بررسی تخمیر، جدا سازی و شناسایی سیکلوسپورین A با کاربرد ژل کروماتوگرافی، روش ضد قارچی و طیف سنجی

سید منوچهر غروی[۱*](Ph.D)، ناصر خدائی[۲](Ph.D)، رحیم بحری نجفی[۳](Ph.D)

۱ - دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

۲ -انستیتو پاستور ایران، تهران

۳ - دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

خلاصه

سابقه و هدف: قارچ ناقص T. Inflatum مولد سیکلوسپورین A از طریق کونیدیوم تولیدمثل می‌کند. اسپورهای آن در محیط‌های مناسب مرطوب یا جامد محتوی عصاره مالت و در حرارت بین $^{\circ}C$ ۳۰-۶ رشد می‌نمایند. سیکلوسپورین‌ها از متابولیت‌های قارچ ماکرولیدی می‌باشند. مهم‌ترین اثر درمانی سیکلوسپورین A، تضعیف سیستم ایمنی و تشکیل آنتی‌بادی در رد کردن پیوند اعضاء می‌باشد. هدف این تحقیق، افزایش تولید سیکلوسپورین A به روش جهش، توسط اشعه ماورای بنفش و فراهم کردن محیط کشت برای اگزوتروف‌های به دست آمده است.

مواد و روش‌ها: Tolypocladium (915 DSM)، محیط کشت عصاره مالت و سابورد دکستروز ۴ درصد، با کتوپپتامین، کازئین هیدرولاز و عصاره مخمر دهیدراته شدند. قارچ روی محیط جامد محتوی ۲٪ عصاره مالت، ۴٪ عصاره مخمر و ۲٪ آگار دکستروز در pH=۷/۵ کشت و در حرارت $^{\circ}C$ ۲۴ نگهداری شد. استخراج سیکلوسپورین‌ها پس از سونیکیت کردن توسط ژل کروماتوگرافی انجام گرفت. برای افزایش تولید سیکلوسپورین A جهش بااشعه فرابنفش و برای ردیابی، از روش اسپکتروفتومتری فرابنفش، تحت قرمز و روش ضدقارچی استفاده گردید.

یافته‌ها: حاصل کشت روی محیط آگار- عصاره مالت در حرارت $^{\circ}C$ ۲۴، کلنی‌های سفید مخملی بود. نمونه‌ها و فراکسیون‌های جدا شده با ژل کروماتوگرافی دارای اثر ضدقارچی روی آسپرژیلوس نیجر بودند. طیف‌سنجی با اشعه فرابنفش مرئی، حداکثر جذب (مطابق nm ۲۳۰-۲۲۰ λ_{Max}) مشابه استاندارد نشان داد و طیف فروقرمز نیز مطابق با طیف استاندارد سیکلوسپورین A بود.

نتیجه گیری: آگزوتروف‌های حاصل از موتاسیون قارچ، در محیط‌های صناعی و محیط خام کشت شدند. بهترین کشت و تولید با استفاده از عصاره مالت همراه با پس‌آب کارخانه روغن‌کشی از ذرت در تاریکی امکان‌پذیراست.

کلمات کلیدی: سیکلوسپورین A، تخمیر، کروماتوگرافی، جهش، اثرات ضدقارچی

مقدمه

در سال ۱۹۷۰ سوش‌های جدیدی از قارچ ناقص که دارای مرحله کونیدی بود از خاک‌های نروژ Wisconsin آمریکا و Hardanger vidda به دست آمد. در طبقه‌بندی جدید آن را Tolypocladium inflatum gams می‌نامند که کد آن NRRL 8044 است [۷]. این قارچ‌ها از طریق اسپورهای غیرجنسی (کونیدیوم) تولیدمثل می‌نمایند [۱۲]. اسپورها در محیط‌های

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۳۱۱-۷۹۲۲۵۸۲، نمابر: ۰۳۱۱-۶۶۸۰۰۱۱

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

مناسب از جمله مالت، اسیدهای آمینه و ترکیبات آلی و غیرآلی ازت دار و املاح معدنی رشد می‌نمایند [۴]. سیکلوسپورین A و C دارای اثر ضدقارچی قوی به ویژه برای آسپرژیلوس نیجر می‌باشند که از روش‌های شناسایی این ماده به شمار می‌آید [۱۱].

