دستکاری ژنتیکی سویه آکرومونیومی تولید کننده سفالوسپورین C به منظور افزایش تولید این آنتی‌بیوتیک

*دکتر محمد ساروخانی I
دکتر نسرین معظمی II
دکتر مرتضی آذرنوش III

چکیده

میزان تولید سفالوسپورین C(CPC) در سویه‌های تولید کننده این ماده در ارتباط با میزان ابراز یا مهار ژنهای تولید کننده آن است. هدف از این مطالعه تغییر ژنتیکی سویه تولید کننده سفالوسپورین C به منظور افزایش تولید این ماده بوده است. در این بررسی از سویه استاندارد تولید کننده آکرومونیوم کرایزوژنوم DSM۲۳۹۹ به عنوان سویه والد استفاده شد. عملیات موتاژنز روی محیطهای تولید بهینه سازی شده با بستر جامد صورت گرفت و موتاژنهای مورد استفاده، اشعه UV و NTG بودند که میزان بهینه آنها جهت موتاژنز به دست آمد. انتخاب موتانت‌ها به صورت اتفاقی و نیز به صورت جهت‌دار (در حضور ++Hg و نیستاتین) صورت گرفت. میزان تولید موتانتها در محیطهای تولید با روشهای سنجش بیولوژیکی و HPLC بررسی شد و تولید نهایی CPC در موتانت نهایی برنامه موتاژنز با روش طیف سنجی جرمی تأیید گردید. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه میزان بهینه دوز موتاژن UV برابر ۲۰۰ ثانیه و دوز تیمار NTG برابر با ۷-۵ دقیقه به دست آمد و میزان دوز مهاری ++Hg و نیستاتین روی سویه به ترتیب ۰/۰۰۶ و ۰/۳ گرم در دسی‌لیتر بود. با هر دو موتاژن و در هر دو روش انتخاب موتانتها، سویه‌های با تولید افزایش یافته CPC به دست آمدند اما اثرات UV و به کارگیری ++Hg در میزان موتاژنز و نیز در میزان افزایش تولید CPC بارزتر بود. در برترین سویه حاصل از این عملیات، تولید CPC به میزان ۲/۳ برابر افزایش یافت. حضور CPC در محیط تولید این سویه با نشان دادن یون مولکولی ٤١٥ در طیف جرمی آن تأیید شد. بطور کلی می‌توان نتیجه گرفت که تغییر ساختار ژنتیکی سویه مولد CPC مقدور بوده و می‌توان سویه‌های موتانت با تولید برتر را با عملیات موتاژنز به دست آورد.

کلیدواژه‌ها: ۱ – بهینه‌سازی سویه ۲ – آکرومونیوم ۳ – موتاژنز

مقدمه

سفالوسپورین C(CPC) به عنوان مهمترین پیش‌ساز آنتی‌بیوتیکهای سفالوسپورینی، تحت شرایط خاصی از گروهی از قارچهای محیطی که آکرومونیوم‌ها نامیده می‌شوند، به عنوان یک متابولیت ثانویه تولید می‌گردد(۱و ۲). ژنهای تولید کننده این ماده در اغلب سویه‌های تولید کننده آنها تحت تأثیر عناصر کربنی و نیتروژنی مختلف مهار شده و ابراز نمی‌گردند. اما در شرایط خاص محیطی(۳) یا در بعضی از سویه‌های تغییر یافته ژنتیکی آکرومونیومی، این مهار صورت نگرفته بنابراین تولید CPC رخ می‌دهد(٤). شرکتهای تولید کننده CPC همواره در صدد راهیابی به ایجاد و جداسازی سویه‌های با مهار ابراز ژنی کمتر و با توان تولید CPC بالاتر هستند که در طی ٤ دهه گذشته موفقیتهای چشمگیری را در این مورد داشته‌اند بطوری که میزان تولید CPC در سویه‌های مولد مورد ادعای این

این مقاله خلاصه‌ای است از پایان نامه دکتر محمد ساروخانی جهت دریافت دکترای بیوتکنولوژی به راهنمایی خانم دکتر نسرین معظمی و مشاوره دکتر مرتضی آذرنوش، سال ۱۳۸۱. بخشهایی از این مقاله در دومین کنگره بیوتکنولوژی در کرج سال ۱۳۸۰ و ششمین کنگره بیوشیمی در تهران سال ۱۳۸۰ ارائه شده است. همچنین این مطالعه تحت حمایت مالی انستیتو پاستور ایران انجام شده است.

