مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هشتم، شماره بیست و نهم - زمستان ۱۳۹۶

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بهینه‌سازی تولید لینکومایسین توسط *Streptomyces lincolenesis* PTCC 1629 در شرایط آزمایشگاهی

زهرا لزومی*، محمد فائزی قاسمی ، خسرو عیسی زاده

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:44 +0430 on Saturday June 23rd 2018

چکیده

سابقه و هدف: لینکومایسین جزء ترکیب‌های لینکوز آمید می‌باشد که به‌طور معمول دارای ۶ و ۸ دی‌اکسی ۶ آمینو اکتوز لینکوز آمین است. هدف از این مطالعه بهینه سازی تولید لینکومایسین توسط استرپتومیسس لینکولنسیس PTCC 1629 با استفاده از روش کلاسیک یک فاکتور در یک زمان بوده و طراحی آزمایشها بوده است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق ابتدا بهینه سازی منابع کربن و نیتروژن آلی و معدنی توسط روش تغییر یک فاکتور در یک زمان انجام پذیرفت. سپس شرایط بهینه تولید توسط روش طراحی آزمایش‌های انجام گرفت. فعالیت آنتی‌بیوتیکی تولید شده با استفاده از سویه‌های استاندارد انجام شد.

یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده نشان داد که گلوگز و نیترات پتاسیم به‌ترتیب مناسب‌ترین منابع کربن و نیتروژن برای تولید لینکومایسین توسط استرپتومیسس لینکولنسیس PTCC 1629 هستند. باکتری‌های گرم مثبت به لینکومایسین تولید شده توسط استرپتومیسس لینکولنسیس PTCC 1629 حساس‌اند، ولی سویه‌های گرم منفی مورد آزمایش به این آنتی‌بیوتیک مقاوم می‌باشند.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج به‌دست آمده، منبع کربن گلوکز و منبع نیتروژن نیترات پتاسیم در میزان تولید آنتی‌بیوتیک بهترین اثر را دارند، اما سایر منابع کربن و نیتروژن مورد آزمایش اثر مهمی بر میزان تولید نمی‌گذارند.

واژه‌های کلیدی: لینکومایسین، بهینه‌سازی، *Streptomyces lincolenesis* PTCC 1629، یک فاکتور در یک زمان

مقدمه

استرپتومیسس‌ها به‌عنوان مهم‌ترین گروه اکتینومیست‌ها از منابع مهم تولیدکننده متابولیت‌های ثانویه، آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم‌های لیز کننده محسوب می‌شوند. بیش از ۹۰ درصد ترکیب‌های بیولوژیکی فعال از این باکتری‌ها استخراج شده که کاربردهای اساسی در داروسازی، صنعت، کشاورزی و محیط زیست دارند. بیش از ۷۵ درصد استرپتومیسس‌ها قادر به تولید آنتی‌بیوتیک هستند (۳،۱۱). مواد استخراج شده از آن‌ها دارای خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضد انگلی، ضدویروسی و ضدسرطانی هستند (۲۴).

بعضی از آن‌ها خاصیت ضد سرطانی دارند؛ زیرا اثر آن‌ها بیش‌تر روی سلول‌هایی است که در حال تقسیم سریع هستند و به‌همین دلیل باکتری‌ها و سلول‌های مغز استخوان که سازنده گویچه‌های سفید خون و گویچه‌های قرمز خون می‌باشند و هم‌چنین سلول‌های سرطانی در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها حساسیت بیش‌تری دارند (۲۸،۱۳).

لینکومایسین به لحاظ شیمیایی به عنوان عضوی از گروه آنتی‌بیوتیک‌های لینکوزآمید در نظر گرفته می‌شود. یک ویژگی معمول در این مولکول‌های آنتی‌بیوتیکی حضور ۶ و۸- دی دئوکسی-۱-تیو-D- اریترو-D-a- گالاکتواکتوپیرانوزید (با نام

نویسنده مسئول:
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان
پست الکترونیکی: z-lozomi@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۹

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:44 +0430 on Saturday June 23rd 2018

عمومی متیل تیو لینکوزآمید) به یک پیوند آمید با مشتق اسید آمینه ترانس-N- متیل-۴-n- پروپیل-L- پرولین (با نام عمومی اسید پروپیل هیگریک) متصل می‌شود (۱۷،۳۲).

لینکومایسین توسط استرپتومیسس لینکولنسیسکه به دسته اکتینومیست‌ها تعلق دارد و یک گونه جدید از استرپتومیسس‌ها می‌باشد تولید شده و به آسانی در آب حل می‌شود. لینکومایسین از گروه آنتی‌بیوتیک‌های لینکوزآمید می‌باشد که خاصیت باکتریواستاتیکی دارد. این دارو به محل 50S ریبوزوم باکتری‌ها متصل شده و سبب مهار ساخت پروتئین می‌شود.

لینکومایسین تحت عنوان یک آنتی‌بیوتیک مهم برای درمان بیماری‌های ناشی از باکتری‌های گرم مثبت دربیمارستان مورد پذیرش واقع شده است (۷،۱۴).

در این مطالعه بهینه‌سازی آنتی‌بیوتیک لینکومایسین توسط استرپتومیسس لینکولنسیس PTCC 1629 در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پودر لیوفیلیزه‌ی باکتریاسترپتومیسس لینکولنسیس PTCC 1629 از سازمان پژوهش‌های علمی وصنعتی ایران تهیه شد. هر ویال در شرایط استریل شکسته و به محیط تریپتیکاز سوی براث منتقل گردید و پس از فعال‌سازی به مدت ۲ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، از آن‌ها کشت در محیط مایع انجام شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

محیط مورد استفاده جهت رشد اولیه باکتری در این پژوهش محیط کشت جامد نشاسته کازئین آگار[1] و محیط کشت مایع عصاره مخمر- عصاره مالت[2] به منظور افزایش سلول‌های باکتری می‌باشد. محیط جامد به ازای هر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر حاوی ترکیب‌های نشاسته (۱۰ گرم)، کازئین (۰/۳ گرم)، نیترات پتاسیم (۲ گرم)، کلرید سدیم (۲ گرم)، فسفات هیدروژن دی پتاسیم (۲ گرم)، سولفات منیزیوم هفت آبه (۰/۰۵ گرم)، سولفات آهن هفت آبه (۰/۰۱ گرم)، کربنات کلسیم (۰/۰۲ گرم) و پودر آگار (۱۸ گرم) می‌باشد و محیط مایع شامل گلوکز (۲ گرم)، عصاره مخمر (۲ گرم) و عصاره مالت (۵ گرم) می‌باشد.

۱) تهیه منحنی رشد از سویه رشد کرده استرپتومیسس لینکولنسیس: برای شمارش سلولی بعد از تهیه سوسپانسیون سلولی، نمونه روی لام نئوبار ریخته شد و با استفاده از میکروسکوپ نوری و بزرگ‌نمایی مناسب سلول‌ها شمارش شدند. از سوسپانسیون باکتریایی دارای حدود$1/5 \times 10^{7}$ cfu.ml به محیط مایع YEME تلقیح شد و به مدت ۶ روز در شیکر انکوباتور با دور ۱۵۰ rpm و درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. با تعیین وزن خشک باکتری‌ها در هر ۲۴ ساعت منحنی رشد سویه رسم گردید.

