مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هفتم، شماره بیست و ششم - بهار ۱۳۹۶

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بهینه‌سازی تولید لینکومایسین توسط *Streptomyces lincolenesis* PTCC 1629

محمد فائزی قاسمی*، زهرا لزومی ، خسرو عیسی زاده

گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، ایران،

چکیده

سابقه و هدف : لینکومایسین جزء ترکیب‌های لینکوز آمید می‌باشد. هدف از این مطالعه بهینه سازی تولید و اثر ضد میکروبی لینکومایسین استرپتومیسس لینکولنسیس PTCC 1629 با استفاده از روش تغییر یک فاکتور در یک زمان بوده است.

مواد و روش‌ها: ابتدا بهینه سازی منابع کربن و نیتروژن آلی و معدنی شامل گلوکز، سوکروز، لاکتوز، مالتوز، فروکتوز، نیترات پتاسیم، نیترات سدیم، سولفات آمونیوم، فسفات دی هیدروژن پتاسیم، کلریدسدیم ،کربنات کلسیم، توسط روش تغییر یک فاکتور در یک زمان انجام و سپس فعالیت ضدمیکروبی آنتی بیوتیک تولید شده بر علیه تعدادی از باکتری‌های شاخص بررسی گردید.

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

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نشان داد که گلوکز چه در محیط پیش کشت و چه در محیط کشت تولید لینکومایسین به عنوان بهترین و در دسترس‌ترین منبع کربن بوده و سویه استرپتومیسس لینکولنسیس PTCC 1629 تحت شرایط اپتیمم محیطی نظیر pH۶/۸ -۷/۲ و دمای °C ۳۰-۲۸ و هوادهی مناسب، بیش‌ترین مقدار تولید را دارا است

واژه‌های کلیدی: لینکومایسین، بهینه‌سازی، استرپتومیسس لینکولنسیس PTCC 1629، تغییر یک فاکتور در یک زمان

مقدمه:

استرپتومیسس‌ها به عنوان مهم‌ترین گروه اکتینومیست‌ها از منابع مهم تولید کننده متابولیت‌های ثانویه، آنتی بیوتیک‌ها 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 (۲). مواد استخراج شده از آن‌ها دارای خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد انگلی، ضد ویروسی و ضدسرطانی هستند (۶). بعضی از آن‌ها خاصیت ضد سرطانی دارند؛ زیرا اثر آن‌ها بیش‌تر روی سلول‌هایی است که در حال تقسیم سریع هستند و به همین 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(۷). لینکومایسین به لحاظ شیمیایی به عنوان عضوی از گروه آنتی‌بیوتیک‌های لینکوزآمید در نظر گرفته می‌شود. یک ویژگی معمول در این مولکول‌های آنتی‌بیوتیکی حضور ۶ و ۸- دی دئوکسی-۱-تیو-D- اریترو-D-a- گالاکتو اکتوپیرانوزید (با نام 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 (۹, ۸). ساختمان لینکومایسین توسط Hoeksema و همکاران با تجزیه شیمیایی و مطالعه NMR بررسی گردیده است و مشخص گردیده است که لینکومایسین دارای آمینو اسیدهای غیر معمول مشتق پرولین است (۴). گزارش‌های اولیه نشان داد که لینکومایسین فعالیت خوب ضد میکروبی در برابر باکتری-های گرم مثبت دارد ولی برای درمان بیماری‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های گرم مثبت مورد قبول واقع شده است (۴). از آنجائی که اطلاعات زیادی در زمینه بهینه سازی و اثر

نویسنده مسئول:
گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، ایران،
پست الکترونیکی: faezi_m@yahoo.com
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۱۰/۱۷
تاریخ پذیرش : ۱۳۹۴/۱۱/۲۱

فاکتورهای مختلف غذایی و محیط کشت بر روی تولید این آنتی‌بیوتیک وجود ندارد. هدف از این مطالعه بهینه سازی تولید و اثر ضد میکروبی لینکومایسین استرپتومیسس لینکولنسیس PTCC 1629 با استفاده از روش تغییر یک فاکتور در یک زمان بوده است.

مواد و روش‌ها: استرپتومیسس لینکولنسیس PTCC 1629 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. هر ویال در شرایط استریل شکسته و به محیط تریپتیکاز سوی براث منتقل گردید. محیط مورد استفاده جهت رشد اولیه باکتری در این پژوهش محیط کشت جامد نشاسته کازئین آگار و محیط کشت مایع عصاره مخمر- عصاره مالت به منظور افزایش سلول‌های باکتری می‌باشد. محیط جامد به ازای هر ۱۰۰۰ میلی لیتر 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) می باشد و محیط مایع شامل گلوکز (۲ گرم)، عصاره مخمر (۲ گرم) و عصاره مالت (۵ گرم) می باشد.

