Archive of SID

غربال‌گری و جداسازی سویه‌های مولد سفالوسپورین C – تولید و استخراج این آنتی‌بیوتیک

دکتر ساروخانی * - دکترمعظمی ** - دکتر میردامادی *** - دکتر خان محمدی **** - دکتر آذرنوش *****

Screening and isolation of CPC- producing strains and its production and purification

M. Sarookhani *N. Moazzami* *S. Mirdamadi* *M. Khanmohammadi* *M. Azarnoosh*

Abstract

Background : *Cephalosporin C (CPC) as a major precursor of semisynthetic cephalosporin antibiotics, is produced by species of Acremonium genus in certain conditions.*

Objective : *To isolale and obtain the strains, detect their production and define optimum production and purification conditions.*

Methods : *Selective media were used for soil scrceening program. Standard strains were obtained from DSMZ. CPC production was confirmed by biological and chromatographic (paper chromatography and HPLC) methods. Different kinds of media with various carbon and nitrogen sources were used to induce production. CPC were removed from the filtered and acid - treated broths by adsorption on a neutral macroporous resine (XAD - 4), followed by adsorption on a weakly basic ion - exchange resine (IRA - 67)*

Findings: *In soil screening program, a native CPC - producing strain was isolated. CPC production in this strain and also in standard strains was shown by different methods. Native and standard strains were differed in CPC production in various fermentation media. CPC was recoverd and extracted from these media with acceptable purity.*

Conclusion : *Results of this study can be used for large - scale prodution of CPC in Iran.*

Keywords: *Cephalosporin C , Acremonium , Screening , Purification.*

چکیده

زمینه : *سفالوسپورین C (CPC) به عنوان مهم ترین پیش ساز آنتی بیوتیک های سفالوسپورینی توسط گونه‌هایی از آکرومونیوم‌ها در شرایط خاص ایجاد می‌شود.*

هدف: *مطالعه به منظور جداسازی و به دست آوردن سویه‌ها، اثبات تولید در آنها و تعیین شرایط بهینه تولید و استخراج سفالوسپورین C انجام شد.*

مواد و روش‌ها: *جهت غربال‌گری در خاک از محیط‌های انتخابی استفاده شد. سویه‌های استاندارد از DSMZ آلمان خریداری شد. تولید CPC با روش‌های بیولوژیک و کروماتوگرافی (کروماتوگرافی کاغذی و HPLC) به اثبات رسید. جهت القاء تولید، از محیط‌های دارای منابع کربنی و نیتروژنی مختلف استفاده شد. جهت استخراج CPC، ابتدا محیط‌های تولید از فیلتر عبور، اسیدی و سپس طی دو مرحله از ستون رزین ماکروپور جذبی خنثی (XAD - 4) و ستون رزین تعویض یونی بازی ضعیف IRA - 67 عبور و جمع آوری شد.*

یافته‌ها : *در مرحلهٔ غربال‌گری، یک سویه مولد CPC بومی جدا شد. تولید CPC در این سویه و نیز سویه‌های استاندارد با روش‌های مختلف اثبات شد. سویه بومی با سویه‌های استاندارد از نظر تولید CPC در محیطهای مختلف تفاوت داشت. CPC از محیط‌های تولید با درصد خلوص قابل قبول بازیافت شد.*

نتیجه‌گیری : *از یافته‌های این تحقیق می‌توان برای تولید کلان CPC در کشور استفاده کرد.*

کلید واژه‌ها: *سفالوسپورین C ، آکرومونیوم ، غربال‌گری ، خالص سازی*

* مربی و عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
** دانشیار سازمان پژوهش‌های علمی
*** استادیار سازمان پژوهش‌های علمی
**** استادیار دانشگاه بین المللی امام(ره)
***** استادیار انستیتو پاستور ایران

www.SID.ir

www.SID.ir

مقدمه:

سفالوسپورین C (CPC) مهم ترین مادهٔ پیش ساز در تولید آنتی بیوتیک های سفالوسپورینی است که ماده ۷ آمینوسفالوسپورانیک اسید (7-ACA) را به وجود می‌آورد و با قرار گرفتن عوامل جانبی (R) روی آن، انواع و اقسام آنتی بیوتیک های قوی و مؤثر حاصل می‌شود. [11] CPC به عنوان یک آنتی بیوتیک پپتیدی و متابولیت ثانویه توسط آکرومونیوم‌ها که از قارچ‌های محیطی هستند، در شرایط ویژه‌ای تولید می‌شود. در مراحل بینابینی بیوسنتز آن، مادهٔ پنی‌سیلین N تولید می‌شود. [۴ و ۱۳] CPC دارای خواص فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی ویژه‌ای است که در شناسایی و استخراج این ماده استفاده می‌شود. [۳ و ۹ و ۱۰] ژن‌های مولد CPC به طور معمول تحت تأثیر عناصر کربنی، نیتروژنی و غیره مهار و فقط در شرایط خاصی از این مهار خارج می‌شوند که عموماً مربوط به شرایط محیط‌های کشت است. [۲ و ۱۳ و ۱۴]

برنامه غربال‌گری و جداسازی سویه‌های مولد آنتی بیوتیک‌ها، به امید به دست آوردن سویه‌هایی با تولید بیشتر و یا خواص درمانی جدید و نیز اثرات نامطلوب کمتر همچنان جزء اولویت‌های مراکز تحقیقات تولید آنتی بیوتیک‌ها قرار دارد. [۷] از طرفی اگر چه تولید CPC در مقیاس صنعتی مدتهاست که در دنیا انجام می‌شود ولی به طور معمول در بررسی مقالات از سویه‌های مولد، خصوصیات آنها، نحوهٔ تولید و استخراج CPC توصیف دقیقی وجود ندارد که ناشی از حفظ جنبه‌های اقتصادی است. [۷ و ۱۳] لذا در این تحقیق که در راستای طرح‌های کلان تولید دارو در کشور است، با به دست آوردن سویه‌های مولد CPC نسبت به تولید و تخلیص این ماده اقدام شد که از این اطلاعات می‌توان در صنعت داروسازی کشور استفاده کرد.

مواد و روش‌ها:

جهت جداسازی و تهیهٔ سویه‌ها از خاک ۵۰ نقطه کشور نمونه‌برداری انجام شد و نمونه‌ها پس از دادن رقت‌های متوالی به محیط‌های انتخابی انتقال داده شدند. جدا سازی قارچ‌ها و آکرومونیوم‌ها بر اساس خصوصیات ماکروسکوپی کلونی و یافته‌های میکروسکوپی در کشت اسلاید انجام شد. [۵] تأیید قطعی شناسایی سویه مولد با نظر پروفسور والترگمس انجام شد. سویه‌های استاندارد از مرکز کلکسیون DSMZ آلمان و به نام آکرومونیوم کرایزوژنوم ATCC 11550 و سویه ATCC 20339 (موتانت سویه اول) خریداری شد.

جهت اثبات تولید CPC در محیط‌های کشت این قارچ‌ها از روش‌های زیر استفاده شد:

روش بیولوژیک کیفی و کمی با استفاده از سویه‌های حساس (Test strains) آلکالی ژنزفکالیس ATCC 8750 (حساس به CPC) و میکروکوکوس لوتئوس ATCC 9341 (حساس به پنی سیلین N) انجام و برای تعیین کمی بیولوژیک (بیواسی) منحنی‌های مربوطه ترسیم گردیدند. [۳ و ۴ و ۵]

روش‌های کروماتوگرافیک شامل کروماتوگرافی کاغذی (PC) با استفاده از سیستم حلال n بوتانل - اسید استیک و آب (3:1:1) انجام شد. [۳] روش HPLC با استفاده از ستون C18 و فاز متحرک بافر فسفات 0.03M صورت گرفت. [۱۰ و ۱۷] در هر دو روش، مقایسه با استفاده از استاندارد خالص CPC

Archive of SID

(سیگما) انجام شد.

