مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۶، شماره ۴، زمستان ۸۵، صفحات ۲۲۵ تا ۲۳۰

Original Article

بررسی میزان افزایش تولید داروی دسفرال توسط باکتری استرپتومایسس گریزئوفلاووس

عظیم اکبرزاده[۱]، داریوش نوروزیان[۱]، علی فرهنگی[۲]، محمد رضا مهرابی[۲]، سید محمد اطیابی[۳]، داود زارع[۴]، کریم عمادزاده[۵]، هادی انصاری هادیپور[۶]، مهری مرتضوی[۷]، زهرا صفاری[۷]، مروارید شفیعی[۷]، مریم مردانه[۷]

[۱] دانشیار، بخش پایلوت بیوتکنولوژی، انیستیتوپاستور ایران، تهران
[۲] محقق، بخش پایلوت بیوتکنولوژی، انیستیتو پاستور ایران، تهران
[۳] استادیار، بخش پایلوت بیوتکنولوژی، انیستیتو پاستور ایران، تهران
[۴] دانشجوی کارشناسی ارشد، شیمی معدنی، بخش پایلوت بیوتکنولوژی، انیستیتو پاستور ایران، تهران
[۵] مربی، دانشگاه آزاداسلامی واحد دهاقان، اصفهان
[۶] استادیار، دانشگاه علوم پزشکی اراک
[۷] همکار طرح، بخش پایلوت بیوتکنولوژی، انیستیتو پاستور ایران، تهران

چکیده

سابقه و هدف: *داروی دسفرال با نام علمی Desfferioxamine B Mesylate یک ترکیب کیلات‌کننده آهن است که باراضافی آهن خون بیماران مبتلا به تالاسمی ماژوری که خون دریافت می‌کنند را از طریق صفرا و ادرار دفع می‌کند. نظر به اینکه شرکت دارویی NOVARTIS تنها تولید کننده آن در جهان است و ارزبری زیادی برای کشوردارد، ما بر آن شدیم که با ایجاد موتاسیون در گونه استرپتومایسس گریزئوفلاووس (S. griseoflavus) میزان تولید این ماده دارویی را افزایش دهیم.*

روش بررسی: *در این مطالعه کاربردی باکتری‌های گرم مثبت استرپتو مایسس گریزئوفلاووس به‌صورت لیوفیلیزه با کد PTCC 1130 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری و در محیط Des4 جامد کشت داده شد. سپس با استفاده ا ز پرتوهای ماورای بنفش، جهش ایجاد شده و با تکنیک پروتوپلاست فیوژن، سویه‌های فوزانت نوترکیبی تهیه شد تا مولکول دسفرال را به میزان بیشتری تولید کند. متغیرها شامل میزان رشد باکتری‌ها و غلظت داروی دسفرال تولید شده توسط آنها بود که از طریق اسپکتروفتومتری، کروماتوگرافی، طیف‌سنجی مادون قرمز و طیف سنجی جرمی مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *میزان تولید دسفرال در سویه‌های موتانت S7011 & C7031 و سویه‌های فوزانت FP9 & FP10 نسبت به سویه وحشی به‌طور قابل توجهی افزایش یافته بود و این افزایش در مورد فوزانتهای FP9 و FP10 به ترتیب برابر ۶۸٪ و ۸۱ ٪ بود.*

نتیجه‌گیری: *موتاسیون و نوترکیبی ایجاد شده از طریق پروتوپلاست فیوژن باعث افزایش تولید داروی دسفرال در باکتری فوق‌الذکر گردید و مقایسه آن با دسفرال تولیدی شرکت نوارتیس به‌وسیله طیف سنجی مادون قرمز نشان داد که این دو طیف مربوط به یک مولکول است و هیچ تفاوتی بین آن دو نیست.*

واژگان کلیدی: *استرپتومایسس گریزئوفلاووس، موتاسیون، پروتوپلاست فیوژن، دسفرال*

مقدمه

تزریق خون یکی از روش‌های اصلی درمان بیماران تالاسمی ماژور است، اما با عوارضی نظیر افزایش بارآهن خون همراه است (۱). حذف آهن اضافی برای اجتناب از عوارض مسمومیت آهن بر روی قلب و کبد و دیگر اندامها ضروری است. دسفری‌اکسامین‌ها ترکیباتی با وزن مولکولی پایین و کیلات‌کننده آهن هستند که توسط گونه‌های متعددی از استرپتومایسس‌ها، نوکاردیا و میکرومونوسپورا تولید می‌شوند (۲). در حال حاضر دسفرال (دسفرواکسامین مزیلات) تنها کیلات‌کننده آهن اضافی موجود در خون بیماران مبتلا به

