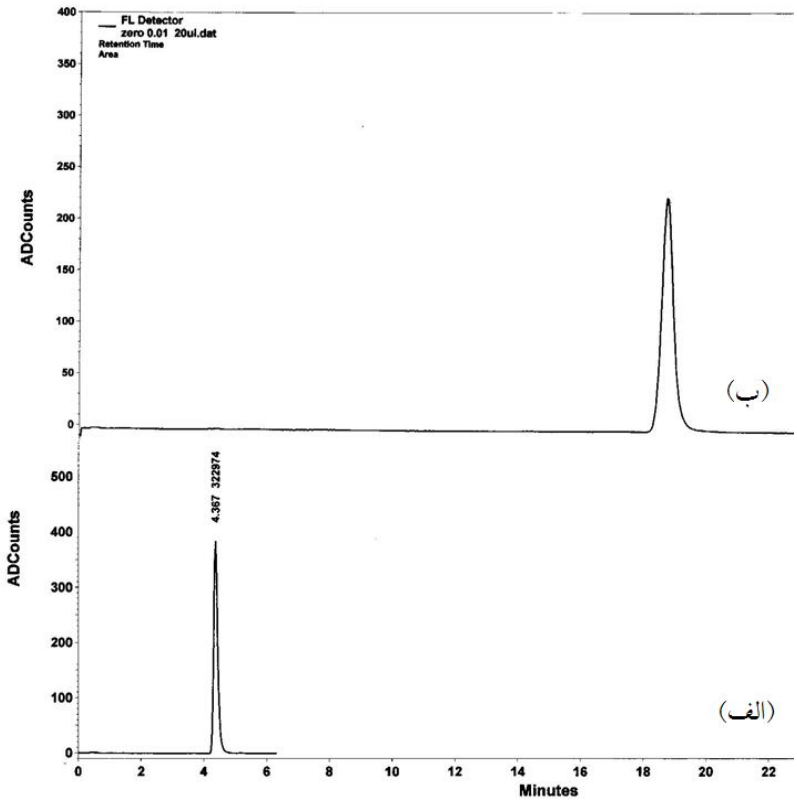
در این بررسی از ملاس کارخانه قند ارومیه به‌عنوان منبع کربن برای رشد سوش *E.coli* استفاده شد. نتایج آنالیزهای بررسی رشد باکتری در محیط حداقل بر اساس اندازه‌گیری جذب نوری در 620 نانومتر و وزن خشک برحسب گرم انجام گرفت و نتایج نشان دادند که پس از شش ساعت کشت در انکوباتور در دمای 37°C و شدت چرخش 250rpm سلول‌ها در مرحله لگاریتمی رشد قرار دارند که نشان‌دهنده متابولیسم فعال باکتری‌ها و شرایط مناسب برای تثبیت است (شکل 1). باکتری های حاصل جمع‌آوری و به روش ذکر شده به صورت دانه‌های آلژینات کلسیم تثبیت شدند. پیش از کشت باکتری تثبیت شده در محیط تولید حاوی ملاس چغندرقند، برای اطمینان از عدم وجود تریپتوفان در ملاس چغندر قند، محتویات ملاس چغندر قند به وسیله HPLC آزمایش و طیف حاصل با طیف مربوط به تریپتوفان خالص مقایسه شد (شکل 2). زمان خروج تریپتوفان از ستون در دقیقه 4/33 است که در طیف ملاس چغندر قند دیده نمی‌شود.

سپس دانه‌های آلژینات کلسیم حاوی باکتری‌های تثبیت شده و سلول‌های آزاد با حضور پیش‌سازها در واکنش تولید تریپتوفان به‌کار برده شدند. پس از 6 ساعت واکنش، سوپرناتانت دو محیط با استفاده از HPLC مورد ارزیابی قرار گرفت و تولید تریپتوفان اثبات شد (شکل 3). هم‌چنین میزان تولید تریپتوفان در محیط دارای سلول‌های تثبیت شده نسبت به سلول‌های آزاد 70 درصد افزایش نشان می‌دهد (شکل 4).

