Archive of SID

مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۱، شماره‌ی ۸۹ بهمن و اسفند ۱۳۹۲، صفحات ۴۰ تا ۵۰

بررسی آنزیم سفالوسپورین آسیلاز در برخی باکتری‌های گرم منفی جدا شده از نمونه‌های بالینی جهت تولید آنتی‌بیوتیک‌های نیمه سنتزی سفالوسپورینی در صنایع داروسازی

دکتر فرزانه حسینی[۱]، دکتر عباس اخوان سپهی[۲]، مائده ورقائی[۳]

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال ma.varghaei@yahoo.com

دریافت: ۹۲/۲/۸ پذیرش: ۹۲/۷/۲

چکیده

زمینه و هدف: *سفالوسپورین آسیلازها پپتیدازهای بسیار تخصص یافته‌ای هستند که قادرند پیوند آمیدی بین یک هسته بتالاکتام و یک زنجیره‌ی جانبی را بدون تخریب حلقه‌ی بتالاکتام بشکنند. این آنزیم سفالوسپورین C را به ۷-آمینوسفالوسپورانیک اسید (۷-ACA) تبدیل می‌کند. ۷-ACA حدواسط مهم برای سنتز سفالوسپورین‌های نیمه سنتتیک در صنایع داروسازی می‌باشد. هدف از این مطالعه، غربالگری و بهینه سازی سویه‌هایی است که بیشترین مقدار تولید آنزیم سفالوسپورین آسیلاز جدا شده از نمونه‌های بالینی در میان برخی باکتری‌های گرم منفی مولد آنزیم سفالوسپورین آسیلاز دارا می‌باشد.*

روش بررسی: *از مجموع ۶۰ سویه جمع‌آوری شده از چندین بیمارستان در نقاط مختلف شهر تهران سویه‌های بالینی سودوموناس، اسینتو باکتر و اشرشیاکلای جدا شد. ابتدا با روش آنتی‌بیوگرام سویه‌های مقاوم تفکیک شده سپس فعالیت آنزیم با دستگاه اسپکتروفتومتریک سنجیده شد. پس از شناسایی و جداسازی سویه‌های مولد آنزیم، اثر مولفه‌های زمان، دما، pH و میزان هوادهی محیط کشت بر میزان تولید آنزیم بررسی شد.*

یافته‌ها: *در این مطالعه از میان سه گروه باکتری‌های ذکر شده، سویه‌ای از سودوموناس آئروژینوزا فعالیت سفالوسپورین آسیلازی قابل توجهی از خود نشان داد. فعالیت بهینه برای این گونه در مولفه‌های pH معادل ۸، زمان گرماگذاری ۴۸ ساعت، دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و مولفه هوادهی با دور ۱۵۰rpm به دست آمد.*

نتیجه گیری: *یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که سویه سودوموناس نسبت به سایر سویه‌های بررسی شده در این مطالعه، فعالیت سفالوسپورین آسیلازی قابل توجهی از خود نشان می‌دهد و همچنین این سویه می‌تواند برای تولید صنعتی آنزیم یا کارهای تحقیقاتی مورد استفاده قرار گیرد.*

واژگان کلیدی: سفالوسپورین آسیلاز، بهینه‌سازی، سفالوسپورین، ۷ -آمینوسفالوسپورانیک اسید، باکتری‌های گرم منفی بیماری‌زا

مقدمه

سفالوسپورین C یک فرم طبیعی از سفالوسپورین می‌باشد که تحت عنوان یک متابولیک ثانویه به وسیله‌ی قارچ سفالوسپوریوم آکرومونیوم تولید می‌شود. در ارزش کل بازار جهانی، آنتی‌بیوتیک سفالوسپورین رتبه‌ی پنجم را در بین عوامل درمانی جهانی دارد. تمام مشتقات مهم آنتی‌بیوتیک سفالوسپورین، از ۷-آمینو سفالوسپورانیک اسید (۷-ACA)

۱- دکترای تخصصی میکروبیولوژی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
۲- دکترای تخصصی میکروبیولوژی، دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
۳- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