I) استادیار بیوتکنولوژی، دکترای علوم آزمایشگاهی، دانشکده بهداشت و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی قزوین(*مولف مسئول).
II) دانشیار بیوتکنولوژی، سازمان پژوهشهای علمی ایران، خیابان نصرت، تهران، ایران.
III) استادیار بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور، تهران، ایران.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-20]

شرکتها نسبت به سویه‌های اولیه صدها برابر افزایش یافته است(۱و ۵) که علت این موفقیتها به کارگیری روشهای بهینه‌سازی سویه با دستکاری‌های ژنتیکی بوده است. این روشها شامل روشهای موتاژنز و انتخاب روشهای درهم آمیختن پروتوپلاستی و فرآیندهای نو ترکیبی DNA می‌باشند(۱و ٦). اگر چه تولید CPC با به کار گیری هر یک از روشهای فوق افزایش می‌یابد اما با توجه به دخالت صدها ژن در کنترل تولید CPC(٤) اصلی‌ترین و مؤثرترین روش در طی دهه‌های گذشته در افزایش تولید CPC روش موتاژنز و انتخاب بوده است(۷و ۸) که در طی آن سویه تولید کننده (آکرومونیوم کرایزوژنوم) بطور مکرر تحت تأثیر موتاژنهای مختلف فیزیکی (UV و غیره) و شیمیایی (NTG و غیره) قرار گرفته و سپس میزان تولید در سویه‌هایی که زنده‌مانده‌اند کنترل و سویه با تولید برتر انتخاب و برای مرحله بعدی به کار گرفته می‌شود که به این ترتیب میزان تولید در هر مرحله افزایش می‌یابد(۱، ۵، ۹و ۱۰).

در مطالعات قبلی(۱۱) ضمن غربالگری و جداسازی سویه‌های تولید کننده CPC، محیطهای مناسب برای تولید CPC در سویه برتر معرفی شده است.

از آنجائیکه میزان تولید CPC در این سویه‌های طبیعی بسیار ناچیز بود، هدف ما در این تحقیق در ادامه مطالعه قبلی، دستکاری‌های ژنتیکی سویه تولید کننده CPC با روشهای موتاژنز و انتخاب به منظور افزایش توان تولید CPC در آن بوده است.

روش بررسی

در این مطالعه از سویه تولید کننده برتر ذکر شده در مقاله قبلی(۱۱) به نام ۲۳۹۹ Acremonium chrysogenum DSM برای انجام فرایندهای بهینه‌سازی و تغییر ژنتیکی استفاده شد.

برای موتاسیون فیزیکی از اشعه UV با استفاده از لامپ فیلیپس با قدرت ۲۰ وات و طول موج ۲٦۰ و در فاصله ۲۸ سانتیمتری و برای موتاسیون شیمیایی از NTG (Nitrosoguanidine) با غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده گردید(۱۲) میزان بهینه موتاژنهای فوق با قرار دادن سوسپانسیون اسپوری سویه تولید کننده ذکر شده در معرض زمانهای مختلف این موتاژنها و کنترل تولید CPC در زنده مانده‌های حاصل از موتاژنزها(روش منحنی میزان ـ پاسخ) به دست آمد(۱۳) و با این زمانهای بهینه، عملیات و سیکلهای متعدد موتاژنز سویه انجام گردید(۷) از محیطهای تولید مشخص و کمپلکس برتر تعیین شده در مقاله قبلی(۱۱) و با افزودن آگار ۱۵ گرم در لیتر جهت جامدسازی آنها به عنوان بستر فرایندهای موتاژنز فوق استفاده گردید. روشهای انتخاب سویه‌های برتر حاصل از موتاژنز، شامل انتخاب اتفاقی(Random) و نیز انتخاب جهت‌دار(Selective) که با انجام موتاژنز در حضور غلظتهای به دست آمده از مهارکننده‌های $HgCl_2$(++Hg) و نیستاتین و گزینش سویه‌های مقاوم به اثرات مهاری این دو ماده بود انجام شد(۱، ۸و ۱۲).

در هر مرحله سویه برتر علاوه بر کدگذاری، برای مرحله بعدی و با موتاژن دیگر به کار گرفته شد.