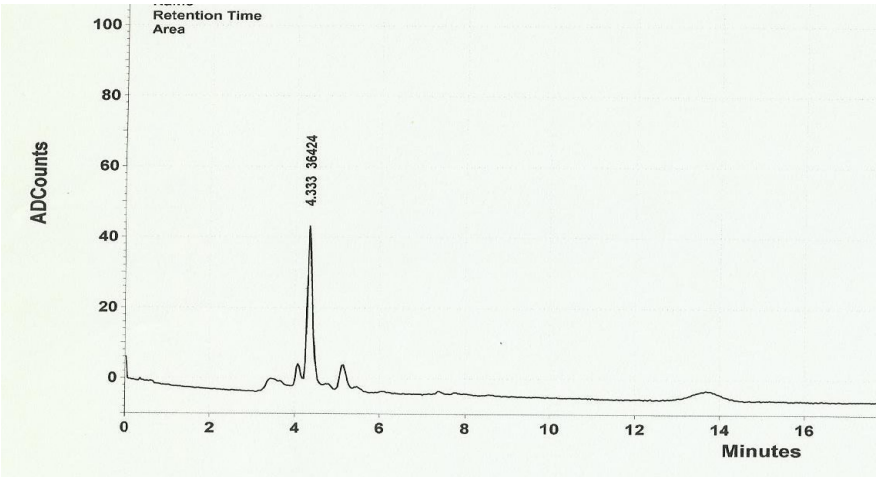
برای ارزیابی توانایی بقای توده سلولی تثبیت شده و استفاده مجدد از آن‌ها در دورهای بعدی واکنش تولید، دانه‌هایی که در یک دوره واکنش تولید (شش ساعت) شرکت داشتند از محیط واکنش خارج شده و پس از سه مرحله شستشو با آب دوبار تقطیر به محیط واکنش دوم تلقیح شدند.



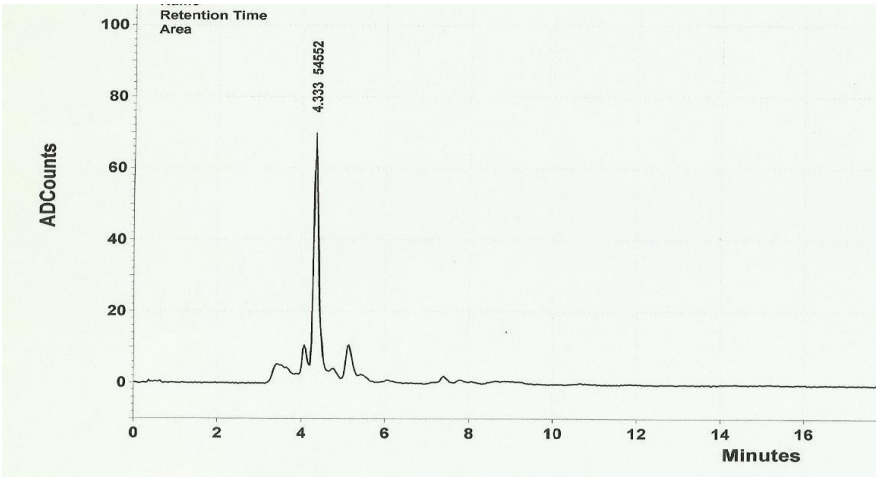
شکل 1 منحنی رشد در فرمانتور (اعداد مربوط به وزن خشک بیوماس با ضریب 0/01 آورده‌شده‌اند). pH=7 و 250 rpm و 37 °C.



