



آنالیز ساختاری آنزیم آسپاراتات کیناز در کورینه باکتریوم به منظور پیشنهاد بهترین ساختار آنزیم جهت افزایش تولید صنعتی اسید آمینه لیزین

مرتضی هاشمی عطار¹، محمدرضا نصیری^{2*}، علی جوادمنش³ و بهار نیری فسائی⁴

تاریخ دریافت: 1397/12/26

تاریخ پذیرش: 1398/03/21

چکیده

آنزیم آسپاراتات کیناز یکی از آنزیم‌های کلیدی و حساس در متابولیسم تولید لیزین در طیف وسیعی از جانوران بخصوص گونه‌های مختلف میکروارگانیسم کورینه باکتریوم می‌باشد. هدف از این تحقیق بررسی بیوانفورماتیکی آنزیم آسپاراتات کیناز در گونه‌های مختلف کورینه باکتریوم توسط پایگاه‌های معتبر می‌باشد تا بهترین ساختار بیوانفورماتیکی آنزیم آسپاراتات کیناز به منظور استفاده برای تولید لیزین در مقیاس صنعتی پیشنهاد شود. ویژگی‌های تکاملی، فیزیولوژیکی و فیزیوشیمیایی آنزیم آسپاراتات کیناز در 33 گونه مختلف کورینه باکتریوم توسط پایگاه‌ها و نرم افزارهای ProtScale، MEGA 6.6 و ProtParam مورد بررسی قرار گرفت. سپس ساختار سه بعدی پروتئین‌های مذکور به روش هومولوژی و با استفاده از سرور Swiss-Model مدل سازی شد و ارزیابی کیفیت مدل‌های بدست آمده پس از بهینه سازی انرژی با استفاده از ابزار Rampage صورت گرفت. نتایج تجزیه و تحلیل درخت تکاملی نشان دادند که زمان اشتقاق پروتئین آسپاراتات کیناز در 33 گونه کورینه باکتریوم مورد مطالعه، بسیار بهم نزدیک می‌باشد. نتایج بررسی پایگاه‌های ProtScale و ProtParam نشان داد که آنزیم آسپاراتات کیناز در گونه کورینه باکتریوم گلوتامیکوم با شماره دستیابی CA000530.1 و SJM57548.1 دارای بهترین خواص فیزیوشیمیایی و بیشترین پایداری می‌باشند. سپس با بررسی‌های بیشتر توسط سرور Swiss-Model و ابزار Rampage مشخص شد که دو پروتئین CA000530.1 و SJM57548.1 دارای بهترین ساختار سه بعدی می‌باشند. از نتایج آنالیز *in silico* به دست آمده می‌توان چنین استنباط نمود که احتمالاً آنزیم آسپاراتات کیناز با شماره‌های دستیابی بالا دارای بهترین خواص فیزیوشیمیایی، بیشترین پایداری و همچنین بهترین ساختار سه بعدی نسبت به دیگر پروتئین‌های مورد بررسی در این مطالعه بود. این یافته‌ها می‌تواند برای بهترین نوع آنزیم آسپاراتات کیناز به منظور تولید نو ترکیب در شرایط آزمایشگاهی مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: آسپاراتات کیناز، بیوانفورماتیک، کورینه باکتریوم، لیزین

مقدمه

افزودن منابع حیوانی و یا مکمل اسید آمینه لیزین انجام شود (6). یکی از منابع غنی از این اسید آمینه‌های ضروری میکروارگانیسم کورینه باکتریوم گلوتامیکوم است که به‌طور گسترده‌ای برای تولید اسیدهای آمینه مثل آل گلوتامات و آل لیزین به کار برده می‌شود (15). این باکتری گرم مثبت، غیر اسپورزا، میله‌ای شکل با انتهای متورم شده و هوازی است (6). مقدار لیزین قابل تولید در انواع وحشی (طبیعی) کورینه باکتریوم گلوتامیکوم بسیار کم است و نمی‌توان با کشت و تکثیر آن‌ها اسید آمینه مورد نیاز بازار را در مقیاس صنعتی و مقرون به صرفه تولید کرد (6). بنابراین تحقیقات زیادی برای اصلاح کردن ژنتیکی این میکروارگانیسم انجام شده است که در راستای بدست آوردن سویه‌های جدید با توان تولید بالای آل لیزین می‌باشد (15).

دستیابی به تکنولوژی‌های جدید همچون ابزارهای بیوانفورماتیک

لیزین یکی از اسیدهای آمینه ضروری می‌باشد که توسط انسان و دیگر پستانداران ساخته نمی‌شود و باید از طریق رژیم غذایی تامین شود (17). از آن جایی که غلات و سبزیجات موجود در رژیم غذایی لیزین کمی دارند، بنابراین برای افزایش ارزش مواد غذایی و غذای حیواناتی که از منابع گیاهی تغذیه می‌کنند، بایستی غنی سازی با

1- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

2- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

3- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

4- دانشیار گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

* - ایمیل نویسنده مسئول: (Email: nassiry@um.ac.ir)

DOI:10.22067/ijasr.v11i4.79758

بررسی فواصل و شباهت های ژنتیکی: به منظور بررسی تکاملی پروتئین آسپاراتات کیناز در 33 گونه کورینه باکتریوم، درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbor Joining (14) و با استفاده از نرم افزار مگا 6 (MEGA 6) ساخته شد و بررسی بوت استرپ با 1000 تکرار به منظور به دست آمدن حدود اطمینان برای شاخه ها نیز انجام گردید (4). روابط فیلوژنتیکی در شکل شماره 1 آورده شده است و همچنین بررسی های هم‌ردیف‌سازی چندگانه و بررسی شباهت های ژنتیکی با توجه به توالی‌های پروتئینی 33 گونه مورد بررسی توسط نرم افزار (CLC Sequence Viewer 8.0) در شکل شماره دو مورد بررسی قرار گرفت.

پیش بینی خواص فیزیکی و شیمیایی: جهت پیش بینی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی پروتئین آسپاراتات کیناز شامل وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک نظری (theoretical isoelectric point)، شاخص ناپایداری (Guruprasad et al 1990)، شاخص آلفاتیکی (7) و گراویتهی پروتئین از سرور Protscal به آدرس (<http://web.expasy.org/protscal>) و سرور ProtParam به آدرس (<http://web.expasy.org/protparam>) استفاده شد (5). با توجه به این که آنزیم‌های آسپاراتات کیناز در گونه کورینه باکتریوم گلوتامیکوم با شماره دستیابی CAO00530.1 و SJM57548.1 دارای بالاترین شاخص آلفاتیکی و همچنین کمترین شاخص ناپایداری بودند، لذا برای آنالیزهای بعدی انتخاب شدند.

پیش بینی ساختار دوم: برای پیش‌بینی ساختار دوم دو پروتئین انتخاب شده از سرور Pspred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) استفاده شد (7). برای این منظور توالی های پروتئینی آسپاراتات کیناز در گونه کورینه باکتریوم گلوتامیکوم با شماره های دستیابی CAO00530.1 و SJM57548.1 به سرور Pspred وارد شد و ساختار دوم آن‌ها ترسیم شد (شکل های 3 و 4).