آدرس نویسنده مسئول: تهران، خیابان ۱۲ فروردین، انستیتو پاستور ایران، گروه پایلوت بیوتکنولوژی، دکترعظیم اکبرزاده (**email**: azimakbarzadeh@pasteur.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۳/۱۸
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۱۰/۲۵

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]

تالاسمی ماژور است که هم‌اکنون توسط شرکت نوارتیس (Novartis Co.) از فرمانتاسیون سویهٔ خاصی از استرپتومایسس پیلوسوس (Streptomyces Pilosus) تولید می شود (۳، ۴). این فرایند ۶ روز طول می‌کشد و تولید دسفری‌اکسامین B پس از شروع فاز رشد آغاز می‌شود. مقدار دسفری‌اکسامین B در طی دورهٔ فرمانتاسیون را می‌توان بوسیله HPLC اندازه‌گیری کرد.

استرپتومایسس‌ها، باکتری‌های گرم مثبت رشته‌ای هستند که به‌خاطر تولید بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها و تعداد زیادی ازمتابولیت‌های اولیه و ثانویه اهمیت صنعتی دارند. از سال ۱۳۷۵ در انستیتو پاستور ایران در بخش پایلوت بیوتکنولوژی به‌عنوان طرح ملی، این دارو در مقیاس آزمایشگاهی با موفقیت تولید شده و کنترل کیفی آن دریافت شده است.

با توجه به تعداد نسبتاً زیاد مبتلایان به تالاسمی ماژور در ایران، در این تحقیق سعی شده با استفاده ازنوترکیبی‌های حاصل از پروتوپلاست‌فیوژن درون‌گونه‌ای در گونه S. griseoflavus، تولید دسفری‌اکسامین B افزایش یابد. دلایل به‌کارگیری تکنیک پروتوپلاست‌فیوژن این است که اولاً ثابت شده این روش کارآمدترین روش ایجاد نوترکیبی در استروپتومایسس‌ها است و ثانیاً هنوز توالی ژن‌های دخیل در ساخت دسفری‌اکسامین به خوبی شناسایی نشده است تا ژن آن کلون شود.

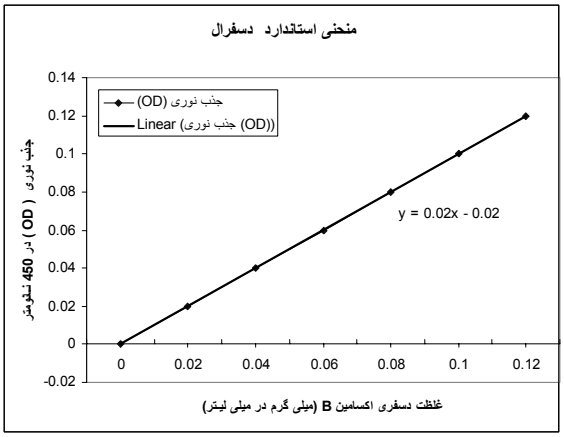
در مطالعاتی که بر روی استرپتومایسس‌ها انجام شده است، مشخص گردیده که لیزین و اورنیتین پیش‌ساز دسفری-اکسامین B می‌باشند. دو ژنی که در تولید دسفری‌اکسامین B دخالت دارند، در سال ۱۹۸۸ توسط Schupp و همکاران کلون شده‌اند (۵). در این برنامه مشخص شد که رونویسی این ژن‌ها و تولید mRNA پلی‌سیسترونی حاصل، تنها در شرایط کمبود آهن انجام می‌شود. هدف اصلی در این تحقیق، افزایش میزان تولید دسفری‌اکسامین B با استفاده از روش پروتوپلاست‌فیوژن درون‌گونه‌ای در باکتری S.griseoflavus است. هم‌چنین روند رشد S.griseoflavus و روند تولید دسفری‌اکسامین B، تهیه سویه‌های شاخص‌دار (Marked Strains) این گونه با استفاده از عوامل جهش‌زا، بهینه‌سازی شرایط و روش‌های تهیه پروتوپلاست از این گونه و فیوژن و باززاد (Regeneration) پروتوپلاست‌ها و نرخ نوترکیبی حاصل از انجام تکنیک پروتوپلاست‌فیوژن بررسی شد.