جهت تولید CPC از دو نوع محیط استفاده شد: یکی محیط مشخص، معرفی شده توسط دیمین برای سویه‌های استاندارد، که حاوی گلوکز، سوکروز، ال‌آسپارژین و DL متیونین (DL-MET) و عناصر معدنی و جزئی بود.[۵] با افزودن یا حذف برخی اجزا در این محیط، عوامل مورد نیاز سویه‌ها بررسی شد. دوم محیط کمپلکس، که دارای انواعی بر حسب نوع منبع ازتهٔ کمپلکس بود که شامل سویا، پپتون، ملاس، fish meal, yeast extract, malt extract, Corn Steep Liqur (CSL) و peanut flour بود.[۴ و ۱۳ و ۱۴ و ۱۸]

جهت استخراج CPC، توده‌های سلولی محیط‌های کشت با سانتریفوژ جدا و سپس محیط فیلتر و PH آن اسیدی شد. فیلتره از روی ستون کروماتوگرافی رزین جذبی خنثی با تخلخل بالا از نوع XAD-4 (Merck) عبور داده شد. سپس این ستون با متانول ۳۰ درصد استخراج گردید و فراکشن‌های حاصل با روش‌های جذب UV در ۲۵۴ نانومتر، بیواسی و HPLC کنترل شد. بخش‌های حاوی CPC جمع آوری و این محلول روی ستون کروماتوگرافی رزین تعویض آنیونی بازی ضعیف از نوع IRA - 67 (سیگما) برده شد و ستون بابافراستات استخراج و سپس بیواسی گردید و در نهایت با HPLC آنالیز شد.[۷ و ۹]

▣ یافته‌ها:

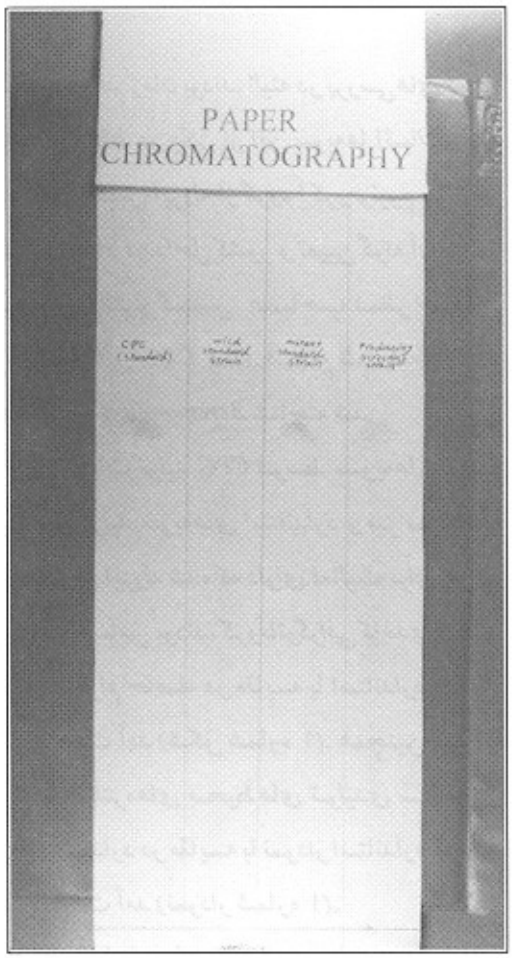
۲۱ مورد از قارچ‌های جدا شده در مرحله غربال‌گری (۶ درصد) از جنس آکرومونیوم‌ها بودند که از این میان دو سویه در بررسی‌های بیولوژیک اولیه دارای اثر روی سویه‌های حساس به پنی سیلین N و CPC به طور هم زمان بودند، البته در بررسی‌های بعدی تولید CPC فقط در یکی از این سویه‌ها اثبات شد. تأیید نهایی جنس ایزوله از گروه آکرومونیوم با نظر پروفسور ارشاد در داخل کشور و تعیین گونه آن با نظر پروفسور والتر گمس صاحب نظر جهانی آکرومونیوم‌ها در CBS هلند انجام شد که به نام Acremomium Persicinum شناخته شد.