از خواص درمانی سیکلوسپورین A تضعیف پاسخ ایمنی و تشکیل آنتی‌بادی در رد کردن پیوند اعضاء است [۱۲]. علاوه بر آن اثرات ضداحتقان [۱۳]، مصرف در آرتریت و پسوریازیس است [۱۱]. در سال‌های اخیر پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در فن‌آوری تخمیر روی داده است که اثرات آن در صنایع غذایی، شیمیایی و دارویی به ویژه آنزیم‌ها، واکسن‌ها و آنتی بیوتیک‌ها چشمگیر است. در این فرایند میکروارگانیسم‌ها به عنوان بهترین بیوکاتالیزور از مؤثرترین عوامل تغییر دهنده مواد آلی در طبیعت می‌باشند؛ چون در مقایسه، از قدرت تکثیر سریعی برخوردارند، به علاوه در شرایط ساده، درجه حرارت کم و مواد غذایی ارزان، قادر به تولید مقادیر زیادی از مواد مورد نظر می‌باشند [۱]. امروزه فرآیند تخمیر روی محیط‌های جامد از روش‌های متداول است و افزایش تولید سلول‌ها با استفاده از جهش سلولی (به کمک اشعه فرابنفش، باکتریوفاژ و جابجایی قطعات DNA از روش‌های شناخته شده می‌باشد [۳]. کاربرد اشعه UV برای جهش سلولی در مقایسه با استفاده از مواد شیمیایی اثرات مرگ‌آور کمتری دارد. روش‌های کروماتوگرافی (ژل کروماتوگرافی و کروماتوگرافی جذبی) با به کار بردن آلومینا، سیلیکاژل و یا زغال فعال از بهترین راه‌های جداسازی و جستجوی ترکیبات بیوسنتز می‌باشد. برای جداسازی و شناسایی سیکلوسپورین از قسمت‌های جدا شده از ستون کروماتوگرافی، از روش بیولوژی (سیلندر و پلیت) برعلیه آسپرژیلوس نیجر استفاده می‌گردد.

مواد و روش‌ها

مواد. از مجموعه میکروبی DSM آلمان، Tolypocladium (915 DSM)، محیط‌های کشت Bactopeptamin از کارخانه Difico آمریکا، کازئین هیدرولیز شده از کارخانه Gibco آمریکا، عصاره دهیدراته مخمر از آمریکا، عصاره مالت و سابورد ۴٪ آگار دکستروز از کارخانه مرک آلمان و ملاس چغندر از ایران (کارخانه قند) تهیه شد. مواد اضافه شده به محیط کشت از جمله اسید آمینوبوتیریک، آگار خالص، دکستروز، مالتوز، اوره، سولفات آهن، هیدروژن فسفات پتاسیم، سولفات منیزیم و نیترات سدیم از کارخانه مرک آلمان، سیکلوسپورین A و D از کارخانه ساندوز سوئیس و سایر مواد شیمیایی از کارخانه مرک آلمان تهیه شدند.

محیط کشت کامل جامد برای جهش میکروارگانیسم و به صورت مایع (بدون آگار) برای تخمیر استفاده شد. این محیط شامل دکستروز (۴۰ گرم) باکوپپتون (۵ گرم)، کازئین هیدرولیز شده اسیدی (۵ گرم)، عصاره مخمر (۲/۵ گرم)، آگار (۲۰ گرم)، آب مقطر تا ۱۰۰۰ میلی‌لیتر و pH = ۵/۶ است. به محیط فوق، پس از سرد شدن، ۸ گرم در لیتر آلفاآمینوبوتیریک که از طریق فیلتراسیون استریل شده بود اضافه گردید.

محیط کشت ملاس (۳٪). این محیط شامل ملاس کارخانه (۳۰ میلی‌لیتر)، نیترات سدیم(۳ گرم)، آلفا آمینوبوتیریک اسید(۸ گرم)، آب مقطر تا ۱۰۰۰ میلی‌لیتر و pH = ۵/۳ است.

روش تهیه کشت اولیه. آمپول لیوفیلیزه اولیه (Preculture میکروارگانیسم) را در لامینار ایرفلو که قبلاً ضدعفونی شده با احتیاط باز کرده، با مقدار کمی از آن سوسپانسیون تهیه شده سوسپانسیون روی محیط کشت آگار محتوی ۲٪ عصاره مالت و ۴٪ عصاره مخمر به صورت خطی کشت شد و برای ۱۵ روز در انکوباتور ۲۴°C قرار داده شد.