رسم منحنی رشد

جهت رسم منحنی رشد استرپتومیسس لینکولنسیس از سوسپانسیون اسپور $۱/۵ \times ۱۰^{۷}$ واحد تشکیل دهنده کلنی (CFU/ml) به محیط کشت مایع(Yeast extract- YEME Malt extract) تلقیح شد. انکوباسیون در ۳۰ درجه سانتی-گراد با دورrpm ۱۵۰ به مدت ۶ روز انجام پذیرفت. منحنی رشد با تعیین وزن تر و خشک سلول‌ها هر ۲۴ ساعت منحنی رسم گردید. جهت تعیین وزن خشک سلول ها در ۶۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب به دست آمده با آب دیونیزه شسته شد و پس از سانتریفیوژ میزان بیومس‌تر سلولی محاسبه شد. برای سنجش وزن خشک سلولی مقدار معینی از بیومس‌تر به وسیله کاغذ صافی از قبل توزین شده و در پلیت شیشه‌ای در آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت تا خشک شدن کامل قرار داده شد.

تعیین حساسیت ضد میکروبی با آنتی بیوتیک های استاندارد : برای تعیین حساسیت ضد میکروبی از کشت ۲۴ ساعته هر سویه‌های استاندارد، سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند تهیه گردید و سپس با سوآپ استریل از این سوسپانسیون‌ها بر روی محیط مولرهینتون آگار کشت سفره‌ای انجام شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک روی محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل شد. انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام پذیرفت و هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه گیری شد. سویه‌های مورد استفاده گرم مثبت و گرم منفی به ترتیب ذیل بودند. *Micrococcus luteus* PTCC 1408، *Staphyloccus aureus* PTCC1113، *Streptococcus pyogenes* PTCC 1447، *Staphyloccus epidermidis* PTCC 1436، *Bacillus cereus* PTCC 1396، *Escherichia coli* PTCC 1230، *Salmonella enterica* PTCC 1188، *Shigella dysenteriae*.

ارزیابی خاصیت ضد میکروبی *Streptomyces lincolenesis* PTCC 1629

روش آگار دیسک[1]: با استفاده از یک چوب پنبه سوراخ کن استریل یک تکه از کشت خطی استرپتومیسس را برداشته و روی پلیت حاوی کشت باکتری هدف قرار گرفت. وجود خاصیت ضد میکروبی به صورت ناحیه ممانعت از رشد در اطراف دیسک مشاهده گردید.

روش دیسک کاغذی: دیسک‌های کاغذی استریل باعصاره حاصل از فیلتراسیون کشت استرپتومیسس لینکولنسیس آغشته شد. بعد از خشک شدن آن‌ها را روی کشت باکتری-های هدف قرار گرفت. وجود خاصیت ضد میکروبی به صورت ناحیه ممانعت از رشد در اطراف دیسک مشاهده گردید.

روش انتشار در چاهک: سوسپانسیون معادل نیم مک‌فارلند از باکتری‌های هدف در محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شد. و در محیط مولر هینتون آگار[2] با سوآپ استریل به صورت سفره‌ای کشت داده شد. برای تعیین فعالیت ضد میکروبی چاهک‌هایی (به اندازه‌ی ۴×۶ mm) روی محیط مولر هینتون آگار حفر شد. سوپرناتانت مایع کشت استرپتومیسس لینکولنسیس در دور ۱۰۰۰۰rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ و سپس محلول رویی[3] در داخل هر چاهک به میزان ۵۰ میکرولیتر ریخته شد. انکوباسیون در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ انجام پذیرفت. خواص ضدمیکروبی با اندازه‌گیری قطر هاله‌های مهاری (بر حسب میلی‌متر) هر میکروارگانیسم مورد آزمایش در اطراف چاهک تعیین شد. هر آزمایش سه بار تکرار و میانگین قطر هاله‌های مهاری محاسبه گردید.

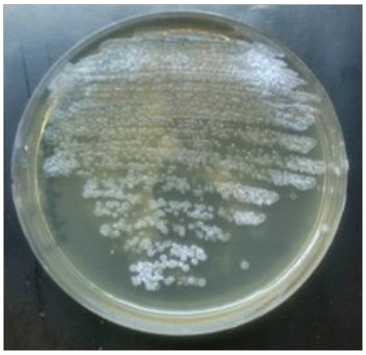
1 Agar disk method
2 Mueller Hinton Agar
3 Supernatant

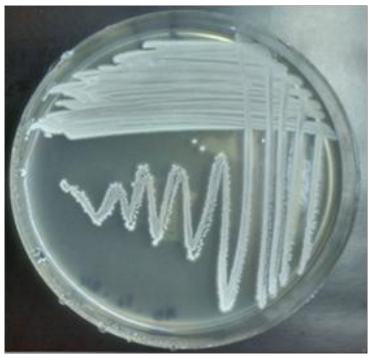
بهینه سازی منابع کربنی ونیتروژنی

روش تغییر یک فاکتور در یک زمان (One-factor-at-a-time-method) جهت بهینه سازی تولید لینکومایسین توسط استرپتومیسس لینکولنسیس استفاده شد. در این روش همه فاکتورهای محیط کشت ثابت مانده و فقط منبع کربن تغییر می کند. منابع کربنی مورد استفاده شامل گلوکز، سوکروز، لاکتوز، مالتوز و فروکتوز بودند. همه منابع در غلظت ۲ گرم در لیتر استفاده شدند. اثر ممانعت کنندگی از رشد با روش‌های دیسک کاغذی و انتشار در چاه با اندازه‌گیری قطر هاله‌های مهاری (بر حسب میلی‌متر) تعیین گردید. منابع نیتروژنی شامل نیترات پتاسیم، نیترات سدیم، سولفات آمونیوم، فسفات دی هیدروژن پتاسیم، کلریدسدیم ،کربنات کلسیم بودند همه منابع در غلظت ۲ گرم در لیتر استفاده شدند.