مدل سازی و پیش بینی ساختار سه بعدی پروتئین: ساختار سه بعدی آنزیم آسپاراتات کیناز توسط سرور Swiss model به آدرس (<https://swissmodel.expasy.org/>) مدل سازی شد (4). سپس کیفیت دو مدل پیش‌بینی شده توسط سرور Rampage به آدرس

(http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampa_ge2.php) مورد ارزیابی قرار گرفت (5) که ساختار سه بعدی پروتئین‌ها در تصویر شماره پنج نشان داده شده است. در مرحله بعد نمودار رامانچاندران به منظور به تصویر کشیدن زوایای پیوندی از نظر سطح انرژی و پایداری جهت محاسبه کانفورمرهای پایدار پروتئین ترسیم گردید (8).

زمینه پیشرفت سریع مطالعات را فراهم نموده است، این ابزارها جهت حل مسائل پیچیده و نتیجه گیری منطقی مورد استفاده قرار میگیرند. امروزه ابزارهای بیوانفورماتیکی متعددی به صورت دسترسی آزاد و آنلاین توسط پایگاه داده ها و نرم افزارهای تحت وب در اختیار محققان قرار گرفته است که با استفاده از این ابزارها میتوان در کمترین زمان و هزینه بر اساس نوع هدف پیشرو به نتایج معتبر دست یافت با توجه به انجام هزینه های بالای آزمایشگاهی، استفاده از روشهای بیوانفورماتیک در بدست آوردن نتیجه نهایی حائز اهمیت خواهد بود (19).

آنزیم آسپاراتات کیناز (EC 2.7.2.4) با فسفریلاسیون آمینواسید آسپاراتات اولین مرحله در بیوسنتز آمینو اسیدهای خانواده آسپاراتات را که شامل لیزین، تره نونین، ایزولوسین، و متیونین می باشد را انجام می دهد (12). آمینواسید لیزین یکی از اولین محصولات های آنزیم آسپاراتات کیناز می باشد که با افزایش بیان آن از طریق مکانیسم فیدبک منفی سبب کاهش فعالیت آنزیم آسپاراتات کیناز (EC 2.7.2.4) می شود (12) رستگاری و همکاران در سال 2013 طی تحقیقی در مورد یکی از ژنهای موثر در چرخه اصلی بیوسنتز لیزین اعلام نمودند که افزایش بیان ژن lysc که کد کننده آنزیم آسپاراتات کیناز در کورینه باکتریوم گلوتامیکوم افزایش 2 برابری تولید ال لیزین می گردد (13). پلاچیز و همکاران در سال 2003 در مطالعه ای که بر روی آنزیم موثر در تولید لیزین داشتند، مشخص گردید که بیان بالای آسپاراتات کیناز که آنزیم اصلی و موثر در چرخه اصلی تولید لیزین در کورینه باکتریوم گلوتامیکوم می باشند، باعث افزایش 250 درصدی تولید لیزین گردید (10). بکرو همکاران در سال 2005 طی تحقیقی اعلام نمودند با استفاده از کورینه باکتریوم گلوتامیکوم جهش یافته (lysc^{T311}) در ژن lysc که کد کننده آنزیم آسپاراتات کیناز می باشد، استفاده از دو پروموتور جدا گانه جهت تولید آنزیم فروکتوز 1 و 6 فسفات با نام های P_{EFTU} fbp و P_{sod} fbp به ترتیب باعث افزایش فعالیت آنزیمی 150 و 75 درصدی و همچنین افزایش 40 درصدی تولید ال لیزین گردیده است (1).

هدف از این تحقیق بررسی بیوانفورماتیکی ساختار آنزیم آسپاراتات کیناز در 33 گونه مختلف کورینه باکتریوم می باشد تا بهترین ساختار بیوانفورماتیکی آنزیم آسپاراتات کیناز به منظور استفاده از آن برای تولید لیزین در مقیاس صنعتی معرفی و پیشنهاد شود.

مواد و روش‌ها

بدست آوردن توالی های پروتئینی: توالی آمینواسیدی آنزیم آسپاراتات کیناز از 33 گونه کورینه باکتریوم از پایگاه NCBI به آدرس (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) دانلود شده و به فرمت FASTA ذخیره گردید (جدول 1).

جدول 1 - نام علمی و شماره دستیابی 33 گونه کورینه باکتریوم در پایگاه داده NCBI

Table 1- Scientific name and accession number of 33 species of *Corynebacterium* from the NCBI database

نام علمی Scientific name	شماره دستیابی Accession number
[<i>Corynebacterium Simulans</i>]	AM091582.1
[<i>Corynebacterium diphtheriae</i>]	CAE48781.1
[<i>Corynebacterium pelargi</i>]	QAU53330.1
[<i>Corynebacterium geronticis</i>]	AZA12319.1
[<i>Corynebacterium maeruchotii</i>]	SPW24280.1
[<i>Corynebacterium provencense</i>]	AWT25259.1
(<i>Corynebacterium</i> sp. KPL1996)	ERS43361.1
[<i>Corynebacterium</i> sp. KPL2004]	ERS76247.1
[<i>Corynebacterium</i> sp. KPL1859]	ERS78921.1
[<i>Corynebacterium ulcerans</i> NCTC 12077]	ESU59341.1
[<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> 090104]	ERJ43463.1
[<i>Corynebacterium marinum</i> DSM 44953]	AJK67843.1
<i>Corynebacterium</i> sp. KPL1998]	ERS74544.1
[<i>Corynebacterium lactis</i> RW2-5]	ALA66521.1
[<i>Corynebacterium deserti</i> GIMN1.010]	ALC04747.1
[<i>Corynebacterium efficiens</i> YS-314]	BAC17030.1
[<i>Corynebacterium glutamicum</i>]	BAV22049.1
[<i>Corynebacterium glutamicum</i>]	CAO00530.1
[<i>Corynebacterium flavescens</i>]	AAA23293.1
[<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 258]	AFK15829.2
[<i>Corynebacterium argentoratense</i> DSM 44202]	AGU14304.1
[<i>Corynebacterium oculi</i>]	KQB84521.1
[<i>Corynebacterium</i> sp. KPL1989]	ERS73502.1
[<i>Corynebacterium</i> sp. KPL1814]	ERS63333.1
[<i>Corynebacterium</i> sp. KPL1818]	ERS61024.1
[<i>Corynebacterium</i> sp. KPL1824]	ERS55010.1
[<i>Corynebacterium</i> sp. KPL1855]	ERS51758.1
[<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032]	CAF18822.1
[<i>Corynebacterium glutamicum</i>]	SJM57548.1
[<i>Corynebacterium</i> sp.jB4]	SLM93573.1
[<i>Corynebacterium glaucum</i>]	AQQ14140.1
[<i>Corynebacterium jeikeium</i>]	SCX24992.1
[<i>Corynebacterium striatum</i>]	CQD06071.1

نتایج و بحث

بررسی فواصل و شباهت های ژنتیکی

به منظور بررسی رابطه فیلوژنتیکی و تکاملی پروتئین آسپاراتات کیناز در کورینه باکتریوم های مورد مطالعه، نمودار درختی با استفاده از 33 توالی هم ردیف شده آمینواسیدهای مربوط به آن ها توسط نرم افزار MEGA 6 رسم گردید (شکل 1).

