

بررسی میزان افزایش تولید داروی دسفرال توسط

باکتری استرپتومایسس گریزئوفلاووس

عظیم اکبرزاده^۱، داریوش نوروزیان^۱، علی فرهنگی^۲، محمد رضا مهربانی^۳، سید محمد اطمینانی^۴، 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، انیستیتو پاستور 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 آزاد اسلامی واحد دهقان، 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 *Desferrioxamine B Mesylate* یک ترکیب کیلات کننده آهن است که باراضافی آهن خون بیماران مبتلا به تالاسمی ماژوری که خون دریافت می کنند را از طریق صفرا و ادرار دفع می کند. نظر به اینکه شرکت دارویی NOVARTIS تنها تولید کننده آن در جهان است و ارزشی زیادی برای کشور دارد، 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 باکتری های گرم مثبت استرپتومایسس گریزئوفلاووس به صورت لیوفیلیزه با کد PTCC 1130 از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران خریداری و در محیط *Des4* جامد کشت داده شد. سپس با استفاده از پرتوهای ماورای بنفش، جهش ایجاد شده و با تکنیک پروتوپلاست فیوژن، سویه های فوزانت نوترکیبی تهیه شد تا مولکول دسفرال را به میزان بیشتری تولید کند. متغیرها شامل میزان رشد باکتری ها و غلظت داروی دسفرال تولید شده توسط آنها بود که از طریق اسپکتروفتومتری، کروماتوگرافی، طیف سنجی مادون قرمز و طیف سنجی جرمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

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

نتیجه گیری: موتاسیون و نوترکیبی ایجاد شده از طریق پروتوپلاست فیوژن باعث افزایش تولید داروی دسفرال در باکتری فوق الذکر گردید و مقایسه آن با دسفرال تولیدی شرکت نوارتیس به وسیله 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

است (۱). حذف آهن اضافی برای اجتناب از عوارض مسمومیت آهن بر روی قلب و کبد و دیگر اندامها ضروری است. دسفری اکسامین ها ترکیباتی با وزن مولکولی پایین و کیلات کننده آهن هستند که توسط گونه های متعددی از استرپتومایسس ها، نوکاردیا و میکرومونوسپورا تولید می شوند (۲). در حال حاضر دسفرال (دسفرواکسامین مزیلات) تنها کیلات کننده آهن اضافی موجود در خون بیماران مبتلا به

تزریق خون یکی از روش های اصلی درمان بیماران تالاسمی ماژور است، اما با عوارضی نظیر افزایش بار آهن خون همراه

آدرس نویسنده مسئول: تهران، خیابان ۱۲ فروردین، انستیتو پاستور ایران، گروه پایلوت بیوتکنولوژی،

دکتر عظیم اکبرزاده (email: azimakbarzadeh@pasteur.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۳/۱۸

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۱۰/۲۵

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 به دست 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 دسفری اکسامین است، از روش تشکیل هاله استفاده شد. برای این کار، پس از کشت سویه فوق در محیط Des4 جامد (محیط کشت Des4 محیط شناسایی کیفی دسفری اکسامین می باشد که حاوی ترکیبات زیر می باشد: دکسترین ۲۰ گرم در لیتر، فسفات پتاسیم دیبازیک ۰/۵ گرم در لیتر، سولفات منیزیم ۷ آبه ۰/۲۵ گرم در لیتر، سولفات روی ۷ آبه ۰/۰۵ گرم در لیتر، متیونین ۰/۱ گرم در لیتر، لیزین ۰/۲۵ گرم در لیتر، مانیتول ۲۰ گرم در لیتر، کربنات کلسیم ۵ گرم در لیتر، آسپاراژین ۱۲ گرم در لیتر و ترئونین ۰/۱ گرم در لیتر) کاغذ آغشته به معرف سولفات آهن آمونیاکی $[(NH_4)Fe(SO_4)_2 \cdot 12H_2O]$ را بر روی کلسی ۴ روزه قرار داده، هاله قهوه‌ای رنگی در سطح و عمق محیط اطراف کلسی تشکیل گردید که طبق نظر Schupp و همکارانش (۵) نشان دهنده وجود دسفری اکسامین 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 می گردد. نمک و اسید را به ملایمت حرارت داده تا بلورهای نمک در اسید حل شود، پس از مدت کوتاهی محلول زرد و شفاف بدست می آید که پس از ۲۴ ساعت کاملاً بی رنگ و شفاف می گردد. برای تعیین مقدار تولید دسفری اکسامین از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد که قبل از آن، منحنی استاندارد جذب فری اکسامین با استفاده از دسفرال محصول کارخانه نوارتیس تهیه و ترسیم شد. برای این کار غلظت مشخصی از دسفرال را در آب مقطر حل کرده و پس از افزودن سولفات آهن آمونیاکی به نسبت v/v ۱۰٪ 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. به منظور مشخص شدن اینکه هاله تشکیل شده در محیط Des4 و همچنین جذب نوری قرائت شده در محیط آرد سویا واقعا مربوط به دسفری اکسامین موجود در محیط بوده است،