مواد و روشها

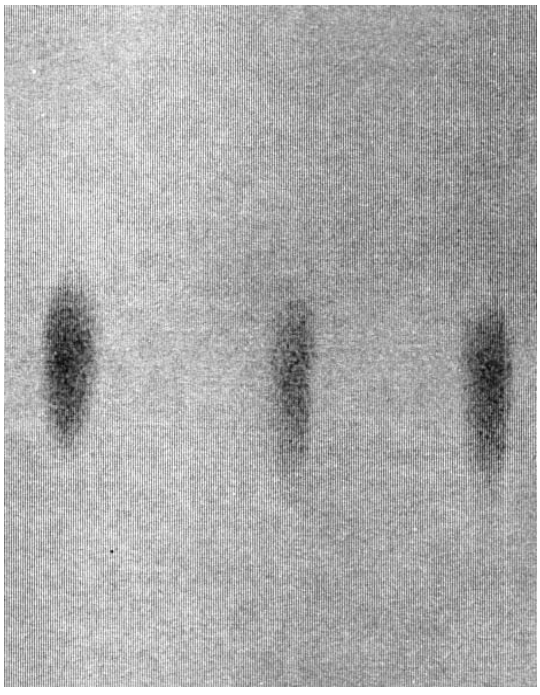
در این پژوهش کاربردی، باکتری به صورت لیوفیلیزه از کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران با کد PTCC1130 خریداری و سپس بر روی محیط‌های کشت مختلف برده شد و منحنی رشد و روند تغییرات pH در حین رشد باکتری مذکور به‌دست آمد. ۵۰ نمونه در ارلن و ۵۰ نمونه در فرمانتور B. Brown ۵ لیتری کشت داده شد. در این روش برای پی بردن به این مطلب که آیا سویه مذکور قادر به تولید دسفری‌اکسامین است، از روش تشکیل هاله استفاده شد. برای این کار، پس ازکشت سویه فوق در محیط Des4 جامد (محیط کشت Des4 محیط شناسایی کیفی دسفری‌اکسامین می‌باشد که حاوی ترکیبات زیر می‌باشد: دکسترین ۲۰ گرم‌درلیتر، فسفات پتاسیم دی‌بازیک ۰/۵ گرم‌درلیتر، سولفات منیزیم ۷ آبه ۰/۲۵ گرم‌درلیتر، سولفات روی ۷ آبه ۰/۰۵ گرم‌درلیتر، متیونین ۰/۱ گرم‌درلیتر، لیزین ۰/۲۵ گرم‌درلیتر، مانیتول ۲۰ گرم‌درلیتر، کربنات کلسیم ۵ گرم‌درلیتر، آسپاراژین ۱۲ گرم‌درلیتر و ترئونین ۰/۱ گرم‌درلیتر) کاغذ آغشته به معرف سولفات آهن آمونیاکی [(NH4)Fe(SO4)2.12H2O] را بر روی کلنی ۴ روزه قرار داده، هاله قهوه‌ای رنگی در سطح و عمق محیط اطراف کلنی تشکیل گردید که طبق نظر Schupp و همکارانش (۵) نشان‌دهنده وجود دسفری‌اکسامین در محیط است. روش تهیه معرف سولفات آهن آمونیاکی به این صورت است که ابتدا به مقدار لازم اسید سولفوریک ۱٪ تهیه و سپس به میزان ۵ گرم در لیتر نمک سولفات آهن آمونیاکی به آن اضافه می‌گردد. نمک و اسید را به ملایمت حرارت داده تا بلورهای نمک در اسید حل شود، پس از مدت کوتاهی محلول زرد و شفافی بدست می‌آید که پس از ۲۴ ساعت کاملا بی‌رنگ و شفاف می‌گردد. برای تعیین مقدار تولید دسفری‌اکسامین از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد که قبل از آن، منحنی استاندارد جذب فری‌اکسامین با استفاده از دسفرال محصول کارخانه نوارتیس تهیه و ترسیم شد. برای این‌کار غلظت مشخصی از دسفرال را در آب مقطر حل کرده و پس از افزودن سولفات آهن آمونیاکی به نسبت ۱۰ v/v٪ جذب نوری هر غلظت در طول موج ۴۳۰ نانومتر قرائت گردید و سپس نمودار استاندارد رسم گردید که در نمودار ۱ نشان داده شده است. به‌منظور مشخص شدن اینکه هاله تشکیل شده در محیط Des4 و هم‌چنین جذب نوری قرائت شده در محیط آرد سویا واقعا مربوط به دسفری‌اکسامین موجود در محیط بوده است،