جهت اثبات تولید CPC توسط سویه‌ها، فیلتره محیط‌های تولید سویه‌های استاندارد و نیز سویه‌های آکرومونیومی ایزوله شده که دارای فعالیت برای هر دو سویه‌های حساس بودند، کروماتوگرافی کاغذی شدند که کروماتوگرام حاصله در مقایسه با استاندارد خالص CPC به دست آمد (شکل شماره ۱). همچنین HPLC مربوط به فیلتره‌های محیط‌های تولیدی سویه‌های بومی و استاندارد در مقایسه با نمودار استاندارد خالص CPC به دست آمد (نمودار شماره ۱).

از نظر قابلیت تولید CPC سویه‌ها در محیط‌های مختلف، سویه بومی جدا شده در محیط تولید مشخص (defined) طراحی شده برای سویه‌های استاندارد مولد، تولید CPC نداشت در حالی که هر دو سویهٔ استاندارد در این محیط تولید داشتند و تولید سویه موتانت بیشتر بود. حذف MET - DL از این محیط باعث فقدان تولید CPC در هر دو سویه استاندارد شد. افزودن آمینواسیدهای پیش‌ساز شامل LYS و CYS و VAL، نه تنها اثری در تولید CPC در سویه بومی نداشت بلکه تولید CPC در سویه‌های استاندارد را هم کم کرد. اما در محیط‌های تولید کمپلکس با منابع ازته مختلف، تولید CPC نه تنها در سویه‌های استاندارد بلکه در سویه بومی نیز مشاهده شد. در این جا نیز تولید سویه‌های استاندارد به خصوص نوع موتانت بیشتر از سویهٔ

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱ :

کروماتوگرافی کاغذی *(PC)* برای نشان دادن تولید *CPC*

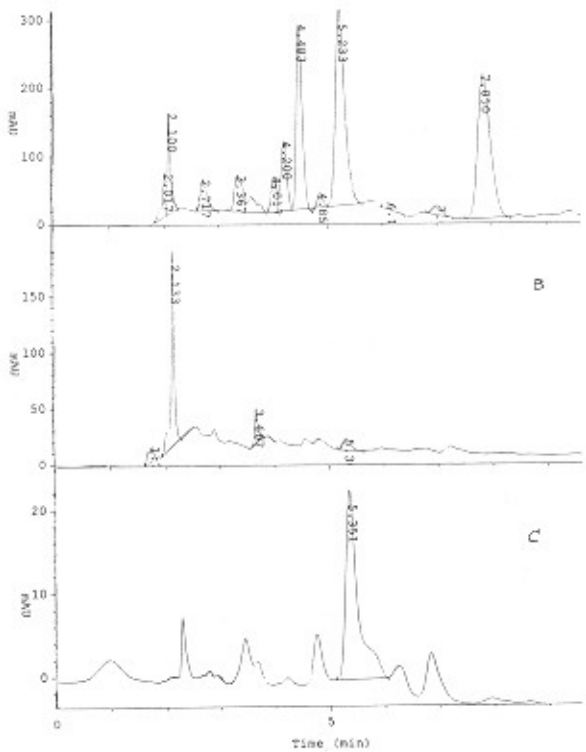
A:استاندارد CPC B: فیلتره محیط سویه استاندارد وحشی C: فیلتره محیط سویه استاندارد موتانت D: فیلتره محیط سویه بومی

بومی بود. در میان‌منابع ازته مختلف به‌کارگرفته در این محیط‌ها، محیط حاوی سویا تأثیر بهتری در تولید *CPC* به خصوص درسویه موتانت داشت. حذف - *DL MET* در این محیط تأثیری در تولید سویه بومی نداشت، ولی تولیدات *CPC* سویه‌های استاندارد را کاهش داد. زمان تولید حداکثر *CPC* در محیط کمپلکس حاوی سویا و *DL - MET* برای سویهٔ بومی ۳ روز، برای سویهٔ استاندارد وحشی ۴ روز و سویه موتانت ۵ روز بود. شکل مرفولوژیک مولد *CPC*

نمودار ۱ :

HPLC در نشان دادن تولید CPC(خ)

A:فیلتره محیط سویه استاندارد B:فیلتره محیط سویه بومی C:استاندارد CPC



در محیط‌های تولیدی مایع که به نام هایفاهای متورم شبیه به مخمر *(Y.L.S.H)* می‌خوانیم، برای سویه موتانت در محیط کمپلکس حاوی سویا حداکثر بود (جدول شمارهٔ ۱).