۲) سنجش وزن تر و خشک باکتریایی: از سوسپانسیون باکتریایی حدود $1/5 \times 10^{7}$ cfu.ml به محیط مایع YEME تلقیح شد و به مدت ۶ روز در شیکر انکوباتور با دور ۱۵۰rpm و درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. کشت حاصل در دور ۶۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب به‌دست آمده با آب دیونیزه شسته شد و پس از سانتریفیوژ با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱g توزین و میزان بیومس تر سلولی محاسبه شد. برای سنجش وزن خشک سلولی مقدار معینی از بیومس تر به‌وسیله کاغذ صافی از قبل توزین شده و پلیت شیشه‌ای در آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت قرار داده شد. بعد از گذشت زمان مربوطه از اختلاف وزن، وزن خشک بیومس تعیین گردید.

در این تحقیق هم‌چنین از دو محیط دست ساز پیش کشت به ازای ۱۰۰۰ میلی لیتر نشاسته (۲۰ گرم)، گلوکز (۱۰ گرم)، آرد سویا (۱۰ گرم)، عصاره ذرت (۳۰ گرم)، سولفات آمونیوم (۱/۵ گرم) و کربنات کلسیم (۵ گرم) و محیط کشت تولید آنتی-بیوتیک به ازای ۱۰۰۰ میلی‌لیتر گلوکز (۱۰۰ گرم)، آرد سویا (۲۵ گرم)، عصاره ذرت (۲ گرم)، سولفات آمونیوم (۸ گرم)،

[1] Starch Casein Agar (SCA)
[2] Liquid Yeast Extract-Malt Extract (YEME)

فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم (۰/۲ گرم)، نیترات سدیم (۸ گرم)، کلرید سدیم (۵ گرم) و کربنات کلسیم (۸ گرم).

۳) تست آنتی‌بیوگرام سویه‌های استاندارد: برای انجام آنتی‌بیوگرام از کشت ۲۴ ساعته هر باکتری، سوسپانسیون استاندارد معادل نیم مک فارلند تهیه گردید. به این صورت که از کشت ۲۴ ساعته باکتری به لوله حاوی محلول سرم فیزیولوژی استریل اضافه شد تا کدورتی معادل نیم مک فارلند حاصل شود. در این حالت تعداد باکتری $1/5\times10^{8}$ CFU/ml خواهد بود.

برای این تست ابتدا سوسپانسیون نیم مک فارلند از باکتری‌های مورد نظر تهیه شد، سپس با سوآپ استریل از این سوسپانسیون‌های باکتری برروی محیط مولرهینتون آگار کشت سفره‌ای انجام شد. در ادامه دیسک‌های آنتی‌بیوتیک به محیط مولر هینتون آگار آغشته شده به باکتری‌های مورد نظر تلقیح شد و پس از ۱۸ الی ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حساسیت باکتری‌های مورد آزمایش نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت. هاله عدم رشد با خط کش بر حسب میلی‌متر اندازه گیری شد.

آزمون‌های زیستی جهت بررسی خاصیت آنتاگونیستی اکتینومیست‌ها

۱) روش دیسک آگار: در این روش با استفاده از یک چوب پنبه سوراخ کن استریل یک تکه دیسک از کشت خطی اکتینومیست برداشته و روی پلیت حاوی کشت چمنی باکتری مورد نظر قرار داده شد و در صورت وجود خاصیت آنتاگونیستی به‌صورت ناحیه ممانعت از رشد در اطراف دیسک اکتینومیست مشاهده می‌شود.

۲) روش استفاده از دیسک‌های کاغذی: ابتدا یک سری دیسک‌های کاغذی تهیه نموده و بعد از استریل نمودن، آن‌ها را داخل عصاره حاصل از فیلتراسیون کشت مایع اکتینومیست فرو می‌برند. بعد از خشک شدن آن‌ها روی کشت چمنی باکتری قرار شد و در صورت وجود آنتی‌بیوتیک در این دیسک‌ها، ناحیه ممانعت از رشد باکتریدر اطراف آن‌ها مشاهده می‌شود.

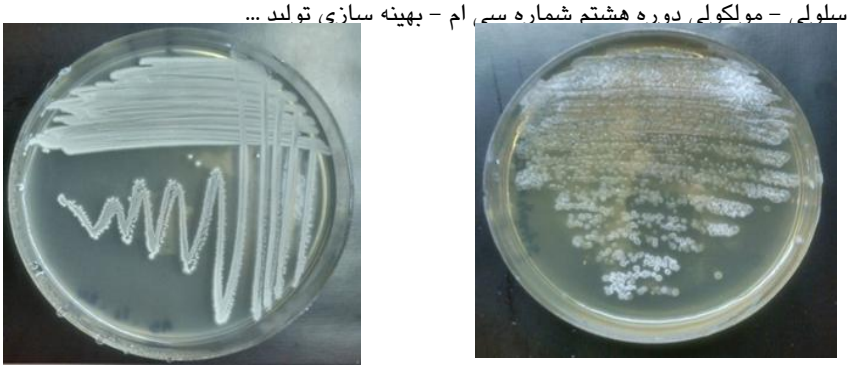
۳) روش انتشار در چاهک: در این روش ابتدا سوسپانسیون نیم مک‌فارلند از باکتری‌های بیماری‌زای مورد آزمایش به‌ترتیب در محیط مولر هینتون براث تهیه شد. سپس باکتری‌ها روی محیط مولر هینتون آگار[1]با سوآپ استریل به‌صورت سفره‌ای کشت داده شد. برای پی بردن به میزان فعالیت ضد میکروبی اکتینومیست‌های موجود در محیط کشت مایع ذکر شده، یک‌سری چاهک‌هایی در شرایط استریل(به اندازه۴×۶ mm) روی محیط‌های ذکر شده که با باکتری‌های مورد آزمایش کشت پرداده شدند، ایجادگردید. سوپرناتانت باکتری مورد نظر در دور ۱۰۰۰۰ rpm به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی[2]کشت مایع اکتینومیست در داخل هر چاهک به میزان ۵۰ میکرولیتر ریخته شد. کشت‌های باکتریایی در دمای۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گشت. خواص ضدمیکروبی با اندازه‌گیری قطر هاله‌های مهاری (برحسب میلی‌متر) هر میکروارگانیسم مورد آزمایش در اطراف چاهک بعد از هرانکوباسیون تعیین شد. هر آزمایش سه بار تکرار گردیده و میانگین قطر هاله‌های مهاری محاسبه گردید. چاهک‌های بلانک بدون محلول رویی به‌عنوان کنترل در نظرگرفته شدند.

یافته‌ها

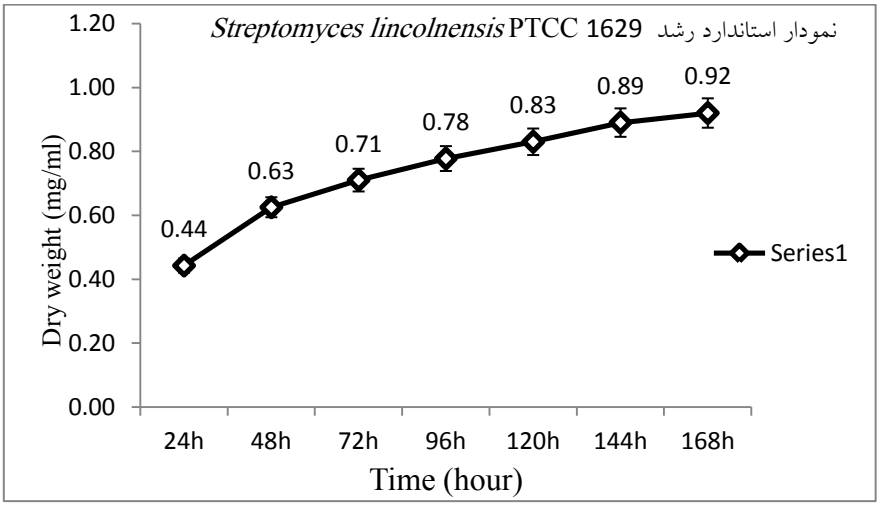
کلنی‌های *S.lincolnensis* در محیط کشت SCA دارای آگار، همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده؛ به‌صورت کلنی‌های کپک مانند به رنگ سفید با ظاهری خشک و گچی مانند است. منحنی رشد استرپتومیسس لینکولنسیس بر اساس وزن خشک در نمودار ۱ نشان داده شده است.