نتایج این آزمون و جدول درصد تشابه ژنتیکی (شکل 2) خصوصاً در مورد سه گونه انتخاب شده CAO00530.1 و SJM57548.1 و CAF18822.1 که مناسب ترین خواص فیزیکی شیمیایی را در بین 33 گونه انتخاب شده دارند، نشان داد که زمان اشتقاق پروتئین آسپاراتات کیناز در 33 گونه کورینه باکتریوم مورد مطالعه، بسیار بهم نزدیک می باشد.

نتیجه بررسی مقایسه روند تکاملی پروتئین آسپاراتات کیناز در

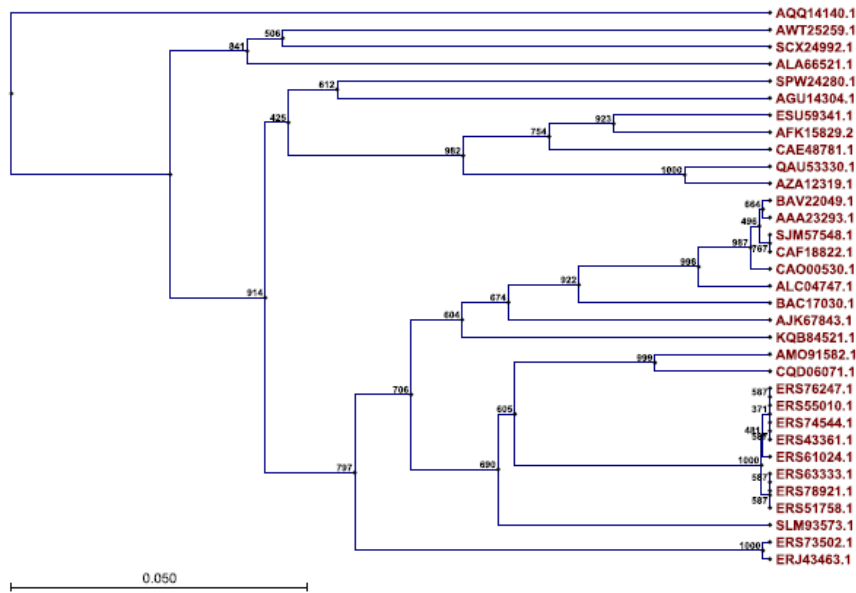
درخت فیلوژنی و جدول درصد تشابهها به این معنی است که بررسی تفاوت تک نوکلئوتیدها در خصوصیات فیزیکی شیمیایی پروتئین ها در گونه هایی که توالی تکاملی شبیه و نزدیک به هم دارند برای بدست آوردن بهترین ساختار پروتئینی حائز اهمیت خواهد بود.

بررسی بیوانفورماتیکی خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیکی شیمیایی آنزیم آسپاراتات کیناز در 33 گونه مختلف، به دست آمده با استفاده از برنامه ProtParam نشان داد که وزن مولکولی محاسبه شده بین 44/56 تا 45/62 کیلو دالتون متغیر هست.

از عواملی که بر روی ثابت انحلال پروتئین ها نقش دارد pH می باشد، حلالیت در pH ایزو الکتریک کمترین است چون بار خالص صفر است، با تغییر pH قابلیت انحلال آنها سریعاً افزایش می یابد چون از نقطه ایزوالکتریک دور می شوند. نقطه ایزو الکتریک pH ای است که در آن یک آمینو اسید و یا پروتئین بار خود را از دست می دهد لذا در میدان الکتریکی با جریان مستقیم قادر به حرکت

از کروماتوگرافی تبادل یونی و الکتروفورز ایزو الکتريک فوکوسینگ بسیار مفید باشد (3).

نمی‌باشد بررسی نقطه ایزو الکتريک یک پروتئين ميتواند برای انتخاب و بهينه‌سازی روش‌های مورد استفاده برای خالص سازی پروتئين اعم



شکل 1- درخت فیلوژنتیکی پروتئين آسپارتات کيناز در 33 گونه کورينه باکتریوم مورد مطالعه.
Figure 1- Phylogenetic tree for Aspartat kinases protein in 33 Corynebacterium species

بسیار بالای این سه گونه کورينه باکتریوم می‌باشد. در واقع طی بررسی صورت گرفته از مطالعات گذشته (3 و 7) نشان می‌دهد که بررسی شاخص الیفاتیک و شاخص ناپایداری ضمن موثر بودن اینکه هریک از شاخص‌ها در بین گونه‌های مورد مقایسه به ترتیب در بالاترین و پائین‌ترین مقدار مورد نظر باشند مناسب تر است و به تنهایی دارای اهمیت می‌باشند ولی بررسی اختلاف بین شاخص ناپایداری و شاخص الیفاتیک (Difference=AI - II) در این خصوص نیز حائز اهمیت می‌باشد که هرچه بیشتر باشد پروتئين پایدارتر خواهد بود.

در این تحقیق اختلاف بین شاخص ناپایداری و شاخص الیفاتیک CAO00530.1 برای سه آنزیم (Difference=AI - II) SJM57548.1 و CAF18822.1 به ترتیب 73/19، 73/37 و 72/61 می‌باشد (جدول 2) که نسبت به سایر گونه‌های مورد بررسی در این تحقیق بالاتر می‌باشند.

با توجه به گزارش کریش ندو و همکاران (2017) در بررسی شاخص‌های مورد مطالعه برای پایداری پروتئين گونه کورينه باکتریوم گلوتامیکوم، با نتایج بدست آمده در این تحقیق همخوانی دارد (11).

نقطه ایزوالکتريک پیش بینی شده برای پروتئين‌های مختلف آسپارتات کيناز بین 4/08 تا 5/11 می‌باشد. شاخص بعدی مورد ارزیابی شاخص الیفاتیک بود (Aliphatic Index-AI) این شاخص در واقع عبارتست از حجم نسبی پروتئين که با زنجیره‌های اسیدآمینه‌ای الیفاتیک اشغال شده اند (آلانین، ایزولوسین، لوسین و وال...ین) که به عنوان یک عامل مهم به منظور برآورد مقاومت پروتئين‌ها در برابر حرارت می‌باشد (7). این شاخص پیش‌بینی شده برای پروتئين‌های مختلف مورد بررسی آسپارتات کيناز بین 89/11 تا 99/35 می‌باشد. طبق این شاخص، پروتئين آسپارتات کيناز با مشخصات CAO00530.1 دارای بالاترین شاخص الیفاتیک و مقاومت در برابر حرارت می‌باشد. CAF18822.1 مربوط به باکتری کورينه باکتریوم گلوتامیکوم می‌باشد (جدول 2).