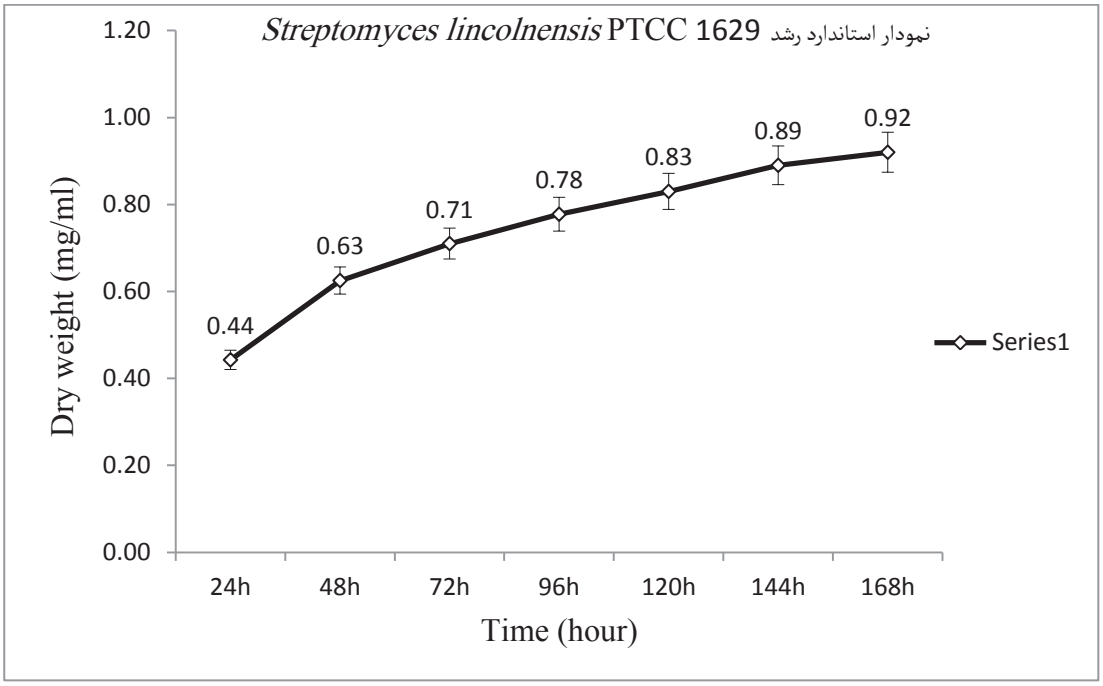
نتایج

کلنی‌های رشد کرده استرپتومیسس لینکولنسیس در محیط کشت Starch Casein Agar.





شکل ۱: رشد استرپتومیسس لینکولنسیس در محیط کشت Starch Casein Agar(SCA)



نمودار ۱: منحنی رشد استرپتومیسس لینکولنسیس

قطر هاله عدم رشد در بهینه سازی تولید لینکومایسین بر اساس منبع کربن، به روش تعیین حساسیت انتشار در چاهک و دیسک بر روی باکتری‌های گرم مثبت وگرم منفی در جداول۱ و ۲ نشان داده شده است. بهینه تولید لینکومایسین بر اساس منبع کربن، به روش تعیین حساسیت انتشار در چاهک و دیسک بر روی باکتری‌های گرم مثبت درنمودار ۲ نشان داده شده است. همان‌طوری که در جدول ۱ نشان داده شده است بیش‌ترین اثر روی کوکسی‌های گرم مثبت