[1]Mueller Hinton Agar
[2] Supernatant

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:44 +0430 on Saturday June 23rd 2018



شکل۱: رشد استرپتومیسس لینکولنسیسدر محیط کشت SCA دارای آگار.



نمودار ۱: منحنی رشد استرپتومیسس لینکولنسیس بر اساس وزن خشک (بررسی در ارلن‌مایر ۵۰ میلی‌لیتری).

قطر هاله عدم رشد در بهینه‌سازی لینکومایسین بر اساس منبع کربن، به‌روش تعیین حساسیت انتشار در چاهک و دیسک بر روی سویه‌های گرم مثبت در جدول ۱ و روی سویه-های گرم منفی در جدول ۲ نشان داده شده است. نمودار بهینه‌سازی لینکومایسین بر اساس منبع کربن، به روش تعیین حساسیت انتشار در چاهک و دیسک بر روی سویه‌های گرم مثبت درنمودار ۲ نشان داده شده است.

جدول۱: اثر لینکومایسین تولید شده در منابع مختلف کربن برروی باکتری‌های گرم مثبت

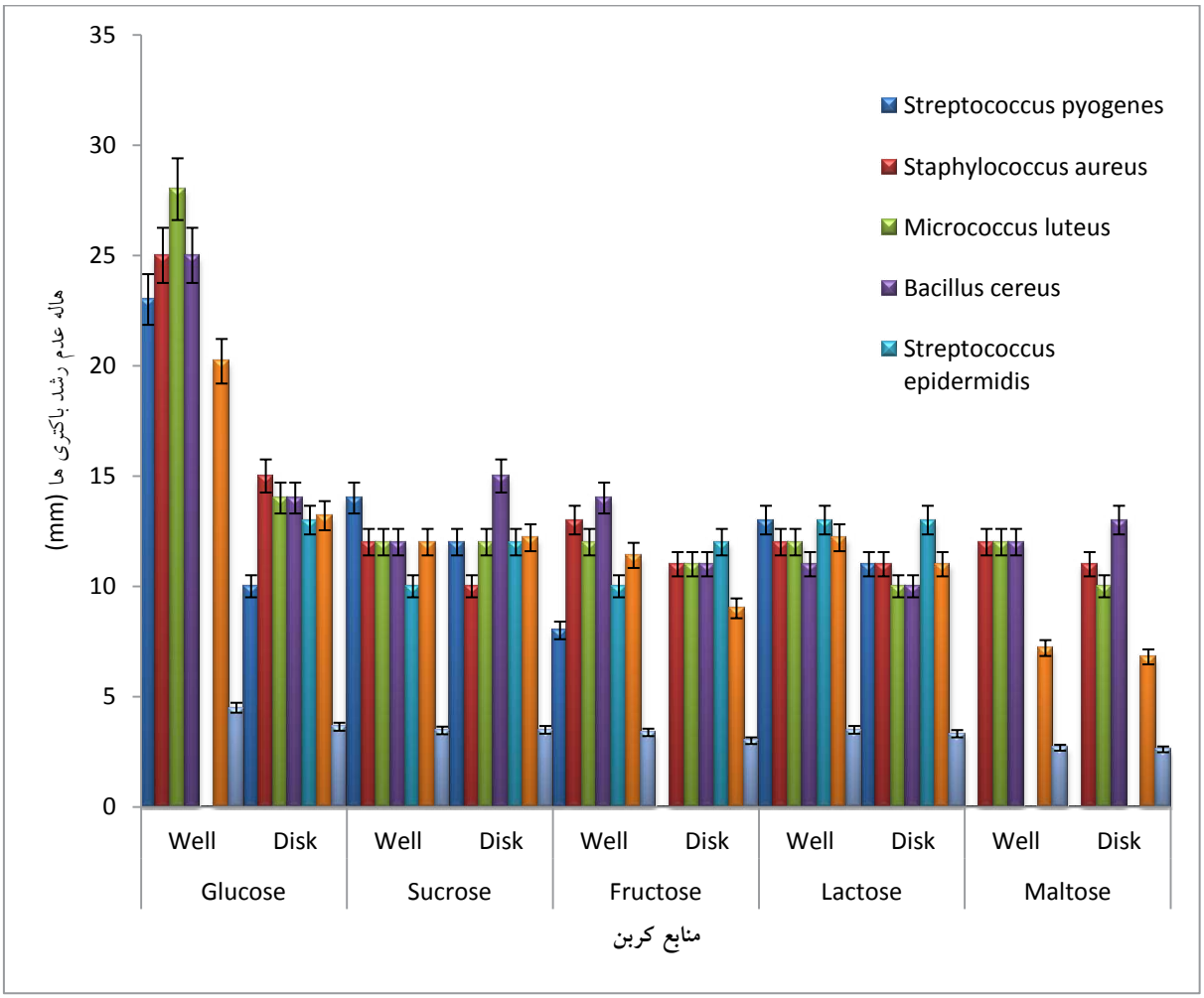
منبع کربن	گلوگز		سوکروز		لاکتوز		مالتوز		فروکتوز	
باکتری	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک
میکروکوکوس لوتئوس	۱۴	۲۸	۱۲	۱۲	۱۰	۱۲	۱۰	۱۲	۱۱	۱۲
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۵	۲۵	۱۰	۱۲	۱۱	۱۲	۱۱	۱۲	۱۱	۱۳
استرپتوکوکوس پایوژنز	۱۰	۲۳	۱۲	۱۴	۱۱	۱۳	۰	۰	۰	۸
استرپتوکوکوساپیدرمایدیس	۱۳	۰	۱۲	۱۰	۱۳	۱۳	۰	۰	۱۲	۱۰
باسیلوس سرئوس	۱۴	۲۵	۱۵	۱۲	۱۰	۱۱	۱۳	۱۲	۱۱	۱۴

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:44 +0430 on Saturday June 23rd 2018

جدول۲: اثر لینکومایسین تولید شده در منابع مختلف کربن برروی باکتری‌های گرم منفی

باکتری	گلوکز		سوکروز		لاکتوز		مالتوز		فروکتوز	
قطر هاله	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک
اشریشیا کلی	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
سالمونلا	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
شیگلا	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-):آنتی بیوتیک لینکومایسین تولید شده بی اثر بود.



نمودار۲: بهینه‌سازی لینکومایسین بر اساس منبع کربن، به روش تعیین حساسیت انتشار در چاهک و دیسک بر روی سویه‌های گرم مثبت.