شاخص بعدی مورد بررسی شاخص ناپایداری می‌باشد که هر چقدر کمتر از 40 باشد به معنای پایدار بودن پروتئين هست (3 و 7). این شاخص با استفاده از سرور ProtParam محاسبه شده و برای گونه‌های مورد بررسی در محدوده 25/34 تا 37/22 می‌باشد که با توجه به این که محدوده مشخص شده کمتر از 40 می‌باشد، آنزیم مذکور پایدار می‌باشد (7). آنزیم‌های CAF18822.1 و CAO00530.1 و SJM57548.1 شاخص ناپایداری آن‌ها به ترتیب 25/95 و 25/98 و 26/38 می‌باشد که نشان دهنده پایداری

ANA0203.1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33			
BAN22058.1	2	98.76																																		
CAP1822.1	3	91.52	93.76																																	
SLM7548.1	4	91.52	93.76	99.52																																
CAO0030.1	5	91.52	93.76	99.52	99.52																															
ALC0472.1	6	93.46	97.62	97.86	97.86	93.46																														
BAC17000.1	7	93.46	93.69	93.63	93.63	93.46	94.16																													
ALK07263.1	8	91.45	91.69	91.92	91.45	91.69	90.89	91.45																												
SLM8373.1	9	90.50	90.74	90.74	90.74	90.50	90.74	90.50	90.50																											
KOB4521.1	10	90.74	90.97	90.74	90.74	90.50	90.74	90.97	90.97	90.50																										
ERS4236.1	11	88.60	88.84	88.60	88.60	88.36	88.31	87.38	89.79	91.45	88.36																									
ERS7821.1	12	88.36	88.60	88.36	88.36	88.12	88.07	87.15	89.25	91.69	88.12	93.76																								
ERS7544.1	13	88.60	88.84	88.60	88.60	88.36	88.31	87.38	89.79	91.45	88.36	100.00	93.76	100.00																						
ERS8070.1	14	88.60	88.84	88.60	88.60	88.36	88.31	87.38	89.79	91.45	88.36	100.00	93.76	100.00	100.00																					
ERS8333.1	15	88.36	88.60	88.36	88.36	88.12	88.07	87.15	89.25	91.69	88.12	93.76	100.00	93.76	100.00	100.00																				
ERS7878.1	16	88.36	88.60	88.36	88.36	88.12	88.07	87.15	89.25	91.69	88.12	93.76	100.00	93.76	100.00	100.00																				
ERS7627.1	17	88.60	88.84	88.60	88.60	88.36	88.31	87.38	89.79	91.45	88.36	100.00	93.76	100.00	93.76	93.76																				
ERS01024.1	18	88.84	89.07	88.84	88.84	88.60	88.55	87.62	90.02	91.45	88.60	93.76	93.76	93.76	93.76	93.76																				
COO0071.1	19	89.31	89.55	89.31	89.31	88.84	89.79	87.85	88.84	91.21	88.84	92.64	92.64	92.64	92.64	92.64																				
AN01503.1	20	87.65	87.89	87.65	87.65	87.17	88.12	85.98	87.41	89.07	85.98	90.97	91.21	90.97	90.97	90.97																				
ERU4083.1	21	86.22	86.46	86.46	86.46	85.99	86.46	85.28	86.84	87.41	85.04	88.12	88.12	88.12	88.12	88.12																				
ERS7502.1	22	86.22	86.46	86.46	86.46	85.99	86.22	85.28	85.70	87.41	85.27	87.89	87.89	87.89	87.89	87.89																				
AKP1502.1	23	84.83	85.07	84.83	84.83	84.60	85.31	83.45	84.60	85.28	84.12	83.18	82.94	83.18	82.94	82.94																				
ESU8934.1	24	84.85	85.09	84.85	84.85	84.62	85.31	84.62	85.28	83.68	82.75	82.52	82.75	82.52	82.52	82.75																				
CAE4878.1	25	87.44	87.68	87.44	87.44	87.20	87.20	85.31	84.62	85.31	84.62	85.31	84.62	85.31	84.62	85.31																				
AZA12319.1	26	86.70	86.94	86.94	86.94	86.70	87.41	85.28	87.41	84.32	86.46	84.32	84.09	84.32	84.09	84.32																				
OUA1330.1	27	86.52	86.76	86.76	86.76	86.52	87.23	85.98	87.47	83.92	86.29	83.92	83.69	83.92	83.69	83.92																				
AGU4324.1	28	85.78	86.02	85.78	85.78	85.55	86.26	84.62	86.02	84.12	85.31	86.49	86.49	86.49	86.49	86.49																				
SPWA200.1	29	84.00	84.23	84.00	84.00	83.76	84.83	84.85	85.07	83.41	84.83	84.12	83.89	84.12	83.89	83.89																				
ALAB821.1	30	82.86	82.90	82.90	82.90	82.90	82.90	82.91	81.95	82.96	82.99	81.95	82.19	82.19	81.95	82.19																				
SCH8092.1	31	82.86	82.90	82.90	82.90	82.86	81.95	82.91	81.95	82.96	82.99	81.95	82.19	82.19	81.95	82.19																				
AMT2595.1	32	82.78	83.02	82.78	82.78	82.31	83.02	82.31	83.02	82.31	83.02	82.31	82.31	82.31	82.31	82.31																				
AOO14160.1	33	78.30	78.54	78.30	78.30	78.07	78.54	77.99	77.99	78.30	78.54	78.30	78.30	78.30	78.30	78.30																				

Figure 2- The genetic similarity (below the diagonal) and differences (above the diagonal) percentages in 33 studied Corynebacterium species

شکل ۲ - درصدهای تشابه (پایین قطر) و تفاوت ژنتیکی (بالای قطر) در ۳۳ گونه کورینه باکتریوم مورد بررسی

- 1- PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
- 2- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(*-Corresponding Author Email: nassiryf@um.ac.ir)

DOI:10.22067/ijast.v1i14.79758

جدول 2- تعیین خصوصیات فیزیکیوشیمیایی آسپاراتات کینازهای مختلف توسط سرورهای ProtScale و ProtParam

Table 2- Determination of physicochemical properties of Aspartate kinase proteins by ProtScale and ProtParam servers