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]

دسفری‌اکسامین تولید شده، پس از استخراج به روش کروماتوگرافی (شکل۱) و طیف سنجی IR (نمودار ۲ و ۳) و جرمی مورد بررسی قرار گرفت و پس از مقایسه با نتایج حاصل از دسفرال استاندارد، تایید گردید.



نمودار ۱- منحنی استاندارد دسفری‌اکسامین B. (در این منحنی جذب نوری غلظت‌های فزاینده دسفری‌اکسامینB در طول موج ۴۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شده است که با استفاده ازآن، غلظت‌های تولیدمان را محاسبه می‌کنیم)



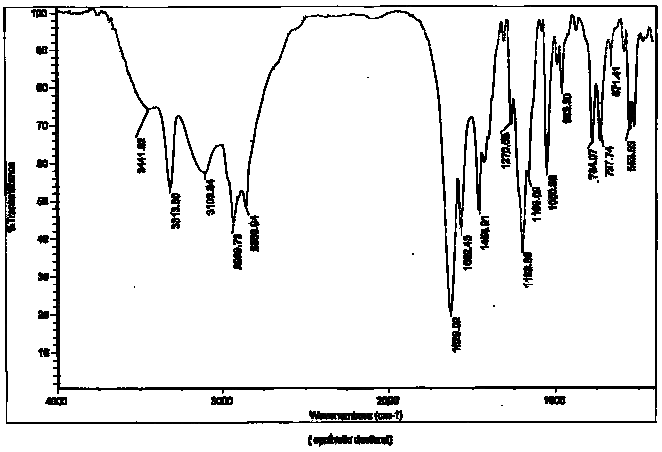
۱ ۲ ۳

شکل ۱- مقایسه کروماتوگرافی کاغذی سه نمونه دسفرال.
ستون ۱، نمونه استخراج شده از کشت سویه فوزانت (F10)؛ ستون ۲، نمونه استخراج شده از کشت سویه استاندارد *S.griseoflavous* و ستون ۳، نمونه استاندارد (دسفری اکسامین B خالص) است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، لکه‌های حاصل از کروماتوگرافی دسفری‌اکسامینB در ستون‌های ۱ و ۲ با لکه حاصل از نمونه استاندارد (ستون ۳) مطابقت دارد.

