

بهینه سازی تولید لینکومایسین توسط *Streptomyces lincolnesis* PTCC 1629

محمد فائزی قاسمی*، زهرا لزومی، خسرو عیسی زاده

گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، ایران،

چکیده

سابقه و هدف: لینکومایسین جزء ترکیب های لینکوز آمید می باشد. 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 روش ها: 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، کلرید سدیم، کربنات کلسیم، توسط روش تغییر یک فاکتور در یک زمان انجام و سپس فعالیت ضد میکروبی آنتی بیوتیک تولید شده بر علیه تعدادی از باکتری های شاخص بررسی گردید.

یافته ها: نتایج به دست آمده نشان داد که گلوکز و نیترات پتاسیم به ترتیب مناسب ترین منابع کربن و نیتروژن برای تولید لینکومایسین هستند. باکتری های گرم مثبت به لینکومایسین تولید شده توسط استرپتومیسس لینکولنسیس PTCC 1629 حساس، ولی سویه های گرم منفی مورد آزمایش به این آنتی بیوتیک مقاوم می باشند.

نتیجه گیری: 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 دسترس ترین منبع کربن بوده و سویه استرپتومیسس لینکولنسیس PTCC 1629 تحت شرایط اپتیمم محیطی نظیر pH ۷/۲-۸ و دمای °C ۳۰-۲۸ و هوادهی مناسب، بیشترین مقدار تولید را دارا است

واژه های کلیدی: لینکومایسین، بهینه سازی، استرپتومیسس لینکولنسیس PTCC 1629، تغییر یک فاکتور در یک زمان

مقدمه:

تقسیم سریع هستند و به همین دلیل باکتری ها و سلول های مغز استخوان که سازنده گویچه های سفید خون و گویچه های قرمز خون می باشند و همچنین سلول های سرطانی در مقابل آنتی بیوتیک ها حساسیت بیش تری دارند (۷). لینکومایسین به لحاظ شیمیایی به عنوان عضوی از گروه آنتی بیوتیک های لینکوز آمید در نظر گرفته می شود. یک ویژگی معمول در این مولکول های آنتی بیوتیکی حضور ۶ و ۸- دی دئوکسی-۱-تیو-D-اریترو-D-a-گالاکتو اکتوپیرانوزید (با نام عمومی متیل تیو لینکوز آمید) به یک پیوند آمید با مشتق اسید آمینه ترانس-N-متیل-۴-n-پروپیل-L-پرولین (با نام عمومی اسید پروپیل هیگریک) متصل می شود (۸، ۹). 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). گزارش های اولیه نشان داد که لینکومایسین فعالیت خوب ضد میکروبی در برابر باکتری های گرم مثبت دارد ولی برای درمان بیماری های ایجاد شده توسط باکتری های گرم مثبت مورد قبول واقع شده است (۴). از آنجائی که اطلاعات زیادی در زمینه بهینه سازی و اثر

استرپتومیسس ها به عنوان مهم ترین گروه اکتینومیسست ها از منابع مهم تولید کننده متابولیت های ثانویه، آنتی بیوتیک ها و آنزیم های لیز کننده محسوب می شوند. بیش از ۹۰ درصد ترکیب های بیولوژیکی فعال از این باکتری ها استخراج شده که کاربردهای اساسی در داروسازی، صنعت، کشاورزی و محیط زیست دارند. بیش از ۷۵ درصد استرپتومیسس ها قادر به تولید آنتی بیوتیک هستند (۲). مواد استخراج شده از آن ها دارای خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد انگلی، ضد ویروسی و ضد سرطانی هستند (۶). بعضی از آن ها خاصیت ضد سرطانی دارند؛ زیرا اثر آن ها بیش تر روی سلول هایی است که در حال

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

انجام شد. دیسک های آنتی بیوتیک روی محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل شد. انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام پذیرفت و هاله عدم رشد بر حسب میلی متر اندازه گیری شد. سویه های مورد استفاده گرم مثبت و گرم منفی به ترتیب ذیل بودند. *Micrococcus luteus* PTCC 1408، *Streptococcus pyogenes* PTCC 1113، *Bacillus cereus* PTCC 1436، *Staphylococcus epidermidis* PTCC 1396، *Escherichia coli* PTCC 1230، *Shigella dysenteriae* PTCC 1188، *Salmonella* PTCC 1188