گرای GRAVY	اختلاف شاخص های ناپایداری و آلیفاتیک Difference of aliphatic index and instability index	شاخص آلیفاتیک Aliphatic index	شاخص ناپایداری Instability index	pH ایزوالکتریک Isoelectric point	وزن مولکولی Molecular weight	شماره دستیابی Accession number
0.018	71.28	96.62	25.34	4.96	44.76	AM091582.1
0.010	63.29	97.31	34.02	4.99	44.73	CAE48781.1
0.009	66.05	97.30	31.25	4.91	44.90	QAU53330.1
0.015	64.97	98.24	33.27	4.81	44.77	AZA12319.1
0.025	69.76	97.5	27.74	5.11	44.65	SPW24280.1
0.012	70.83	97.28	26.45	5.07	45.12	AWT25259.1
0.011	67.78	94.51	26.73	4.91	44.69	ERS43361.1
-0.074	67.66	94.51	26.85	4.91	44.56	ERS76247.1
-0.094	61.56	94.53	32.97	4.94	44.69	ERS78921.1
-0.000	65.97	96.64	30.67	5.02	45.52	ESU59341.1
0.008	59.77	96.81	37.04	4.99	44.69	ERJ43463.1
0.013	68.72	97.10	28.38	4.97	45.48	AJK67843.1
0.049	67.78	94.51	26.73	4.91	44.69	ERS74544.1
-0.013	62.89	95.86	32.97	4.95	44.96	ALA66521.1
0.007	68.04	98.71	30.67	4.88	44.65	ALC04747.1
-0.003	56.6	93.64	37.04	4.97	45.62	BAC17030.1
-0.074	70.56	98.94	28.38	4.92	44.73	BAV22049.1
-0.094	73.37	99.35	25.98	4.92	45.12	CAO00530.1
-0.000	66.17	99.14	32.97	4.89	44.79	AAA23293.1
0.008	67.72	97.76	30.04	5.09	45.04	AFK15829.2
0.013	62.26	89.11	26.85	4.99	44.85	AGU14304.1
-0.054	63.65	96.62	32.97	5.04	44.73	KQB84521.1
-0.013	71.1	97.05	25.95	4.99	44.67	ERS73502.1
-0.094	65.15	94.51	29.36	4.91	44.69	ERS63333.1
-0.000	65.46	94.51	29.05	4.91	44.70	ERS61024.1
0.008	57.29	94.51	37.22	4.08	44.69	ERS55010.1
0.013	61.6	94.57	32.97	4.94	44.69	ERS51758.1
-0.054	73.19	99.14	25.95	4.92	44.75	CAF18822.1
0.008	72.61	98.99	26.38	4.92	44.75	SJM57548.1
0.019	68.37	95.91	27.54	4.97	44.80	SLM93573.1
0.020	68.44	94.58	26.14	4.72	44.56	AQQ14140.1
0.040	68.61	94.98	26.37	5.00	45.15	SCX24992.1
0.022	70.67	96.81	26.14	4.98	44.69	CQD06071.1

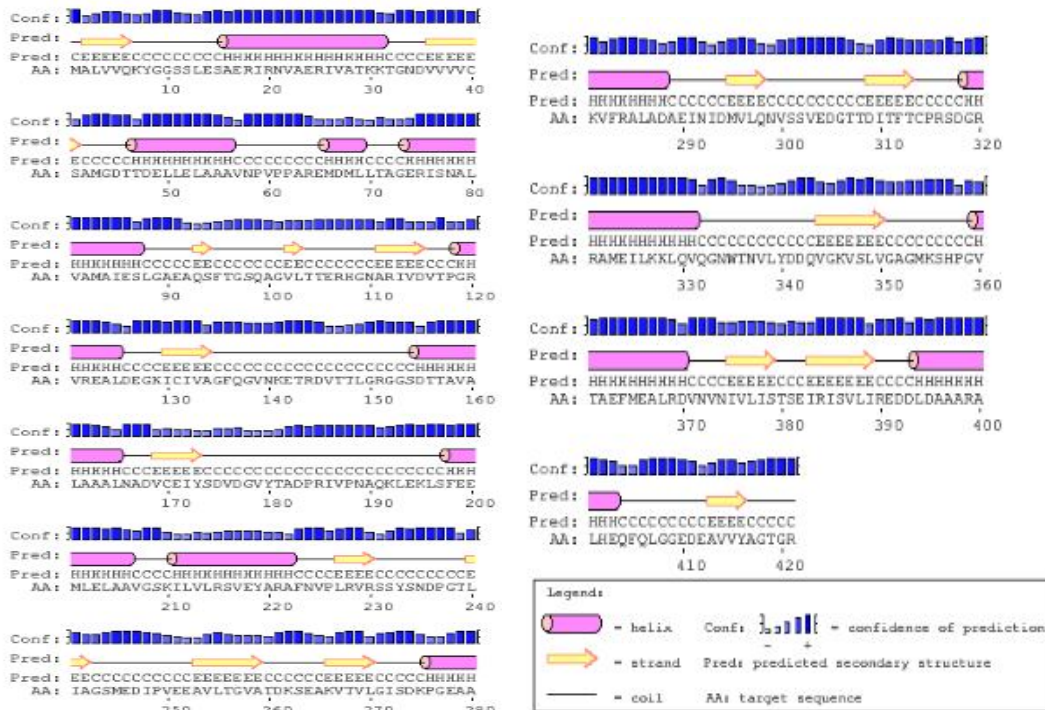
باکتریوم گلوتامیکوم با شماره‌های دستیابی 1 CAO00530 و SJM57548.1 به سرور psipred وارد شد و ساختار دوم آن‌ها ترسیم شد (شکل های 3 و 4).

نتایج نشان داد که آنزیم آسپاراتات کیناز در گونه کورینه باکتریوم گلوتامیکوم با شماره دسترسی 1 CAO00530 دارای 12 مارپیچ آلفا، 17 صفحه بتا و 30 عدد کوئل می باشد. همچنین آنزیم آسپاراتات کیناز در گونه کورینه باکتریوم با شماره دسترسی SJM57548.1 نیز دارای 12 مارپیچ آلفا، 17 صفحه بتا و 30 عدد کوئل می باشد که ساختار سه بعدی آنزیم آسپاراتات کیناز برای دو پروتئین مذکور در کورینه باکتریوم گلوتامیکوم توسط سرور Swiss model (<https://swissmodel.expasy.org>) مدل سازی و نشان داده شده است (شکل 5).

در تحقیقی کاربردی توسط بکر و همکاران (2005) جهت تولید صنعتی ال - لیزین استفاده از آنزیم آسپاراتات کیناز کورینه باکتریوم گلوتامیکوم CAF18822.1 جهت جهش نقطه‌ای به جهت دارا بودن پارامترهای مناسب نسبت به سایر گونه‌ها انتخاب که باعث افزایش 80 درصدی در تولید اسید آمینه ال - لیزین گردید (1).