نتایج هاله عدم رشد بهروش آگار دیسک در باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Micrococcus luteus*، *Escherchia coli*، *Salmonella* و *Shigella* در شکل ۳ نشان داده شده است. هاله عدم رشد در باکتری‌های گرم مثبت شامل *M. luteus* و *S. aureus* مشاهده شد، اما در باکتری-های گرم منفی هاله‌ای مشاهده نشد.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:44 +0430 on Saturday June 23rd 2018

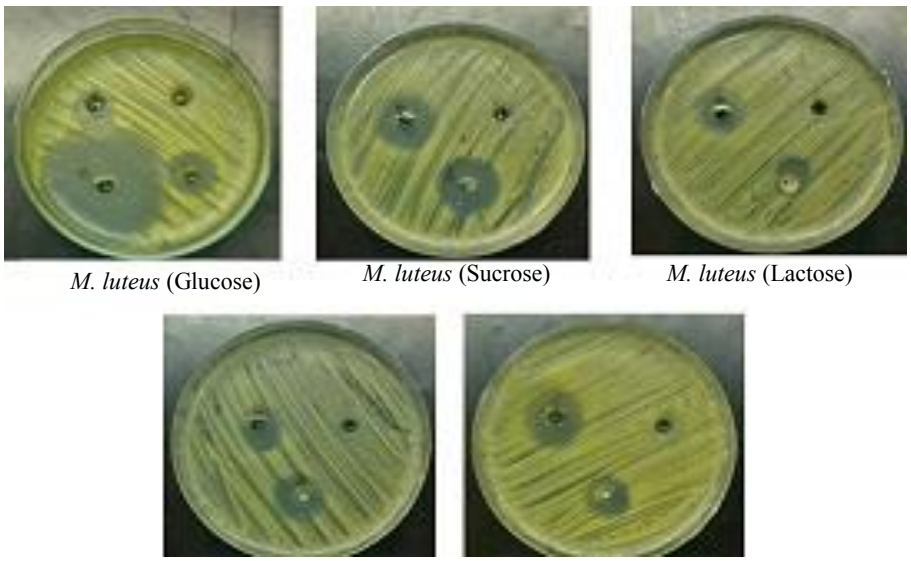
Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:44 +0430 on Saturday June 23rd 2018

S. aureus (Agar disk) *M. luteus* (Agar disk) *E. coli* (Agar disk)

Salmonella(Agar disk) *Shigella* (Agar disk)

شکل-۳:(a) روش آگار دیسک به ترتیب در (بالا، چپ): *Staphylococcus aureus*، (بالا، مرکز): *Micrococcus luteus*، (بالا، راست): *Escherchia coli*، (پایین، چپ): *Salmonella*، (پایین، راست): *Shigella*.

نتایج مربوط به بهینه‌سازی منابع کربنی به روش چاهک در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در شکل‌های ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ و به روش دیسک در شکل ۹ نشان داده شده است. نتایج تست دیسک منبع کربن گلوکز در شکل ۱۰ نشان داده شده است.



M. luteus (Glucose) *M. luteus* (Sucrose) *M. luteus* (Lactose)

M. luteus (Maltose) *M. luteus* (Fructose)

شکل-۴: نتایج مربوط به بهینه سازی منبع کربن در *Micrococcus luteus*

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:44 +0430 on Saturday June 23rd 2018

S. aureus (Glucose)

S. aureus (Sucrose)

S. aureus (Lactose)

S. aureus (Maltose)

S. aureus (Fructose)

شکل-۵: نتایج مربوط به بهینه سازی منبع کربن در *Staphylococcus aureus*

E. coli (Glucose)

E. coli (Sucrose)

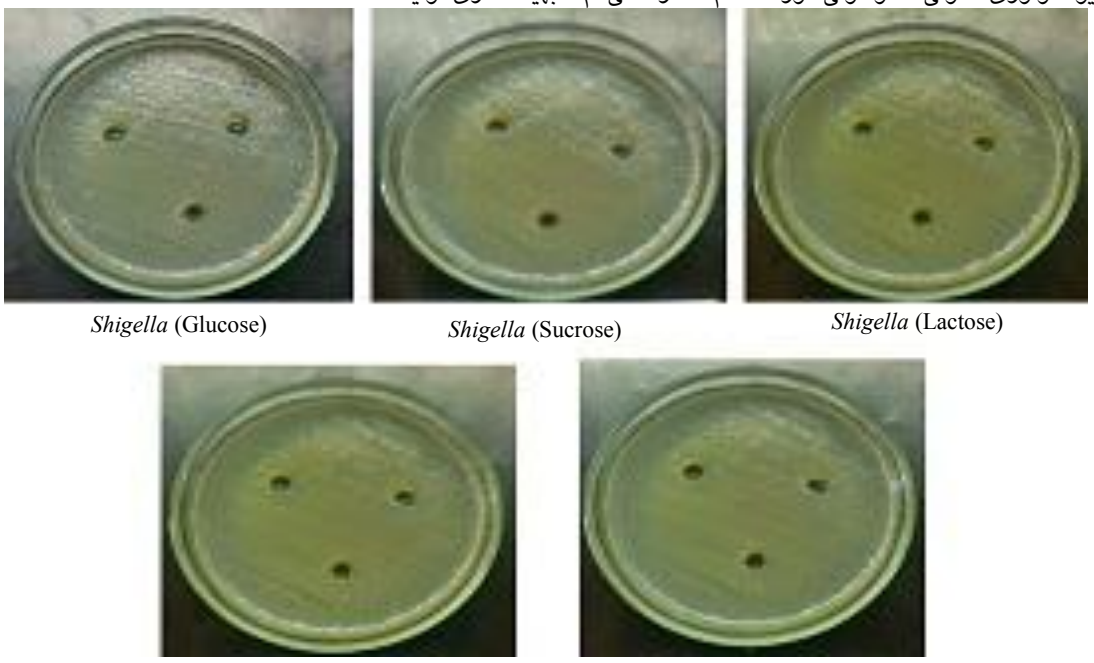
E. coli (Lactose)

E. coli (Maltose)

E. coli (Fructose)

شکل-۶: نتایج مربوط به بهینه سازی منبع کربن در*E. coli*

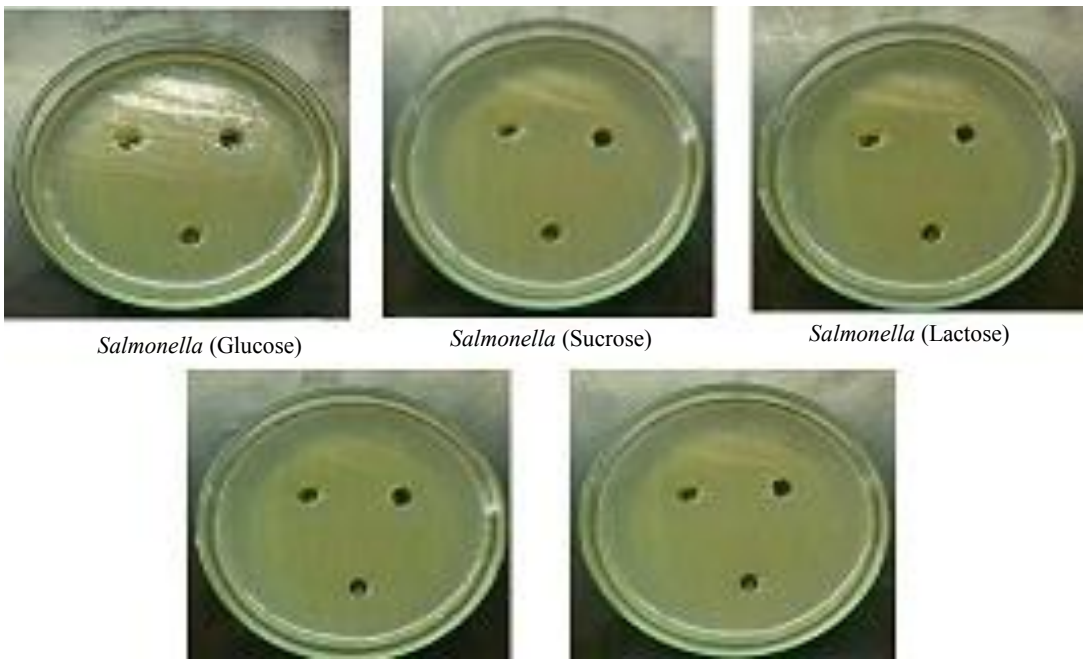
Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:44 +0430 on Saturday June 23rd 2018