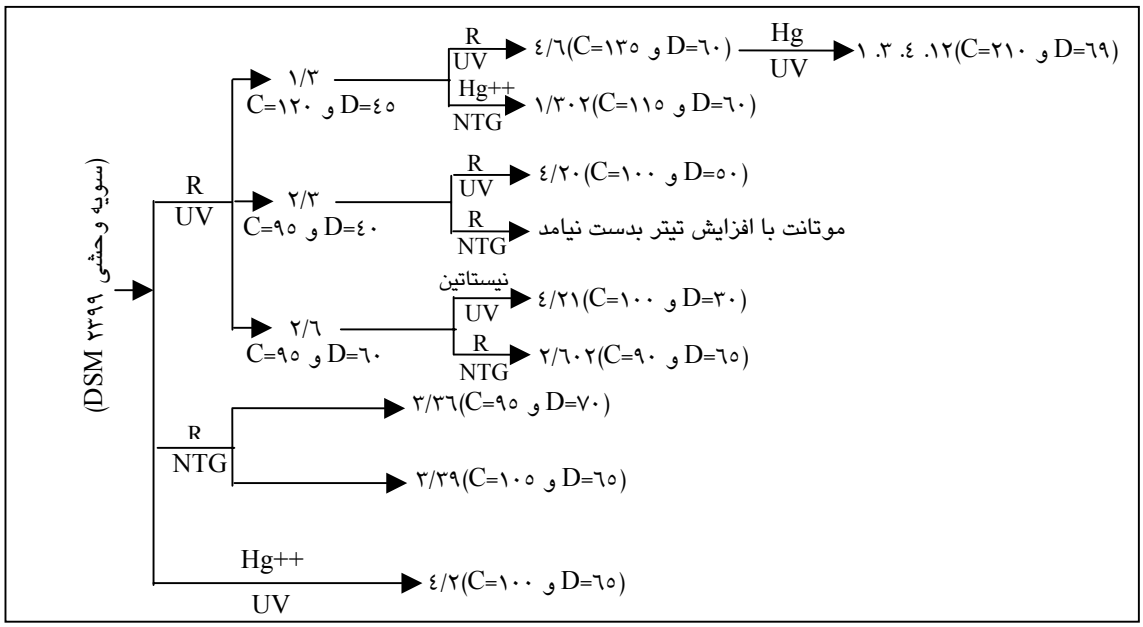
جهت سنجش CPC در محیطهای تولید از روش سنجش بیولوژیکی(Bioassay) و با استفاده از سویه حساس Alkaligenes faecalis ATCC۸۷۵۰ و نیز از روش HPLC استفاده شد(۷و ۱۱) اثبات نهایی تولید CPC در محیطهای تولید سویه موتانت نهایی حاصل از برنامه موتاژنز با استفاده از متد طیف سنجی جرمی (Mass Spectrometery) و با استفاده از سیستم Varian و در مقایسه با استاندارد خالص CPC(Sigma) صورت گرفت(۱٤).

نتایج

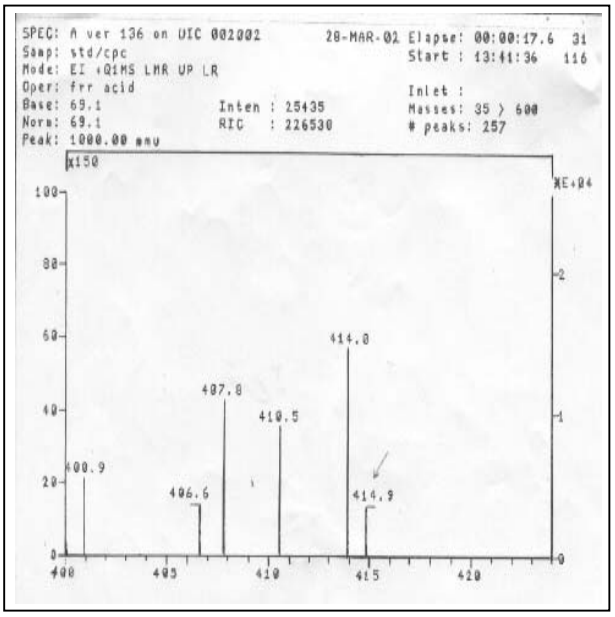
میزان بهینه دوز اشعه UV جهت انجام عملیات موتاژنز روی سویه مولد برابر ۲۰۰ ثانیه و میزان بهینه NTG برابر ۷-۵ دقیقه به دست آمد. مقادیر غلظتهای مهاری به کار برده شده در بستر محیطهای تولید جامد شده که در حضور آنها سویه مولد قادر به رشد نیست برای ++Hg و نیستاتین به ترتیب ۰/۰۰٦ و ۰/۳ گرم در دسی‌لیتر به دست