روش کشت روی محیط جامد. از قارچ T.Inflatum به صورت خطی روی پلیت محتوی ۲٪ عصاره مالت و ۴٪ عصاره مخمر و ۳۰٪ آگار در pH=۵/۷ کشت تهیه و برای مدت ۱۳ روز در حرارت ۲۴°C انکوبه گردید. میسلیوم‌های روی محیط جامد به وسیله سرم فیزیولوژی و میله شیشه‌ای استریل برداشته

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

شده و به محیط تخمیر در ارلن منتقل گردید.

روش استخراج سیکلوسپورین A. محیط تخمیر پس از ۱۳ روز کشت، ابتدا به وسیله سانتریفوژ سرعت ۵-۲ هزار دور در دقیقه خوب به هم زده شد و میسلیوم‌ها با صاف کردن به وسیله قیف بوخنر از محیط کشت جدا شده، پس از خروج آب از آنها، وزن میسلیوم اندازه‌گیری شد. ابتدا میسلیوم‌های جدا شده در متانول ۹۰٪ با سونیکیت، خرد و له شد که پس از خروج محتویات آنها [۸] با متانول در روتاری $40^{\circ}C$-۳۰ تغلیظ گردید و چربی عصاره توسط پترولئوم اتر گرفته شد.

روش ژل فیلتراسیون. برای جداسازی سیکلوسپورین A از قسمت‌های جدا شده از ستون‌های جذبی از سایر سیکلوسپورین‌ها و ترکیبات مشابه، ستون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون به کار گرفته شد. برای تهیه ستون از پودر نرم سفادکس LH20 استفاده (سوسپانسیون در متانول) و در ستون با ابعاد ۳۰×۱ سانتی‌متر ریخته شد، پس از ایجاد یک ستون ۲۵ سانتی‌متری، فراکسیون‌های جذبی اکسید آلومینیوم به کمک شوینده محتوی ۲۵٪ اتیل‌استات عبور داده شد. حجم فراکسیون‌های جدا شده ۳ میلی‌لیتر بود که در آن سیکلوسپورین A ردیابی گردید.

روش ردیابی سیکلوسپورین A (روش ضدقارچی). برای تشخیص وجود سیکلوسپورین در محلول‌های آزمایش از روش میکروبی و انتشار در آگار استفاده گردید. در این روش از سیلندرهای با ابعاد ۱±۱۰ میلی‌متر طول و ۱±۶ میلی‌متر قطر داخلی، ۱±۸ میلی‌متر قطر خارجی به عنوان مخزن استفاده شد. ابتدا یک لایه آگار مغذی در پلیت‌های استریل با ضخامت یکسان ریخته شد و بعد سوسپانسیونی از اسپور قارچ آسپرژیلوس نیجر در آگار مذاب به مقدار ۱۰۸ml اسپور تهیه گردید، سوسپانسیون به صورت یک لایه نازک و یکنواخت روی آگار در پلیت ریخته شد، پس از سفت شدن لایه محتوی میکروارگانیسم، سیلندرها در عمق یک میلی‌متری قرار گرفت، سپس قسمت‌های جدا شده از ستون داخل سیلندرها وارد گردید، بعد پلیت‌ها در گرم‌خانه $25^{\circ}C$ قرار داده شد. زمانی که کلنی قارچ روی پلیت‌ها تشکیل می‌شد، پلیت‌ها را از انکوباتور خارج کرده و با توجه به هاله‌های ایجاد شده در اطراف سیلندرها، فراکسیون‌های محتوی سیکلوسپورین مشخص می‌گردید. USP،این روش را برای تعیین مقدار آنتی‌بیوتیک‌ها نیز پیشنهاد کرده است [۹].

روشهای طیف سنجی. علاوه بر روش میکروبی برای شناسایی، از روش‌های طیف‌سنجی و کروماتوگرافی برای شناسایی و تائید وجود سیکلوسپورین استفاده گردید:

الف ـ طیف Uv/vis: برای گرفتن طیف، ابتدا سیکلوسپورین A استاندارد با غلظت ۱۰۰μg/ml در متانول تهیه شد که با دستگاه اسپکتروفتومتر Uv/vis در محدوده ۴۰۰-۲۰۰ نانومتر طیف آن تهیه و سپس از عصاره‌های مختلف و قسمت‌های جدا شده از ستون‌های جذبی و ژل سفادکس LH20 طیف Uv تهیه گردید.

ب - طیف IR: برای تهیه طیف IR، سیکلوسپورین A استاندارد؛ ابتدا مطابق با توصیه USP پودر را به مدت ۳ ساعت در دمای $600^{\circ}C$ خشک کرده و سپس با پودر BrK آن را صلایه و دیسک تهیه شد. از سیکلوسپورین D استاندارد به همین ترتیب طیف تهیه و به عنوان طیف شاخص نگهداری شد. برای مقایسه، از کریستال‌های حاصله در برخی از نمونه‌ها با استفاده از BrK طیف تهیه شد.

