

## غربالگری و جداسازی سویه‌های مولد سفالوسپورین C - تولید و استخراج

### این آنتی‌بیوتیک

دکتر ساروخانی\* - دکتر معظمی\*\* - دکتر میردامادی\*\*\* - دکتر خان محمدی\*\*\*\* - دکتر آذرنوش\*\*\*\*\*

## Screening and isolation of CPC- producing strains and its production and purification

M. Sarookhani N. Moazzami S. Mirdamadi M. Khanmohammadi M. Azarnoosh

### ☐ Abstract

**Background :** *Cephalosporin C (CPC) as a major precursor of semisynthetic cephalosporin antibiotics, is produced by species of Acremonium genus in certain conditions.*

**Objective :** *To isolate and obtain the strains, detect their production and define optimum production and purification conditions.*

**Methods :** *Selective media were used for soil screening program. Standard strains were obtained from DSMZ. CPC production was confirmed by biological and chromatographic (paper chromatography and HPLC) methods. Different kinds of media with various carbon and nitrogen sources were used to induce production. CPC were removed from the filtered and acid - treated broths by adsorption on a neutral macroporous resine (XAD - 4), followed by adsorption on a weakly basic ion - exchange resine (IRA - 67)*

**Findings:** *In soil screening program, a native CPC - producing strain was isolated. CPC production in this strain and also in standard strains was shown by different methods. Native and standard strains were differed in CPC production in various fermentation media. CPC was recovered and extracted from these media with acceptable purity.*

**Conclusion :** *Results of this study can be used for large - scale production of CPC in Iran.*

**Keywords:** *Cephalosporin C , Acremonium , Screening , Purification.*

### ☐ چکیده

**زمینه :** سفالوسپورین C (CPC) به عنوان مهم ترین پیش ساز آنتی بیوتیک های سفالوسپورینی توسط گونه‌هایی از آکرومونیم‌ها در شرایط خاص ایجاد می‌شود.

**هدف:** مطالعه به منظور جداسازی و به دست آوردن سویه‌ها، اثبات تولید در آنها و تعیین شرایط بهینه تولید و استخراج سفالوسپورین C انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** جهت غربالگری در خاک از محیط‌های انتخابی استفاده شد. سویه‌های استاندارد از DSMZ آلمان خریداری شد. تولید CPC با روش‌های بیولوژیک و کروماتوگرافی (کروماتوگرافی کاغذی و HPLC) به اثبات رسید. جهت القاء تولید، از محیط‌های دارای منابع کربنی و نیتروژنی مختلف استفاده شد. جهت استخراج CPC، ابتدا محیط‌های تولید از فیلتر عبور، اسیدی و سپس طی دو مرحله از ستون رزین ماکروپور جذبی خنثی (XAD - 4) و ستون رزین تعویض یونی بازی ضعیف IRA - 67 عبور و جمع آوری شد.

**یافته‌ها :** در مرحله غربالگری، یک سویه مولد CPC بومی جدا شد. تولید CPC در این سویه و نیز سویه‌های استاندارد با روش‌های مختلف اثبات شد. سویه بومی با سویه‌های استاندارد از نظر تولید CPC در محیط‌های مختلف تفاوت داشت. CPC از محیط‌های تولید با درصد خلوص قابل قبول بازیافت شد.

**نتیجه‌گیری :** از یافته‌های این تحقیق می‌توان برای تولید کلان CPC در کشور استفاده کرد.

**کلید واژه‌ها:** سفالوسپورین C ، آکرومونیم ، غربالگری ، خالص سازی

\* مری و عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

\*\* دانشیار سازمان پژوهش‌های علمی

\*\*\* استادیار سازمان پژوهش‌های علمی

\*\*\*\* استادیار دانشگاه بین المللی امام (ره)