Shigella (Glucose) *Shigella* (Sucrose) *Shigella* (Lactose)

Shigella (Maltose) *Shigella* (Fructose)

شکل-۷:نتایج مربوط به بهینه سازی منبع کربن در *Shigella*

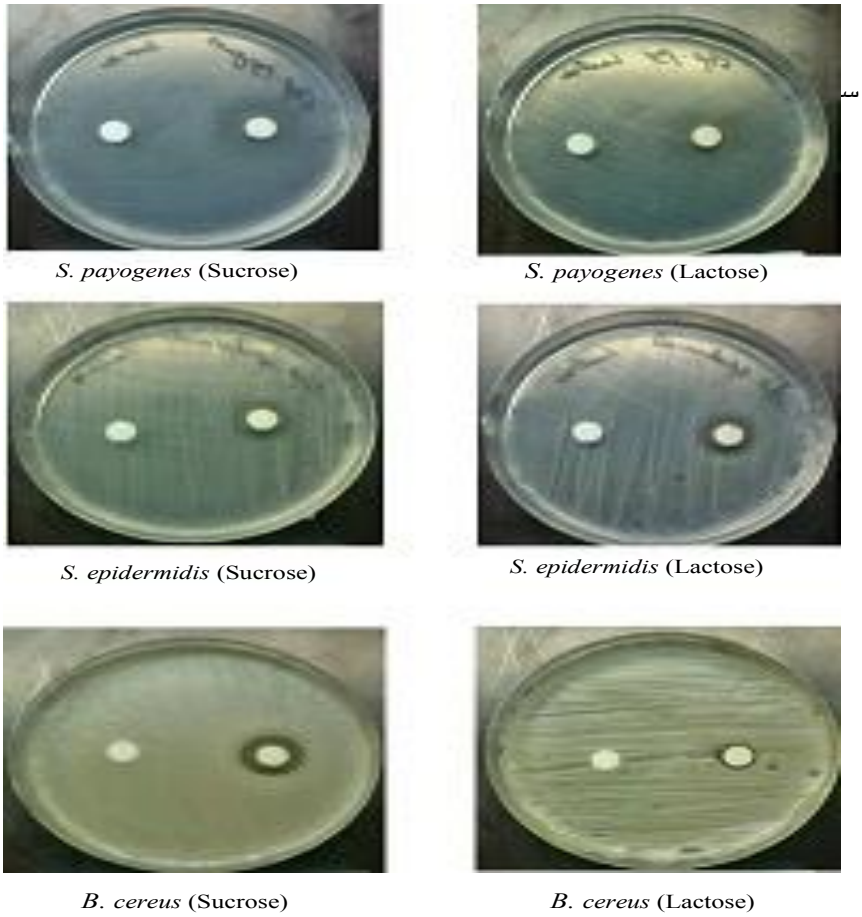


Salmonella (Glucose) *Salmonella* (Sucrose) *Salmonella* (Lactose)

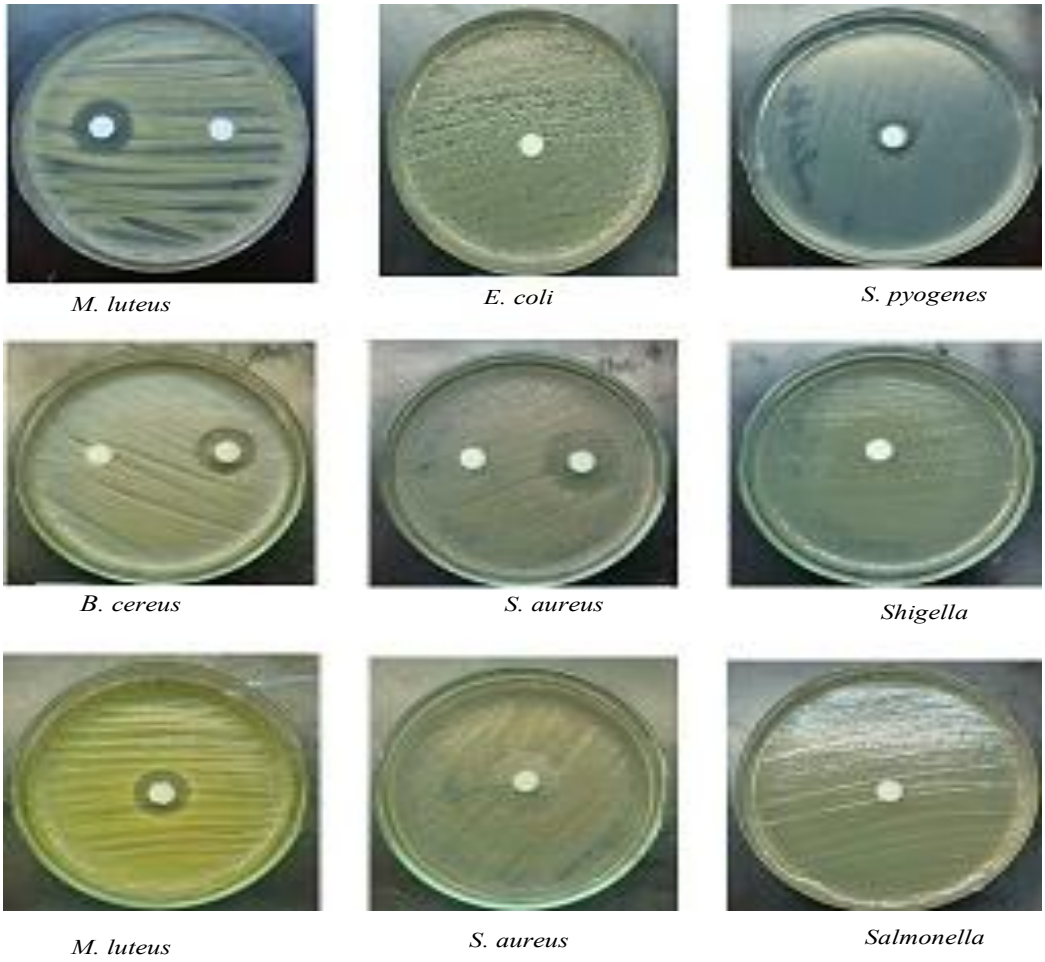
Salmonella (Maltose) *Salmonella* (Fructose)

شکل-۸: نتایج مربوط به بهینه سازی منبع کربن در *Salmonella*

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:44 +0430 on Saturday June 23rd 2018



شکل-۹: نتایج تست دیسک منابع کربنی سوکروز و لاکتوز در باکتری‌های گرم مثبت.



شکل-۱۰: نتایج تست دیسک منابع کربنی گلوکز در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:44 +0430 on Saturday June 23rd 2018

بحث

جنس استرپتومیسس، یکی از باکتری‌های گرم مثبت، فیلامنتوس و از خانواده اکتینومیست‌ها می‌باشد.این باکتری به-عنوان یکی از باکتری‌های بومی خاک مهم‌ترین میکروارگانیسممولد آنتی‌بیوتیک شناخته شده است.امروزه حدود ۷۵ درصد آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده و مورد استفاده در درمان از استرپتومیسس‌ها استخراج شده‌اند و تحقیقات متعدد در این زمینه ادامه دارد (۱،۳).