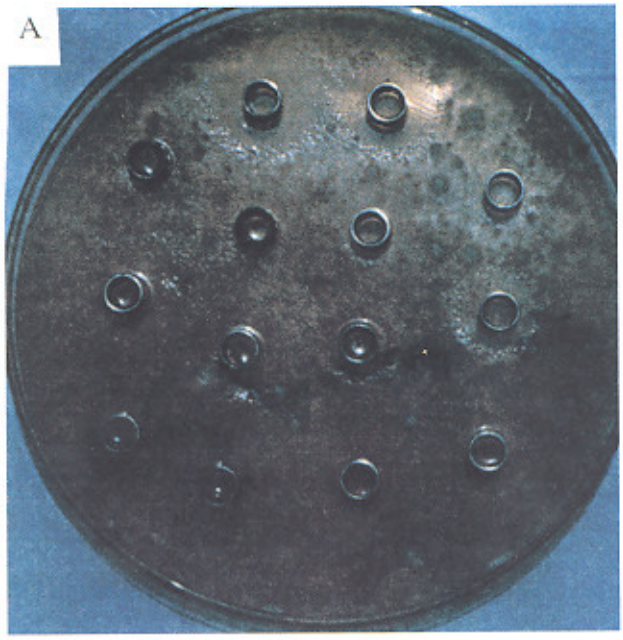
نتایج

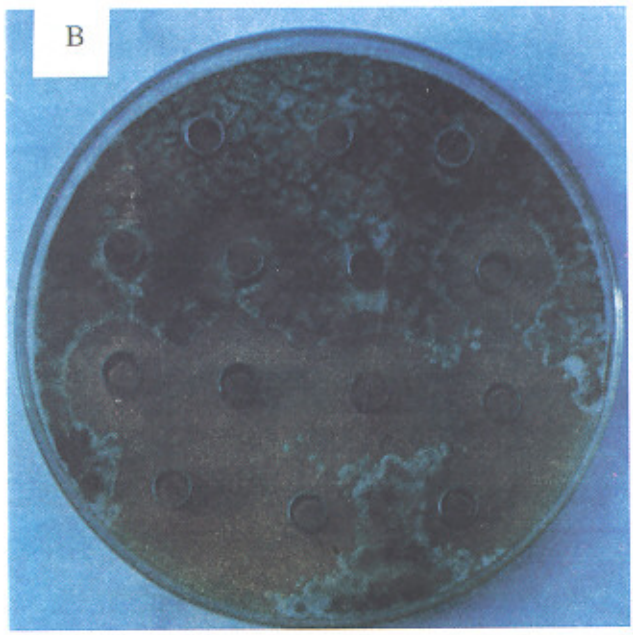
۱ - تولید کلنی. محصول کشت T.Inflatum روی محیط کشت آگار ـ عصاره مالت در انکوباتور $24^{\circ}C$ پس از ۴ روز ایجاد کلنی‌های سفید مخملی روی سطح پلیت نمود که پس از ده روز قطر آنها به ۴۵ میلی‌متر رسید.

۲ - ردیابی سیکلوسپورین A در عصاره‌ها و فراکسیون‌ها. نمونه‌هایی که دارای اثر ضدقارچی بودند در اطراف سیلندر هاله‌ای از عدم رشد ایجاد نمودند (شکل A-۱). برخی از فراکسیون‌های جدا شده از ستون نیز دارای اثر ضدقارچی بودند که معمولاً پشت سر هم از ستون خارج می‌گردیدند. برای مثال هاله ایجاد شده

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

فراکسیون‌های جدا شده از ستون ژل در شکل B-۱ دیده می‌شوند.