\*\*\*\*\* استادیار انسینو پاستور ایران

## □ مقدمه:

سفالوسپورین C (CPC) مهم‌ترین ماده پیش ساز در تولید آنتی بیوتیک های سفالوسپورینی است که ماده ۷ آمینوسفالوسپورانیک اسید (7-ACA) را به وجود می‌آورد و با قرار گرفتن عوامل جانبی (R) روی آن، انواع و اقسام آنتی بیوتیک های قوی و مؤثر حاصل می‌شود. (۱۱) CPC به عنوان یک آنتی بیوتیک پتیدی و متابولیت ثانویه توسط آکرومونوم ها که از قارچ های محیطی هستند، در شرایط ویژه ای تولید می‌شود. در مراحل بینابینی بیوسنتز آن، ماده پنی سیلین N تولید می‌شود. (۲ و ۱۳) CPC دارای خواص فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی ویژه ای است که در شناسایی و استخراج این ماده استفاده می‌شود. (۳ و ۹ و ۱۰) ژن های مولد CPC به طور معمول تحت تأثیر عناصر کربنی، نیتروژنی و غیره مهار و فقط در شرایط خاصی از این مهار خارج می‌شوند که عموماً مربوط به شرایط محیطی های کشت است. (۲ و ۱۳ و ۱۴)

برنامه غربالگری و جداسازی سویه های مولد آنتی بیوتیک ها، به امید به دست آوردن سویه هایی با تولید بیشتر و یا خواص درمانی جدید و نیز اثرات نامطلوب کمتر همچنان جزء اولویت های مراکز تحقیقات تولید آنتی بیوتیک ها قرار دارد. (۷) از طرفی اگر چه تولید CPC در مقیاس صنعتی مدتهاست که در دنیا انجام می‌شود ولی به طور معمول در بررسی مقالات از سویه های مولد، خصوصیات آنها، نحوه تولید و استخراج CPC توصیف دقیقی وجود ندارد که ناشی از حفظ جنبه های اقتصادی است. (۷ و ۱۳) لذا در این تحقیق که در راستای طرح های کلان تولید دارو در کشور است، با به دست آوردن سویه های مولد CPC نسبت به تولید و تخلیص این ماده اقدام شد که از این

اطلاعات می‌توان در صنعت داروسازی کشور استفاده کرد.

## □ مواد و روش‌ها:

جهت جداسازی و تهیه سویه ها از خاک ۵۰ نقطه کشور نمونه برداری انجام شد و نمونه ها پس از دادن رقت های متوالی به محیط های انتخابی انتقال داده شدند. جدا سازی قارچ ها و آکرومونوم ها بر اساس خصوصیات ماکروسکوپی کلونی و یافته های میکروسکوپی در کشت اسلاید انجام شد. (۵) تأیید قطعی شناسایی سویه مولد با نظر پروفیسور والتر گمس انجام شد. سویه های استاندارد از مرکز کلکسیون DSMZ آلمان و به نام آکرومونوم کرایزوزنوم ATCC 11550 و سویه ATCC 20339 (موتانت سویه اول) خریداری شد.

جهت اثبات تولید CPC در محیط های کشت این قارچ ها از روش های زیر استفاده شد:

روش بیولوژیک کیفی و کمی با استفاده از سویه های حساس (Test strains) آلکالی ژنزفکالیس ATCC 8750 (حساس به CPC) و میکروکوکوس لوتنوس ATCC 9341 (حساس به پنی سیلین N) انجام و برای تعیین کمی بیولوژیک (بیواسی) منحنی های مربوطه ترسیم گردیدند. (۳ و ۴ و ۵)

روش های کروماتوگرافیک شامل کروماتوگرافی کاغذی (PC) با استفاده از سیستم حلال n بوتانل - اسید استیک و آب (3:1:1) انجام شد. (۳) روش HPLC با استفاده از ستون C18 و فاز متحرک بافر فسفات 0.03M صورت گرفت. (۱۰ و ۱۷) در هر دو روش، مقایسه با استفاده از استاندارد خالص CPC

(سیگما) انجام شد.