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-20]

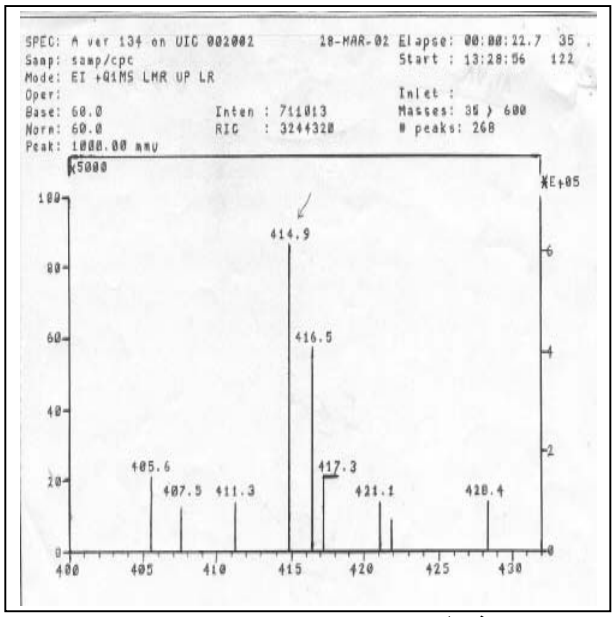
آمد که از چنین غلظتهایی برای انجام موتاسیونهای جهتدار استفاده شد. سیکلهای مختلف و متعدد موتاژنز با شرایط و روشهای انتخاب فوق انجام و سویه‌های برتر در هر مرحله انتخاب شدند که در تصویر شماره ۱ دودمان سویه‌های برتر این تحقیق حاصل از مراحل مختلف موتاژنز با دو موتاژن UV و NTG و با دو روش انتخاب اتفاقی(R) و جهتدار(S) و میزان تولید CPC در هر مرحله در هر دو محیط تولید مشخص(D) و کمپلکس(C) نمایش داده شده است. دو موتانت با تولید برتر در محیطهای D و C با کد مشخص کننده سویه، در مرکز کلکسیون میکروبی سازمان پژوهشهای علمی(PTCC) حفظ گردیدند. در تصویرهای شماره ۲ و ۳ طیف جرمی نمونه‌های استاندارد CPC(در حالت Free acid) و نمونه محیط تولید سویه برتر که در هر دو یون مولکولی حدود ٤١٥ که معرف جرم مولکولی CPC است و حکایت از حضور این ماده دارد، مشاهده می‌شود.



تصویر شماره ۱- دودمان سویه‌های برتر حاصل برنامه موتاژنز



تصویر شماره ۲- طیف جرمی نمونه استاندارد خالص CPC در حالت Free acid



تصویر شماره ۳- طیف جرمی نمونه محیط تولید سویه برتر(حضور یون مولکولی ٤١٥ نظیر تصویر ۲ در آن مشهود است).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-20]