در مورد استخراج *CPC* از محیط‌ها، با توجه به تولید بالاتر و بهتر سویه موتانت در محیط‌های مختلف، از محیط‌های تخمیری این سویه جهت تولید و استخراج *CPC* در مراحل خالص‌سازی استفاده شد.

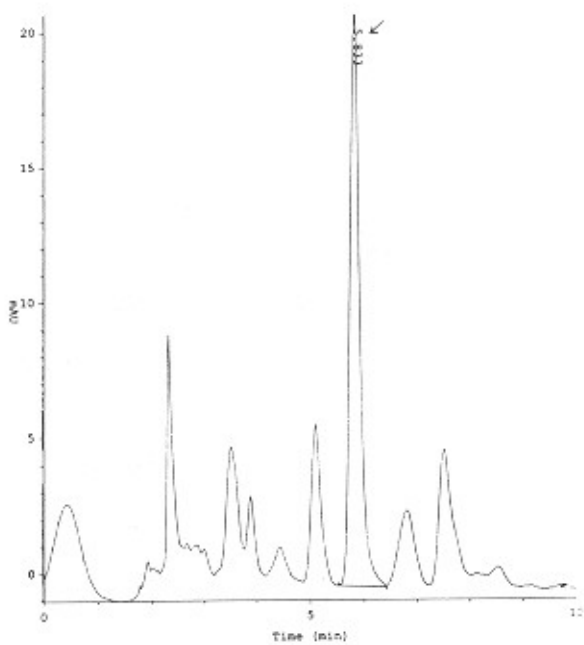
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱:
مشخصات محیطهای تولید *CPC* و تولید سویه‌ها دراین محیط‌ها

ردیف	سویه / محیط	بومی	استاندارد وحشی	استاندارد مونانت
۱	محیط مشخص با گلوکز، سوکروز و *Asn* و *DL-MET*	–	+	++
۲	محیط یک منبای *DL-MET*	–	–	–
۳	محیط یک به‌علاوه *lys* و *cys* و *val*	–	+	+
۴	محیط کمپلکس حاوی سویا و *DL - MET*	+	++	+++
۵	محیط کمپلکس حاوی *CSL*	+	+	+
۶	محیط کمپلکس حاوی عصاره مالت و *fish meal*	+	+	+
۷	محیط چهار منبای *DL -MET*	+	+	+
۸	زمان تولید *CPC* در محیط چهار (به روز)	۳	۴	۵
۹	تولید *YLSH* در محیط چهار	جزئی	کم	فراوان

نمودار ۲:
کروماتوگرام *HPLC* نمونه محیط کشت خالص شده



فراکشن‌های با فعالیت بیولوژیک و یا جذب *UV* بالا در مراحل خالص سازی در ستون‌های کروماتوگرافی جمع‌آوری و مورد آنالیز *HPLC* قرار گرفتند و کروماتوگرام حاصله به دست آمد (نمودار شماره ۲).

بحث و نتیجه‌گیری :

در این تحقیق سویهٔ بومی مولد سفالوسپورین *C* جدا سازی شد. سویه مولد *CPC* نخستین بار توسط بروتزو در ساردینیای ایتالیا جدا و در یک مقاله غیر رسمی معرفی شد. طی سال‌های متمادی تلاش‌های زیادی جهت شناسایی عوامل مؤثر و لازم در رشد و تولید *CPC* در این سویه به خصوص توسط پروفسور دیمین انجام شد و محیط‌های مختلفی برای تولید *CPC* در آنها طراحی گردید.[۴و۵و۶] همچنین جهت بهینه سازی این سویه با روش‌های دست‌کاری ژنتیکی تحقیقات گسترده‌ای صورت گرفت. سویه مولد بروتزو در ۱۹۷۱ توسط والترگمس در گروه آکرومونیوم‌ها قرار گرفت و به نام *A.chrysogenum* خوانده شد.[۸] تلاش‌های دیگری در جهت غربال‌گری و ایزوله نمودن سویه‌هایی با تولید *CPC* صورت گرفته و تولید *CPC* در سویه‌هایی نظیر *Emericellopsis salmosynnemata*، *Paecilomyces persicinus* و *Paecilomyces canneus* گزارش شده است که پروفسور گمس تمام این سویه‌ها را نیز جزء آکرومونیوم‌ها طبقه‌بندی نموده است.[۶و۹و۱۵] سویه مولد بومی ایزوله شده احتمالاً مشابه سویه *P.persicinus P10* است که پیزانو تولید *CPC* را توسط آن گزارش نموده است.[۱۶]