ارزیابی خاصیت ضد میکروبی 1629 *Streptomyces lincolnesis* PTCC

روش آگار دیسک^۱: 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: دیسک های کاغذی استریل با عصاره حاصل از فیلتراسیون کشت استرپتومیسس لینکولنسیس آغشته شد. بعد از خشک شدن آن ها 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 مک فارلند از باکتری های هدف در محیط کشت مولر هینتون برات تهیه شد. و در محیط مولر هینتون آگار^۲ با سوآپ استریل به صورت سفره ای کشت داده شد. برای تعیین فعالیت ضد میکروبی چاهک هایی (به اندازه ۴×۶ mm) روی محیط مولر هینتون آگار حفر شد. سوپرناتانت مایع کشت استرپتومیسس لینکولنسیس در دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ و سپس محلول رویی^۳ در داخل هر چاهک به میزان ۵۰ میکرولیتر ریخته شد. انکوباسیون در ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ انجام پذیرفت. خواص ضد میکروبی با اندازه گیری قطر هاله های مهاری (بر حسب میلی متر) هر میکروارگانیزم مورد آزمایش در اطراف چاهک تعیین شد. هر آزمایش سه بار تکرار و میانگین قطر هاله های مهاری محاسبه گردید.

فاکتورهای مختلف غذایی و محیط کشت بر روی تولید این آنتی بیوتیک 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 روش ها: استرپتومیسس لینکولنسیس PTCC

1629 از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. هر ویال در شرایط استریل شکسته و به محیط تریپتیکاز سوی برات منتقل گردید. محیط مورد استفاده جهت رشد اولین باکتری در این پژوهش محیط کشت جامد نشاسته کازئین آگار و محیط کشت مایع عصاره مخمر - عصاره مالت به منظور افزایش سلول های باکتری می باشد. محیط جامد به ازای هر ۱۰۰۰ میلی لیتر حاوی ترکیب های نشاسته (۱۰ گرم)، کازئین (۳/۰ گرم)، نیترات پتاسیم (۲ گرم)، کلرید سدیم (۲ گرم)، فسفات هیدروژن دی پتاسیم (۲ گرم)، سولفات منیزیم هفت آب (۵/۰ گرم)، سولفات آهن هفت آب (۱/۰ گرم)، کرینات کلسیم (۲/۰ 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 $10^7 \times 1/5$ واحد تشکیل دهنده کلنی (CFU/ml) به محیط کشت مایع (Yeast extract- YEME) (Malt extract) تلقیح شد. انکوباسیون در ۳۰ درجه سانتی گراد با دور rpm ۱۵۰ به مدت ۶ روز انجام پذیرفت. منحنی رشد با تعیین وزن تر و خشک سلول ها هر ۲۴ ساعت منحنی رسم گردید. جهت تعیین وزن خشک سلول ها در rpm ۶۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب به دست آمده با آب دیونیزه شسته شد و پس از سانتریفیوژ میزان بیومس تر سلولی محاسبه شد. برای سنجش وزن خشک سلولی مقدار معینی از بیومس تر به وسیله کاغذ صافی از قبل توزین شده و در پلیت شیشه ای در آون ۵۰ درجه سانتی گراد 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 سویه های استاندارد، سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند تهیه گردید و سپس با سوآپ استریل از این سوسپانسیون ها بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت سفره ای

1 Agar disk method
2 Mueller Hinton Agar
3 Supernatant

بهینه سازی منابع کربنی و نیتروژنی

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 روش های دیسک کاغذی و انتشار در چاه با اندازه گیری قطر هاله های