CPC به طور هم زمان بودند، البته در بررسی‌های بعدی تولید CPC فقط در یکی از این سویه‌ها اثبات شد. تأیید نهایی جنس ایزوله از گروه آکرومونیموم با نظر پروفیسور ارشاد در داخل کشور و تعیین گونه آن با نظر پروفیسور والت‌رگممس صاحب نظر جهانی آکرومونیموم‌ها در CBS هلند انجام شد که به نام *Acromonium Persicinum* شناخته شد.

جهت اثبات تولید CPC توسط سویه‌ها، فیلتره محیط‌های تولید سویه‌های استاندارد و نیز سویه‌های آکرومونیمومی ایزوله شده که دارای فعالیت برای هر دو سویه‌های حساس بودند، کروماتوگرافی کاغذی شدند که کروماتوگرام حاصله در مقایسه با استاندارد خالص CPC به دست آمد (شکل شماره ۱). همچنین HPLC مربوط به فیلتره‌های محیط‌های تولیدی سویه‌های بومی و استاندارد در مقایسه با نمودار استاندارد خالص CPC به دست آمد (نمودار شماره ۱).

از نظر قابلیت تولید CPC سویه‌ها در محیط‌های مختلف، سویه بومی جدا شده در محیط تولید مشخص (*defined*) طراحی شده برای سویه‌های استاندارد مولد، تولید CPC نداشت در حالی که هر دو سویه استاندارد در این محیط تولید داشتند و تولید سویه موتانت بیشتر بود. حذف DL - MET از این محیط باعث فقدان تولید CPC در هر دو سویه استاندارد شد. افزودن آمینواسیدهای پیش‌ساز شامل LYS و CYS و VAL، نه تنها اثری در تولید CPC در سویه بومی نداشت بلکه تولید CPC در سویه‌های استاندارد را هم کم کرد. اما در محیط‌های تولید کمپلکس با منابع از ته مختلف، تولید CPC نه تنها در سویه‌های استاندارد بلکه در سویه بومی نیز مشاهده شد. در این جا نیز تولید سویه‌های استاندارد به خصوص نوع موتانت بیشتر از سویه

جهت تولید CPC از دو نوع محیط استفاده شد: یکی محیط مشخص، معرفی شده توسط دیمین برای سویه‌های استاندارد، که حاوی گلوکز، سوکروز، آل‌آسپارژین و DL متیونین (DL-MET) و عناصر معدنی و جزئی بود. (۵) با افزودن یا حذف برخی اجزا در این محیط، عوامل مورد نیاز سویه‌ها بررسی شد. دوم محیط کمپلکس، که دارای انواعی بر حسب نوع منبع از ته کمپلکس بود که شامل سویا، پپتون، ملاس، *fish meal, yeast extract, malt extract, Corn Steep Liquor (CSL) و peanut flour* بود. (۴ و ۱۳ و ۱۴ و ۱۸)

جهت استخراج CPC، توده‌های سلولی محیط‌های کشت با سانتریفوژ جدا و سپس محیط فیلتر و PH آن اسیدی شد. فیلتره از روی ستون کروماتوگرافی رزین جذبی خنثی با تخلخل بالا از نوع XAD-4 (Merck) عبور داده شد. سپس این ستون با متانول ۳۰ درصد استخراج گردید و فراکشن‌های حاصل با روش‌های جذب UV در ۲۵۴ نانومتر، بیواسی و HPLC کنترل شد. بخش‌های حاوی CPC جمع‌آوری و این محلول روی ستون کروماتوگرافی رزین تعویض آنیونی بازی ضعیف از نوع IRA - 67 (سیگما) برده شد و ستون بابافراستات استخراج و سپس بیواسی گردید و در نهایت با HPLC آنالیز شد. (۷ و ۹)