www.SID.ir

Archive of SID

یا ۷- آمینو دزاستوکسی سفالوسپورانیک اسید (ADCA-۷) تولید می‌شود (۱). ACA-۷ یکی از ترکیبات حدواسط لازم برای سنتز سفالوسپورین‌های نیمه سنتتیک می‌باشد (۳و۲). تولید ACA-۷ در صنعت معمولا از دآسیلاسیون شیمیایی آنتی بیوتیک سفالوسپورین C طبیعی با استفاده از ترکیبات سمی و از قبیل ایمونواتر، نیتروزیل کلراید و متانول انجام می‌گیرد. روش‌های شیمیایی برای سنتز ACA-۷ شامل اقدام چند مرحله‌ای می‌باشد که بسیار پر هزینه بوده، بنابراین روش‌های آنزیمی در حال بررسی می‌باشد تا جایگزین روش‌های شیمیایی گردد. در روش آنزیماتیک تولید ACA-۷ توسط آنزیم سفالوسپورین آسیلاز انجام می‌شود. این آنزیم از نظر صنعتی، آنزیم بسیار مهمی است که سفالوسپورین را به ACA-۷ هیدرولیز می‌کند و یکی از اجزای کلیدی برای تولید مشتقات سفالوسپورین و سفالوسپورین‌های نیمه سنتنیک می‌باشد (٤). تولید آنزیمی ACA-۷ ازسفالوسپورین C (CPC) به ۲ روش صورت می‌گیرد: در یک روش CPC به صورت اکسیداتیو به‌وسیله‌ی D–آمینواسید اکسیداز به کتوآدیپیل ACA-۷ تبدیل می‌شود که بعد گلوتاریل ۷- آمینوسفالوسپورانیک اسید در حضور پراکسیدهیدروژن و آنزیم گلوتاریل ACA-۷ آسیلاز به ACA-۷ تبدیل می‌شود .در روش دیگر، سفالوسپورین C به طور مستقیم در حضور سفالوسپورین C آسیلاز و در یک مرحله مجزا به ACA-۷ تبدیل می‌شود. سفالوسپورین آسیلازها، پپتیدازهای بسیار تخصص یافته‌ای که قادر به شکستن پیوند آمیدی بین یک هسته‌ی بتالاکتام و یک زنجیره، بدون تخریب حلقه‌ی بتالاکتام هستند (۸-۵). سفالوسپورین C آسیلاز بیشتر به‌وسیله‌ی قارچ‌ها و بعضی باکتری‌ها تولید می‌شود. بعضی میکروارگانیسم‌هایی که تولید کننده سفالوسپورین C آسیلاز هستند به‌ترتیب عبارتند از: *آرتروباکترویسکوسوس، باسیلوس مگاتریم ATCC ۵۳٦٦۷، اشرشیاکلی، Paecilimyces C ۲۱۰٦، پنی‌سیلیوم گریزوفولوین، پنی‌سیلیوم رگولوسوم، سودوموناس پوتیدا و سودوموناس سویه N۱۷٦، V۲۲* می‌باشد. گزارش‌های مختلف جداسازی میکروارگانیسم‌های مولد سفالوسپورین آسیلاز را ثبت کرده است اغلب میکروارگانیسم‌های مولد آنزیم از خانواده سودموناس‌ها می‌باشند (۹). امروزه با پیشرفت‌های روز افزون بیوتکنولوژی در تولید آنزیم‌های صنعتی از میکروارگانیسم‌ها در صنایع داروسازی و روش‌های مبتنی بر آن همانند غربال سازی و بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم و دستکاری‌های ژنتیکی می‌توان تهدید یک باکتری بیماری‌زا را به یک فرصت تولید آنزیم و در نهایت تولید آنتی‌بیوتیک‌های نیمه سنتزی سفالوسپورین در صنایع دارو سازی تبدیل کرد. به‌طور کلی اهداف مطالعه‌ی حاضر، جداسازی و انتخاب سویه‌های بالینی باکتریایی مولد آنزیم سفالوسپورین آسیلاز، شناسایی و تعیین هویت سویه‌های مولد جدا شده و سپس بهینه سازی شرایط برای کسب بالاترین میزان آنزیم در سویه‌هایی که دارای بیشترین میزان تولید آنزیم بودند، بود.

روش بررسی

در این مطالعه‌ی توصیفی - مقطعی ٦۰ نمونه‌ی ادراری، زخم، سوختگی و خون که در طی ماه‌های فروردین تا تیرماه سال ۱۳۹۱ از بیماران بستری و سرپایی مبتلا به عفونت مجاری ادراری، سوختگی و زخم که به بیمارستان‌های مطهری، امام خمینی در شهر تهران مراجعه کرده بودند، جمع‌آوری گردید و پس از کشت باکتری بر روی محیط های EMB آگار، سیتریمیدآگار و BHI آگار (شرکت Merck آلمان) و انجام تست‌های بیوشیمیایی افتراقی نظیر TSI، سیمون سیترات، اکسیداز، کاتالاز، اوره آز، MR/VP، SIM با استفاده از جدول استاندارد (۱۰)، جداسازی گردید. با در نظر گرفتن احتمال این موضوع که باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌توانند دارای آنزیم سفالوسپورین

www.SID.ir

Archive of SID

آسیلاز باشد آنتی‌بیوگرام انجام شد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی با انجام تست آنتی‌بیوگرام از طریق روش انتشار از دیسک (Disk Diffusion Method) و با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک تهیه شده از شرکت پادتن طب شامل: پنی‌سیلین (۱۰ µg)، آموکسی‌سیلین (۱۰ µg)، سفالوتین (۳۰ µg) از نسل اول سفالوسپورین‌ها، سفروکسیم (۳۰ µg) از نسل دوم سفالوسپورین‌ها، سفکسیم (۵ µg) و سفتیزوکسیم (۳۰ µg) از نسل سوم سفالوسپورین‌ها تعیین گردید و با اندازه‌گیری هاله‌ی عدم رشد توسط خط کش میلی‌متری، سویه‌های حساس و نیمه حساس و مقاوم با استفاده از استاندارد جهانی [Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)] (۱۱) مشخص شدند. سپس برای انجام جداسازی سویه‌های مولد آنزیم به روش اسپکتروفوتومتریک (۱۵-۱۲)، از ایزوله‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مذکور استفاده شد. بدین ترتیب که از نمونه‌های باکتری‌های مختلف رشد کرده در محیط انتخابی موردنظر، کلنی تک گرفته شد. سپس به درون ارلن‌های حاوی محیط LB تلقیح شد و ارلن‌ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور شیکردار انکوبه گردید. سپس از محیط کشت در فالکون ریخته شده و در دور ٤۰۰۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتیریفوژ شد تا به اندازه کافی توده‌ی سلولی وجود داشته باشد. سپس مایع رویی بیرون ریخته شده و فالکون شدیداً ورتکس شد تا حل شده و سپس در بافر فسفات ۰/۱ مولار در pH ۷ به مقدار یک میلی‌لیتر حل گردید و دوباره در دور ٤۰۰۰ به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس در همان بافر شناور گردید. سوسپانسیون سلولی موجود به عنوان محلول آنزیم در آزمایشات استفاده شد. به ۰/۲۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات (pH معادل ۷) حاوی ۲/۵ میلی‌گرم پودر سفالوسپورین C، مقدار ۰/۲۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس به منظور توقف واکنش ۳ میلی‌لیتر از محلولی که به‌وسیله‌ی مخلوط کردن ۲ میلی‌لیتر از گراسیال استیک اسید ۲۰ درصد با یک میلی‌لیتر NaOH ۰/۰۵ مولار ساخته شده بود به مخلوط واکنش اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. به سوپرناتانت سانتریفیوژ مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از p-DAB ۰/۵ درصد محلول در متانول اضافه گردید و بعد از ۳ دقیقه در دمای اتاق جذب نوری آن در طول موج ٤۱۵ نانومتر خوانده شد (۱۵-۱۲). جهت تهیه‌ی منحنی استاندارد، رقت‌هایی از سفالوسپورین C تهیه شده و با مقدار معینی از p-DAB وارد واکنش گردید. مقدار جذب نوری در طول موج ٤۱۵ نانومتر قرائت شده و منحنی استاندارد محاسبه می‌شود. بلانک حاوی ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات + یک میلی‌لیتر NaOH ۰/۰۵ مولار + ۲ میلی لیتر استیک اسید ۲۰ درصد + ۰/۵ میلی‌لیتر p-DAB محلول در متانول بود. در این مرحله از سویه‌های غربال شده، که میزان تولید آنزیم سفالوسپورین C آسیلاز در آن‌ها توسط روش اسپکتروفتومتریک مشخص شده بود، ایزوله‌ایی که دارای فعالیت آنزیمی قابل توجهی بود انتخاب و برای آزمایش تغییر شرایط محیطی و بهینه‌سازی و انتخاب بهینه‌ترین شرایط جهت بیشترین مقدار تولید آنزیم استفاده گردید و با تغییر دادن مؤلفه‌های مختلف همچون زمان گرما گذاری محیط کشت باکتری، pH محیط، دمای گرماگذاری محیط کشت و هوادهی، میزان تولید آنزیم در شرایط مختلف مورد بررسی قرار گرفت (۲۳-۱٦).