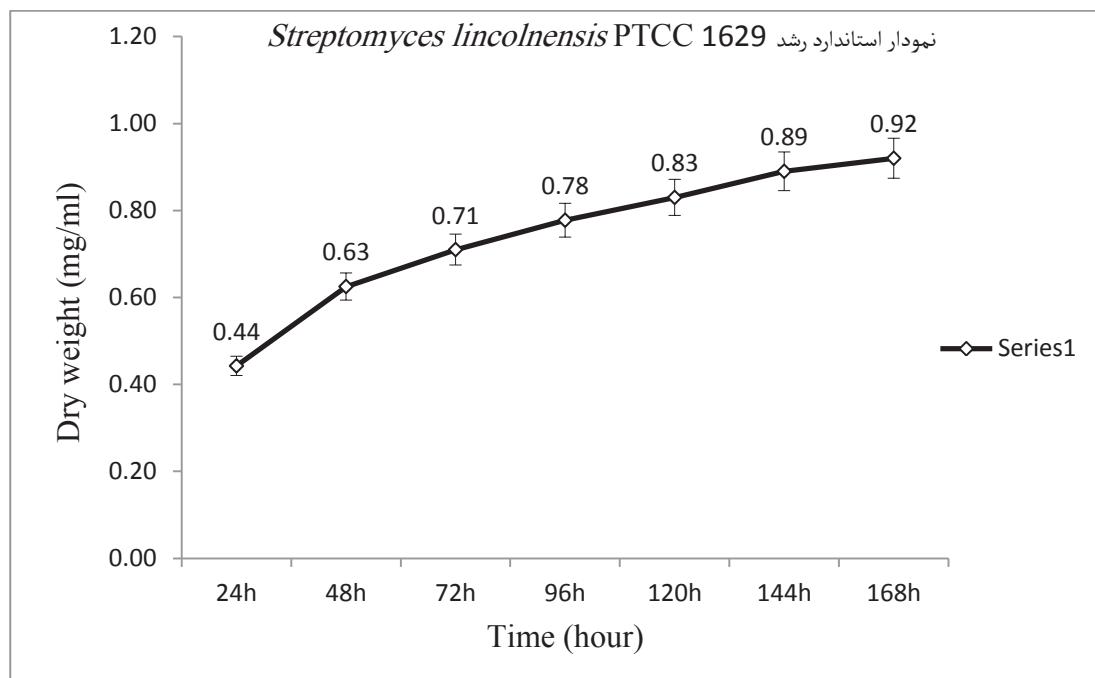
مهارى (بر حسب میلی متر) تعیین گردید. منابع نیتروژنی شامل نیترات پتاسیم، نیترات سدیم، سولفات آمونیوم، فسفات دی هیدروژن پتاسیم، کلرید سدیم، کربنات کلسیم بودند همه منابع در غلظت ۲ گرم در لیتر استفاده شدند.

نتایج

کلنی های 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

بر اساس منبع کربن، به روش تعیین حساسیت انتشار در چاهک و دیسک بر روی باکتری های گرم مثبت در نمودار ۲ نشان داده شده است. همان طوری که در جدول ۱ نشان داده شده است بیشترین اثر روی کوکسی های گرم مثبت

قطر هاله عدم رشد در بهینه سازی تولید لینکومایسین بر اساس منبع کربن، به روش تعیین حساسیت انتشار در چاهک و دیسک بر روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است. بهینه تولید لینکومایسین

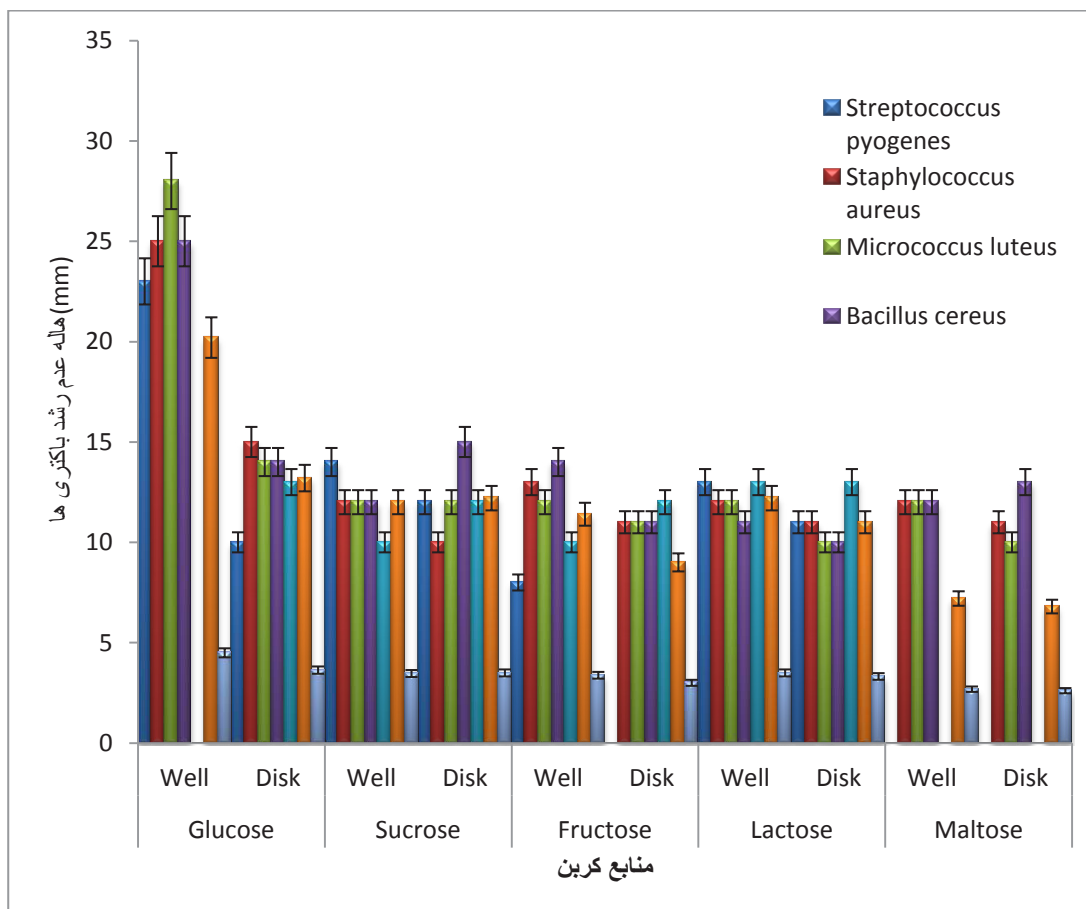
میکروکوکوس لوتئوس استافیلوکوکوس اورئوس دیده می شود. در جدول ۲ دیده می شود لینکومایسین تولید شده توسط این این اثر در روش چاهک بیش تر و مؤثر تر است. همان طوری که استرپتومیسس تأثیری روی باکتری های گرم منفی ندارد.