بحث

در این تحقیق سویه‌های موتانت با تولید افزایش یافته CPC به دنبال مراحل مختلف موتاژنز به دست آمدند که در میان آنها موتانت با کد ۱۲. ٤. ۲. ۱ بیشترین تولید CPC را داشت و تولید آن نسبت به سویه والد و در محیط کمپلکس به میزان ۲۱۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر از CPC رسید یعنی ۲/۳ برابر افزایش تولید را نشان داد. اگر چه میزان تولید CPC به دست آمده در این موتانتها هنوز در حد سویه‌های با تولیدات بالا که ۲۰-۱۵ گرم در لیتر تولید دارند(۱۵) نیست اما باید توجه داشت که این سویه‌ها حاصل حدود ٤۰ سال فعالیت در این زمینه بوده‌اند اما سویه‌های اولیه‌ای نظیر سویه ۸٦۵۰ Mو سویه ۷-٦۳-۱٦۳-OP با سالها تلاش تولیداتی بین ۱۰۰-۳۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر داشته‌اند(۱٦) و سویه CW۱۹ که از آن به عنوان سویه خوب مولد CPC نیز نام برده می‌شود در محیط مشخص ٤۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر و در محیط کمپلکس ۵۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر تولید داشته است(۱۷) بنابراین با توجه به میزان فعالیت ۱/۵ ساله و تعداد سیکلهای محدود موتاژنز در این تحقیق، میزان افزایش تولید CPC حاصل شده، مطلوب است. با مراجعه به انواع روشهای موتاژنز سویه‌های آکرومونیومی و به کارگیری انواعی از موتاژنهای فیزیکی(نظیر UV) و شیمیایی(نظیر NTG) و در حضور یا فقدان مهار کننده‌ها(۱)، در این مطالعه نیز به همین شکل عمل شد که از میان دو موتاژن انتخاب شده، اشعه UV دارای اثرات موتاژنز بهتری نسبت به NTG بود که علاوه بر راحتی کار، بطوری که در بررسی دودمان سویه‌های حاصل از موتاژنز ملاحظه شد، میزان وقوع موتاژنز و افزایش میزان CPC نیز در مورد موتاژن UV نسبت به NTG دارای برتری بود. Elander نیز در مطالعات خود به چنین نتیجه‌ای رسیده بود(۸و ۹). در زمینه موتاژنز در حضور مهار کننده‌ها، در موتانتهای مقاوم به ++Hg میزان تولید CPC در مقایسه با موتانتهای مقاوم به نیستاتین بیشتر بود. که این امر دور از ذهن نیست زیرا چنین موتانتهایی مجبور به تولید بیشتر CPC جهت خنثی کردن اثرات سمی ++Hg هستند(۵) اما مسئله مقاومت به نیستاتین فقط به نفوذپذیری دیواره سلولی برمی‌گردد. از آنجا که ممکن است در طی سیکلهای متعدد موتاژنز، ماهیت آنتی‌بیوتیک ایجادی نیز به علت تغییر ساختار ژنتیکی سویه دستخوش تغییر گردد(۷) بنابراین برای شناسایی نهایی تولید CPC در موتانت نهایی به دست آمده در این تحقیق، در محیط تولید این سویه، طیف سنجی جرمی انجام شد و حضور CPC با نشان دادن یون مولکولی ٤۱۵ که نشان دهنده جرم مولکولی CPC است به اثبات رسید. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، امکان ادامه افزایش تیتر CPC با عملیات موتاژنز پی در پی امکان‌پذیر بوده و با داشتن تیمهای کاری وسیع می‌توان سویه با مقادیر بسیار بالای تولید CPC نیز به دست آورد و در تولید کلاژن CPC در کشور از آن بهره گرفت.

سپاسگزاری

از پرسنل بخش ژنتیک و از ریاست محترم بخش ژنتیک سازمان پژوهشها برای حمایت مالی این پروژه و از آقای دکتر محسن امینی استاد دانشکده داروسازی دانشگاه تهران تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

1- Flickinger M., and Drew S.,(ed); Encyclopedia of bioprocess technology (Vol:1-5); U.S.A, John wiley & Sons inc, 1999, PP: 560-570.

2- Katzung B., Basic and clinical pharmacology, 3 rd edition, California U.S.A. LANGE medical book, 1987, PP: 516-526.

3- Zohu W., Bayer T., and Schuegerl K., Influence of medium composition on the cephalosporin C production with a highly productive strain of C. acremonium, J Biotechnol, 1992, 23(3): 315-329.

4- Brakhage A., Molecular regulation of β-lactam biosynthesis in filamentous fungi; Microbiology and Molecular Biology Review; 1998, 62(3): 547-585.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-20]

5- Moo-Young M., Comprrehensive biotechnology (Vol 3), Oxford; U.K. pergamon press, 1985, PP; 163-185.

6- Earl A., The genetic engineering approach to beta-lactam antibiotic process and strain improvement; J. Chem. Tech. Biotech, 1991, 50: 123-126.

7- Demain AL., and Solomon N.,(eds); Manual of industrial microbiology and biotechnology, American society of microbiology, 1st ed., U.S.A. 1986, PP: 122-126 & 170-190.