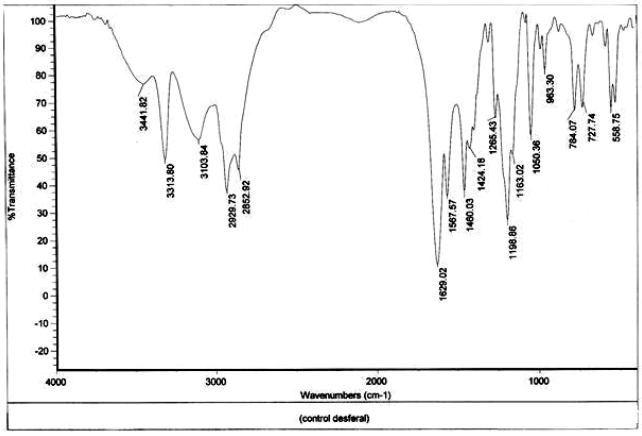
جهت استخراج دسفری‌اکسامین ازمحیط کشت، از دستورالعمل Gaeumann (۶) استفاده شد و منحنی تولید دسفری‌اکسامین توسط باکتری و روند تغییرات pH در حین تولید رسم گردید (نمودار ۴). در کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران، تنها سویه وحشی آن موجود بود. لذا جهت تهیه سویه‌های مورد نیاز، با استفاده از پرتو ماورای بنفش سویه‌های جهش‌یافته ایجاد گردید. سپس منحنی بقاء باکتری برای دوزهای مختلف تابش و دوزی که در آن ۵-۱٪ سلول‌ها قادر به ادامه زندگی باشند، تهیه و ترسیم گردید. به‌منظور جداسازی موتانتی که به غلظت‌های مشخص سدیم آزاید و کریستال ویوله به عنوان شاخص، مقاومت داشته باشد، اسپورهای باکتری‌ها در محیط انتخابی حاوی یکی از این مواد تحت تابش ماورای بنفش قرار گرفتند. پس از انجام کلیه مراحل دو موتانت بنام S7011 و C7031 (در واقع بر اساس بزرگی هاله) در محیط Des4 جدا شده و دسفری‌اکسامین تولید شده پس از استخراج برای آزمایش کروماتوگرافی (شکل ۱) و مقایسه با سویه اصلی به‌کار گرفته شد. منحنی رشد و تولید دسفری‌اکسامین موتانت‌ها و روند تغییرات pH در حین رشد و تولید آنها ترسیم شد (نمودار ۴). برای تهیه پروتوپلاست از موتانت‌ها، ازروش Matsushima و Baltz (۷) استفاده شد. غلظت مناسب گلایسین و زمان مناسب سونیکاسیون (Sonication) دو فاکتور مهم در این امر محسوب می‌شدند. جهت این کار محیط MYB تهیه و گلایسین با غلظت‌های ۰/۰۹ – ۰/۰۱ درصد به آن اضافه شده و پس از تلقیح با ۰/۵ میلی‌لیترسوسپانسیون اسپوری حاوی ۱×۱۰^{۶} در میلی‌لیتر اسپور، گرماگذاری در ۲۹ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ rpm انجام شد. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری جذب نوری هر یک از کشت‌ها پس از سونیکاسیون و یکنواخت کردن در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. غلظتی از گلایسین که جذب آن نصف جذب شاهد، یعنی محیط تلقیح شده بدون گلایسین باشد به عنوان غلظت مناسب گلایسین در نظر گرفته شد. جهت تعیین زمان مناسب سونیکاسیون، کشت ۲۴ ساعته باکتری تهیه شد و با نسبت ۱ به ۲۰ با محیط MYA آگار رقیق شد و برای زمان‌های مختلف تحت تاثیر امواج پالسی با قدرت ۷۶ وات قرار گرفت. سپس از هر یک از نمونه‌های سونیکه شده، لام میکروسکوپی تهیه شده و به روش گرم، رنگ‌آمیزی شد. بهترین زمان سونیکاسیون، زمانی است که میسلیوم‌ها به خوبی از هم جدا شده باشند ولی متلاشی نشوند. جهت تهیه پروتوپلاست‌ها، سویه‌ها در محیط حاوی گلایسین با غلظت

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]

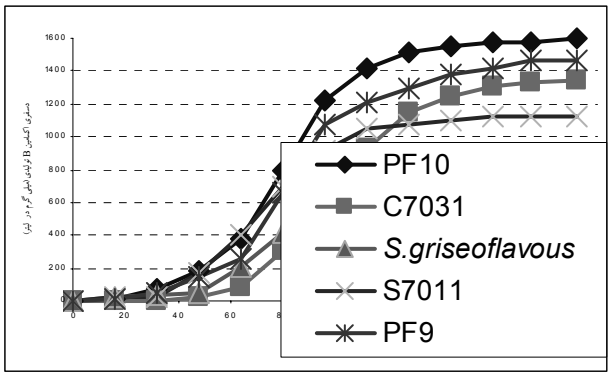
بهینه کشت شده و سپس با مناسب‌ترین زمان سونیکه شدند. سپس با استفاده از آنزیم لیزوزیم با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پروتوپلاست آنها جدا گردید (۸). پروتوپلاست‌ها با روش تهیه رقت‌های متوالی آگار نرم روی محیط باززاد پخش شدند. برای محاسبه فراوانی پروتوپلاست‌های قابل باززایی رقت مناسبی از کشت باکتری (پس از سونیکاسیون) روی محیط باززای R2 برده شد. تعداد کلنی‌های حاصل روی این محیط را CFU (Colony Forming Unit) می‌گویند (۹). با در دست داشتن CFU، تعداد پروتوپلاست در واحد حجم و درصد سلول‌های زنده غیرپروتوپلاستی می‌توان فراوانی پروتوپلاست-های قابل باززایی را به‌دست آورد (۱۰) .