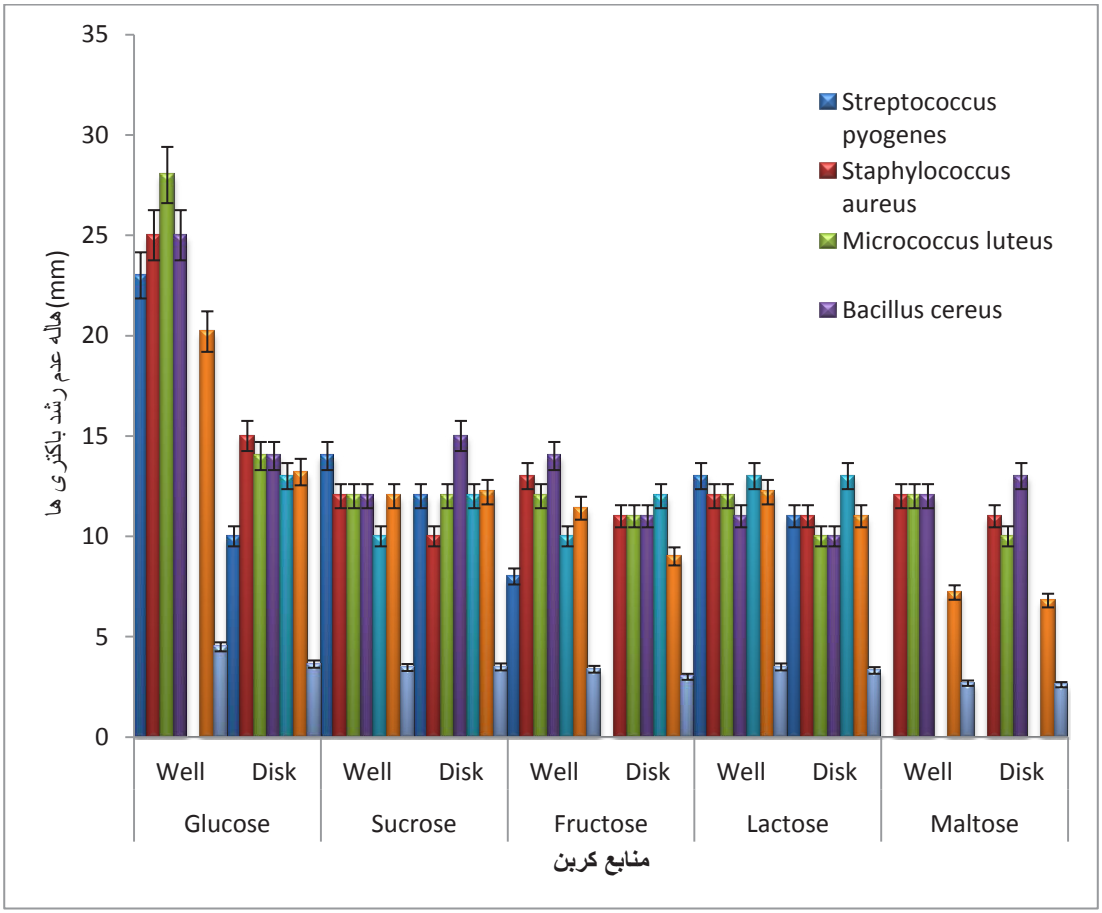
میکروکوکوس لوتئوس استافیلوکوکوس اورئوس دیده می شود. این اثر در روش چاهک بیش‌تر و مؤثرتر است. همان‌طوری که در جدول ۲ دیده می‌شود لینکومایسین تولید شده توسط این استرپتومیسس تأثیری روی باکتری‌های گرم منفی ندارد.

جدول ۱: اثر لینکومایسین تولید شده در منابع مختلف کربن بر روی باکتری‌های گرم مثبت(اعداد برحسب میلی متر)

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
استرپتوکوکوس اپیدرمایدیس	۱۳	۰	۱۲	۱۰	۱۳	۱۳	۰	۰	۱۲	۱۰
باسیلوس سرئوس	۱۴	۲۵	۱۵	۱۲	۱۰	۱۱	۱۳	۱۲	۱۱	۱۴

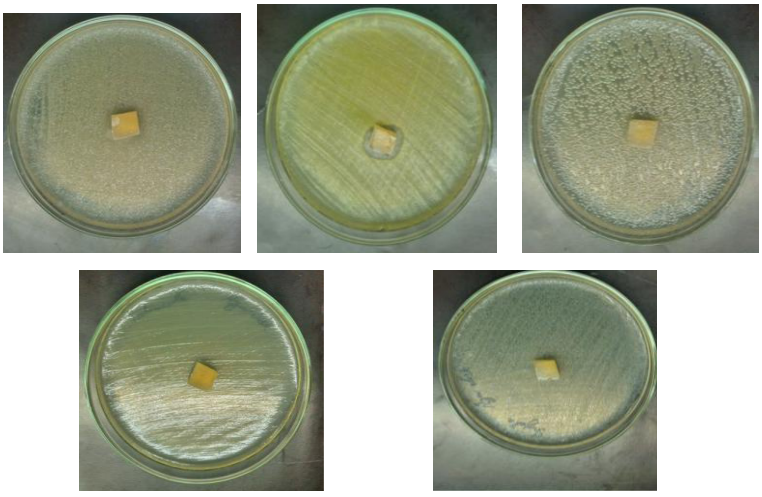
جدول ۲: اثر لینکومایسین تولید شده در منابع مختلف کربن بر روی باکتری‌های گرم منفی

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



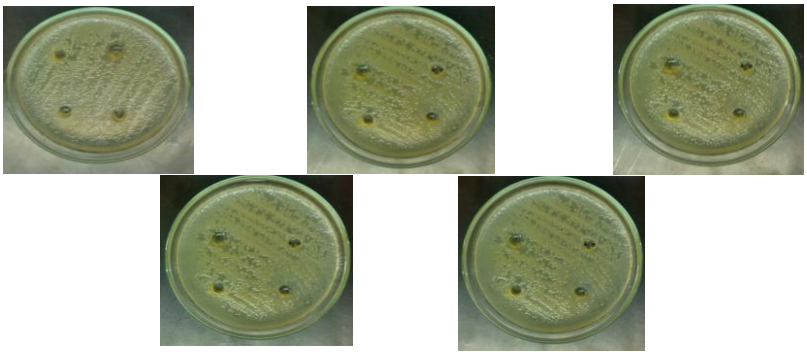
نمودار ۲: بهینه سازی لینکومایسین بر اساس منبع کربن، به روش تعیین حساسیت انتشار در چاهک و دیسک بر روی سویه‌های گرم مثبت

نتایج هاله عدم رشد به روش آگار دیسک در باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Micrococcus luteus*، *Escherchia coli*، *Salmonella* و *Shigella* در شکل ۲ نشان داده شده است. هاله عدم رشد در باکتری‌های گرم مثبت شامل *M. luteus* و *S. aureus* مشاهده شد، اما در باکتری‌های گرم منفی هاله‌ای مشاهده نشد.