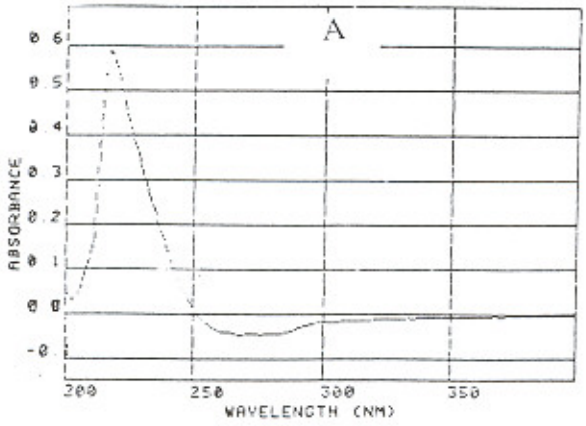


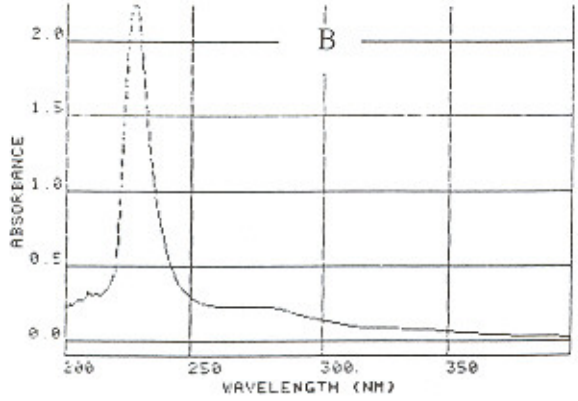


شکل ۱.A: تصویر هاله عدم رشد قارچ اسپرژیلوس نیجر در اثر عصاره‌های استخراج شده از T.inflatum. B: تصویر هاله عدم رشد قارچ اسپرژیلوس نیجر در اثر فراکسیونهای جدا شده از ستونهای جذبی.

۳ - طیف‌سنجی، ردیابی و شناسایی سیکلوسپورین A.

الف - نتایج طیف‌سنجی فرابنفش و مرئی: ابتدا طیف UV/vis با غلظت ۱۰۰μg/ml در متانول در محدوده ۴۰۰-۲۰۰ نانومتر تهیه شد که حداکثر جذب آن ۱۹۲-۲۲۰ = lmax نانومتر بود (شکل A-۲).از سیکلوسپورین D، با غلظت ۸۰μg/ml در طیف تهیه شد که کاملاً مشابه با سیکلوسپورین A (حداکثر جذب ۱۹۲-۲۲۰ = lmax نانومتر) بود. از عصاره تام ۶۰μg/ml در متانول نیز منحنی تهیه شد که حداکثر جذب ۲۳۰-۲۲۰ = lmax نانومتر بود. طیف فراکسیون جدا شده از ستون نیز در شکل B-۲ ملاحظه می‌گردد.