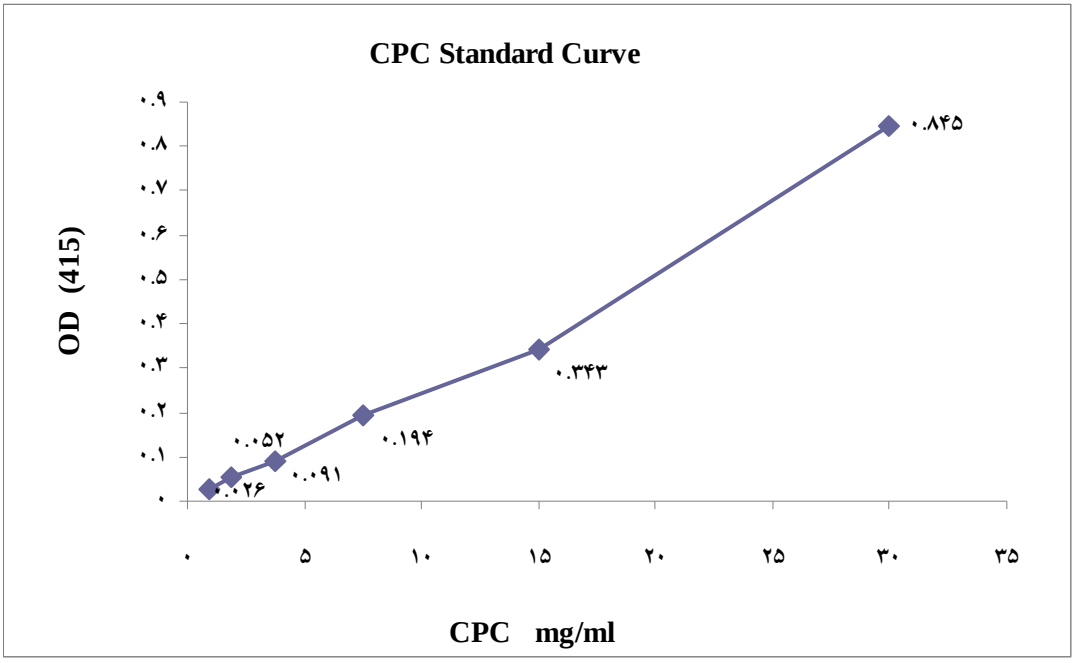
یافته‌ها

٦۰ سویه‌ی بالینی از بیمارستان‌های مختلف شهر تهران شناسایی و مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به روش رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی از ٦۰ سویه جمع‌آوری شده ۲۰ سویه (۳۳/۳۳ درصد)متعلق به سودوموناس آئروجینوزا، ۲۰ سویه (۳۳/۳۳ درصد)متعلق به اسینتوباکتر بومانی، ۲۰ سویه (۳۳/۳۳ درصد) متعلق به

www.SID.ir

Archive of SID

اشرشیاکلای بود. با انجام تست آنتی‌بیوگرام بر روی ٦٠ سویه‌ی بالینی، ٤٤ سویه (٢٠ سویه متعلق به سودوموناس آئروجینوزا و ٢٠ سویه‌ی متعلق به اسینتوباکتر بومانی و ٤ سویه متعلق به اشرشیاکلای) به‌طور کامل به دیسک‌های آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، سفالوتین (نسل اول سفالوسپورین‌ها)، سفروکسیم (نسل دوم سفالوسپورین‌ها)، سفکسیم و سفتیزوکسیم (نسل سوم سفالوسپورین‌ها) مقاوم بودند. از میان ٤٤ سویه (٧٣/٣٣ درصد) بالینی مقاوم به آنتی‌بیوتیک بتا لاکتام (پنی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، سفالوتین، سفروکسیم، سفکسیم و سفتیزوکسیم) ٢٠ سویه (٣٣/٣٣ درصد) شامل ٨ سویه سودوموناس آئروجینوزا (١٣/٣٣ درصد)، ٨ سویه اسینتوباکتر بومانی (١٣/٣٣ درصد) و ٤ سویه اشرشیاکلای (٦/٦٦ درصد) تولید آنزیم را به میزان قابل توجهی از خود نشان دادند. اما ١ سویه *سودوموناس آئروجینوزا* بالاترین جذب نوری را با استفاده از روش اسپکتروفتومتریک در دمای ٣٧ درجه‌ی سانتی‌گراد و ٤٨ ساعت انکوباسیون و pH معادل ٧ و با دور rpm ١٦٠، را از خود نشان داد که از این سویه جهت انجام آزمایشات تکمیلی از جمله بهینه سازی شرایط تولید آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. برای رسم منحنی استاندارد، به‌ترتیب غلظت‌های ٣٠ میلی‌گرم، ١٥ میلی‌گرم، ٧/٥ میلی‌گرم، ٣/٧٥ میلی‌گرم، ١/٨٧٥ میلی‌گرم، ٠/٩٣٧ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از سفالوسپورین C پس از مخلوط کردن محلول‌های فوق با معرف DAB _ p و قرائت جذب نوری با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ٤١٥، نتایج زیر به‌دست آمد.