میکروارگانیسم‌ها بعضی ازترکیب‌های مهم دارویی را که تاکنون گسترش یافته، تولید می‌کنند. آن‌ها منبع درمان‌های نجات بخش برای عفونت‌های باکتری و قارچی هستند. افزایش تعداد، دو برابرسازی و نیاز ضروری برای ساختارهای اصلی جدید در داروشناسی ما را به تحقیق در مورد متابولیت‌ها در مکان‌های طبیعی ویژه که تاکنون دست نخورده بوده وادار می-نماید (۶،۹). توجه ما روی میکروارگانیسم‌های متعلق به خانواده اکتینومیست‌ها به‌ویژه جنس استرپتومیسس‌ها متمرکز شده است. اعضایی که فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی نشان می‌دهند. تخمین زده می‌شود که جنس استرپتومیسس ممکن است حداقل صد هزار ترکیب جدیدبیولوژیکی قابل توجه را تولید نماید (۳۲).

دراین تحقیق از دو محیط پیش کشت و محیط تولید برای تولید آنتی‌بیوتیک استفاده شد. از آن‌جایی که تفاوت این دو محیط فقط در منبع کربن آن‌ها می‌باشد، بنابراین منابع کربن متفاوتی که در محیط‌های مختلف برای تولید آنتی‌بیوتیک توسط اکتینومیست‌ها به کارمی‌رود می‌تواند در نوع و مقدارتولید متابولیت‌های مختلف و در نتیجه فعالیت ضد میکروبی آن‌ها نقش داشته باشد. حساسیت و دقت روش تلقیح نقطه‌ای نسبت به‌روش انتشار چاهک در آگار خیلی کم‌تر می-باشد و در روش غربالگری اولیه ممکن است متابولیت‌های غیر فعال زیستی و مواد سمی هم تولید شوند و باعث از بین رفتن میکروب‌ها گردند، ولی در روش انتشار چاهک در آگار متابولیت تولید شده را سانتریفیوژ نموده و سپس آن وارد چاهک‌ها می-شود که ممکن است هنگام سانتریفیوژ خیلی از ترکیب‌هایی که در روش تلقیح نقطه‌ای تولید می‌شدند در این روش رسوب کنند و در روش انتشار مورد استفاده قرار نگیرند و فعالیت ضد میکروبی نشان ندهند.در اکثر تحقیقات انجام شده فعالیت ضد باکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی بیش‌تر بود. این تفاوت در حساسیت باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نسبت به متابولیت‌های مختلف می‌تواند به تفاوت‌های مورفولوژیکی بین این میکروارگانیسم‌ها مرتبط باشد (۸،۲۹). باکتری‌های گرم منفی یک غشای خارجی پلی-ساکاریدی دارند که دارای ترکیب‌هایی با ساختارلیپوپلی-ساکاریدی هستند و یک دیواره سلولی نفوذ ناپذیر به وجود می‌آورند. اما باکتری‌های گرم مثبت بیش‌تر حساس هستند، چون فقط یک لایه پپتیدوگلیکان خارجی دارند که نمی‌تواند یک مانع مؤثری برای نفوذپذیری متابولیت‌ها باشد (۲۹).

مشخص شده است که لینکومایسین عضوی از دسته جدید آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد، یعنی آنتی‌بیوتیک‌هایی که توسط یک آلکیل ۶-آمینو-۶،۸- دئوکسی -۱-تیو- D-اریترو- α-D-گالاکتو اکتوپیرانوزید شناخته می‌شوند و توسط یک پیوندآمید با یک پرولین پیوند برقرار می‌کنند که فرصتی جدید برای تغییر شیمیایی و میکروبیولوژیکی لینکومایسین می‌باشد (۱۹،۲۰).

یک فرآیند معمول کشت در یک تخمیر کننده انجام می‌شود که این تخمیر کننده با یک سوسپانسیون (اسپور) یا یک کشت گیاهی منجمد تلقیح شده است. در عمل، سلول‌های مربوط به فلاسک‌های در حال تکان دادن به یک تخمیر کننده ۸l انتقال داده می‌شوند و در نهایت به یک تخمیر کننده ۲۵۰lمنتقل می‌شوند. رشد عامل کشت براساس ارزیابی غلظت اسید دی آمینوپیملیک ادامه می‌یابد. ذخیره کافی اکسیژن و نیز دما و pH محیط کشت، نقش مهمی را در تعیین سطوح تولید ایفا می‌کنند. تحت شرایط بهینه گونه وحشی استرپتومیسس لینکولنسیس که توسط Zhang، (۱۹۹۳) استفاده شد، یک ژن جهش‌یافته از *S. lincolnensis NRRL* 2936 می‌باشد که در برابر فاژ مقاوم است و لینکومایسین را

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:44 +0430 on Saturday June 23rd 2018

بیش از حد تولید می‌کند و حدود ۲/۵mg/l لینکومایسین A را ترکیب می‌کند (۱۵).

اولین نسخه که تولید لینکومایسین را تشریح می‌کند توسط Upjohn ثبت شده بود. گونه‌ی تولیدکننده *S. lincolnensis Var.lincolnensis* دارای یک رشد هوایی فشرده و رشد گیاهی زرد رنگ است و ملانین مثبت می‌باشد. زنجیره‌های اسپور منعطف و صاف هستند. خواص رشد آن در محیط بیولوژیکی استاندارد و جذب کربن آن نیز در این نسخه تشریح شده است. فرآیند کشت در یک تخمیرکننده l ۳۸۰ که حاویl ۲۵۰ محیط استریل می‌باشد و به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت، در حالی‌که به میزان HZ ۶/۵ تکان داده شد و در سرعت l۱۰۰ هوا در دقیقه تهویه شد. در پایان فرآیند تخمیر (۱۱۴ ساعت)، میزان l ۲۱۰ کشت مایع از تخمیرکننده به‌دست آمد.

تمام کشت مایع تخمیرکننده با استفاده از۷۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ از pH ۷/۹ به pH ۶/۷ تغییر یافت و تصفیه شد. فیلتر با استفاده از یک دهم حجم آب بر مبنای کل کشت مایع شسته و به مایع تمیز اضافه گردید. این مایع تمیز با استفاده از ۳۰۰ میلی‌لیتر از ۵۹ درصد محلول آبی هیدروکسید سدیم به pH ۱۰ تغییر یافت و با استفاده از یک سوم حجم ۱-بوتانول دو بار عصاره‌گیری شد. عصاره شسته شده‌ی بوتانول به شکل منجمد خشک شد تا در حدود ۱۰۵ گرم فرآورده خشک شده با سنجشbiounits/mg ۱۲۵به‌دست آید. پس از تصفیه‌سازی بیش‌تر، میزان بازدهی در یک میزان خالصیت biounits/mg ۲۳۲، ۳۲ گرم لینکومایسین A بود.

برای تولید لینکومایسین، براساس نسخه کشف شده، اکتینومیست *S. vellosus var.NRRL* 8037 که از خاک آریزونا گرفته شده بود مورد استفاده قرار گرفت. این کشت می‌تواند به‌سادگی از دیگر تولیدکنندگان لینکومایسین بر اساس خواص آن نظیر رنگ، ظاهرکلی، فرآیند کشت و خواص بیوشیمیایی مشخص گردد (۱۱). مهم‌تر این‌که این نژاد بدون تولید هم‌زمان لینکومایسین B، لینکومایسین A را تولید می‌کند. دیگر شاخصه این نژاد، تولید تیترهای مشابه لینکومایسین در دماهای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۴۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. در کنار لینکومایسین، یک آنتی‌بیوتیک بسیار نزدیک و مرتبط از تخمیرهای نژاد استرپتومیسس لینکولنسیسایزوله شده بود. تحقیقات مربوط به ساختار این نژاد نشان داده‌است که این نژاد با لینکومایسین B یعنی اتیل-۴- دی پروپیل-۴´لینکومیسین(4)[1] مرتبط می‌باشد.