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

منبع کربن		گلوز		سوکروز		لاکتوز		مالتوز		فروکتوز	
چاهک	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک	دیسک
میکروکوکوس لوتئوس	۱۴	۲۸	۱۲	۱۲	۱۰	۱۲	۱۰	۱۲	۱۰	۱۲	۱۱
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۵	۲۵	۱۰	۱۲	۱۱	۱۲	۱۱	۱۲	۱۱	۱۳	۱۱
استرپتوکوکوس پایورنز	۱۰	۲۳	۱۲	۱۴	۱۱	۱۳	۱۱	۰	۰	۸	۰
استرپتوکوکوس اپیدرمایدیس	۱۳	۰	۱۲	۱۰	۱۳	۱۳	۱۳	۰	۰	۱۰	۱۲
باسیلوس سرئوس	۱۴	۲۵	۱۵	۱۲	۱۰	۱۱	۱۰	۱۲	۱۳	۱۴	۱۱

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

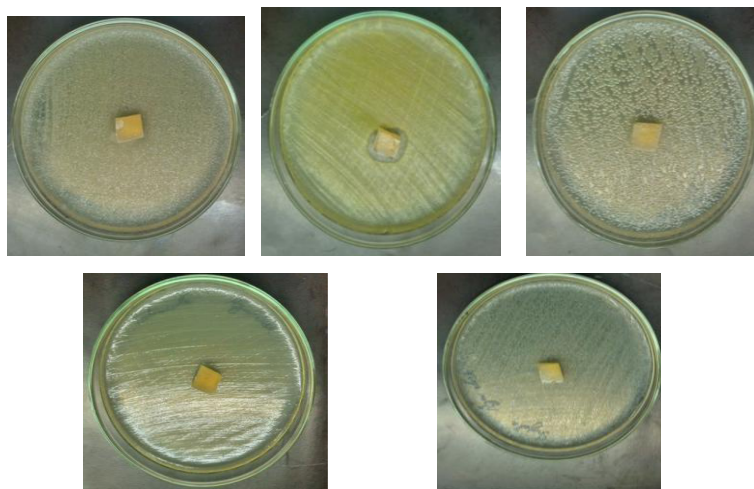
باکتری		گلوز		سوکروز		لاکتوز		مالتوز		فروکتوز	
چاهک	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک	دیسک
قطر هاله	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
اشریشیا کلی	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
سالمونلا	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
شیگلا	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



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

نشان داده شده است. هاله عدم رشد در باکتری های گرم مثبت شامل *M. luteus* و *S. aureus* مشاهده شد، اما در باکتری های گرم منفی هاله ای مشاهده نشد.