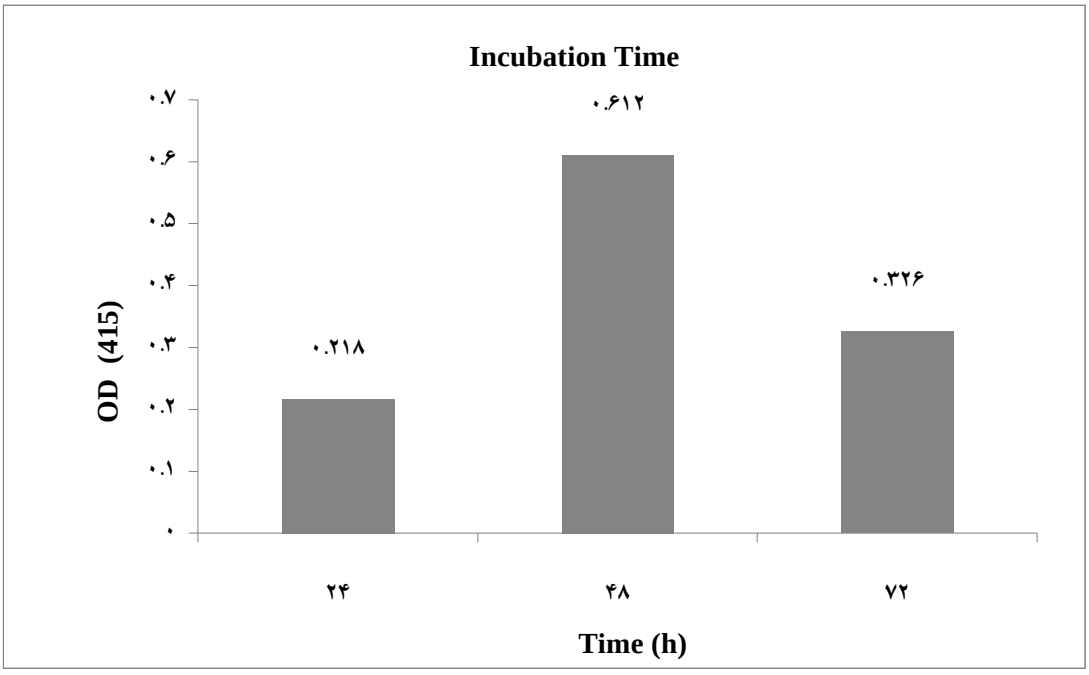
نمودار ١: منحنی استاندارد جذب نوری CPC در طول موج ٤١٥ نانومتر با معرف P –DAB

پس از تاثیر مدت زمان‌های مختلف انکوباسیون در مقدار تولید آنزیم با استفاده از روش اسپکتروفتومتریک نتایج به دست آمده در نمودار ٢ رسم شده است. ایزوله سودوموناس آئروجینوزا انتخابی در ٤٨ ساعت انکوباسیون بیشترین فعالیت خود را با جذب نوری ٠/٦١٢ نشان داد و با افزایش زمان انکوباسیون فعالیت تولید آنزیم کاسته شد. کمترین میزان تولید

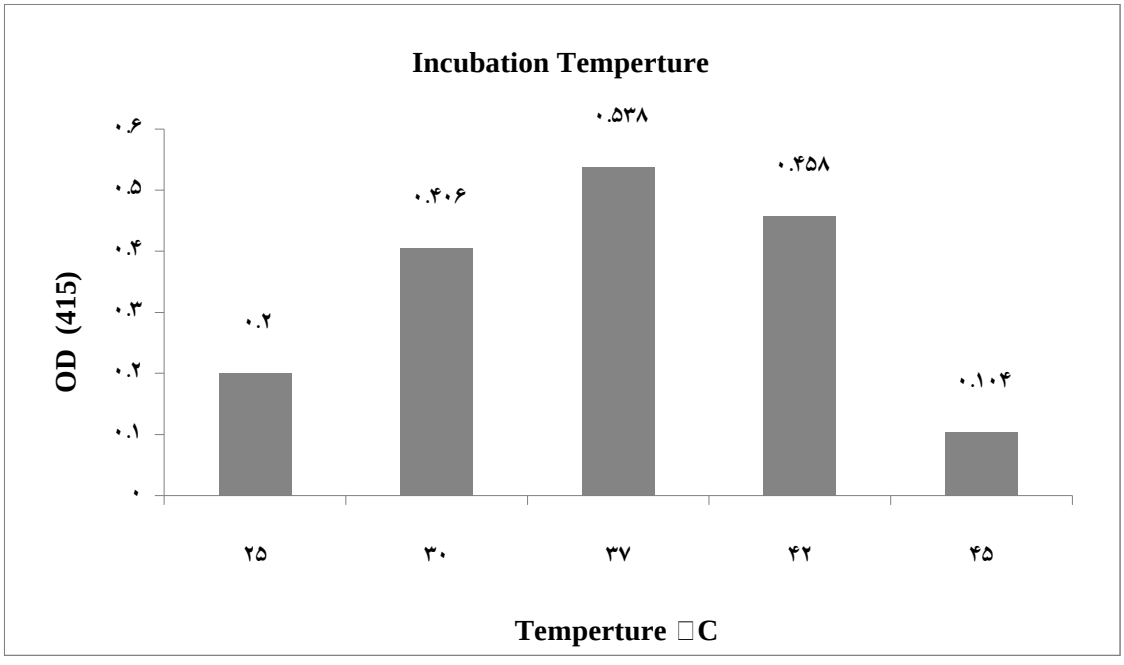
www.SID.ir

Archive of SID

آنزیم در این ایزوله در زمان ۲٤ ساعت با جذب نوری ۰/۲۱۸ ثبت شد. پس از تاثیر دماهای مختلف انکوباسیون در مقدار تولید آنزیم با استفاده از روش اسپکتروفتومتریک نتایج به دست آمده در نمودار ۳ رسم شده است.