نمودار ۲- طیف IR از دسفرال تولید شده در بخش پایلوت انستیتو پاستور ایران.



نمودار ۳- طیف IR از دسفرال تولید شده در شرکت نوارتیس (دسفرال استاندارد)



نمودار ۴- مقایسه تولید دسفری‌اکسامین B در S.griseoflavous و سویه‌های موتانت و فوزانت آن. (همان‌طور که در نمودار دیده می‌شود، میزان تولید دسفرال در سویه‌های موتا نت (S7011، C7031) و فوزانت (FP9 ، FP10) بطور قابل توجهی نسبت به سویه وحشی افزایش یافته است)

برای تعیین فراوانی کل سلول‌های باززاد شده به درصد، میانگین تعداد کلنی‌ها روی محیط باززاد بر تعداد سلول‌های شمارش شده توسط لام نئوبار تقسیم شده در عکس رقت و عدد ۱۰۰ ضرب شد. فراوانی سلول‌های غیر پروتوپلاستی باززاد شده به درصد برابر بود با تعداد سلول‌های شمارش شده توسط لام نئوبار تقسیم بر میانگین تعداد کلنی‌ها روی محیط باززاد ضربدر عکس رقت ضربدر ۱۰۰. برای تعیین فراوانی پروتوپلاست‌های باززاد شونده، فراوانی سلول‌های غیرپروتوپلاستی باززاد شده از فراوانی سلول‌های باززاد شده کسر شد. سهم واقعی نوترکیبی بین دو شاخص برابر بود با تعداد کلنی‌های آخرین سری محیط‌های انتخابی تقسیم بر تعداد کلنی های محیط انتخابی اول (باززاد).

یافته‌ها

پس از خواندن جذب مربوط به دسفری‌اکسامین در محیط آرد سویا در فواصل زمانی ۸ ساعت و مقایسه آن با منحنی استاندارد جذب دسفری‌اکسامین (نمودار ۱)، مقادیر تولید بر حسب میلی گرم در لیتر محاسبه و منحنی تولید ترسیم شد که در (نمودار ۴) نشان داده شده است. اولین قدم جهت گزینش موتانت، انتخاب جهش یافته‌هایی بود که نسبت به غلظت W/V % ۰/۰۰۳ سدیم آزاید و غلظت W/V % ۰/۰۰۰۳ کریستال ویوله مقاوم باشند. در این راستا، در گروه سدیم آزاید، ۱۷ سویه و در گروه کریستال ویوله، ۹سویه انتخاب شدند که پس از انجام آزمایشات ضربدری، تنها دو سویه C7031 و S7011 برای ادامه آزمایش مناسب بودند.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]

مقایسه منحنی تولید دسفری‌اکسامین توسط سویه والد اصلی و C7031 و S7011 در نمودار ۴ نشان داده شده است. نتایج مربوط به تولید دسفری‌اکسامین توسط موتانت‌ها پس از استخراج و کروماتوگرافی کاغذی و در مقایسه با استاندارد نوارتیس، نشان دهنده تولید دارو توسط موتانت‌ها می‌باشد که در شکل ۳ نشان داده شده است. همچنین طیف IR دسفری‌اکسامین تولید شده توسط بخش پایلوت بیوتکنولوژی انستیتو پاستورایران، با طیف IR دسفری‌اکسامین B شرکت نوارتیس به‌عنوان استاندارد در نمودارهای ۲ و ۳ جهت مقایسه با یکدیگر نشان داده شده است. هیچ فرقی بین دسفری‌اکسامین تولید شده در این بخش با دسفری‌اکسامین شرکت نوارتیس وجود نداشت، به‌عبارتی دسفری‌اکسامین تولید شده از نوع B بود.