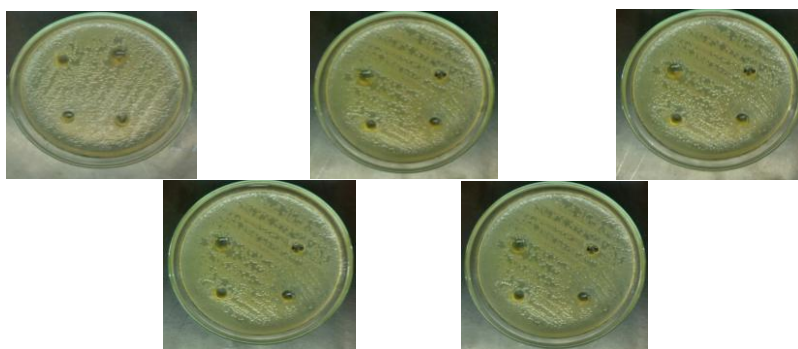
نتایج هاله عدم رشد به روش آگار دیسک در باکتری های *Micrococcus luteus*، *Staphylococcus aureus*، *Escherchia coli* و *Shigella* در شکل ۲



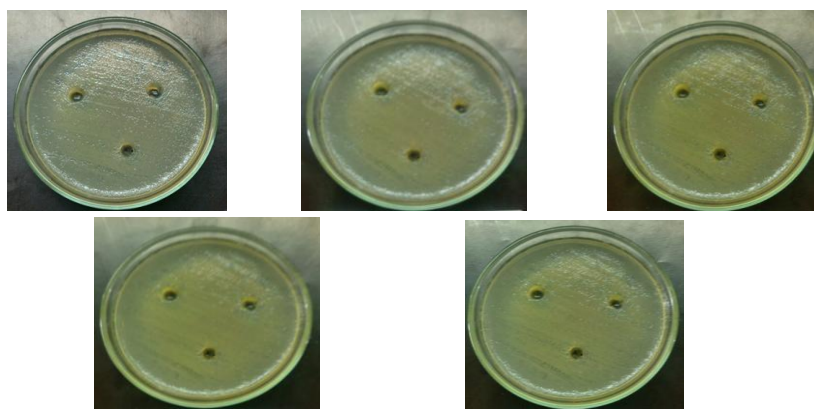
شکل ۲: (a) روش آگار دیسک به ترتیب در (بالا، چپ): *Staphylococcus aureus* (بالا، مرکز): *Micrococcus luteus* (بالا، راست): *Escherchia coli* (پایین، چپ): *Salmonella*، (پایین، راست): *Shigella*

دهنده بهینه منابع کربنی در ممانعت از رشد باکتری های گرم مثبت است. نتایج ممانعت از رشد به روش انتشار از دیسک منبع گلوکز در شکل ۷ نشان داده شده است.

نتایج مربوط به بهینه منابع کربنی در ممانعت از رشد باکتری های گرم مثبت و گرم منفی استاندارد به روش چاهک در شکل های ۳، ۴، ۵، نشان داده شده است. شکل ۶ نشان