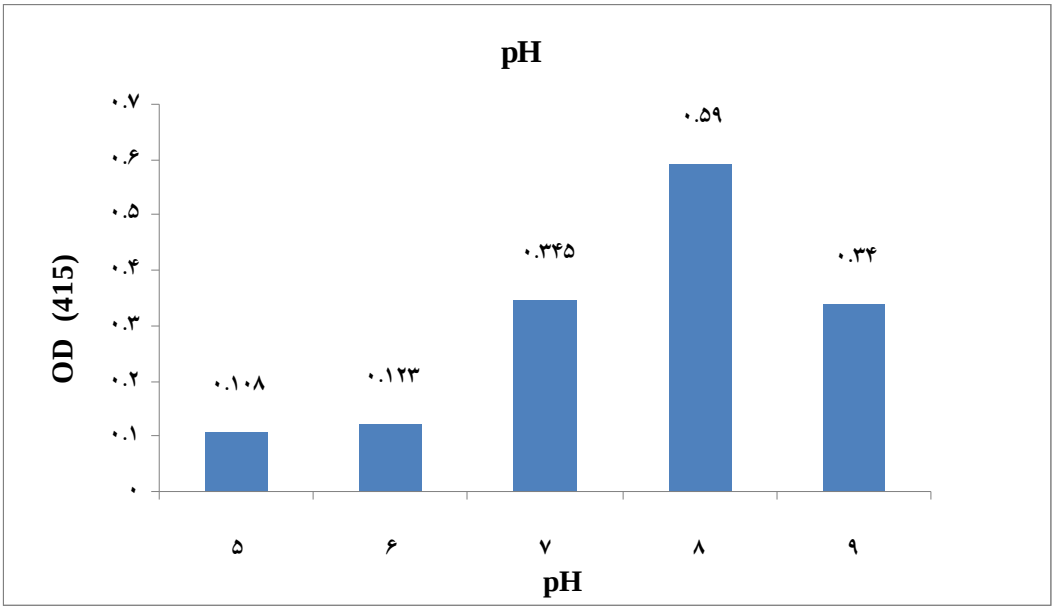
نمودار ۲: منحنی تاثیر زمان انکوباسیون بر مقدار تولید آنزیم سفالوسپورین آسیلاز



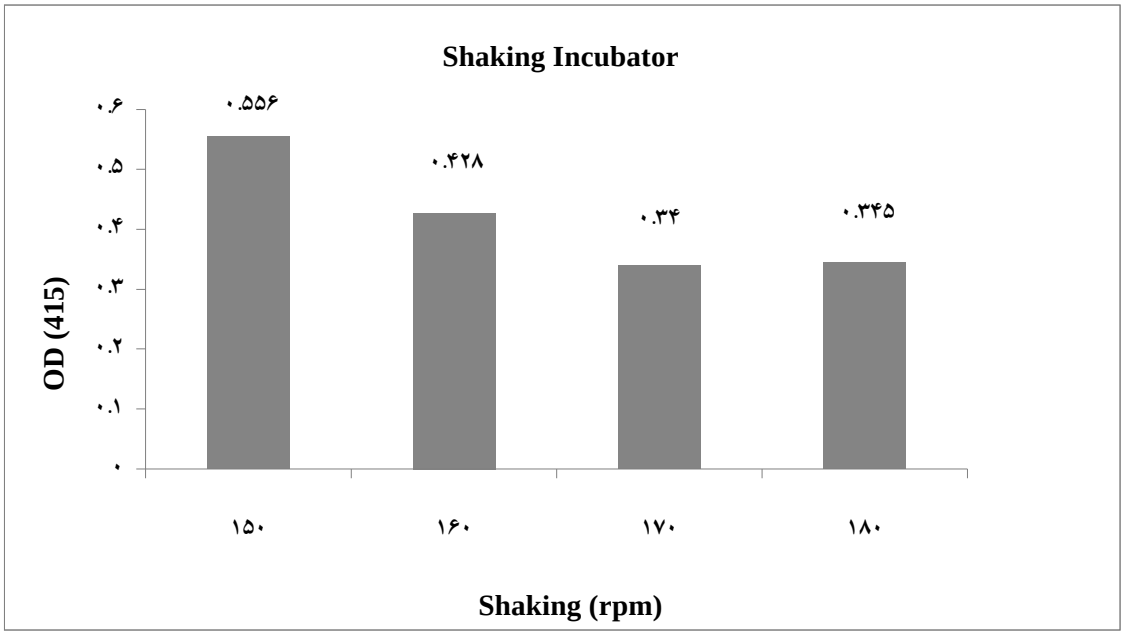
نمودار ۳: منحنی تاثیر دماهای مختلف انکوباسیون بر مقدار تولید آنزیم سفالوسپورین آسیلاز

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ٤: منحنی تاثیر pH های مختلف بر مقدار تولید آنزیم سفالوسپورین آسیلاز



نمودار ٥: منحنی تاثیر دورهای مختلف انکوباتور شیکر دار بر مقدار تولید آنزیم سفالوسپورین آسیلاز