8- Elander RP., in Trends in antibiotic research; in: Humezawa H., Demain AI., Hata T., and Hutchinson C.R.(eds); Japan antibiotic research association, Japan, 1982, PP: 16-31.

9- Elander RP., Change T., and Wilgus RM., Ultra violet mutagenesis and cephalosporin synthesis in strains of cephalos porium acremonium. In: Mac Donald K.D(ed); second international symposium on the genetics of industrial microorganisms; London, academic press, 1976, PP: 253-271.

10- Korean patent KR., 910437; New microorganisms for cephalosporin C production, 1991.(no pages).

۱۱- ساروخانی ـ م، معظمی ـ م، میردامادی ـ س، خان‌محمدی ـ م، آذرنوش ـ م، غربالگری و جداسازی سویه‌های مولد سفالوسپورین C، تولید و استخراج این آنتی‌بیوتیک ـ مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، بهار ۱۳۸۱، شماره ۲۱، صفحه ۱ الی ۷.

12- Clowick S., and Kaplan N(eds): Methods in enzymology(Vol.XLIII: Antibiotics); 1st ed., U.S.A. Academic press, 1975, PP: 11-56.

13- Drew S., and Demain A., Production of cephalosporin C by single and double sulfur auxotrophic mutants of cephalosporium acremonium; Antimicrobial agents and chemotherapy,1975, Vol 8, No(1): 5-10.

14- Silverstein R., Bassler C., Morill T.,(ed); Spectrometric identification of organic compounds; (Persian Translation by sadeghi M., and Saeedi M.,) 1st ed., Isfahan University press; Isfahan, Iran, 1991, PP: 56-186.

15- Pan lab, Co; internet: WWW/pan lab. Htm.(no pages).

16- Sermonti G.,(ed); Genetics of antibiotic producing microorganisms, 1st ed., London, John wilev, 1969, PP: 10-41.

17- Dermain AL., strain exchange between industry and academy. ASM news, 1983, 49: 431.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-20]

GENETIC MANIPULATION OF CEPHALOSPORIN C-PRODUCING ACREMONIUM STRAIN FOR INCREASING ANTIBIOTIC TITER

*M. Sarookhani, Ph.D [I] N. Moazzami, Ph.D [II] M. Azarnoosh, Ph.D [III]

ABSTRACT

The extent of cephalosporin C(CPC) production in producing strains is related with the expression or inhibition of the relevent genes. The goal of this study was manipulate of the producing strain in order to increase its CPC production. Acremonium chrysogenum DSM 2399 is used as parent strain. Mutagenesis is performed on solid form of optimized production media. UV ray and NTG (with their optimum doses) were used as mutagens. Random and directed (in presence of Hg++ or nystatin) selections were applied. Biological (Bioassay) and HPLC assays were performed for CPC measurment. The identity of CPC is confirmed by mass spectrometery in final resulting best strain. The optimum mutagenic doses of UV and NTG were 200 sec. And 5-7 min respectively. Also the inhibitory doses of Hg++ and Nystatin were 0.006g/dl and 0.3g/dl respectively. Raised titer mutants were obtained with both mutagens and both selection methods, although UV mutagen and the presence of Hg++ were more effective. CPC titer were rised 2.3 fold in final resulting mutant. CPC identity in its production media were shown by observing, the unique 415 ion in mass spectrometery. By mutagenesis protocols, it is available to chang the CPC-biosynthetic genes in producing strains and increase CPC titer.

Key Words: 1) Strain improvement 2) Acremonium 3) Mutagenesis

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-20]

This article is the summary of the thesis of M.Sarookhani,Ph.D under supervision of N.Moazzami,Ph.D and consultant with M.Azarnosh, Ph.D, 2002. Part of this study is presented in 6th congress of Biotechnology, Karaj, 2001 and congress of biochemistry, Tehran, 2001. Also this study is conducted under financial support of pasteur Institue of Iran.

I) *Ph.D, Assistant professor of Biotechnology and medical laboratory sciences, faculty of health and paramedicine, Qazvin University of Medical Sciences and Health Services, Qazvin, Iran.(*Corresponding author)*

II) *Ph.D, Associate professor of Biotechnology, Iranian research organization for Science and Technology(IROST), Nosrat Ave, Tehran, Iran.*

III) *Ph.D, Assistant professor of Biotechnology, Pasteur Institue, Tehran, Iran.*