لینکومیسین B که تا اوایل سال ۱۹۶۵ به عنوان عضوی کم اهمیت در کشت‌های استرپتومیسس لینکولنسیس توصیف می‌شد، فقط ۲۵ درصد از فعالیت آنتی‌بیوتیکی ارائه شده توسط لینکومایسین A را نشان می‌دهد (۲۲). همان‌طور که در جدول نشان داده شده است، لینکومایسین B در زنجیره کناری اسید پروپیل هیگریک حاوی یک گروه کم‌تر از متیلن می‌باشد.

نتیجه‌گیری

مقالات مختلفی منتشر شده‌اند که روش‌های کاهش میزان لینکومایسین B را در طول فرآیند تخمیر تشریح می‌کنند. افزودن پروپیل پرولین به محیط کشت نشان داده است که میزان لینکومایسینB را کاهش می‌دهد. تصور شده که پروپیل پرولین در لینکومایسین A یک ماده پیش‌نیاز احتمالی از اسید پروپیل هیگریک می‌باشد، درحالی که اتیل پروپیل یک پیش-نیاز همیشگی از اسیداتیل هیگریک در لینکومایسین B می-باشد. اسیدهای آمینه آروماتیک، مثل ال-تیروزین،ال-دی هیدروکسی- فنیل آلانین و دیگر ترکیب‌های مشابه تیروزین در طول کشت نژاد استرپتومیسس لینکولنسیس در لینکومایسین A تزریق می‌شوند. افزودن ال-تیروزین یا ال-دی هیدروکسی-فنیل آلانین که باعث تجمع پروپیل پرولین می‌گردد و با این حال تا حدی کم‌تر، تجمع اتیل پرولین نیز شکل می‌گیرد.

علی‌رغم این حقیقت که مکانیسم مربوط به افزودن پروپیل پرولین یا ال-تیروزین و ترکیبات مشابه هنوز مشخص نشده

[1] 4´-depropyl-4- ethyl

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:44 +0430 on Saturday June 23rd 2018

است (بر بیوسنتز لینکومیسین تأثیر می‌گذارند)، با این حال نتایج به‌دست آمده تا این لحظه نشان می‌دهد که ترکیبات سنتزی N- دی متیل لینکومیسین، یعنی آنزیم‌هایی که پیوند بین اسید آمینه وقند لینکومیسین را کاتالیز می‌کنند، ترجیحاً از پروپیل پرولین استفاده می‌کنند.

تأثیرهای نمک‌های مختلف، نیتروژن و منابع کربنی بر نسبت‌های خاص تولید لینکومیسین در گونه یاسترپتومیسس لینکولنسیس در یک محیط تعیین شده شیمیایی نیز مورد بررسی قرار گرفته است. تأثیرهای غلظت بیوماس، pH و استفاده از منابع کربنی مثل گلوکز و سیترات در تولید لینکومیسین در شکل ۱ نشان داده شده اند. حداکثر تولید لینکومیسین در طول مراحل آخر فرآیند رشد شناسایی می شود.

وقتی منابع کربنی رو به اتمام هستند، فرآیند رشد به سرعت کاهش پیدا می‌کند، در حالی‌که تولید لینکومیسین در بعضی اوقات ثابت باقی می‌ماند. افزودن فسفات‌ها به‌عنوان تنظیم‌کنندگان فیزیولوژیکی تولید لینکومیسین نیز تشریح شده است. حداکثر تولید لینکومیسین در ۳ mM شناسایی شد و در طی غلظت‌های بیش‌تر فسفات میزان تولید به سرعت کاهش پیدا می‌کند، در حالی‌که مقدار جرم سلولی به شکل قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد. عامل بیولوژیکی دیگر یعنی نیتروژن (به شکل نمک‌های آمونیاک) نه تنها بر تولید لینکومیسین تأثیر می‌گذارد بلکه بر میزان رشد نیز اثرگذار است. غلظت مناسب برای تولید لینکومایسین بین۴۰ تا Mm ۲۰۰ متغیر است. به نظر می‌رسد غلظت gr/l ۳۰-۲۰ گلوکز در محیط تعیین شده شیمیایی بهترین منبع کربنی می‌باشد.

میزان اکسیژن آزاد و میزان اکسیژن نامحلول در سیستم‌های فرمانتور که جهت تولید متابولیت‌های ثانویه مانند آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت استفاده می‌شود به‌عنوان فاکتوری مهم در پروسه تولید است. در تحقیقی که در سال۲۰۰۷ Xiao-Bing Li و همکاران انجام شد، بهبود تخمیر صنعتی لینکومایسین به‌وسیله تغذیه فسفربه فرمانتور مورد بررسی قرار گرفت که در نتیجه آن فسفر به‌عنوان یک فاکتور مؤثر در افزایش بیومس در فرمانتور و متعاقب آن تولید بیش‌تر لینکومایسین بیان شده است. علاوه بر آن با افزایش بیومس و فعالیت‌های متابولیسمی میکروارگانیسم شرکت‌کننده در تشکیل بیومس، اکسیژن نامحلول و اکسیژن آزاد نیز تحت بررسی قرار داد. طی این تحقیق نشان داده شد که میزان اکسیژن در دسترس در ابتدا به‌عنوان فاکتور محدود کننده تلقی شده اما با افزایش بیومس موجود در فرمانتور میزان اکسیژن نامحلول فاکتور محدود کننده می‌باشد. بنابراین با افزایش غلظت فسفر به درون فرمانتور، میزان لینکومایسین تولید شده افزایش محسوس دارد. طی نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، مشاهده شد که منبع گلوکز چه در محیط پیش کشت و چه در محیط کشت تولید لینکومایسین به‌عنوان بهترین و در دسترس‌ترین منبع کربن بوده و سویه استرپتومیسس لینکولنسیس PTCC 1629 تحت شرایط اپتیمم محیطی نظیر۷/۲- pH:۶/۸ و دمای۳۰-۲۸ Ċ و هوادهی مناسب، بیش‌ترین مقدار تولید را داراست. با توجه به میزان منابع کربنی و نیتروژنی موجود در محیط‌های پیش کشت و تولید لینکومایسین، ده برابر شدن میزان گلوکز مشاهده می‌شود. در واقع میزان گلوکز افزوده شده از ۱۰ گرم به ازای هر لیتر در محیط پیش کشت به ۱۰۰ گرم به ازای هر لیتر در محیط کشت تولید، می‌تواند دال بر این موضوع باشد که افزایش غلظت گلوکز موجود در محیط کشت تولید باعث افزایش بیومس موجود در محیط کشت تولید لینکومایسین شده که رابطه مستقیم با افزایش مقدار اکسیژن در دسترس و هم‌چنین تولید لینکومایسین دارد. علاوه‌براین در محیط پیش کشت مقدار ترکیب مکمل فسفردارشده مانند KH_2PO_4 نیز از مقدار ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر لیتر در محیط پیش کشت به ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر لیتر در محیط کشت تولید لینکومایسین افزایش داده شد؛ که این نیز دلیلی بر افزایش مقدار تولید لینکومایسین مطابق با یافته‌های Xiao-Bing Li می‌باشد.