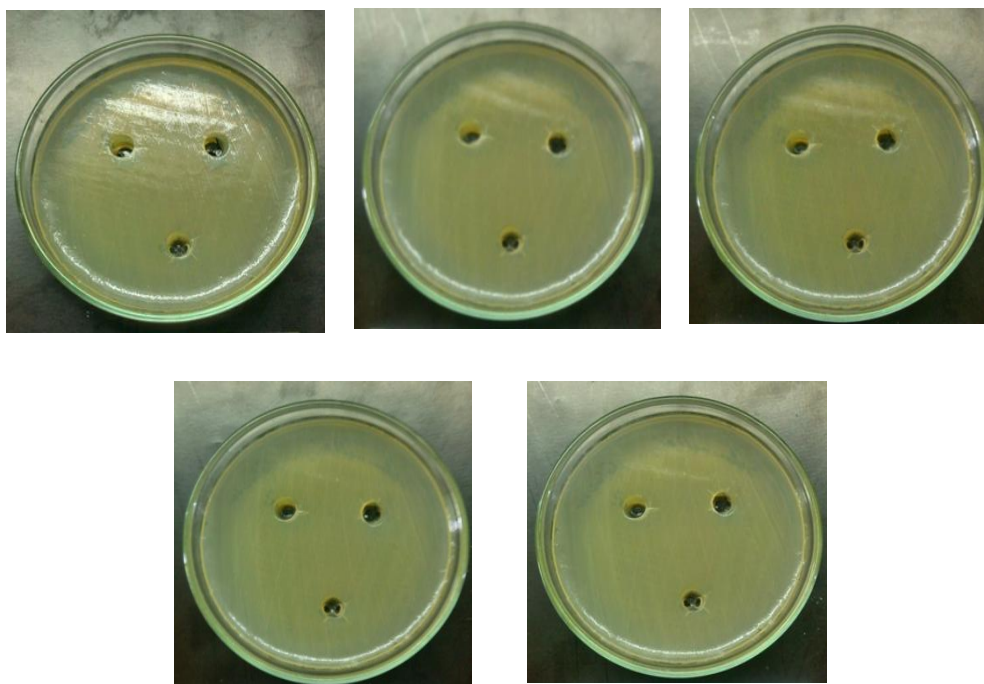


شکل ۳: نتایج ممانعت از رشد منابع کربنی به روش انتشار در چاهک برای باکتری *E. coli*

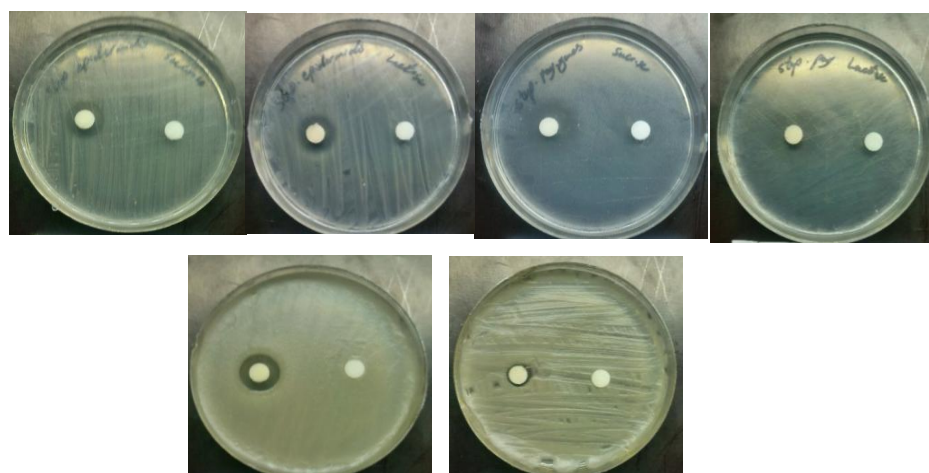


شکل ۴: نتایج ممانعت از رشد منابع کربنی به روش انتشار در چاهک برای باکتری *Shigella*

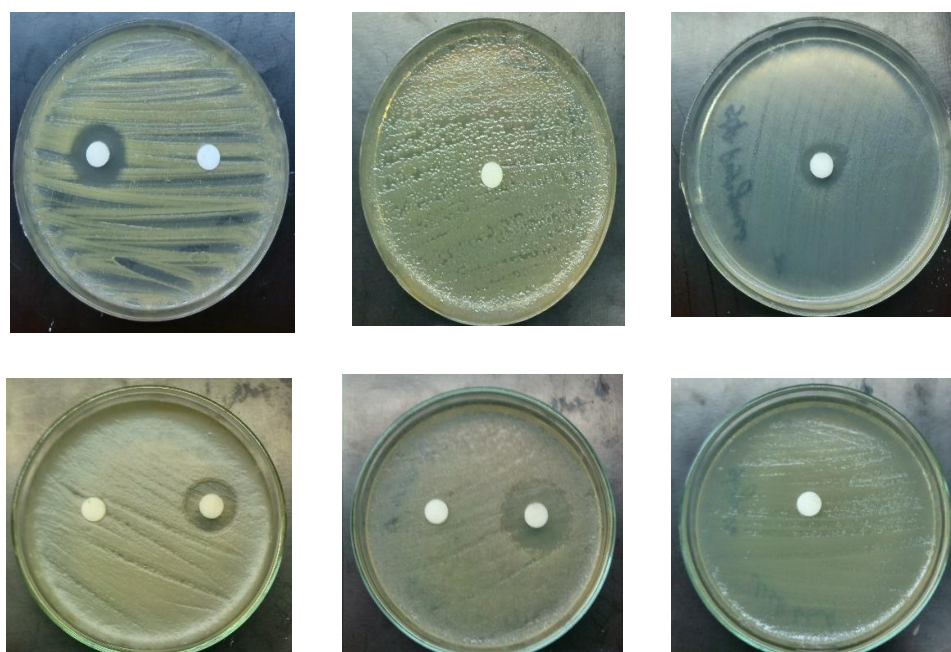
تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی دوره هفتم شماره بیست و شش - بهینه سازی تولید لینکومایسین ...