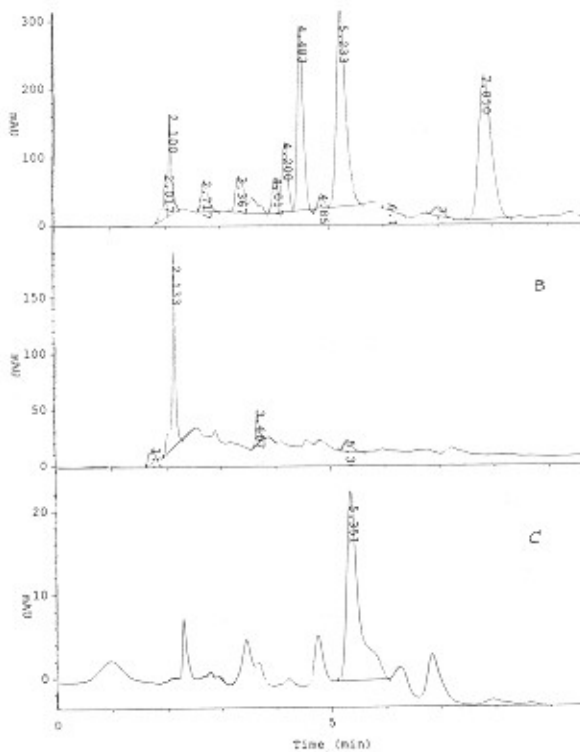
#### ۹ یافته‌ها :

۲۱ مورد از قارچ‌های جدا شده در مرحله غربالگری (۶ درصد) از جنس آکرومونیموم‌ها بودند که از این میان دو سویه در بررسی‌های بیولوژیک اولیه دارای اثر روی سویه‌های حساس به پنی سیلین N و

نمودار ۱ :

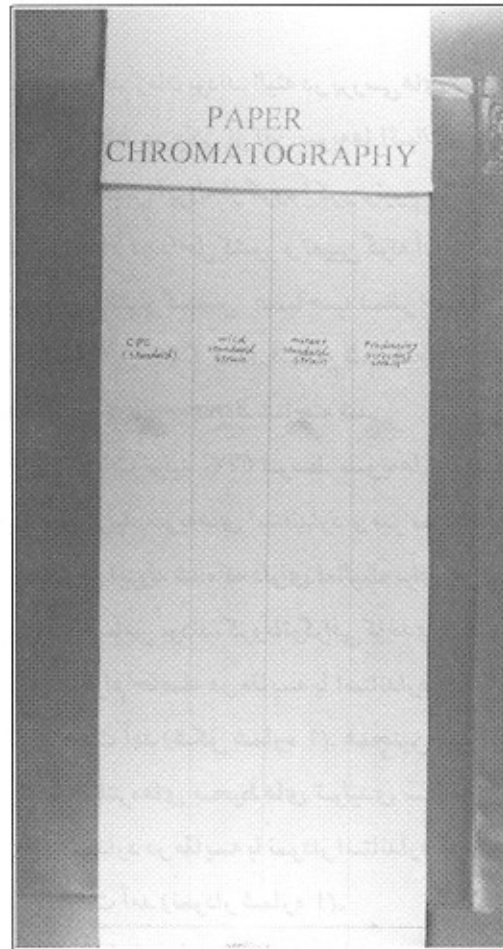
HPLC در نشان دادن تولید CPC (شکل)

A: فیلتره محیط سویه استاندارد B: فیلتره محیط سویه بومی  
C: استاندارد CPC



در محیط‌های تولیدی مایع که به نام هایفاهای متورم شبیه به مخمر (*Y.L.S.H*) می‌خوانیم، برای سویه موتانت در محیط کمپلکس حاوی سویا حداکثر بود (جدول شماره ۱).

در مورد استخراج CPC از محیط‌ها، با توجه به تولید بالاتر و بهتر سویه موتانت در محیط‌های مختلف، از محیط‌های تخمیری این سویه جهت تولید و استخراج CPC در مراحل خالص سازی استفاده شد.