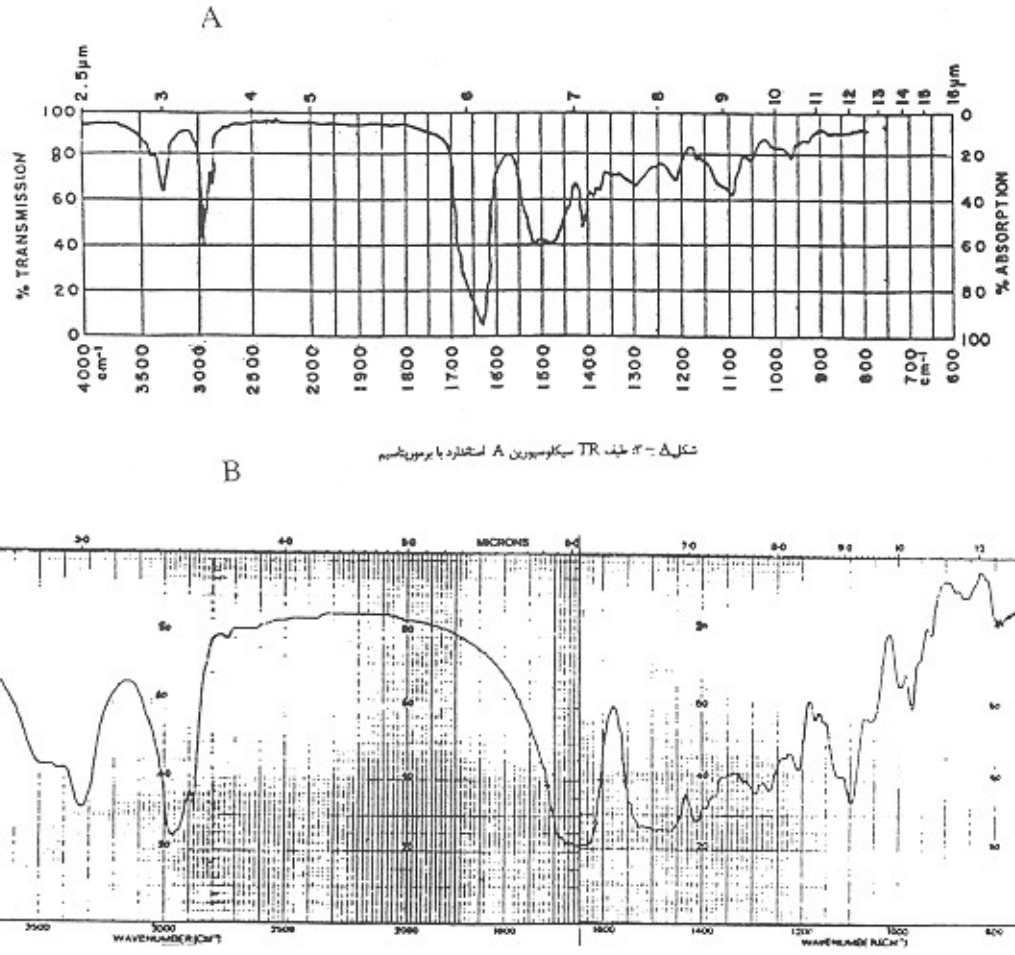




شکل ۲. A: طیف UV/vis سیکلوسپورین A با غلظت ug/ml ۱۰۰ در متانول. B: طیف UV/vis فراکسیون جدا شده از ستون کروماتوگرافی.

ب - نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز (IR): ابتدااز سیکلوسپورین A استاندارد با Brk دیسک تهیه گردید و طیف آن در محدوده IR گرفته شد (شکل A-۳). برای مقایسه، از کریستال‌های به دست آمده از استخراج و جداسازی نیز طیف IR تهیه شد (شکل B-۳). ایجاد کریستال سیکلوسپورین A بسیار دشوار بود، چون نیاز به نگهداری در استون در حرارت $^{\circ}C$ ۱۵۰ داشت (کریستال‌های سوزنی شکل حاصل می‌گردید).

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]



شکل ۳. طیف TR سیکلوسپورین A استاندارد با برمورپتاسیم غلظت. B: طیف TR کریستال‌های سیکلوسپورین A از بیوسنتز قارچ T.inflantum.

بحث

سیکلوسپورین A با خاصیت مهارکننده سیستم ایمنی، یکی از داروهای مهم برای پذیرش پیوند اعضاء است. این دارو در بیماران برای پیوند مغز استخوان یا بیماری‌های خودایمنی، پسوریازیس و آرتریت روماتویید مصرف می‌گردد. هدف از تحقیق حاضر بررسی بیوسنتز سیکلوسپورین A پس از موتاسیون T. inflatum با اشعه UV می‌باشد. در اغلب مطالعات برای تولید سیکلوسپورین A از قارچ ناقص Tolypocladium Inflatum برای تخمیر استفاده می‌گردد [۱۴]. برای تکثیر و اطلاع از چگونگی راندمان تولید سیکلوسپورین از روش کشت جامد استفاده می‌شود و برای افزایش تولید از روش جهش با اشعه UV کمک گرفته می‌شود، که اگزوتروف‌های مطلوب به دست می‌دهد [۸]. اشعه UV همانند سایر روش‌ها، از جمله استفاده از نیتروزگوانیدین خطر ابتلاء به سرطان را ندارد. در محیط کشت، اسیدآمینه به کار رفته آلفاآمینوبوتیریک اسید می‌باشد که بیشتر متابولیسم قارچ را به سمت تولید بیشتر سیکلوسپورین سوق می‌دهد [۱]. سه اگزوتروف A, B و C به دست آمد که دارای میزان میسلیوم متفاوتی در محیط‌های تخمیر بودند که براساس میسلیوم خشک آنها طبق جدول شماره ۱ به ترتیب A از همه بیشتر و B از همه کمتر بود ولی در عین حال هر سه اگزوتروف از سوش اصلی T بهتر بودند.

از سوش‌های جهشی، کشت اولیه تهیه شد [۵]، که از محیط کشت سابورد دکستروز آگار و هم از محیط آگار همراه با مخمر و عصاره مالت بودند. چنین به نظر می‌رسد که محیط کشت محتوی مخمر و عصاره مالت