برای تعیین تولید *CPC* در محیط‌های تخمیری از روش‌های متعددی نظیر روش‌های بیولوژیک و روش‌های کروماتوگرافی استفاده می‌شود که تعیین

www.SID.ir

www.SID.ir

حضور CPC در نمونه‌ها در این روش‌ها با هم انطباق دارند، ولی حساسیت و تعیین نوع فعالیت ماده فوق در آنها متفاوت است.[۹] در مطالعه حاضر روش HPLC قادر به تعیین مقادیر کمتری از CPC بود. در صورتی که روش بیولوژیک با استفاده از سویه حساس اختصاصی فعالیت آنتی بیوتیکی CPC موجود در نمونه‌ها را بهتر نشان داد (این مقایسه در این مقاله نشان داده نشده است). با توجه به محیط‌های تولیدی با پاسخ مثبت در تولید CPC توسط سویه‌های مختلف، به نظر می‌رسد که میان عناصر لازم جهت تولید CPC در سویه‌ها تفاوت‌هایی وجود دارد که براخاژ نیز در خصوص تنظیم تولید CPC، به عناصر تنظیمی و مواد مؤثر روی ژن‌های متابولیسمی مولد CPC تأکید دارد.[۱] همچنین MET - DL در مقاله های متعدد و به‌خصوص تحقیقات چهل سالهٔ پرفسور دیمین به عنوان محرک تولید CPC معرفی شده است.[۴ و ۶] اما در تحقیق فعلی MET - DL روی تولید سویه بومی اثری نداشت و تحقیقات داماتو نیز مؤید همین مطلب است.[۴و۶و۱۵] البته در پژوهش حاضر این امر در محیط مشخص اختصاصی برای سویه بومی تجربه نشده، بلکه یافته‌های تولید CPC در محیط کمپلکس این نتیجه را نشان داد. همچنین به نظر می‌رسد در محیط‌های کمپلکس عناصر محرک رشد، ویتامین‌ها و یا آمینو اسیدهایی وجود دارند که روی ژن‌های مولد سویه بومی اثرات تنظیمی مثبتی دارند که این عناصر در محیط‌های مشخص وجود ندارند. در ضمن اثرات مثبت محیط کمپلکس حاوی سویا و MET - DL روی تولید CPC در سویهٔ موتانت کاملاً مشهود است که این مسأله در تولید سطح بالای CPC از دید اقتصادی حائز اهمیت است.

از آن جایی که CPC ماده‌ای شدیداً هیدروفیل است، روش‌های متفاوتی نسبت به سایر بتالاکتام‌های هیدروفوب برای جداسازی آن از محیط‌های کشت ذکر می‌شود و عموماً در این منابع به روش استفاده توأم از رزین‌های جذبی و رزین‌های معاوضه‌گر یونی که CPC را در شرایط خاص به طور ویژه در خود نگه می‌دارند اشاره شده است.[۳و۷و۹] در مطالعه حاضر نیز از این روش استفاده شد، همان طور که کروماتوگرام HPLC نمونه خالص شده نیز نشان داد، CPC را به درجاتی خالص نمود. لذا با توجه به این که خالص سازی زیاد CPC که خود باید در پروسه‌های بعدی تولید قرار گیرد، از ضرورت زیادی برخوردار نیست لذا این میزان از خلوص کفایت دارد.[۷]