شکل 2 تصویرآنالیز HPLC: الف- استاندارد تریپتوفان، ب- نمونه ملاس چغندرقند

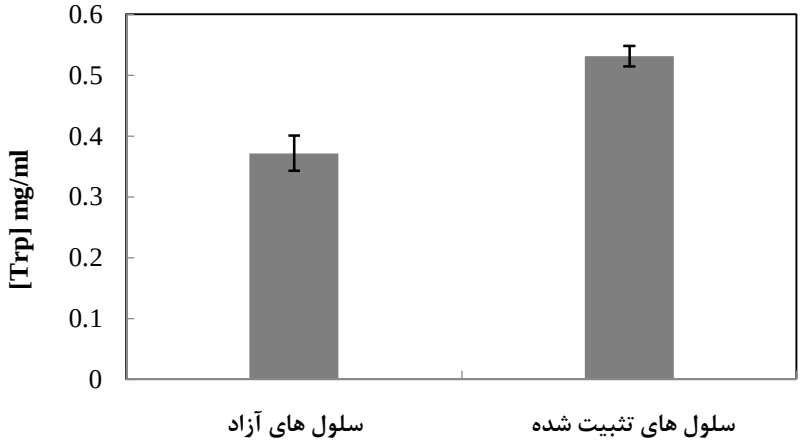


(الف)



(ب)

شکل 3 آنالیز HPLC از سوپرناتانت محیط تولید به وسیله الف- سلول‌های آزاد و ب- تثبیت‌شده پس از 6 ساعت واکنش pH=7 و 250 rpm و 37 °C.

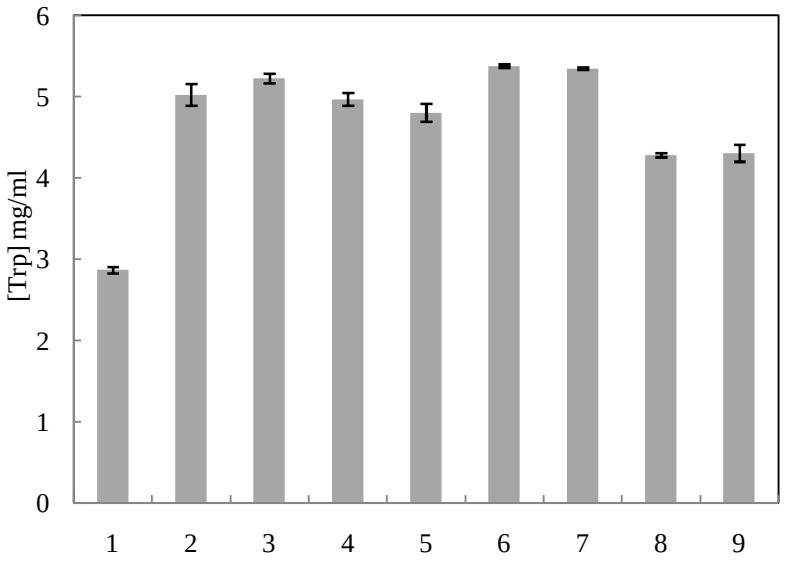


شکل 4 مقایسه تریپتوفان تولیدی توسط سلول‌های آزاد و تثبیت‌شده

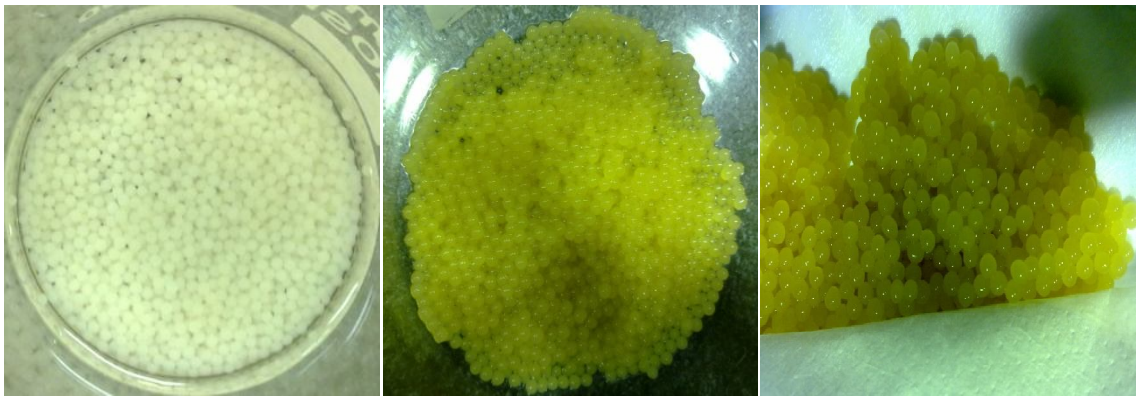
این عمل تا 9 دور واکنش تکرار شد و میزان تولید در هر مرحله با HPLC بررسی شد. مساحت زیر پیک‌های مربوط به تریپتوفان به عنوان مقدار تولید تعریف و مقادیر آنها در دورهای متوالی تولید ثبت شد (شکل 5). ذکر این نکته لازم است که رنگ دانه‌های آلژینات در دور دوم تولید تغییر می‌کند (شکل 6). علاوه بر این، ویژگی های فیزیکی دانه‌ها هم دچار تغییر شدند، به‌طوری‌که حجم آنها بیشتر و سختی آنها کمتر شد.