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

برای بیوسنتز سیکلوسپورین ضروری است. استفاده از آگار برای ایجاد کنیدی و تکثیر قارچ ناقص، ضروری به نظر می‌رسد [۲]. بیشترین کنیدی در دمای $^{\circ}C$ ۲۴ و مدت زمان ۱۳ روز حاصل شد. برای تکثیر اینوکولوم و تخمیر از محیط‌های کشت صناعی و خام استفاده می‌شود [۲]؛ در این مطالعه نیز از محیط‌های کشت صناعی مالتوز، گلوکز و محیط کامل استفاده گردیده است. محیط خام ملاس برای تأمین هیدرات‌های کربن [۱۳] و از کازیین - پپتون (کازیین هیدرولیز شده اسیدی همراه با کوپپتون)، عصاره مخمر و مخلوط متیونین و والین برای غنی سازی محیط کشت استفاده شد [۲]. وجود پیروکسیدین هم در محیط ضروری بود [۱۵]. مدت زمان تخمیر، درجه حرارت و pH از عوامل مهم برای دستیابی به حداکثر تولید سیکلوسپورین بود. در این مطالعه زمان انکوبه کردن ۱۳ روز در حرارت $^{\circ}C$ ۲۷۰ و میزان هوادهی توسط شیکر با ۱۱۷rpm توصیه می‌گردد. استفاده از سونیکیت برای تهیه سوسپانسیون میسلیوم با متانول و بعد اتیل‌استات و دی‌کلرواتان پیشنهاد می‌گردد [۱۲]. ولی قبل از استخراج، باید بقیه متانول موجود در محیط حذف گردد، چون موجب تشکیل امولسیون و عدم جداسازی فازها خواهد شد. عصاره حاصل از استخراج، احتمالاً محتوی سیکلوسپورین A و سایر سیکلوسپورین‌ها از Z-A می‌باشد و بنابراین باید برای جداسازی، از ژل فیلتراسیون استفاده گردد [۱۴]. در این مطالعه از سفادکس LH2O و متانول برای جداسازی و خالص کردن استفاده گردید. برای ردیابی سیکلوسپورین روش ضدقارچی مناسب بود [۱۱]، زیرا با این روش می‌توان حجم زیادی از نمونه حدود یک میلی‌لیتر را در داخل سیلندر ریخته و کوچک‌ترین اثرات ضدقارچی را مشاهده کرد. این روش، ساده و ارزان است و به وسایل پیچیده‌ای نیاز ندارد. فقط باید توجه داشت که علاوه بر سیکلوسپورین A، سیکلوسپورین C نیز دارای اثر ضدقارچی می‌باشد [۸]. به هر صورت یکی از روش‌های متداول جداسازی و ردیابی می‌باشد.

برای شناسایی و تأیید روش ضدقارچی از طیف‌سنجی مرئی و فرابنفش کمک گرفته شد، که در این مورد از طیف فرابنفش سیکلوسپورین A در متانول با حداکثر جذب ۲۱۹ ـ ۲۲۰ نانومتر استفاده شد، که با مقایسه جزئیات طیف (حداکثر، حداقل و نقاط عطف) می‌توان مشخصات ترکیب خالص را تعیین کرد. البته باید توجه داشت که کاربرد طیف جذبی در نواحی فرابنفش و مرئی در آنالیزهای کیفی محدودتر از سایر روش‌ها می‌باشد، چون ممکن است در مواردی به علت گستردگی نوارهای جذبی احتمالاً تمام جزئیات را مشخص نکند، به همین علت از طیف مادون قرمز سیکلوسپورین نیز کمک گرفته شد، چون به علت داشتن ساختمان‌های ظریف برای مقاصد کیفی مناسب‌تر از طیف UV می‌باشد. با توجه به این واقعیت که هیچ‌گاه دو ملکول با ساختمان‌های شیمیایی متفاوت، دارای طیف مادون قرمز مشابه نخواهند بود، شاید دلیل استفاده از طیف IR برای شناسایی ملکول‌ها باشد. مهم‌ترین شاخص در قله جذب در ناحیه ۱۶۰۰ تا ۱۶۶۰ Cm^{-1} بود، که نشان دهنده میزان تقریباً بالای ازت با پیوند C=O آمیدی است. به هر صورت طیف IR نمونه که از کریستال‌های جدا شده با BrK تهیه گردیده بود، با طیف استاندارد کاملاً انطباق داشت.

بنابراین به طور خلاصه می‌توان نتیجه این تحقیق را یکی از موارد پیشنهادی برای تولید، جداسازی و شناسایی سیکلوسپورین A مورد مطالعه دقیق‌تر قرار داده و با سایر روش‌های دیگر مقایسه کرد.

منابع

[۱] معظمی، نسرین. شجاع‌الساداتی. عباس، مقدمه‌ای بر بیوتکنولوژی، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس، سال ۱۳۷۴.

[2] Badsgard, O., Fisher, G., Voorhees, J. and Cooper, K.D., The role of the immune system in the pathogenesis of psoriasis, J. Invest. Dermatol., 95 (1990) 32-40.