باید اذعان داشت که تولید هیچ یک از سویه‌های موجود در بررسی فعلی، در حد سویه‌های صنعتی مولد CPC که به صورت Patent هستند و تولیداتی در حدود ۱۵ تا ۲۰ گرم در لیتر را دارند، نیست.[۹ و ۱۳] لذا لزوم به کارگیری روش‌های دستکاری ژنتیکی جهت بهینه‌سازی سویه کاملاً مشهود است و ادامه این پروژه به این امر اختصاص دارد. در این راستا با توجه به خصوصیات متفاوت سویه‌های در دست مطالعه، می‌توان با فرآیندهای مختلف موتاژنزویا ادغام پروتوپلاستی و روش‌های مهندسی ژنتیک، ارگانیسم مولد با خصوصیات بهتری بوجود آورده و تولید CPC را بهبود بخشید.

سپاسگزاری:

بدین وسیله از همکاری پروفسور دیمین، پروفسور والتر گمس، پروفسور جعفر ارشاد و سرکار خانم انصاری تقدیر می‌گردد.

Archive of SID

مراجع :

1. Bang W, Chu Z, Constandines A. Modeling, optimization and computer control of the cephalosporin C fermentation process. Biotechnology and Bioengineering 1988; 32: 277 - 88

2. Brakhage AA. Molecular regulation of beta - lactam biosynthesis in filamentous fungi. Microbiology and Molecular Biology Reviews 1998; 62(3):547 - 85

3. Colowick SP, Kaplan NO. Methods in enzymology. USA, Academic press, 1975, vol XLIII, 48 - 121

4. Demain A L. Biochemistry of penicillin and cephalosporin fermentations. L Loydia 1974; 37: 147 - 67

5. Demain AL, Solomon NA. Manual of industrial microbiology and biotechnology. USA, American society of microbiology, 1986, 410-35

6. Demain AL, Zhange G. Cephahalosporin C production by C.acremonium: the methionine story. Crit Rev Biotechnol 1998; 186 (4): 283-94

7. Flickinger Mc, Drew SW. Encyclopedia of bioproccss technology. USA, John wiley & sons inc, 1999, vol 1, 560-69

8. Gams W, Domsch KH, Anderson T. Compendium of soil fungi. London, Academic Press, 1980, vol 10, 16-29

9. Ghosh AC, Mathur RK, Dutta NN. Extraction and purification of cephalosporin antibiotics, Advances Biochem Eng Biotechnol 1987; 56: 111-45

10. Holzhauer K, Zhou W, Schugerl K. On - line high performance liquid chromatography for the determination of cephalosporin C and by-products in complex fermentation broths. J of Chromatography 1990; 499: 609 - 15

11. Jawetz E. Penicillins & cephalosporins. in: Katzung BG. Basic & clinical pharmacology. 3rd ed. USA, lange medical book, 1987, 516-26

12. Keruffa L, Sandor E, Kozma J, Szentimail A. Methionine enhances sugar consumption, fragmentation, vaculization and cephalosporin C production in acremonium chrysogenum. proccss biochemistry. 1997; 32 (6): 495-9

13. Mooyaung M. Comprehensive biotechnology. UK, pergamon press, 1985, vol 1, 163-85

14. Pauls S, Bezharuah RL, Ghosh AC. Enhancement of growth and antibiotic titer in Cephalosporium acremonium induced by sesam oil. Folia microbiol 1997; 42 (3): 211-3

15. Pisano MA, D'Amato RF. A chemically defincd medium for cephalosporin C production by Paecilomyces persicinus. Antonie leeuwenhoek 1976; 42: 299 - 308

16. Pisano MA, Vellozi EM. Production of cephalosporin C by Paecilomyces persicinus P10. Antimicrob Agents Chemother 1974; 6: 447-51

17. Roderick white E, Fox M. Custom made C18

www.SID.ir

Archive of SID

columns for the hydrophobic chromatography of cephalosporin C derivatives. J Antibiot 1982; 5: 1538-46

18. Zhou W, Rieger K, Dors M, Schugerl K. Influence of medium composition on the cephalosprin C production with a highly productive strain of Cephalosporium acremonium. J of Biotechnology 1992; 23: 315 -29

www.SID.ir