شکل ۱ :

کروماتوگرافی کاغذی (PC) برای نشان دادن تولید CPC

A: استاندارد CPC B: فیلتره محیط سویه استاندارد وحشی  
C: فیلتره محیط سویه استاندارد موتانت D: فیلتره محیط سویه بومی

بومی بود. در میان منابع ازته مختلف به کار گرفته در این محیط‌ها، محیط حاوی سویا تأثیر بهتری در تولید CPC به خصوص در سویه موتانت داشت. حذف DL - MET در این محیط تأثیری در تولید سویه بومی نداشت، ولی تولیدات CPC سویه‌های استاندارد را کاهش داد. زمان تولید حداکثر CPC در محیط کمپلکس حاوی سویا و MET - DL برای سویه بومی ۳ روز، برای سویه استاندارد وحشی ۴ روز و سویه موتانت ۵ روز بود. شکل مرفولوژیک مولد CPC

فراکشن‌های با فعالیت بیولوژیک و یا جذب UV بالا در مراحل خالص سازی در ستون‌های کروماتوگرافی جمع‌آوری و مورد آنالیز HPLC قرار گرفتند و کروماتوگرام حاصله به دست آمد (نمودار شماره ۲).

### بحث و نتیجه‌گیری :

در این تحقیق سویه بومی مولد سفالوسپورین C جدا سازی شد. سویه مولد CPC نخستین بار توسط بروتزو در ساردینیای ایتالیا جدا و در یک مقاله غیر رسمی معرفی شد. طی سال‌های متمادی تلاش‌های زیادی جهت شناسایی عوامل مؤثر و لازم در رشد و تولید CPC در این سویه به خصوص توسط پروفیسور دیمین انجام شد و محیط‌های مختلفی برای تولید CPC در آنها طراحی گردید. (۶ و ۵ و ۴) همچنین جهت بهینه سازی این سویه با روش‌های دست‌کاری ژنتیکی تحقیقات گسترده‌ای صورت گرفت. سویه مولد بروتزو در ۱۹۷۱ توسط والترگمس در گروه آکرومونوم‌ها قرار گرفت و به نام *A.chrysogenum* خوانده شد. (۸) تلاش‌های دیگری در جهت غریبالگری و ایزوله نمودن سویه‌هایی با تولید CPC صورت گرفته و تولید CPC در سویه‌هایی نظیر *Emericellopsis salmosynnemata*، *Paecilomyces canneus* و *Paecilomyces persicinus* گزارش شده است که پروفیسورگمس تمام این سویه‌ها را نیز جزء آکرومونوم‌ها طبقه‌بندی نموده است. (۶ و ۵ و ۴) سویه مولد بومی ایزوله شده احتمالاً مشابه سویه *P.persicinus* P10 است که پیزانو تولید CPC را توسط آن گزارش نموده است. (۱۶)

برای تعیین تولید CPC در محیط‌های تخمیری از روش‌های متعددی نظیر روش‌های بیولوژیک و روش‌های کروماتوگرافی استفاده می‌شود که تعیین

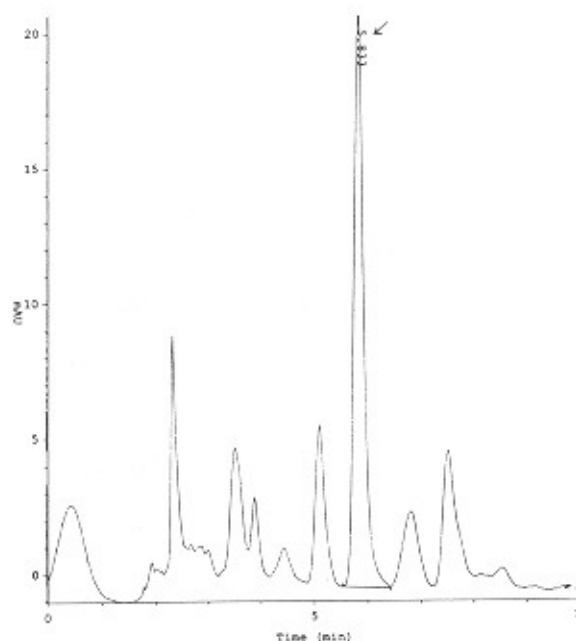
### جدول ۱:

مشخصات محیط‌های تولید CPC و تولید سویه‌ها در این محیط‌ها

ردیف	سویه / محیط	بومی	استاندارد وحشی	استاندارد مونانت
۱	محیط مشخص با گلوکز، سوکروز و Asn و DL-MET	-	+	++
۲	محیط یک منهای DL-MET	-	-	-
۳	محیط یک به علاوه lys و val و cys	-	+	+
۴	محیط کمپلکس حاوی سویا و DL - MET	+	++	+++
۵	محیط کمپلکس حاوی CSL	+	+	+
۶	محیط کمپلکس حاوی عصاره مالت و fish meal	+	+	+
۷	محیط چهار منهای DL - MET	+	+	+
۸	زمان تولید در CPC در محیط چهار (به روز)	۳	۴	۵
۹	تولید YLSH در محیط چهار	جزئی	کم	فراوان

### نمودار ۲:

کروماتوگرام HPLC نمونه محیط کشت خالص شده



از آن جایی که CPC ماده‌ای شدیداً هیدروفیل است، روش‌های متفاوتی نسبت به سایر بتالاکتام‌های هیدروفوب برای جداسازی آن از محیط‌های کشت ذکر می‌شود و عموماً در این منابع به روش استفاده توأم از رزین‌های جذبی و رزین‌های معاوضه‌گریونی که CPC را در شرایط خاص به طور ویژه در خود نگه می‌دارند اشاره شده است. (۳ و ۹) در مطالعه حاضر نیز از این روش استفاده شد، همان طور که کروماتوگرام HPLC نمونه خالص شده نیز نشان داد، CPC را به درجاتی خالص نمود. لذا با توجه به این که خالص سازی زیاد CPC که خود باید در پروسه‌های بعدی تولید قرارگیرد، از ضرورت زیادی برخوردار نیست لذا این میزان از خلوص کفایت دارد. (۷)

باید اذعان داشت که تولید هیچ یک از سویه‌های موجود در بررسی فعلی، در حد سویه‌های صنعتی مولد CPC که به صورت Patent هستند و تولیداتی در حدود ۱۵ تا ۲۰ گرم در لیتر دارند، نیست. (۹ و ۱۳) لذا لزوم به کارگیری روش‌های دستکاری ژنتیکی جهت بهینه‌سازی سویه کاملاً مشهود است و ادامه این پروژه به این امر اختصاص دارد. در این راستا با توجه به خصوصیات متفاوت سویه‌های در دست مطالعه، می‌توان با فرآیندهای مختلف موتاژنوزیا ادغام پروتوپلاستی و روش‌های مهندسی ژنتیک، ارگانسیم مولد با خصوصیات بهتری بوجود آورده و تولید CPC را بهبود بخشید.

#### ▣ سپاسگزاریم:

بدین وسیله از همکاری پروفیسور دیمین، پروفیسور والتر گمس، پروفیسور جعفر ارشاد و سرکار خانم انصاری تقدیر می‌گردد.

حضور CPC در نمونه‌ها در این روش‌ها با هم انطباق دارند، ولی حساسیت و تعیین نوع فعالیت ماده فوق در آنها متفاوت است. (۹) در مطالعه حاضر روش HPLC قادر به تعیین مقادیر کمتری از CPC بود. در صورتی که روش بیولوژیک با استفاده از سویه حساس اختصاصی فعالیت آنتی بیوتیکی CPC موجود در نمونه‌ها را بهتر نشان داد (این مقایسه در این مقاله نشان داده نشده است). با توجه به محیط‌های تولیدی با پاسخ مثبت در تولید CPC توسط سویه‌های مختلف، به نظر می‌رسد که میان عناصر لازم جهت تولید CPC در سویه‌ها تفاوت‌هایی وجود دارد که براخاژ نیز در خصوص تنظیم تولید CPC، به عناصر تنظیمی و مواد مؤثر روی ژن‌های متابولیسمی مولد CPC تأکید دارد. (۱) همچنین DL - MET در مقاله‌های متعدد و به خصوص تحقیقات چهل ساله پرفسور دیمین به عنوان محرک تولید CPC معرفی شده است. (۲ و ۶) اما در تحقیق فعلی DL - MET روی تولید سویه بومی اثری نداشت و تحقیقات داماتو نیز مؤید همین مطلب است. (۴ و ۱۵) البته در پژوهش حاضر این امر در محیط مشخص اختصاصی برای سویه بومی تجربه نشده، بلکه یافته‌های تولید CPC در محیط کمپلکس این نتیجه را نشان داد. همچنین به نظر می‌رسد در محیط‌های کمپلکس عناصر محرک رشد، ویتامین‌ها و یا آمینو اسیدهایی وجود دارند که روی ژن‌های مولد سویه بومی اثرات تنظیمی مثبتی دارند که این عناصر در محیط‌های مشخص وجود ندارند. در ضمن اثرات مثبت محیط کمپلکس حاوی سویا و DL - MET روی تولید CPC در سویه موتانت کاملاً مشهود است که این مسأله در تولید سطح بالای CPC از دید اقتصادی حائز اهمیت است.