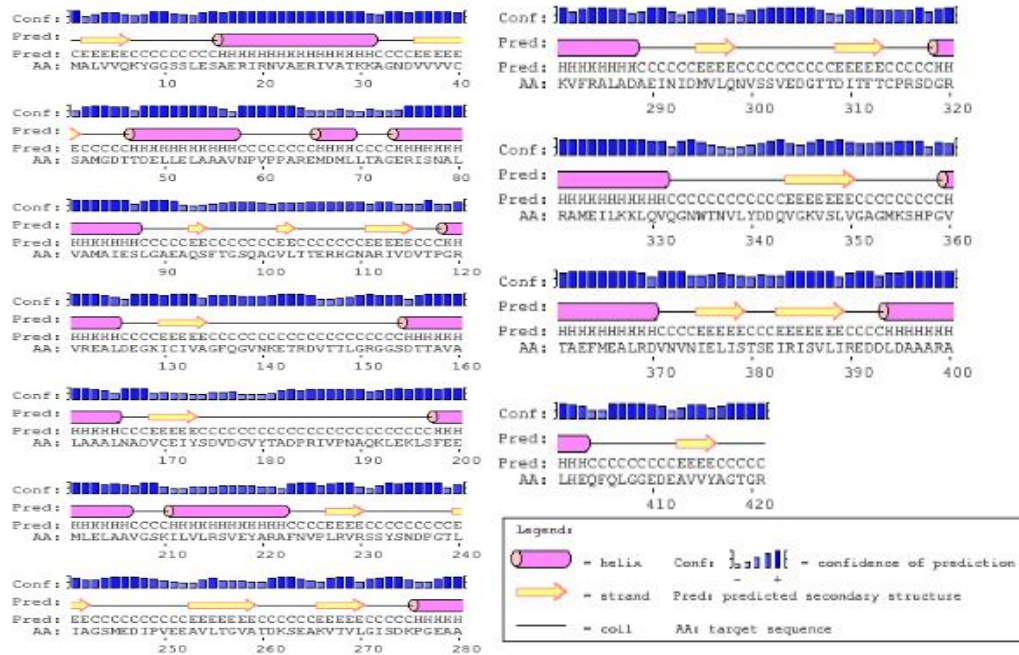
با توجه به این که آنزیم های آسپاراتات کیناز در گونه کورینه باکتریوم گلوتامیکوم با شماره دستیابی 1 CAO00530 و SJM57548.1 در NCBI دارای مناسب ترین پارامتر های مورد نظر در بین 33 گونه مورد بررسی بودند، لذا برای آنالیزهای بعدی انتخاب شدند.

برای پیش بینی ساختار دوم دو پروتئین انتخاب شده از سرور psipred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) استفاده شد (2). برای این منظور توالی های پروتئینی آسپاراتات کیناز در گونه کورینه



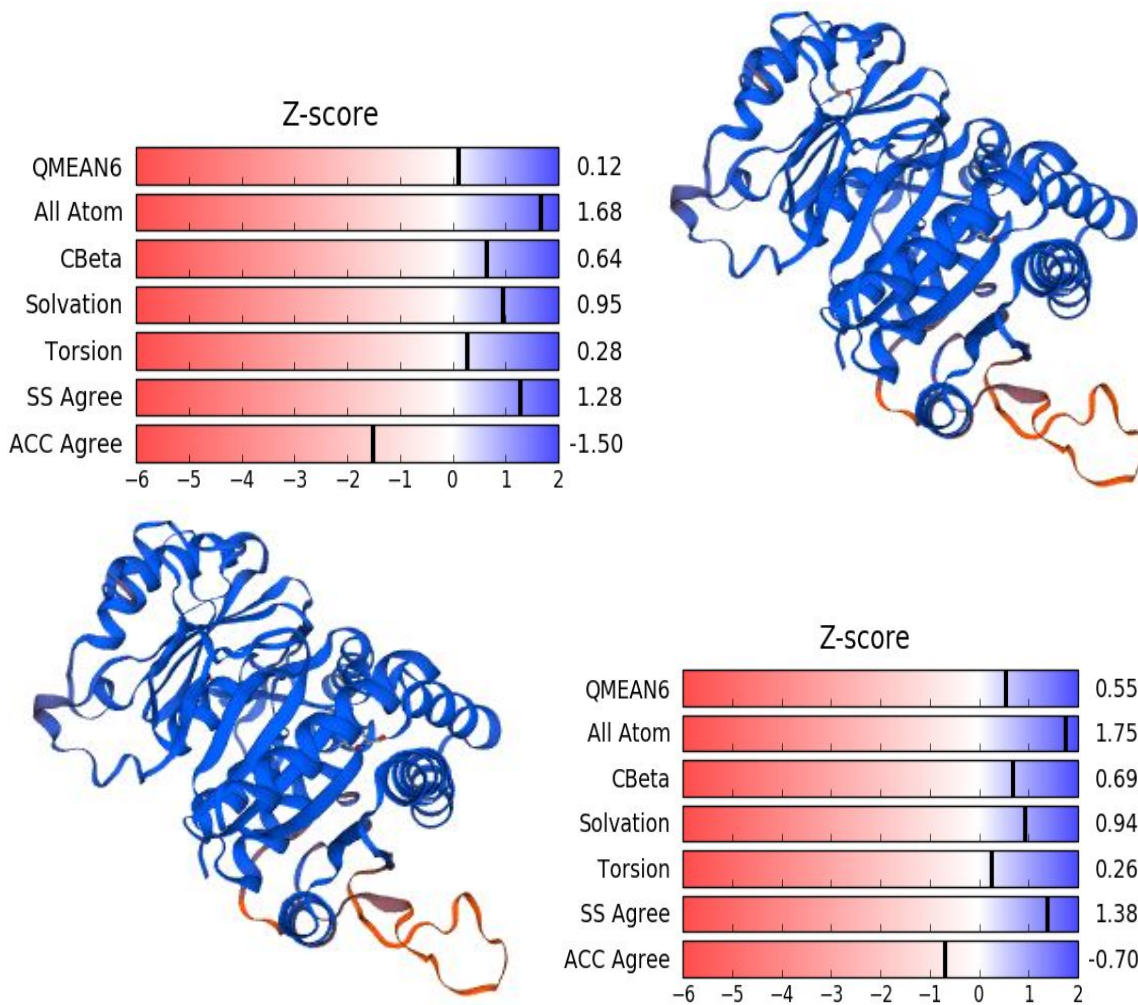
شکل 3- ساختار دوم پیش‌بینی شده برای آنزیم آسپارات کیناز توسط سرور psipred با شماره دستیابی CAO0530.1.

Figure 3 - Prediction of the second structure for the aspartate kinase enzyme by the psipred server (Accession number: CAO0530.1).



شکل 4- ساختار دوم پیش‌بینی شده برای آنزیم آسپارات کیناز توسط سرور psipred با شماره دستیابی SJM57548.1.

Figure 4 - Prediction of the second structure for the aspartate kinase enzyme by the psipred server (Accession number: SJM57548.1).