4- بحث و نتیجه‌گیری

همان‌طور که پیشتر اشاره شد، هدف از این تحقیق، کاهش هزینه تولید اسیدآمینه تریپتوفان وکاهش آلودگی محیطی ایجاد شده از طریق مصرف یک محصول جانبی صنعتی (ملاس چغندر قند) برای تولید یک محصول دارویی و مکمل غذایی (تریپتوفان) است. ملاس چغندرقند دارای 80 درصد مواد خشک است که 50 درصد از این مقدار را مواد قندی تشکیل می‌دهند و باقی‌مانده شامل املاح و مواد آلی نیتروژن‌دار است.



شکل 5 میزان تولید در سیکل‌های متوالی واکنش تولید اسیدآمینه تریپتوفان. اعداد درج شده بر روی محور Xها نشان‌دهنده دوره‌های متوالی از واکنش‌های تولید هستند. pH=7 و 250 rpm و 37 °C.



(الف) (ب) (ج)

شکل 6 دانه‌های آلژینات کلسیم. الف- بلافاصله پس از تشکیل شدن، ب- پس از شرکت در یک دور واکنش تولید، ج- پس از 2 دور واکن

کاربردهای مرسوم ملاس در خوراک دام، طعم دهنده در صنایع نان و شیرینی‌پزی، صنایع تخمیری ازجمله تولید میکروبی اسیدهای آمینه‌ای مانند گلوتامیک اسید و لیزین است [13]. ترکیبات غیرقندی ملاس به‌ویژه ترکیبات نیتروژن‌دار آن نقش تعیین‌کننده‌ای در بهبود رشد سویه‌های باکتریایی برعهده دارند. قند موجود در ملاس چغندر قند نیز به‌عنوان منبع کربن برای رشد میکروب‌ها مصرف می‌شود [14]. به‌علاوه یکی از مزایای ملاس، در دسترس بودن و قیمت پایین آن می‌باشد.

گزارش شده است که استفاده از محیط رشد حاوی مقادیر کم تریپتوفان، سبب افزایش بیان اپرون بیوسنتزی trp و تولید مقادیر افزایش یافته‌ای از این آمینواسید توسط *E.coli* می‌شود [15]. همچنین استفاده از سلول‌هایی که در مرحله لگاریتمی رشد بوده‌اند، موجب اطمینان از تولید بهینه متابولیت‌هایی مانند اسیدآمینه تریپتوفان می‌باشد [16]. به‌این ترتیب، محیط حداقل که در این تحقیق به‌عنوان محیط تولید مورد استفاده قرار گرفت و مرحله لگاریتمی رشد (شکل 1) باکتری را در بهترین شرایط تولید قرار می‌دهد.فرایند تثبیت سلول یکی از تکنیک‌های معمول برای افزایش در غلظت و حاصلخیزی کلی در محیط تخمیر بوده و سبب حفاظت فیزیکی سلول‌ها در برابر ترکیبات مختلفی در محیط تولید می‌شود. ملاس استفاده شده در این بررسی محتوی ترکیبات گوناگونی می‌باشد که اثرات کاهشی در بازده تولید اسیدآمینه تریپتوفان در محیط تولید اعمال می‌کنند [17]. همچنین از آنجا که استفاده از ایندول به‌عنوان پیش‌ساز در فرایند تولید تریپتوفان سبب کاهش در بیان آنزیم‌های دخیل در این مسیر تولید می‌گردد، از سلول‌های به‌دام افتاده در پوشش پلی‌ساکاریدی آلژینات استفاده شده تا با ایجاد محیط‌های کوچک در پیرامون این سلول‌ها و نیز با ایجاد شیب‌های غلظتی از این ترکیبات مهارکننده و بازدارنده در اطراف سلول‌ها، افزایش در بیان و تولید آنزیم‌ها به‌دست آید [18].