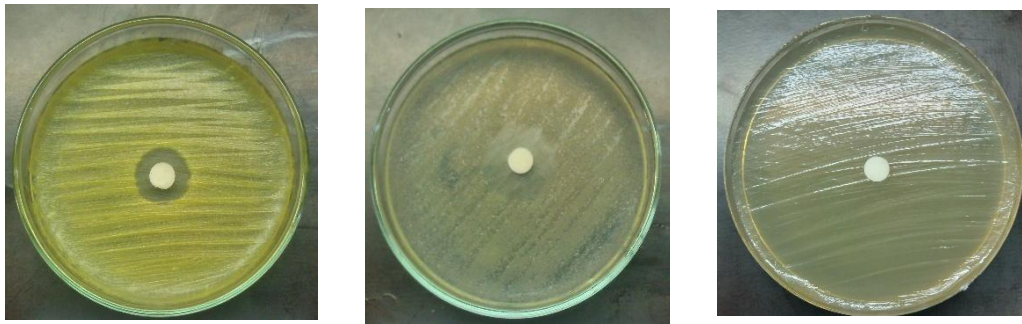


شکل ۵: نتایج ممانعت از رشد منابع کربنی به روش انتشار در چاهک برای باکتری *Salmonella*



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





شکل ۷: نتایج ممانعت از رشد به روش انتشار از دیسک منبع گلوکز

بحث

می تواند در حدود ۲/۵ mg/l لینکومایسین A را تولید می کند. افزودن پروپیل به محیط کشت میزان لینکومایسین B را کاهش می دهد. عقیده بر این است که پروپیل در لینکومایسین A یک ماده پیش نیاز احتمالی از اسید پروپیل هیگریک می باشد، درحالی که اتیل پروپیل یک پیش نیاز اسیداتیل هیگریک در لینکومایسین B می باشد. اسیدهای آمینه آروماتیک، مثل ال- تیروزین، ال- دی هیدروکسی- فنیل آلانین و دیگر ترکیب های 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 می گردد اما اتیل پرولین کم تر شکل می گیرد. ژن های کد کننده و بیوسنتز کننده لینکومایسین روی کروموزوم روی یک منطقه تنهای کروموزومی با شاخص های مقاومت آنتی بیوتیکی قرار گرفته است (۳، ۷، ۹) تأثیرهای نمک های مختلف، نیتروژن و منابع کربنی بر نسبت های خاص تولید لینکومایسین در گونه استرپتومیسس لینکولنسیس در یک محیط تعیین شده شیمیایی نیز مورد بررسی قرار گرفته است. منحنی رشد *Streptomyces lincolnesis* 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 می باشد، 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 نترات پتاسیم به ترتیب مناسب ترین منابع کربن و نیتروژن برای تولید لینکومایسین هستند. به طور معمول وقتی منابع کربنی رو به اتمام هستند، فرآیند

میکروارگانیزم ها بعضی از ترکیب های مهم دارویی را تولید می کنند که در درمان های عفونت ها استفاده می شوند. توجه به خانواده اکتینومیست ها به ویژه جنس استرپتومیسس ها بیشتر است. جنس استرپتومیسس جز باکتری های گرم مثبت و از خانواده اکتینومیست ها است. اکتینومیست ها در خاک مهم ترین میکروارگانیزم های مولد آنتی بیوتیک ها می باشند. تخمین زده می شود که جنس استرپتومیسس حداقل صد هزار ترکیب جدید بیولوژیکی قابل توجه را تولید می نماید. امروزه حدود ۷۵ درصد آنتی بیوتیک های تولید شده و مورد استفاده در درمان از استرپتومیسس ها 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 می تواند به سادگی از دیگر تولید کنندگان لینکومایسین بر اساس خواص آن نظیر رنگ، ظاهر کلی، فرایند کشت و خواص بیوشیمیایی مشخص گردد. مهم تر این که این نژاد بدون تولید هم زمان لینکومایسین B، لینکومایسین A را تولید می کند. دیگر شاخصه این نژاد، تولید غلظت های مشابه لینکومایسین در دماهای ۲۸ و ۴۵ درجه سانتی گراد می باشد. در کنار لینکومایسین، یک آنتی بیوتیک بسیار نزدیک و مرتبط از تخمیرهای نژاد استرپتومیسس لینکولنسیس ایزوله شد و تحقیق های مربوط به ساختار این نژاد نشان داده است که این نژاد با لینکومایسین B یعنی اتیل-۴- دی پروپیل-۴' لینکومایسین (۹) مرتبط می باشد. لینکومایسین B که تا اوایل سال ۱۹۶۵ به عنوان عضوی کم اهمیت در کشت های استرپتومیسس لینکولنسیس توصیف می شد، فقط ۲۵ درصد از فعالیت آنتی بیوتیکی ارائه شده توسط لینکومایسین A را نشان می دهد. لینکومایسین B در زنجیره کناری اسید پروپیل هیگریک حاوی یک گروه کم تر از متیلن می باشد. تحت شرایط بهینه گونه جهش یافته استرپتومیسس لینکولنسیس استفاده شد *S. lincolnesis* NRRL 2936