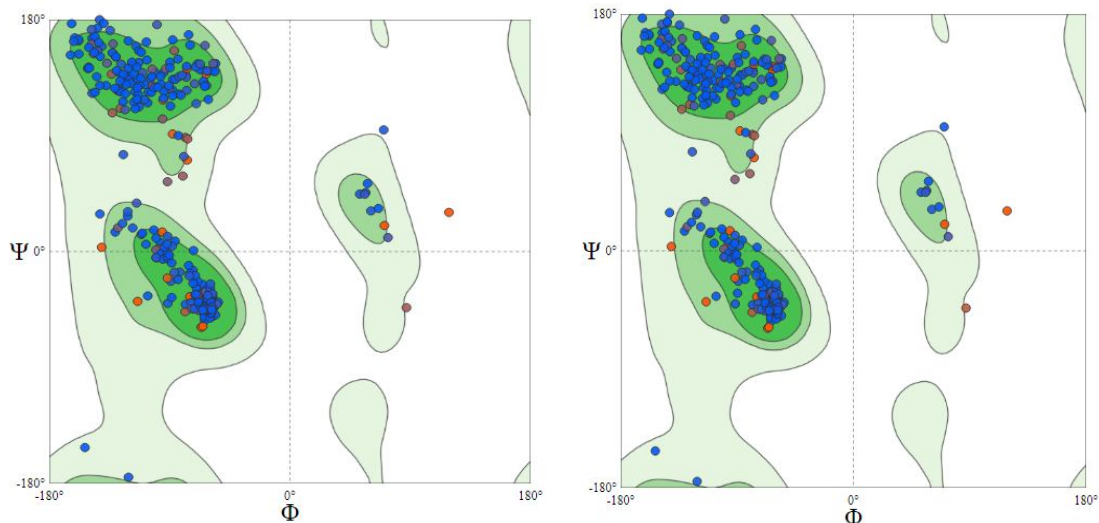
شکل 5- ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده برای آنزیم اسپاراتات کیناز در دو گونه کورینه باکتریوم گلوتامیکوم توسط سرور سوئیس مدل. شماره دستیابی CAO00530.1 (شکل بالا) و شماره دستیابی SJM57548.1 (شکل پایین)

Figure 5 - The predicted three-dimensional structure for the aspartate kinase enzyme in *corynebacterium glutamicum* by the Swiss model access (bottom) access number SJM57548.1 number CAO00530.1 (top) and

اسیدها در ناحیه مطلوب، 1/2 درصد در ناحیه مجاز و 0/7 درصد آمینواسیدها در ناحیه غیر مجاز قرار گرفته‌اند و همچنین برای گونه کورینه باکتریوم گلوتامیکوم به شماره دستیابی SJM57548.1 نیز 98 درصد آمینواسیدها در ناحیه مطلوب، 1/2 درصد در ناحیه مجاز و 0/7 درصد آمینواسیدها در ناحیه غیرمجاز قرار گرفته‌اند. با توجه به نتایج مذکور، هر دو مدل شبیه سازی شده کیفیت بسیار مناسبی دارند (شکل 5). که با نتایج یوشیدا و تومیتا (2010) در آنالیز بهترین ساختار کریستالی آنزیم اسپاراتات کیناز در کورینه باکتریوم گلوتامیکوم مطابقت دارد (18).

سپس کیفیت دو مدل پیش بینی شده توسط سرور Rampage (http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampa_ge2.php) مورد ارزیابی قرار گرفت (9) و نمودار رامچاندرا مربوطه به منظور به تصویر کشیدن زوایای پیوندی از نظر سطح انرژی و پایداری در جهت محاسبه کانفورم‌های پایدار پروتئین ترسیم شد نمودار رامچاندرا با محاسبه درصد آمینواسیدهای قرار گرفته در نواحی مطلوب، مجاز و غیرمجاز، کیفیت مدل پیش‌بینی شده را تعیین می‌کند (8) (شکل 6).

داده های بدست آمده از این نمودار توسط سرور rampage نشان می‌دهد که برای آنزیم اسپاراتات کیناز در دو گونه کورینه باکتریوم گلوتامیکوم به شماره دستیابی CAO00530.1، 98 درصد آمینو



شکل 6- نمودار رامانچاندان برای مدل شبیه سازی شده سه بعدی آسپارات کیناز توسط سرور Swiss model (11) به شماره دستیابی CAO00530.1 (شکل راست) و به شماره دستیابی SJM57548.1 (شکل چپ). سبز تیره نواحی مطلوب، سبز روشن نواحی مجاز و سفید نواحی غیرمجاز.

Figure 6- The Ramachandran diagram for the simulated model of aspartate kinase by the Swiss model server. access number CAO00530.1 (right) and access number SJM57548.1 (left). Darker green represents favored, lighter green represent allowed and white color represent disallowed region.

ویژگی های فیزیکوشیمیایی، بیشترین پایداری و همچنین بهترین ساختار سه بعدی به منظور کلونینگ و تولید لیزین در مقیاس صنعتی را دارند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و با شماره گرنت 3/37050 انجام شد.

نتیجه گیری کلی

با توجه به اهمیت تولید لیزین در کشور و نیاز به انتخاب سویه مناسب کورینه باکتریوم، جهت انجام مهندسی ژنتیک و تولید صنعتی استفاده از ابزارهای بیو انفورماتیک جهت پیش بینی مناسب حائز اهمیت می باشد، از نتایج آنالیز *in silico* به دست آمده می توان چنین استنباط نمود که در مقایسه آنزیم آسپارات کیناز در 33 گونه متفاوت کورینه باکتریوم، وجود گونه های کورینه باکتریوم گلوتامیکوم با شماره دستیابی CAO00530.1 و SJM57548.1 دارای بهترین

منابع

- 1-Becker, J., C. Klopprogge, O. Zelder, E. Heinzle, and C Wittmann. 2005. Amplified Expression of Fructose 1,6-Bisphosphatase in *Corynebacterium glutamicum* Increases In Vivo Flux through the Pentose Phosphate Pathway and Lysine Production on Different Carbon Sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12): 8587-8596.
- 2-Chou P. Y., and G. D. Fasman. 1974. Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheet, and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry*, 13: 211-222.
- 3-Fallahzadeh Mamaghani V. 2016. Characterization of Conserved Hypothetical Proteins from Proteome of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, with Ethylene Induction Activity on *Arabidopsis thaliana*. *Genetic Engineering and Biosafety*, 5(1): 31-39.
- 4-Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- 5-Gasteiger, E., C. Hoogland, A.Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel, and A. Bairoch. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, pp. 571-607.
- 6-Hermann, T. 2003. Industrial production of amino acids by *Coryneform* bacteria. *Journal of Biotechnology*, 104: 155-172.
- 7-Ikai A. 1980. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *Journal of Biochemistry*, 88: 1895-1898.
- 8-Kent, J. T., Mardia, K. V., and C. C. Taylor. 2010. Matching Unlabelled Configurations and Protein Bioinformatics.