ازسوی دیگر، حفاظت سلول‌های میکروبی قابل زیست و کارا برای مدت طولانی، یکی از مزایای عمده استفاده از سلول‌های تثبیت شده به‌شمار می‌رود [19]. سلول‌های آزاد، معمولاً پس از طی یک مرحله واکنش تولید، قدرت زیست و بیوکاتالیزوری خود را ازدست می‌دهند. در مقابل، سلول‌های میکروبی زنده و تثبیت شده در پلیمر آلژینات کلسیم، می‌توانند در واکنش‌های متوالی به عنوان بیوکاتالیزور سلولی شرکت کرده و سبب افزایش قابل‌توجهی در راندمان تولید این اسیدآمینه با ارزش شوند [20]. افزایش 42/9 درصدی تولید تریپتوفان در تحقیق حاضر (شکل 4) نیز مؤید همین واقعیت است. همچنین در این بررسی، واکنش تولید در محیط حاوی ملاس چغندر قند تا 9 چرخه پیگیری و مشاهده شد که سلول‌ها قدرت بیوکاتالیزوری خود را به خوبی حفظ نموده‌اند (شکل 5). از چرخه دوم به بعد استحکام ساختاری دانه‌ها به تدریج کاهش یافته و حجم آنها افزایش پیدا کرد (شکل6). می‌توان افزایش معنی‌دار تریپتوفان آزاد شده در محیط واکنش را پس از روز اول (شکل 5)، به افزایش نفوذپذیری دانه‌ها در اثر افزایش حجم آنها، در نتیجه نفوذ آسانتر مواد لازم و پیش‌سازها به درون دانه‌ها و همچنین آزاد شدن آسان تر تریپتوفان محبوس شده از درون دانه‌ها نسبت داد. نتایج بررسی انجام‌شده توسط دلمان و همکاران در 1997 توسط سلول‌های *E.coli* تغییر یافته ژنتیک [20] تثبیت شده در آلژینات کلسیم بر حفظ 80% از ظرفیت تولید تریپتوفان در بیش از 13 دور واکنش تولید دلالت دارد. همچنین در بررسی دیگر که توسط بنگ و همکاران در 1983 انجام گرفت ، سلول-های تثبیت شده *E.coli* در بیدهای پلی اکریل آمید، 56% از عملکرد تریپتوفان سینتازی را در مقایسه با سلول‌های آزاد دارا بودند و بعد از 30 دور واکنش تولید 76-79% توانایی تولید را داشتند [21].

به‌این‌ترتیب بررسی حاضر نشان می‌دهد که ملاس چغندرقند به‌عنوان یک منبع ارزان و در دسترس کربن برای دوره‌های متوالی تولید زیستی تریپتوفان توسط باکتری تثبیت شده اشریشیاکلی قابل استفاده است. نتایج این مطالعات ازطریق آزمایش‌های تکمیلی با هدف بهبود تولید تریپتوفان در شرایط بهینه تولید، تکمیل و به مرحله کاربرد نزدیکتر می‌شود.