تالاسمی ماژور است که هم اکنون توسط شرکت نوارتیس (Novartis Co.) از فرمانتاسیون سویه خاصی از استرپتومایسس پیلوسوس (*Streptomyces Pilosus*) تولید می شود (۳، ۴). این فرایند ۶ روز طول می کشد و تولید دسفری اکسامین B پس از شروع فاز رشد آغاز می شود. مقدار دسفری اکسامین B در طی دوره فرمانتاسیون را می توان بوسیله HPLC اندازه گیری کرد.

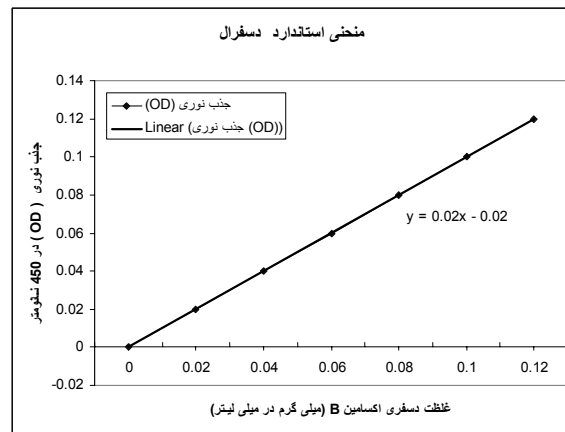
استرپتومایسسها، باکتریهای گرم مثبت رشته‌ای هستند که به خاطر تولید بسیاری از آنتی بیوتیکها و تعداد زیادی از متابولیت‌های اولیه و ثانویه اهمیت صنعتی دارند. از سال ۱۳۷۵ در انستیتو پاستور ایران در بخش پایلوت بیوتکنولوژی به عنوان طرح ملی، این دارو در مقیاس آزمایشگاهی با موفقیت تولید شده و کنترل کیفی آن دریافت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

با توجه به تعداد نسبتاً زیاد مبتلایان به تالاسمی ماژور در ایران، در این تحقیق سعی شده با استفاده از نو ترکیبیهای حاصل از پروتوپلاست فیوژن درون گونه‌ای در گونه *S. griseoflavus*، تولید دسفری اکسامین B افزایش یابد. دلایل به کارگیری تکنیک پروتوپلاست فیوژن این است که اولاً ثابت شده این روش کارآمدترین روش ایجاد نو ترکیبی در استرپتومایسسها است و ثانیاً هنوز توالی ژنهای دخیل در ساخت دسفری اکسامین به خوبی شناسایی نشده است تا ژن آن کلون شود.

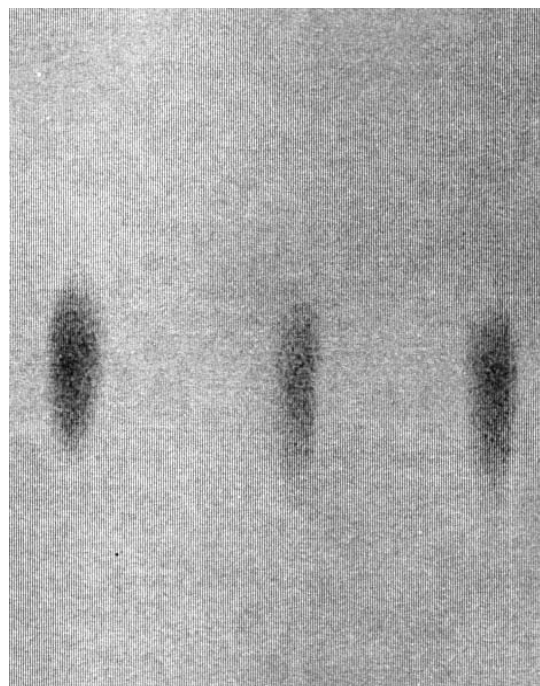
در مطالعاتی که بر روی استرپتومایسسها انجام شده است، مشخص گردیده که لیزین و اورنیتین پیش ساز دسفری- اکسامین B می باشند. دو ژنی که در تولید دسفری اکسامین B دخالت دارند، در سال ۱۹۸۸ توسط Schupp و همکاران کلون شده‌اند (۵). در این برنامه مشخص شد که رونویسی این ژنها و تولید mRNA پلی سیسترونی حاصل، تنها در شرایط کمبود آهن انجام می شود. هدف اصلی در این تحقیق، افزایش میزان تولید دسفری اکسامین B با استفاده از روش پروتوپلاست فیوژن درون گونه‌ای در باکتری *S. griseoflavus* است. همچنین روند رشد *S. griseoflavus* و روند تولید دسفری اکسامین B، تهیه سویه‌های شاخص دار (Marked Strains) این گونه با استفاده از عوامل جهش‌زا، بهینه سازی شرایط و روشهای تهیه پروتوپلاست از این گونه و فیوژن و باززاد (Regeneration) پروتوپلاستها و نرخ نو ترکیبی حاصل از انجام تکنیک پروتوپلاست فیوژن بررسی شد.