ایزوله سودوموناس آئروجینوزا انتخابی در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد فعالیت ناچیزی از تولید آنزیم با جذب نوری ۰/۲ را نشان می‌دهد ولی با افزایش دما، فعالیت تولید نیز افزایش می‌یابد تا دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد که فعالیت سویه به حاکثر خود با جذب نوری ۰/۵۳۸ می‌رسد و با افزایش دما تولید نیز کاهش می‌یابد و بعد از دمای ٤٠ درجه‌ی سانتی‌گراد

www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت تولید آنزیم به شدت افت می‌کند. کمترین فعالیت با جذب نوری ۰/۱۰۴ را در دمای ٤٥ درجه‌ی سانتی‌گراد نشان داد. پس از تاثیر pH های مختلف در مقدار تولید آنزیم با استفاده از روش اسپکتروفتومتریک نتایج به دست آمده در نمودار ٤ رسم شده است. ایزوله سودوموناس آئروجینوزا انتخابی در pH اسیدی دارای فعالیت ناچیزی با جذب نوری ۰/۱۰۸ بود ولی با قلیایی‌تر شدن محیط، مقدار فعالیت افزایش یافت و در pH معادل ۸ به حاکثر مقدار خود با جذب نوری ۰/۵۹ رسید و بعد از آن دوباره کاهش پیدا کرد. پس از تاثیر دورهای مختلف انکوباتور شیکر دار در مقدار تولید آنزیم با استفاده از روش اسپکتروفتومتریک نتایج به دست آمده در نمودار ٥ رسم شده است. ایزوله سودوموناس آئروجینوزا انتخابی با افزایش دور انکوباتور فعالیتی رو به کاهش را از خود نشان می‌دهد در نتیجه بیشترین فعالیت را با جذب نوری ۰/٥٥٦ در دور ۱٥۰rpm دارد و کمترین فعالیت با جذب نوری ۰/۳٤ در دور rpm ۱۷۰ دارد.

بحث

در تحقیق حاضر ٤٤ سویه‌ی (۷۳/۳۳ درصد) مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام از ٦۰ سویه بالینی (شامل سودوموناس آئروجینوزا، اسینتو باکتربومانی و اشرشیاکلای) با روش آنتی‌بیوگرام جدا شد. سپس فعالیت آنزیم این ٤٤ سویه‌ی مقاوم با روش اسپکتروفوتومتریک سنجیده شد. در این روش سویه‌های بالینی در مجاورت سفالوسپورین C قرار گرفتند و در صورت وجود آنزیم و شکسته شدن سفالوسپورین C به ۷ – آمینو سفالسپورانیک اسید و در حضور ماده رنگ زا p-DAB با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر و در طول موج ٤۱٥ بررسی شود. آنالیز رشد سلولی و تولید آسیلاز به عنوان تابعی از زمان فرمانتاسیون، نشان دهنده‌ی این است که تولید آسیلاز مرتبط با رشد سلولی می‌باشد. در طی فاز سکون یا اواخر فاز لاگ، سنتز سفالوسپورین آسیلاز به حداکثر میزان خود می‌رسد (۲٤). در تحقیق حاضر مدت زمان گرماگذاری ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرارگرفت و بیشترین مقدار فعالیت آنزیمی در ٤۸ ساعت ثبت گردید که حدودا ۳ برابر فعالیت آنزیم در کشت ۲٤ ساعته بود و پس از آن دوباره فعالیت آنزیم کاهش محسوسی پیدا کرد. در تحقیق کنگ و همکارانش در سال ۲۰۰۰ بیشترین فعالیت آنزیم در سویه‌ی *BY*۲۱ در ۳٦ ساعت به دست آمده است (۲۲). در تحقیق سوناوین و همکارانش در سال ۲۰۰٦ بیشترین فعالیت آنزیم در سویه مورد آزمایش در حدود ٥۰ تا ٦۰ ساعت به دست آمده است (۲٥). فیضی و همکارانش در سال ۲۰۱۲ بیشترین فعالیت آنزیم در سویه سودوموناس غربال شده از خاک در ٤۸ ساعت ثبت کردند (۲٦). سفالوسپورین آسیلازهای گزارش شده در این مبحث از سویه‌های باکتری‌های مزوفیل جداسازی شده‌اند. دمای بهینه دقیق دراکثر سفالوسپورین آسیلازها گزارش نشده است. بیان فعالیت سفالوسپورین آسیلازی نیازمند دمای بین ۲۸ تا ۳۲ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌باشد (۲۷). در تحقیق حاضر مقدار تولید آنزیم در دماهای ۲٥، ۳۰، ۳۷، ٤۲ و ٤٥ درجه‌ی سانتی‌گراد مورد بررسی و آزمایش قرار گرفت. بیشترین مقدار تولید آنزیم در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نشان داده شد. در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد فعالیت آنزیم ۲/٥ برابر در دمای ۲٥ درجه‌ی سانتی‌گراد بود و بعد از دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد مقدار فعالیت آنزیم تا دمای ٤٥ درجه‌ی سانتی‌گراد به شدت کاهش یافت. کنگ و همکارانش در سال ۲۰۰۰ دمای بهینه برای GL-۷-ACA آسیلاز سویه‌ی سودوموناس سپاسیا *BY*۲۱ ٤٥ درجه سانتیگراد گزارش کردند (۲۲). در مطالعه‌ی هیرو و همکارانش در سال ۲۰۰۸ حداکثر فعالیت برای سفالوسپورین آسیلاز سویه‌ی *Alcaligenes xylosoxidans MTCC* ٤۹۱ دمای ٤۰ درجه‌ی سانتی‌گراد گزارش شد (۲۸). فیضی و همکارانش در سال ۲۰۱۲ دمای بهینه برای سفالوسپورین آسیلاز سویه‌ی