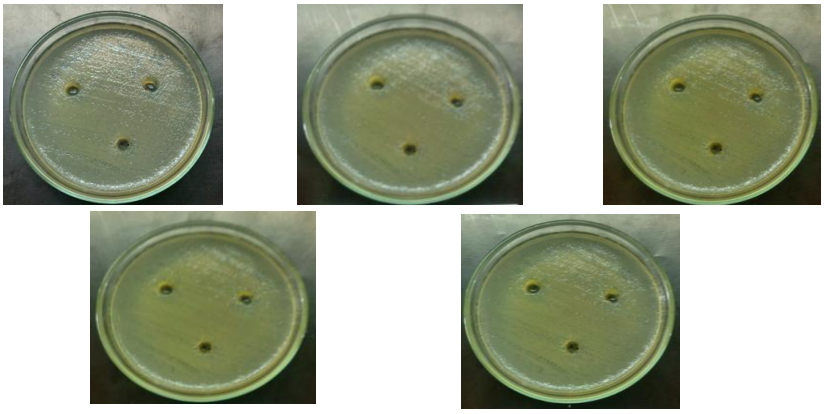


شکل۲: (a) روش آگار دیسک به ترتیب در (بالا، چپ): *Staphylococcus aureus*، (بالا، مرکز): *Micrococcus luteus*، (بالا، راست): *Escherchia coli*، (پایین، چپ): *Salmonella* ، (پایین، راست): *Shigella*

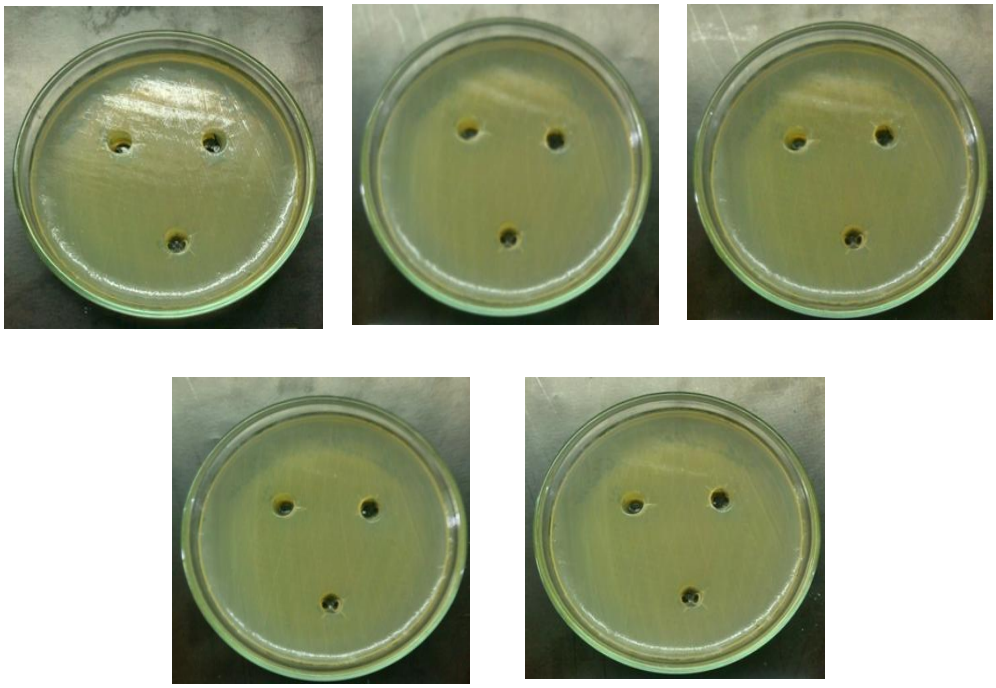
نتایج مربوط به بهینه منابع کربنی در ممانعت از رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی استاندارد به روش چاهک در شکل‌های۳ ،۴ ،۵ ، نشان داده شده است . شکل۶ نشان دهنده بهینه منابع کربنی در ممانعت از رشد باکتری‌های گرم مثبت است. نتایج ممانعت از رشد به روش انتشار از دیسک منبع گلوکز در شکل ۷ نشان داده شده است.