جهت رفع محدودیت اکسیژن، حرکت‌های ارتعاشی و لرزشی در بررسی Li و همکاران نیز پیشنهاد شده است؛ که در این بررسی نیز محیط‌های کشت پیش کشت و تولید تحت تأثیر حرکات دورانی قرار گرفت و تا حدودی از میزان مهاری این اکسیژن نامحلول کاسته شد و تمام این شرایط به مصرف بیش‌تر منابع نیتروژن و کربن و رشد بیش‌تر استرپتومیسس لینکولنسیس در مرحله رشد منجر شد و در نتیجه زمان برای تجمع غلظت بالای بیومس کاسته می‌شود. از طرفی متابولیسم بقا و متابولیسم ثانویه این آنتی‌بیوتیک تحت موازنه ثابت‌تری خواهد بود، بر همین اساس تولید بهینه لینکومایسین در مرحله تولیدی تخمیر بیش‌تر می‌شود.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:44 +0430 on Saturday June 23rd 2018

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:44 +0430 on Saturday June 23rd 2018

منابع

۱. امتیازی گ. میکروبیولوژی خاک. انتشارات مانی، اصفهان، ۱۳۸۶، صفحه ۱۸.

۲. امامی م، کچوئی ر، بابایی غ، گرامی شعار م. بررسی و جداسازی اکتینومیست‌های هوازی از خاک ۱۶ شهرستان استان اصفهان. *مجله قارچشناسی*، ۱۳۷۷، دوره دهم، صفحات ۱-۵.

۳. بابایی ن. بررسی خواص ضدمیکروبی استرپتومیسس‌ها و قارچهای جداشده از خاک‌های جنگل آمل و مناطق بیابانی کهریزک و حسن آباد خالصه.*پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی*، ۱۳۸۷، شماره ۷۹، صفحات ۱۲۴ - ۱۱۹.

۴. بشارتیح، فلاحع. وخسرویه.میکروبیولوژی خاک.تهران،آییژ،۱۳۸۴،صفحات ۹۳-۸۰.

۵. سلامی ف. جداسازی مواد آنتی‌باکتریال از استرپتومیسس‌های بومی ایران.*پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان*. پاییز ۱۳۸۳،شماره ۶۴، صفحات ۴۷-۴۱.

۶. لکزیان ا، شیبانی س، بهادران م. میکروبیولوژی خاک. انتشارات سخن گستر مشهد، ۱۳۸۴، صفحات ۱۴۸-۱۳۷.

۷. نوحی ا. میکروبیولوژی خاک. انتشارات امید تهران،۱۳۸۳، صفحات ۸۴-۷۳.

8. Atta H. An Antifungal Agent Produced by Streptomyces olivaceiscleroticus, AZ-SH514. *World Applied Sciences Journal, 2009;6*, 1495-1505.
9. Baniasadi F. Biological control of Sclerotinia sclerotiorum, by use of soil actinomycetes isolates.*American Journal of Agricultural and Biological Sciences,2009;4*, 146-151.
10. Berdy J. Bioactive microbial metabolites: a personal view. *J Antibiot,2005;58*(1) 1-26.
11. Bibb M. Regulation of secondary metabolism in Streptomycetes. *Curr Opin Microbiol,2005;8*, 208-215.
12. Boone R, Castenholtz R & Garrity G. Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer-Verlag. New York, Berlin Heidelberg,2001; 1**,** 163-164.
13. Chattway M, Dallman T, Okeke I & Wain J. Enteroaggregative *E. coli* O104 from an outbreak of HUS in Germany 2011, could it happen again? *J Infect Dev Ctries,*2011; *5*, 425-436.
14. Gebreyohannes G, Moges F, Sahile S & Raja N. Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pac J Trop Biomed, 2013; 3*, 426–435.
15. Gray W & Jacobs F. Penicillin: the first miracle drug. *Journal of Drug,2003;* 396-390.
16. Horn S, Vaaje-Kolstad G, Westereng B & Eijsink V. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels,2012; 5*, 1-12.
17. Kumar P, Preetam RA. J, Duraipandiyan V& Ignacimuthu S. Antibacterial activity of some actinomycetes from Tamil Nadu, India. *Asian Pac J Trop Biomed,2012; 2*, 936-943.
18. Li X, ZhangJ, Tan Y. L, Li ZH, Yu X. F, XiaJY, ChuJ & Ge YQ. Effects of flow field on the metabolic characteristics of Streptomyces lincolnensis in the industrial fermentation of lincomycin. *Journal of Bioscience and Bioengineering,2013; 115* (1), 27-31.
19. Locci R. *Streptomyces* and related genera. Bergeys manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkns Company,1989; 23.2508-44.
20. MaierA, Riedlinger J, Fiedler HP& Hampp R. Actinomycetales bacteria from a spruce stand:characterization and effects on growth of root symbiotioc and plant parasitic soil fungi in dual culture. Morphological and biochemical studies microbiological Reserch,2004; 3(2):129-136.
21. Mamseong ch, choi JI & Baik k. An Improved selective Isolation of are Actinomycetes from foreest soil. The Journel of Microbiology, 2012; 39, 17-23.
22. Mann J. Natural products as immunosuppressive agents. NatProd Rep, 2001; 18, 417-430.
23. Mellouli L. Isolation,Purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain.*Research in Microbiology, 2003; 154***,** 345-352.
24. Miyadoh S. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade.*Actinomycetologica,1993; 9***,**100-106.
25. Mokrane S, Bouras N, Sabaou N & Mathieu F. Actinomycetes from saline and non-saline soils of Saharan palm groves: Taxonomy, ecology and antagonistic properties. *African Journal of Microbiology Research,*2013; *7***,** 2167-2178.
26. NonohJ, Lwande W, Masiga D, Herrmann R, PresnailJ, Schepers E, OkechM, Bagine, R, Mungai P, BernardnyendeA & Boga H. Isolation and characterization of Streptomyces species with antifungal activity from selected national parks in Kenya. *African Journal of Microbiology Research,2010; 4***,** 856-864.
27. OskayM, UsameA, AzeriT & Azeri C. Antibacterial activity of some Actinomycetes isolated from farming Soils of Turky**.** *AfricanJornal of Biotecnology*, 2004; *3*:441- 446.

28. PelczarJ, Chan E & Krieg NR. Microbiology, concepts and applications. *McGraw raw-Hill, Inc: NewYork*,1993; 557-581.
29. Pimenta-Rodrigues MV, Fusco-Almeda AM, Bertoni, BW. Assesment of genetic relationship between klebsiella pneumonia and klebsiella oxytoca samples isolated from a dental office. *J. venom. Anim. Toxinsincl. trop. Dis,2008; 14*, 703-718.
30. RahmansyahM, Agustiyani D, Julistiono H & Dewi T. Groeth and adaptation of four Streptomyces isolates in the media containing propoxur.*ARPN Journal of Agricultural and Biological Science,2012; 7, 773-781.*
31. Redenbach M & Spatz K. Characterization of the streptomyces violaceoruber SANK 95570 plasmids pSV1 andpSV2. *Microbial Letters,*2002; *213*, 87-92.
32. Verdier L, Bertho G, Gharbi-Benarous J& Girault JP. Lincomycin and Clindamycin Conformations. A Fragment Shared by Macrolides, Ketolides and Lincosamides Determined from TRNOE Ribosome-Bound Conformations. *Bioorganic & Medicinal Chemistry,2000; 8*, 1225-1243.
33. Verghess& MisraAK.Frankia-Actinorhizal symbiosis with special reference to host-microsymbiont relationship,2002; *83*, 404-408.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:44 +0430 on Saturday June 23rd 2018

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:44 +0430 on Saturday June 23rd 2018