www.SID.ir

Archive of SID

سودوموناس ایزوله شده از خاک ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد گزارش کردند (۲۶). سفالوسپورین آسیلازهای سویه‌های مختلف گونه‌های سودوموناس، انواع مختلفی از فعالیت‌ها در طی محدوده وسیعی از pH نشان می‌دهند (۱۶). هسته‌ی سفالوسپورین در محدوده‌ی pH قلیایی ناپایدار است از این رو یک آنزیم آسیلاز با pH بهینه نزدیک خنثی برای فعالیت‌های صنعتی مطلوب است (۲۹). در تحقیق حاضر pH محیط کشت ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داده است که در pH اسیدی تولید آنزیم بسیار ناچیز بود و بیشترین مقدار فعالیت آنزیم در سویه‌ی جدا شده در pH ۸ به‌دست آمد. با افزایش فعالیت آنزیم pH کاهش پیدا کرد. کنگ و همکارانش در سال ۲۰۰۰ pH بهینه برای GL-۷-ACA آسیلاز سویه‌ی *سودوموناس سپاسیا BY۲۱*، ۸ گزارش کردند (۲۲). در مطالعه‌ی هیرو و همکارانش در سال ۲۰۰۸ حداکثر فعالیت برای سفالوسپورین آسیلاز سویه‌ی *Alcaligenes xylosoxidans MTCC ٤٩١* در pH برابر ۸ گزارش شد (۲۸). فیضی و همکارانش در سال ۲۰۱۲، pH بهینه برای سفالوسپورین آسیلاز سویه‌ی سودوموناس ایزوله شده از خاک ۸ گزارش کردند (۲۶). یکی دیگر از عوامل مهم در تولید آنزیم سفالوسپورین آسیلاز میزان اکسیژن محلول در محیط کشت است. با توجه به اینکه میزان حلالیت اکسیژن بسیار محدود است، باید به نحوی میزان بهینه اکسیژن برای هر سویه تعیین و تامین شود. در مجموع میزان هوادهی کم جهت تولید آنزیم لازم است. گزارش‌ها نشان می‌دهد که در مقادیر زیاد اکسیژن تولید آنزیم متوقف می‌شود که این شاید به دلیل پدیده‌ی Shearing Force باشد. میزان مناسب هوادهی را می‌توان با تنظیم دور شیکر و همچنین نسبت فضای خالی ظرف به محیط کشت به‌دست آورد. بدین‌ترتیب در نتیجه تماس محیط کشت با هوا، حلالیت اکسیژن در محیط کشت افزایش می‌یابد. در تحقیق حاضر تاثیر هوادهی محیط کشت با دورهای ۱۵۰ rpm، ۱۶۰ rpm، ۱۷۰ rpm و ۱۸۰ rpm در چهار انکوباتور شیکر دار مجزا برروی فعالیت آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داده است که با افزایش دور انکوباتور سویه‌ی مولد آنزیم فعالیتی رو به کاهش را از خود نشان می‌دهد. در نتیجه سویه‌ی مولد آنزیم بیشترین فعالیت را در دور ۱۵۰ rpm دارد. گزارش‌های کمی در مورد میزان هوادهی محیط کشت در دسترس می‌باشد. فیضی و همکارانش در سال ۲۰۱۲، دور شیکر ۱۵۰rpm در کنار سایر مولفه‌های دما و pH در نظر گرفتند (۲۶).

نتیجه‌گیری

در این تحقیق به نظر می‌رسد که از باکتری‌های بیماری‌زا گرم منفی بررسی شده‌ی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های گروه سفالوسپورین‌ها، سودوموناس آئروجینوزا دارای بیشترین فعالیت آنزیم سفالوسپورین آسیلاز است که با بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم و دستکاری‌های ژنتیکی می‌توان تهدید یک باکتری بیماری‌زا را به یک فرصت تولید آنزیم و تولید آنتی‌بیوتیک‌های نیمه سنتزی سفالوسپورین در صنایع داروسازی تبدیل کرد.

References

1- Kim Y, Hol Wim G. Structure of cephalosporin acylase in complex with glutaryl-7-aminocephalosporanic acid and glutarate: insight into the basis of its substrate specifity. *Chem Biol.* 2001; 8: 1253-1264.

2- Otten G. Directed Evolution of a cephalosporin acylase: changing the substrate specificity of the industrially relevant glutaryl acylase from Pseudomonas SY-77. Riyksuniversiteit Gromingen. 2004; 9-25.

www.SID.ir

Archive of SID

3- Sio C. Mutants and homologs of cephalosporin acylase: for antibiotics and antibiosis. Rijksunversitersitet Groningen. 2004, pp: 11-29.

4- Vinod Kumar, Nigam. Cephalosporin acylases and production of 7-aminocephalosporanic acid. *Res J Biotech.* 2009; 4.

5- Elander RP. Industrial production of b-lactam antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003; 61: 385-392.

6- Zheng G, Li Y, Chen F, Jiang H, Zhao P, Wang D. Two novel engineered bacteria for secretary expression of glutary (-7-Amino cephalosporanic acid acylase. *Biotechnology Letters.* 2001; 23: 1781-1787.

7- Bruggink A, Roos E, de Vroom E. Penicillin acylase in the industrial production of beta lactam antibiotics. Organic Process Research & Development. 1998; 2: 128-133.

8- Bianchi D, Bortolo R, Golini P, Cesti P. Enzymatic transformation of cephalosporin C to ACA by Stimultaneous action of immdoilized D-amino acid oxidase & glutaryl-7-ACA acylase. Appl. *Biochem & Biotech.* 1998; 73: 257-268.

9- Sonawane C, Jolly S, Vohra M. Cephalosporin modification: an extracellular glutaryl-7-ACA acylase from Bacillus sp. *Biotechnology letters.* 1996; 18: 965-968.

10- Garrity GDJ, Brenner NR, Krieg JR. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. Vol. 2: Springer, 2005.

11- Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Twenty-Second informational supplement. Wayne, PA: CLSI, 2012.

12- Shibuya Y, Matsumoto K, Fuji T. Isolation and properties of 7-β-(-4carboxybutanamido) cephalosporanic acid acylase- producing bacteria. *Agricultural & Biological.* 1981; 45: 1501-1567.