بهترین زمان کشت موتانتS7011 ، برای رسیدن به حداکثر پروتوپلاست،۴۰ ساعت و برای موتانت C7031 ، ۶۰ ساعت برآورد شد. زمان مجاورت با ۱۰ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر لیزوزیم برای دو موتانت به ترتیب ۴۰و ۲۵ دقیقه بود (۱۱-۷).

در جدول ۱ فراوانی سویه‌های به‌دست آمده نشان داده شده است.

جدول۱- فراوانی سویه ها جهت تولید دسفری اکسامین

نوع سویه ها	فراوانی (درصد)
سلولهای باززاد شده سویه S7011	۴۷/۵
سلولهای غیر پروتوپلاستی باززاد شده سویهS7011	۱۵/۸
پروتوپلاستهای باززاد شونده سویهS7011	۳۱/۷
سلولهای باززاد شده سویهC7031	۳۹/۴
سلولهای غیر پروتوپلاستی باززاد شده سویهC7031	۱۱/۴
پروتوپلاستهای باززاد شونده سویهC7031	۲۸

دمای رشد سلول‌ها قبل از تشکیل پروتوپلاست و دمای انکوباسیون حین باززاد از مهمترین عوامل مؤثر بر فراوانی باززاد و فراوانی نوترکیبی هستند. در این تحقیق دمای ۲۹ درجه سانتیگراد بهترین دما بود. هم‌چنین فراوانی نوترکیبی حاصل از PEG1000 به مراتب بیشتر از PEG4000 بود.

پس از استخراج و کروماتوگرافی دسفری‌اکسامین تولیدی توسط فوزانت PF10 و مقایسه Rf و IR آن با استاندارد و دسفری‌اکسامین سویه اصلی S. griseoflavus، مشخص شد که مانند سویه اصلی و موتانت های C7031 و S7011، قسمت اعظم دسفری‌اکسامین تولید شده توسط این فوزانت از نوع دسفری‌اکسامین B است. از نظر مرفولوژی و قدرت اسپورزایی، فوزانت‌های PF9 و PF10 با سویه والد اصلی و موتانت‌ها هیچ تفاوتی نداشتند (۱۱-۷).

بحث

افزایش تولید در سویه‌های موتانت غیرمنتظره نیست، چون جهش‌های گسترده‌ای که توسط پرتو ماورای بنفش بر این سلولها اعمال شده، می‌توانسته بر بسیاری از ژن‌هایی که به نحوی در تنظیم تولید دسفری‌اکسامین نقش یا دخالت داشته باشند، اثر گذارد. به‌علاوه با تغییراتی که در دیوارهٔ سلول پدید می‌آید، برداشت مواد غذایی توسط سلول و برون‌ده متابولیت‌های آن نیز افزایش می‌یابد. تهیه و تشکیل پروتوپلاست مرحله بسیار دقیق و حساسی است. چون هرگونه آسیبی که در این مرحله به پروتوپلاست وارد آید، بر فیوژن و باززاد آن اثر می‌گذارد و بالطبع فراوانی نوترکیبی را تحت تأثیر قرار می دهد (۱۱). حساسیت این مرحله باعث شده که محققان مجبور شوند، برای هر کدام از گونه‌های مورد مطالعه‌شان، شرایط تشکیل پروتوپلاست و متعاقب آن شرایط فیوژن و باززاد را به دقت مورد بررسی قرار دهند و این شرایط را برای آن‌گونه خاص بهینه نمایند. بنابر این هرگز کسی نمی‌تواند ادعا کند که روش ابداعی او برای تمامی باکتری‌ها عمومیت دارد و همیشه قابل استفاده است. اما گاهی روش‌های کلی ابداع می‌شوند که می توان آنها را با تغییرات جزئی با شرایط باکتری مورد نظر، تطابق داد. سونیکاسیون سبب قطعه قطعه شدن میسلیومها و باز شدن کلاف بهم پیچیده کلنی استروپتومایسس‌ها می‌شود و در این عمل، گلایسین با سست کردن اتصالات بین میسلیوم‌ها، به جدا شدن آنها کمک می‌کند. به‌علاوه منافذی که در اثر سونیکاسیون در دیواره باکتری ایجاد می‌شوند، راه را برای نفوذ هرچه سریع‌تر آنزیم به داخل دیواره، باز می‌کند و البته وجود گلایسین در ایجاد پیوندهای پپتیدوگلیکان دیواره و نفوذپذیرکردن آن نسبت به آنزیم بی‌تأثیر نیست (۱۰). هر کدام از ژنهایی که مسوول سرعت تکثیر، ویژگی‌های مورفولوژیکی، سرعت اسپورزایی و یا تولید یک نوع متابولیت هستند می توانند به ترتیبی که گفته شد، دچار نوترکیبی شوند، اما از آنجا که شاخص انتخاب یک سلول فوزانت یا نوترکیب، توانایی رشد آن در محیط انتخابی هر دو والدش است، تنها سلول‌هایی که در اثر نوترکیبی چنین