دیواره سلولی نفوذ ناپذیر به وجود می آورند. اما باکتری های گرم مثبت بیش تر حساس هستند، چون فقط یک لایه پپتیدوگلیکان خارجی دارند که نمی تواند یک مانع موثری برای نفوذ پذیری 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 دسترس ترین منبع کربن بوده و سویه استریپتومیسس لینکولنسیس PTCC 1629 تحت شرایط اپتیمم محیطی نظیر pH ۷/۲ - ۶/۸ و دمای ۲۸-۳۰°C و هوادهی مناسب، بیش ترین 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 می شود. 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، می تواند 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 میلی گرم به ازای هر لیتر در محیط پیش کشت به ۲۰۰ میلی گرم به ازای هر لیتر در محیط کشت تولید لینکومایسین افزایش داده شد؛ که این نیز دلیلی بر افزایش مقدار تولید لینکومایسین مطابق با یافته های Xiao-Bing Li می باشد (۵). در این بررسی محیط های کشت پیش کشت و تولید تحت تأثیر حرکت های دورانی قرار گرفت و تا حدودی از میزان مهارت این اکسیژن نامحلول کاسته شد و تمام این شرایط به مصرف بیش تر منابع نیتروژن و کربن و رشد بیش تر استریپتومیسس 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 آنتی بیوتیک تحت موازنه ثابت تری خواهد بود، بر همین اساس تولید بهینه لینکومایسین در مرحله تولیدی تخمیر بیش تر می شود.

نتیجه گیری

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

رشد به سرعت کاهش پیدا می کند، در حالی که تولید لینکومایسین در بعضی وقت ها ثابت باقی می ماند. افزودن فسفات ها به عنوان تنظیم کننده تولید لینکومایسین را تحت تأثیر قرار می دهد. حداکثر تولید لینکومایسین در ۳ mM فسفات شناسایی شد و در طی غلظت های بیش تر فسفات میزان تولید به سرعت کاهش پیدا می کند، در حالی که مقدار جرم سلولی به شکل قابل ملاحظه ای افزایش می یابد. عامل نیتروژن (به شکل نمک های آمونیاک) نه تنها بر تولید لینکومایسین تأثیر می گذارد بلکه بر میزان رشد نیز اثرگذار است. غلظت مناسب نمک های آمونیوم برای تولید لینکومایسین بین ۴۰ تا ۲۰۰ Mm متغیر است. به نظر می رسد غلظت ۲۰-۳۰ gr/l گلوکز در محیط تعیین شده شیمیایی بهترین منبع کربنی می باشد 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 بیش تر لینکومایسین بیان شده است (۵). علاوه بر آن با افزایش بیومس و فعالیت های 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 می باشد. 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 بیش تر است. در روش انتشار از چاهک سوپرناتانت کشت را سانتریفیوژ نموده و سپس آن را وارد چاهک ها کرده که ممکن است در هنگام سانتریفیوژ بسیاری از ترکیب ها رسوب کنند و فعالیت ضد میکروبی نشان ندهند. فعالیت ضد میکروبی لینکومایسین علیه باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی بیش تر است. تفاوت در حساسیت باکتری های گرم مثبت و گرم منفی نسبت به لینکومایسین می تواند به تفاوت های مورفولوژیکی بین این میکروارگانیسم ها مرتبط باشد. باکتری های گرم منفی یک غشای خارجی پلی ساکارییدی دارند که دارای ترکیب هایی با ساختار لیپوپلی ساکارییدی هستند و یک

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 lincolnensis* 78-11. *Molecular microbiology*. 1992; 6(15):2147-57.