[3] Feutren, G. and Graffenried, B.V.,

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

Pharmacology of cyclosporin A (sandimmune) and clinical experience in inflammatory bowel diseases, Schweiz. Med. Wschr., 121 (1991) 748-753.

[4] Harr, E. and Ruegger, A., United states patent and tradmark office,1979, pp. 4, 117, 118.

[5] Kobel, H., Loosli, R. and Voges, R., Contribution to knowledge of the biosynthesis of cyclosporin A, Experientia. 39 (1983) 873-876.

[6] Olive, C. and Richard, L.H., The preparation and some properties of crystalline glucose 6-phosphate dehydrogenase from leuconostoc mesenteroids, Biochemistry, 5 (1967) 730-750.

[7] Petcher, T.J., Weber, H.P. and Ruegger A., Crystal and molecular structure of an iodo-derivative of cyclic undecapeptide cyclosporin A. Chim. Acta., 59 (1976) 1480-1489.

[8] Rehm, H.J. and Feed. G., Biotechnology, Vol.1, VCH, Germany, 1986, pp: 401-403.

[9] Senn, H., Weber, C., Kobel, H. and Traber, R., Selective 13 C-labeling of cyclosporin A, J. Am. Chem. Soc., 15(1991) 653-658.

[10] The united states pharmacopeia XXIII-National Formulary XVIII Mack, Pub. Co. Easton, PA. 1995, pp:443-446.

[11] Wang, D.P., Yilin, C. and Chu, D., Effect of various physical/chemical properties on the transdermal delivery of cyclosporin through topical application D.D.I.P., 23 (1997) 99-106.

[12] Wartburg, A.V. and Traber, R., Cyclosporins. Fungal metabolites with immunosuppressive activites In: G.P. Ellis, G.B. West (Eds)., Progress in mechanical chemistry. Vol.25. Elsevier Science Fub, 1988, p.1032.

[13] Wartburg, A.V. and Traber, R., Ciclosporin In : J.F. Borel (Ed.), Progress in allergy, S. Karger, Basel, 1986, pp: 28-45.

[14] Zocher, R., Nohira, T., Paul, E., Madry N. and Peeters, H., Biosynthesis of cyclosporin A: partial purification and properties of a multifunctional enzyme from tolypocladium inflatum, Biochemistry, 25 (1986) 550-553.

[15] Zocher, R., Madry, N., Peeters, H. and Klemkauf, H., Biosynthesis of cyclosporin A, Phytochemistry, 23 (1984) 549-551.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

Assesment, isolation and identification of cyclosporin A by gel chromatography, fungicidal activity and spectroscopy

M. Gharavi[*1] (Ph.D), N. Khodai[2] (Ph.D), R. Bahri Najafi[3] (Ph.D)

1- School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, Iran

2- Pastur Institute, Tehran, Iran

3- School of Pharmacy, Shiraz University of Medical Science, Shiraz, Iran

Introduction: T.inflatum (Tolypocladium inflatum) is a primitive fungi that reproducts via conidiums. Spors grow up on malt extract culture at 6-32^{0}C at wet or dry medium. Of course it is found of some others culture which are contain aminoacids, mineral or organic matter. Cyclosporin A (Cy A) is the metabolite of t.inflatum. Cy A is an immunosuppressive drug. The aim of this study was to promote production of Cy A by mutation via ultraviolet radiation (UVR) and to find out a suitable medium for auxotrophs.

Material and Methods: Tolypocladium inflatum (DSM 915), malt extract and sabourd 4% dextrose agar, Bactopeptamine, casein hydrolysate and yeast extract dehydrated. The fungi was cultivated for 10-20 days duration on a medium contains 2% malt extract, 4% yeast extract and 20% agar at pH 5.7. Extraction was carried out by gel chromatography. For mutation of the fungi, UVR was used, and for identification of Cy A fungicidal, ultraviolet, visible and infra-red spectroscopy were methods of choice.

Results: White velvey colonies were collected from the medium of agar and malt extract. Samples and fractions of gel chromatography extraction showed antifungal activity on aspergillus niger. Ultraviolet visible spectroscopy gave λmax similar to that of standared and infra-red spectra was similar to the standared spectra.

Conclusion: Auxotrophic strains were cultivated on synthetic and raw mediums. Finally the high production of Cy A was produced of sugar factroy and hogwash of corn oil pressing factroy, at a dark place.

Keywords: Cyclosporin; Fermentation; Chromatography; Mutation; Fungicidal activity

* Corresponding author. Fax: 0311-6680011; Tel: 0311-7922582

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]