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]

توانایی را پیدا کرده باشند، قابل غربال کردن هستند. سویه‌های نوترکیب، تنوع وسیعی را در تولید دسفری‌اکسامین نشان می دهند. دو فوزانت PF9 و PF10 به ترتیب ۶۸٪ و ۸۱٪ افزایش تولید نسبت به سویه والد اصلی را نشان دادند (۵). در حال حاضر این طرح ملی با تولید نیمه صنعتی داروی دسفرال با بازده ۲/۷ گرم در لیتر به مرحله تولید صنعتی نزدیک می‌شود. با بهینه‌سازی کلیه مراحل تولید وکنترل کمی وکیفی آنها و نیز تکرارپذیرنمودن آنها و جمع‌آوری کلیه داده‌ها که از یک‌صد بار کشت در اشل آزمایشگاهی و در فرمانتورهای نیمه‌صنعتی بخش پایلوت بیوتکنولوژی انستیتو پاستورایران حاصل شده است و پس از تهیه دانش فنی نیمه‌صنعتی تولید داروی دسفرال، مرحله صنعتی آن را شروع می‌کنیم. البته پیشنهاد عملی برای این طرح ملی، تهیه سوش صنعتی باکتری استرپتومایسس گریزئوفلاووس است که گروه پایلوت بیوتکنولوزی انستیتو پاستور ایران در حال اجرای آن می باشد.

REFERENCES

۱. آذرکیوان آ. ارزیابی روش جدید در تجویز مادۀ آهن زدای دفروکسامین. مجله تالاسمی (دو فصلنامه انجمن تالاسمی ایران)، ۱۳۷۶؛ شمارۀ ۱۲: صفحات ۴۱ الی۴۳.

۲. آذرکیوان آ. عوارض تزریق خون. مجله تالاسمی (دو فصلنامه انجمن تالاسمی ایران)، ۱۳۷۶؛ شمارۀ ۱۲: صفحات۳۳ الی ۳۷.

3. Poreddy AR, Schall OF, Osiek TA, Wheatley JR, Beusen DD, Marshall GR, et al. Hydroxamate-based iron chelators: combinatorial synthesis of Desferrioxamine B analogues and evaluation of binding affinities. J Comb 2004;6:239-54.

4. Gunter K, Toupet C, Schupp T. Characterization of iron-regulated promoter involved in Desferrioxamine B synthesis in S. pilosus: binding site and homology to the diphtheria toxin gene promoter. J Bacteriol 1993;175:3295-302

5. Schupp T, Toupet C, Divers M. Cloning and expression of two genes of S. Pilosus involved in the biosynthesis of the siderophore Desferrioxamine B. Gene 1988;64:179-88.

6. Gaeumann E, Prelog V. Process or producing ferrioxamines, in United States patent office, No.3153621, 1964.

7. Matsushima P, Baltz RH. Protoplast fusion. In: Demain AL, Solomon NA (Eds). Manual of industrial microbiology and biotechnology. Washington DC: American Society for Microbiology; 1986, p:170-83.

8. Hopwood DA. Genetic studies with bacterial protoplasts. Ann Rev Microbial 1981;35:237-72.

9. Pigac J, Hranueli D, Smokvinay T, Alacevic M. Optimal culture and physiological conditions for handy S. rimosus protoplasts. Appl Environ Microbiol 1982;44:1178-86.

10. Peberdy JF. Protoplast fusion tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganisms. Enzyme Microbe Technol 1980;2:23-29.

11. Baltz RH, Matsushima P. Protoplast fusion in streptomyces: condition for efficient genetic recombination and cell regeneration. J Gen Microbial 1981;127:137-46.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-05]