## مراجع :

1. Bang W, Chu Z, Constandines A. Modeling, optimization and computer control of the cephalosporin C fermentation process. *Biotechnology and Bioengineering* 1988; 32: 277 - 88
2. Brakhage AA. Molecular regulation of beta - lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998; 62(3):547 - 85
3. Colowick SP, Kaplan NO. *Methods in enzymology*. USA, Academic press, 1975, vol XLIII, 48 - 121
4. Demain A L. Biochemistry of penicillin and cephalosporin fermentations. *L Loydia* 1974; 37: 147 - 67
5. Demain AL, Solomon NA. *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. USA, American society of microbiology, 1986, 410-35
6. Demain AL, Zhange G. Cephalosporin C production by *C. acremonium*: the methionine story. *Crit Rev Biotechnol* 1998; 186 (4): 283-94
7. Flickinger Mc, Drew SW. *Encyclopedia of bioprocess technology*. USA, John wiley & sons inc, 1999, vol 1, 560-69
8. Gams W, Domsch KH, Anderson T. *Compendium of soil fungi*. London, Academic Press, 1980, vol 10, 16-29
9. Ghosh AC, Mathur RK, Dutta NN. Extraction and purification of cephalosporin antibiotics, *Advances Biochem Eng Biotechnol* 1987; 56: 111-45
10. Holzhauer K, Zhou W, Schugerl K. On - line high performance liquid chromatography for the determination of cephalosporin C and by-products in complex fermentation broths. *J of Chromatography* 1990; 499: 609 - 15
11. Jawetz E. Penicillins & cephalosporins. in: Katzung BG. *Basic & clinical pharmacology*. 3rd ed. USA, lange medical book, 1987, 516-26
12. Keruffa L, Sandor E, Kozma J, Szentimail A. Methionine enhances sugar consumption, fragmentation, vaculization and cephalosporin C production in *acremonium chrysogenum*. *process biochemistry*. 1997; 32 (6): 495-9
13. Mooyaung M. *Comprehensive biotechnology*. UK, pergamon press, 1985, vol 1, 163-85
14. Pauls S, Bezharuah RL, Ghosh AC. Enhancement of growth and antibiotic titer in *Cephalosporium acremonium* induced by sesame oil. *Folia microbiol* 1997; 42 (3): 211-3
15. Pisano MA, D'Amato RF. A chemically defined medium for cephalosporin C production by *Paecilomyces persicinus*. *Antonie leeuwenhoek* 1976; 42: 299 - 308
16. Pisano MA, Vellozi EM. Production of cephalosporin C by *Paecilomyces persicinus* P10. *Antimicrob Agents Chemother* 1974; 6: 447-51
17. Roderick white E, Fox M. Custom made C18

*columns for the hydrophobic chromatography of cephalosporin C derivatives. J Antibiot 1982; 5: 1538-46*

18. Zhou W, Rieger K, Dors M, Schugerl K. *Influence of medium composition on the*

*cephalosprin C production with a highly productive strain of Cephalosporium acremonium. J of Biotechnology 1992; 23: 315-29*