13- Balasingham K, Warburton D, Lilly M. The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli. Biochim Acta.* 1972; 276: 250-257.

14- Bomstein J, Evans W. Automated colorimetric determination of 6-aminopenicillanic acid in fermentation media. *Anal Chem.* 1965; 37: 576-578.

15- Patett F, Fischer L. Spectrophotometric assay for quantitative determination C. *Anal Biochem.* 2006; 350: 304-306.

16- Aramori I, Fukagawa M, Tsumura M, et al. Cloning and nucleotide sequencing of a novel 7-β-(-4-carboxybutanamido)cephalosporanic acid acylase gene of *Bacillus laterosporus* and its expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis. J Bacteriol.* 1991; 173: 7848-7855.

17- Lee Y, Park S. Two-step autocatalytic processing of the glutaryl 7-aminocephalosporanic acid acylase from *pseudomonas* sp. Strain GK16. *J Bacteriol.* 1998; 180: 4576-4582.

18- Battistel E, Bianchi D, Bortolo R, Bonoldi L. Purification and stability of glutaryl-7-ACA acylase from Pseudomonas sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 1998; 69: 53-67.

19- Aramori I, Fukagawa M, Tsumura M, et al.

www.SID.ir

Archive of SID

Isolation of soil strains producing new cephalosporin acylase. *J Frement Bioeng.* 1991; 72; 227-231.

20- Kawate S, Fukuo T, Kunito K, Kuwahara Y. Cephalosporin C acylase,Part II. Purification and characterization of the enzyme. *Baiotekunoroji Kenkyu Hokokusho.* 1987; 37: 37-46.

21- Nobbs TJ, Ishii Y, Fujimora T, Saito Y, Niwa M. Chemical modification and site directed mutagenesis of tyrosine residue in cephalosporin C acylase from pseudomonas strain N176. *Ferment Bioeng.* 1994; 77: 604-609.

22- Khang H， Yoo H. Isolation & characterization of a novel soil strain, *Pseudomonas cepacia* BY21, with glutaryl -7-ACA acylase activity. Biotechnology letters. 2000; 22: 317-320.

23- Franzosi G, Battistel E, Gagliardi I, Vander GW. Screening and characterization of micrroorganisms with glutaryl-7-ADCA acylase activity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1995; 43: 508-513.

24- Kim Y, Yoon H, Khang Y, Turley S, Hol J. The 2.A crystal structure of cephalosporin acylase. *Structure.* 2000; 8: 1059-1068.

25- Sonawane C. Enzymatic modifications of cephalosporins by cephalosporin acylase and other enzymes. *Crit Rev Biotechnol.* 2006; 26: 95-120.

26- Feizi H, Farajnia S, Shapouri R, Hemati S, Azimi H. Screening and isolation of cephalosporin acylase enzyme-producing bacteria and optimization of enzyme production process. *Pharmaceutical Sciences.* 2012; 7: 51-60.

27- Binder R, Numata K, Loiws D, Murakami T, Brown J. Isolation and characterization of a pseudomonas strain producing glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase. Appl Environ Microbiol. 1993; 59: 3321-3326.

28- Hirve N, Tingare A, Sharath B, Prabhune A. Media Optimization for the production of cephalosporin C acylase from a novel bacterial source. *Res J Biotech.* 2008; 3: 1-3.

29- Nobbs TJ, Ishii Y, Fujimora T, Saito Y, Niwa M. Chemical modification and site directed mutagenesis of tyrosine residue in cephalosporin C acylase from pseudomonas strain N176. *Ferment Bioteng.* 1994; 77: 604-609.

www.SID.ir

Archive of SID

A Study on Cephalosporin Acylase Enzymes in Some Gram-Negative Bacteria Isolated from Clinical Samples for Producing Cephalosporin Semi-Synthetic Antibiotics in Pharmaceutical Industries

Hosseini F[1], Sepahy A[1], Varghaei M[1]

[1]Tehran Azad University, North Branch, Tehran, Iran.

Corresponding Author: Varghaei M, Tehran Azad University, North Branch, Tehran, Iran

E-mail: ma.varghaei@yahoo.com

Received: 28 Apr 2013 **Accepted:** 24 Sep 2013

Background and Objective: Cephalosporin acylases (CA) are highly specialized peptidases that are able to break down the amide bond between the lactam nucleus and lateral chain without destruction of beta-lactam ring. This enzyme transmutes the cephalosporin C to 7-ACA. The 7-ACA is an important intermediate in synthesizing the semi-synthetic cephalosporin in pharmaceutical industries. The purpose of this study was to screen and optimize the species having maximum amount of production of cephalosporin acylase enzyme isolated from clinical samples among some gram- negative bacteria producing cephalosporin acylase.

***Materials and Methods*:** Out of a total of 60 species gathered from several hospitals in different places of Tehran city, the clinical species such as *Pseudomonas*, *Acintobacter* and *Escherichia* coli were isolated. At first, the resistant species were differentiated by antibiogram method. Then, the activity of enzyme was measured by spectrophotometer. After identification and isolation of the enzyme producing species, the effect of factors such as time, temperature, pH and the amount of aeration of cultivation environment on the amount of enzyme production was investigated.

Results: In this study, among the three groups of bacteria mentioned above, a species of *Pseudomonas aeroginosa* showed a significant cephalosporin acylases activity. Optimum activity for this species regarding the mentioned factors was estimated as follows: pH 8, incubation time 48 h, temperature 37 C and the component of aeration was 150 rpm.

***Conclusion*:** The findings point out that *Pseudomonas* species has a significant cephalosporin acylases activity compared with other species examined in this study. Therefore, this species may have implication for industrial production of the above mentioned enzyme and also can be used in related researches.

Keywords: Cephalosporin acylase, Optimization, Cephalosporin, Cephalosporin -7 - Aminocephalosporanic acid, Pathogenic gram-negative bacteria

www.SID.ir