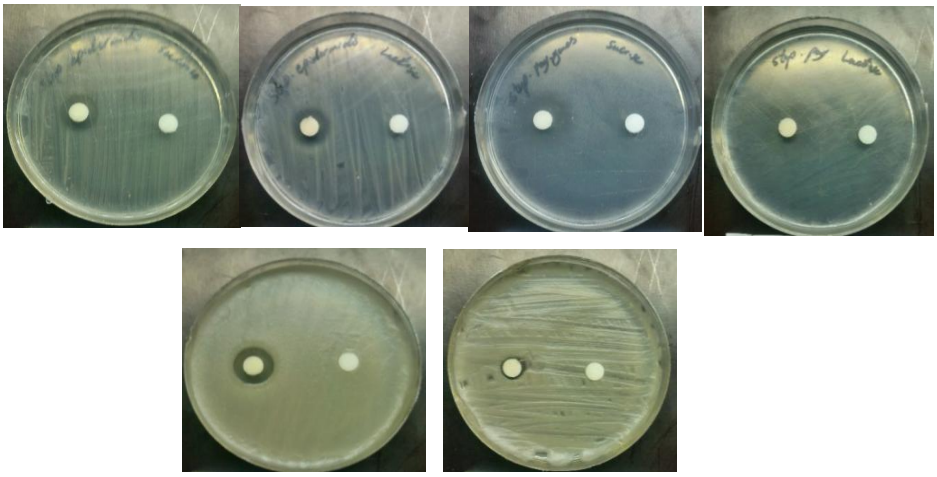
شکل ۳: نتایج ممانعت از رشد منابع کربنی به روش انتشار در چاهک برای باکتری *E. coli*



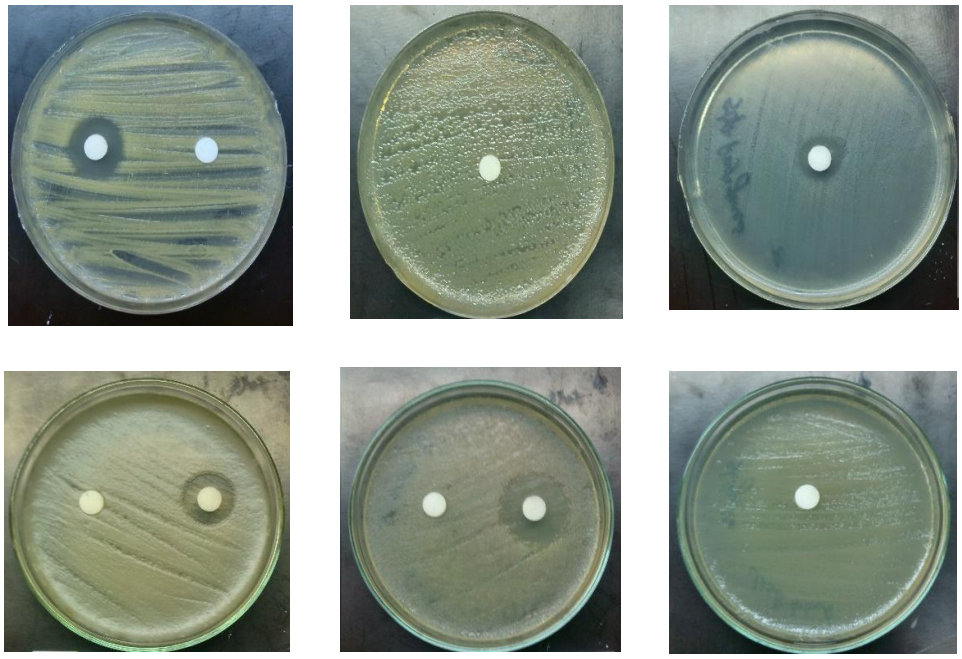
شکل ۴: نتایج ممانعت از رشد منابع کربنی به روش انتشار در چاهک برای باکتری *Shigella*

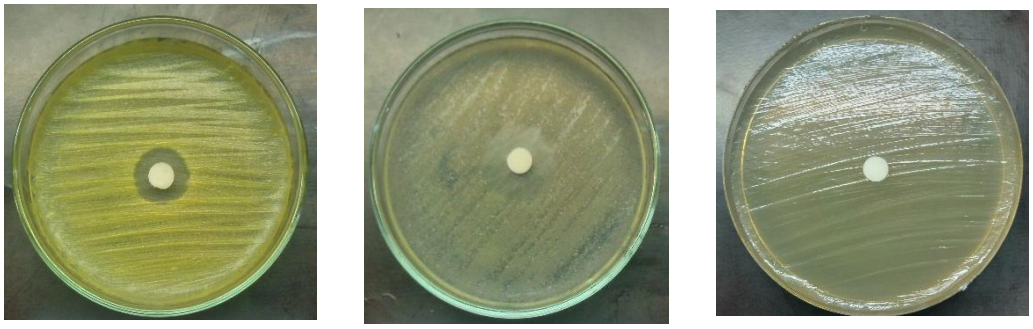


شکل ۵: نتایج ممانعت از رشد منابع کربنی به روش انتشار در چاهک برای باکتری *Salmonella*