- Research Report STAT10-01, University of Leeds, Leeds, UK.
- 9-Lovell S. C., I. W. Davis, W. B. Arendall, P. I. W. de Bakker, J. M. Word, M. G. Prisant, J. S. Richardson and D. C. Richardson. 2002. Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins*, 50: 437-450.
- 10-Plachys, J., and S. Ulbert. 1985. Preparation of lysine by mutants of *Corynebacterium*. *Kvasny Prumysl*, 31: 159-160.
- 11-Pramanik, K., P. Rajbhar. 2017. Functional and Phylogenetic Analyses of *Corynebacterium* Aspartokinase: An Enzyme of Aspartate Family of Amino Acids. Microbiology Laboratory, Department of Botany, The University of Burdwan Burdwan, PIN-713104, West Bengal, India.
- 12-Rafalski J. A., and S. C. Falco. 2004. Structure of the yeast HOM3 gene which encodes aspartokinase. *Journal of Biological Chemistry*, 263(5):2146-2151.
- 13-Rastegari H., M. Chiani, A. Akbarzadeh, S. Cheraghi, Z. Saffari, M. R. Mehrabi. 2013. Improvement in the Production of L-Lysine by Over expression of Aspartokinase (ASK) in *C. glutamicum* ATCC21799. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12 (1): 51-56.
- 14-Saitou N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- 15-Seibold, G., M. Auchter, S. Berens, J. Kalinowski, B. J. Eikmanns. 2006. Utilization of soluble starch by a recombinant *Corynebacterium glutamicum* strain: Growth and lysine production. *Journal of Biotechnology*, 124(2): 381-391.
- 16-Tamura K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- 17-Tryfona, T., and M. T. Bustard. 2005. Fermentative production of lysine by *Corynebacterium glutamicum*: transmembrane transport and metabolic flux analysis. *Process Biochemistry*, 40(2): 499-508.
- 18-Yoshida, A., and T. Tomita. 2010. Mechanism of Concerted Inhibition of 2-type Hetero-oligomeric Aspartate Kinase from *Corynebacterium glutamicum*. The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan.
- 19-Zhu, Z. Y., and T. L. Blundell. 1996. The use of amino acid patterns of classified helices and strands in secondary structure prediction. *Journal of Molecular Biology*, 260: 261-276.

Structural analysis of aspartate kinase enzyme in *Corynebacterium* species to find the best enzyme structure for high industrial production of lysine amino acid

M. Hashemi Attar¹, M. Nassiri^{2*}, A. Javadmanesh³ and B. Nayeri fasaee⁴

Received: 17-03-2019

Accepted: 11-06-2019

Introduction Lysine is one of the essential amino acids not synthesized biologically in the human body and mammals so should be supplied through diets. Among the industrially important amino acids, L-lysine is in 1st position, which is used in pharmaceuticals, animals, human feeds and precursors for the production of peptides or agrochemicals. As L-lysine has large applications, the demand for it is increasing constantly year by year. To minimize the gap between increasing demand and production of L-lysine, it has to be produced in large scale. *Corynebacterium* species especially *Corynebacterium glutamicum* is widely used for the industrial production of amino acids especially L-glutamate and L-lysine. The *C. glutamicum* from long period has been used for the industrial production of various amino acids, primary metabolites and nucleotides. This organism is an aerobic gram positive, rod shaped and non-sporulating bacteria which used for the industrial production of amino acids of L-lysine and L-glutamate. This bacterium uses a variety of carbohydrates, alcohols and organic acids as single sources of carbon and energy for growth and also for the amino acid production. The quantity of lysine production by wild (natural) type of *Corynebacterium glutamicum* is very low, and its cultivation and propagation cannot provide the amino acid required by markets, therefore the wild type of this bacterium is not suitable and cost-effective for industrial purposes. To minimize the gap between increasing demand and production of L-lysine, it has to be produced in large scale. Aspartate kinase (AK) is one of the key enzymes in the biosynthesis of aspartate-derived amino acids such as lysine. This enzyme catalyzes the transfer of the C-phosphate group of ATP to aspartic acid. In most bacteria, the reaction is the first step of branched biosynthetic pathway for lysine, threonine, isoleucine and methionine and is known to be regulated by the end metabolites through feedback inhibition. For example, aspartate kinase from *Corynebacterium glutamicum* is concertedly inhibited by lysine and threonine, while aspartate kinase I and III from *Escherichia coli* is inhibited by threonine and lysine, respectively. Due to industrial production of lysine amino acid by using *Corynebacterium* species, a lot of researches have been done to improve the genetic modification of these microorganisms. Today, bioinformatics tools are available as online access through web-based databases and software, which can be used to study best structures of aspartate kinase enzyme with the least cost and time. Also due to high laboratory costs, the use of bioinformatics methods will be important in obtaining the final result. The aim of this study was to investigate the bioinformatics structure of aspartate kinase enzyme in different species of *Corynebacterium* by authenticated bioinformatics databases to suggest best bioinformatics structure of the aspartate kinase enzyme for applying in laboratory cloning and production of lysine amino acid for industrial purposes.

Material and methods The amino acid sequences of the aspartic kinase enzyme from 33 species of the *Corynebacterium* was obtained from the NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) and stored as FASTA. In order to study the genetic distances and similarities in 33 species of *Corynebacterium* a phylogenetic tree was constructed using the Neighbor Joining method using the Mega software (MEGA 6). (A bootstrap check with 1000 replications was also conducted to obtain a confidence level for the branches) CIC main work bench5 software was used to investigate genetic similarities using protein sequences. The Evolutionary properties, physiological and physicochemical properties of aspartate kinase enzyme were studied and investigated in 33 different species of *Corynebacterium* through valid databases and software of NCBI, MEGA, ProtScale and

1- PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

4- Associate Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran

(*-Corresponding Authors Email: nassiry@um.ac.ir)

DOI:10.22067/ijasr.v11i4.79758

ProtParam. In order to predict the second structure, two proteins selected from the psipred server were used (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>). For this purpose, the protein sequences of aspartate kinase enzyme in *Corynebacterium glutamicum* with access numbers of CAO00530.1 and SJM57548.1 introduced into the psipred and their second structure was mapped. Afterward, three-dimensional structure of mentioned protein was modeled using Swiss-model server (<https://swissmodel.expasy.org>) Then the quality of the two predicted models evaluated by the Rampage server (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage2.php>), and in the next step its ramachandran plot mapped.

Results and discussions The results of evolutionary tree analysis in *Corynebacterium* species showed that derivation time of aspartate kinase protein in these 33 species is very close. The results of the ProtScale and ProtParam databases showed that the aspartatekinase enzyme of *Corynebacterium glutamicum* with the access number of CAO00530.1 and SJM57548.1 have the best physicochemical and maximum stability among 33 different species of study. Afterward, with further *in silico* investigation by the Swiss-Model server and Rampage tool, it was found that the two access numbers of CAO00530.1 and SJM57548.1 had the best three-dimensional structure. From the results of *in silico* analyses, it can be inferred that the aspartate kinase enzyme with the two access numbers of CAO00530.1 and SJM57548.1 have the best physicochemical properties, the most stable and also the best three-dimensional structure and therefore could be offered for laboratory cloning and production of lysine amino acid for industrial purposes.

Conclusion Due to wide applications and importance of lysine production in our country and also the necessity of selecting appropriate strain of *Corynebacterium* for genetic engineering and industrial production, this bioinformatics study was done to predict best structure of aspartate kinase enzyme and best strain of *Corynebacterium*. Based on the results of our *in silico* analysis, it is suggested that *corynebacterium glutamicum* has the best protein structure of aspartate kinase enzyme and may be beneficial to increase Industrial lysine amino acid production.

Keywords: Aspartate kinase, Bioinformatics, *Corynebacterium*, Lysine amino acid production.