5- منابع

[1] Fernstrom, J. D. (1983). Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain. *Physiol. Rev.*63 (2), 484-546.

[2] Robinson, O. J., Sahakian, B. J., (2009). Acute tryptophan depletion evokes negative mood in healthy females who have previously experienced concurrent negative mood and tryptophan depletion. *Psychopharmacology (Berl).*;205 (2) :227-35.

[3] Wilcock, G. F., Stevens, J., Perkins, A. (1987). Trazodone/ Tryptophan for aggressive behaviour. *Lancet.* 329, 929-930.

[4] Hrboticky, N.,Leiter, L. A., Anderson,G. H. (1985). Effects of L-tryptophan on short term food intake in lean men. *Nutrition Res.* 5(6), 595-607.

[5] Riemann, D., Feige, B., Hornyak, M., Koch, S., Hohagen, F., Voderholzer, U. (2002). The tryptophan depletion test: impact on sleep in primary insomnia - a pilot study. *Psychiatry Res.* ;109(2):129-35..

[6] Alteria, K. D. (1996). Determination of drug-related impurities by capillary electrophoresis. *JChromatoger A.* 735, 43-56.

[7] Ikeda, M. (2002). Amino acid production processes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*. 79, 1-35.

[8] Hirst, E. L., Rees, D. A. (1965). The structure of alginic acid. Part V. Isolation and unambiguous characterization of some hydrolysis products of the methylated polysaccharide. *J. Chem. Soc*.1182-1187.

[9] Karel, S. F.,Libicki, S. B., Robertson, C. R. (1985). *Chem Eng Sci.* 40, 1321- 1354.

[10] Tanaka, A., Nakajima, H. (1990). Application of immobilized growing cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol*.42, 97-131

[11] DehghanShasaltaneh, M.,Fooladi, J.,Moosavi-Nejad, S.Z. (2010). L-tryptophan production by *Escherichia coli* in the presence of Iranian cane molasses.*J. Paramed. Sci*.1,19-25.

[12] Delgado-Andrade, C., Rufians-Henares, J. A., Jimenes-Preze, S., Morales, F. J. (2006). Tryptophan determination in milk- based ingredients and dried sport supplements by liquid chromatography with fluorescence. *Food chem*. 5,580- 585.

[13] Olbrich, H. (1963). The Molasses, Fermentation Technologist, Institutfür Zuckerindustrie, Berlin, Germany.

[14] Curtin L.V. (1983). Molasses-General considerations. Molasses in Animal Nutrition, National Feed Ingredients Association, West Des Moines, Iowa

[15] Yanofsky, Ch., Virginia, H., Paul, G. (1991). Physiological studies of tryptophan transport and tryptophanase operon induction in *Escherecia Coli*. *Am.Soc. Microb.* 6009-6017.

[16] Demain, A.L. (2000). Small bugs, big business: The economic power of the microbe. *Biotechnol. Adv.* 18,499–514.

[17] Langrene, S., Sicsic, S. and Le Goffic, F. (1984). Entrapment of L-tryptophan producing*Escberichia coil* indifferent matrices: activity of immobilized cells. *Enzyme Microb. Technol*., 6, 81-84

[18] Wang, H., Seki, M,. Furusaki, S. (1995). Matematical model for analysis of mass transfer for immobilized cells in lactic acid fermentation. *Biotechnol. Prog* 11, 558-564

[19] Kostav, G., Angelov, M., Mihailov, I., Poncelet, D. (2010). mechanical properties of Ca- alginate beads for ethanol fermentation with immobilized yeast. *Revue de genie industriel*, 5, 23-35

[20] Dallmann, K., Orosz, L. BélaSzajáni. (1997). Prolonged production of tryptophan using immobilized bacteria. *Biotechnology letters.* 19, 123-125

[21] Bang, W., Behrendt, U., Lang, S., Wagner, F. (1983). Continuous Production of L-Tryptophan from Indole and L-Serine by Immobilized *Escherichia Coli* Cells. *Biotechnology and Bioengineering.* 25, 1013-1025