شکل ۶: نتایج ممانعت از رشد به روش انتشار از دیسک منابع سوکروز ،لاکتوز





شکل۷: نتایج ممانعت از رشد به روش انتشار از دیسک منبع گلوکز

بحث

میکروارگانیسم‌ها بعضی از ترکیب‌های مهم دارویی را تولید می‌کنند که در درمان‌های عفونت‌ها استفاده می شوند. توجه به خانواده اکتینومیست‌ها به ویژه جنس استرپتومیسس‌ها بیشتراست. جنس استرپتومیسس جز باکتری‌های گرم مثبت و از خانواده اکتینومیست‌ها است. اکتینومیست‌ها در خاک مهم-ترین میکروارگانیسم‌های مولد آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند. تخمین زده می‌شود که جنس استرپتومیسس حداقل صد هزار ترکیب جدید بیولوژیکی قابل توجه را تولید می‌نماید. امروزه حدود ۷۵ درصد آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده و مورد استفاده در درمان از استرپتومیسس‌ها استخراج شده است. برای تولید لینکومایسین *Streptomyces Svellosus var*.NRRL 8037 از خاک آریزونا گرفته شده بود مورد استفاده قرار می-گیرد (۱) . این ارگانیزم می‌تواند به سادگی از دیگر تولید-کنندگان لینکومایسین بر اساس خواص آن نظیر رنگ، ظاهر کلی، فرایند کشت و خواص بیوشیمیایی مشخص گردد. مهم‌تر این که این نژاد بدون تولید هم‌زمان لینکومایسین B، لینکومایسین A را تولید می‌کند. دیگر شاخصه این نژاد، تولید غلظت‌های مشابه لینکومایسین در دماهای ۲۸ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. در کنار لینکومایسین، یک آنتی‌بیوتیک بسیار نزدیک و مرتبط از تخمیرهای نژاد استرپتومیسس لینکولنسیس ایزوله شد و تحقیق‌های مربوط به ساختار این نژاد نشان داده است که این نژاد با لینکومایسین B یعنی اتیل-۴- دی پروپیل-۴′ لینکومیسین (۹) مرتبط می‌باشد. لینکومیسین B که تا اوایل سال ۱۹۶۵ به عنوان عضوی کم اهمیت در کشت‌های استرپتومیسس لینکولنسیس توصیف می شد، فقط ۲۵ درصد از فعالیت آنتی‌بیوتیکی ارائه شده توسط لینکومایسین A را نشان می‌دهد. لینکومایسین B در زنجیره کناری اسید پروپیل هیگریک حاوی یک گروه کم‌تر از متیلن می‌باشد. تحت شرایط بهینه گونه جهش یافته استرپتومیسس لینکولنسیس استفاده شد *S. lincolnensis* NRRL 2936 می تواند در حدود ۲/۵ mg/l لینکومایسین A را تولید می-کند. افزودن پروپیل به محیط کشت میزان لینکومایسین B را کاهش می‌دهد. عقیده بر این است که پروپیل در لینکومایسین A یک ماده پیش‌نیاز احتمالی از اسید پروپیل هیگریک می-باشد، درحالی که اتیل پروپیل یک پیش‌نیاز اسیداتیل هیگریک در لینکومایسین B می‌باشد. 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 وارد می-شوند. افزودن ال- تیروزین یا ال- دی هیدروکسی- فنیل آلانین که باعث تجمع پروپیل پرولین می‌گردد اما اتیل پرولین کم‌تر شکل می‌گیرد. ژن‌های کد کننده و بیوسنتز کننده لینکومایسین روی کروموزوم روی یک منطقه تنهای کروموزومی با شاخص های مقاومت آنتی بیوتیکی قرار گرفته است (۹ ،۷، ۳) تأثیرهای نمک‌های مختلف، نیتروژن و منابع کربنی بر نسبت‌های خاص تولید لینکومیسین در گونه استرپتومیسس لینکولنسیس در یک محیط تعیین شده شیمیایی نیز مورد بررسی قرار گرفته است. منحنی رشد *Streptomyces lincolenesis* PTCC 1629 در شکل ۱ نشان داده شده است با توجه به شکل حداکثر میزان رشد در ساعت ۱۶۸ مشاهده می گردد.

در این تحقیق بهینه سازی تولید لینکومایسین توسط استرپتومیسس لینکولنسیس PTCC 1629 با روش تغییر یک فاکتور در یک زمان برای منابع کربنی و نیتروژن انجام شد. از آنجائی که تفاوت این دو محیط فقط در منبع کربن و نیتروژن می‌باشد، بنابراین منابع کربن و نیتروژن متفاوت در محیط کشت در تولید لینکومایسین توسط استرپتومیسس لینکولنسیس PTCC 1629 نقش دارند. نتایج به دست آمده نشان داد که گلوکز و نیترات پتاسیم به ترتیب مناسب‌ترین منابع کربن و نیتروژن برای تولید لینکومایسین هستند. به طور معمول وقتی منابع کربنی رو به اتمام هستند، فرآیند

رشد به سرعت کاهش پیدا می‌کند، در حالی که تولید لینکومیسین در بعضی وقت‌ها ثابت باقی می‌ماند. افزودن فسفات‌ها به عنوان تنظیم کننده تولید لینکومیسین را تحت تأثیر قرار می‌دهد. حداکثر تولید لینکومیسین در ۳ mM فسفات شناسایی شد و در طی غلظت‌های بیش‌تر فسفات میزان تولید به سرعت کاهش پیدا می‌کند، در حالی که مقدار جرم سلولی به شکل قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد. عامل نیتروژن (به شکل نمک‌های آمونیاک) نه تنها بر تولید لینکومیسین تأثیر می‌گذارد بلکه بر میزان رشد نیز اثرگذار است. غلظت مناسب نمک‌های آمونیوم برای تولید لینکومایسین بین۴۰ تا ۲۰۰ Mm متغیر است. به نظر می‌رسد غلظت ۳۰-۲۰ gr/l گلوکز در محیط تعیین شده شیمیایی بهترین منبع کربنی می‌باشد و این نتایج با نتایج به دست آمده این تحقیق مشابه است. میزان اکسیژن در سیستم فرمانتور به عنوان فاکتوری مهم در پروسه تولید است. در تحقیقی که در سال ۲۰۰۷ Xiao-Bing و همکاران انجام شد، بهبود تخمیر صنعتی لینکومایسین به وسیله تغذیه فسفر به فرمانتور مورد بررسی قرار گرفت که در نتیجه آن فسفر به عنوان یک فاکتور مؤثر در افزایش بیومس در فرمانتور و متعاقب آن تولید بیش‌تر لینکومایسین بیان شده است (۵). علاوه بر آن با افزایش بیومس و فعالیت‌های متابولیسمی میکروارگانیسم شرکت کننده 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 به عنوان 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. در این تحقیق مشخص گردید که حساسیت و دقت روش انتشار از چاهک نسبت انتشار از دیسک بیش‌تر است. در روش انتشار از چاهک سوپرناتانت کشت را سانتریفیوژ نموده و سپس آن را وارد چاهک‌ها کرده که ممکن است در هنگام سانتریفیوژ بسیاری از ترکیب‌ها رسوب کنند و فعالیت ضد میکروبی نشان ندهند. فعالیت ضد میکروبی لینکومایسین علیه باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی بیش‌تر است. تفاوت در حساسیت باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نسبت به لینکومایسین می‌تواند به تفاوت‌های مورفولوژیکی بین این میکروارگانیسم‌ها مرتبط باشد. باکتری‌های گرم منفی یک غشای خارجی پلی‌ساکاریدی دارند که دارای ترکیب‌هایی با ساختار لیپوپلی‌ساکاریدی 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 موثری برای نفوذپذیری باشد (۴).

طی نتایج به دست آمده در این مطالعه، مشاهده شد که منبع گلوکز چه در محیط پیش کشت و چه در محیط کشت تولید لینکومایسین به عنوان بهترین و در دسترس‌ترین منبع کربن بوده و سویه استرپتومیسس لینکولنسیس PTCC 1629 تحت شرایط اپتیمم محیطی نظیر pH ۷/۲- ۶/۸ و دمای ۳۰-۲۸°C و هوادهی مناسب، بیش‌ترین مقدار تولید را دارا است. با توجه به میزان منابع کربنی و نیتروژنی موجود در محیط های 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. علاوه بر این در محیط پیش کشت مقدار ترکیب مکمل فسفردار شده 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 (۵). در این بررسی محیط‌های کشت پیش کشت و تولید تحت تأثیر حرکت های 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 می شود. 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.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج به دست آمده، نیترات پتاسیم در میزان تولید آنتی بیوتیک و فعالیت ضد میکروبی لینکومایسین تولید شده

توسط بهترین اثر را دارند، سایر منابع کربن و نیتروژن مورد آزمایش اثر مهمی بر میزان تولید اثر گزار نبودند.

سپاسگزاری

این تحقیق در قالب پایان نامه تحقیقاتی کارشناسی ارشد انجام گردید. بدینوسیله از حمایت های معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان و کارشناسان محترم آزمایشگاه های گروه میکروبیولوژی تشکر و تقدیر می شود.

منابع

1.Bergy ME, Coats JH, Malik VS. Process for preparing lincomycin. Google Patents; 1981.
2. Bibb MJ. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. Current opinion in microbiology. 2005; 8(2):208-15
3. Chung S, Crose L, editors. Transposon Tn4556-mediated DNA insertion and site-directed mutagenesis. Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms Societe Francaise de Microbiologie, Strasbourg; 1990.
4.Hoeksema H, Bannister B, Birkenmeyer R, Kagan F, Magerlein B, MacKellar F, et al. Chemical studies on lincomycin. I. The structure of lincomycin. Journal of the American Chemical Society. 1964; 86(19):4223-4.
5. Li X-B, Zhao G-R, Zheng H, Yuan Y-J. Improved industrial fermentation of lincomycin by phosphorus feeding. Process biochemistry. 2007; 42(4):662-8.
6. Miyadoh S. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganism approach. Actinomycetologica. 1993; 7(2):100-6.
7. Pelczar M, Chan E, Microbiology NKN. Concepts and Applications. McGraw-Hill Inc., New York; 1993.
8. Spížek J, Řezanka T. Lincomycin, cultivation of producing strains and biosynthesis. Applied microbiology and biotechnology. 2004; 63(5):510-9.
9.Verdier L, Bertho G, Gharbi-Benarous J, Girault J-P. Lincomycin and clindamycin conformations. A fragment shared by macrolides, ketolides and lincosamides determined from TRNOE ribosome-bound conformations. Bioorganic & medicinal chemistry. 2000;8(6):1225-43.
10. Wovcha M, Steuerwald D, Manis J, editors. Cloning and characterization of a lincomycin resistance gene from Streptomyces lincolnensis. 5th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms Split, Yugoslavia; 1986.
11. Zhang HZ, Schmidt H, Piepersberg W. Molecular cloning and characterization of two lincomycin-resistance genes, ImrA and ImrB, from Streptomyces lincolnensls 78–11. Molecular microbiology. 1992; 6(15):2147-57.