جهت استخراج دسفری اکسامین از محیط کشت، از دستورالعمل Gaeumann (۶) استفاده شد و منحنی تولید دسفری اکسامین 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 جهش یافته 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، اسپوره‌های 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 دسفری اکسامین تولید شده پس از استخراج برای آزمایش کروماتوگرافی (شکل ۱) و مقایسه با سویه اصلی به کار گرفته شد. منحنی رشد و تولید دسفری اکسامین موتانت‌ها و روند تغییرات pH در حین رشد و تولید آنها ترسیم شد (نمودار ۴). برای تهیه پروتوپلاست از موتانت‌ها، از روش 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 میلی لیتر سوسپانسیون اسپوری حاوی 1×10^6 در میلی لیتر 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، رنگ آمیزی شد. بهترین زمان سونیکاسیون، زمانی است که میسلیم‌ها به خوبی از هم جدا شده باشند ولی متلاشی نشوند. جهت تهیه پروتوپلاست‌ها، سویه‌ها در محیط حاوی گلایسین با غلظت

دسفری اکسامین تولید شده، پس از استخراج به روش کروماتوگرافی (شکل ۱) 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.

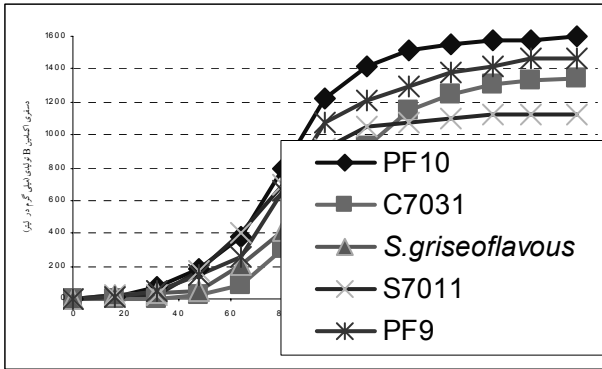


نمودار ۱- منحنی استاندارد دسفری اکسامین B. (در این منحنی جذب نوری غلظت‌های فزاینده دسفری اکسامین B در طول موج ۴۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شده است که با استفاده از آن، غلظت‌های تولیدمان را محاسبه می‌کنیم)



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 دسفری اکسامین B در ستون‌های ۱ و ۲ با لکه حاصل از نمونه استاندارد (ستون ۳) مطابقت دارد.



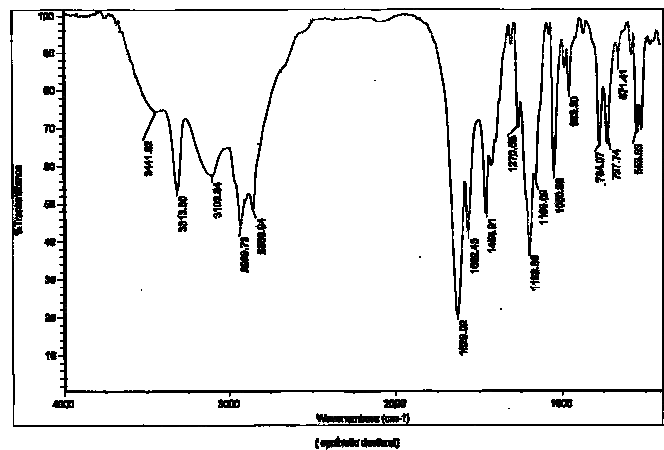
نمودار ۴- مقایسه تولید دسفری اکسامین B در *S.griseoflavous* و سویه‌های موتانت و فوزانت آن. (همان‌طور که در نمودار دیده می‌شود، میزان تولید دسفرال در سویه‌های موتانت (S7011، C7031) و فوزانت (FP10، FP9) بطور قابل توجهی نسبت به سویه وحشی افزایش یافته است)

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 ضرب 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 غیر پروتوپلاستی باززاد شده از فراوانی سلول‌های باززاد شده کسر شد. سهم واقعی نو ترکیبی بین دو شاخص برابر بود با تعداد کلنی‌های آخرین سری محیط‌های انتخابی تقسیم بر تعداد کلنی‌های محیط انتخابی اول (باززاد).

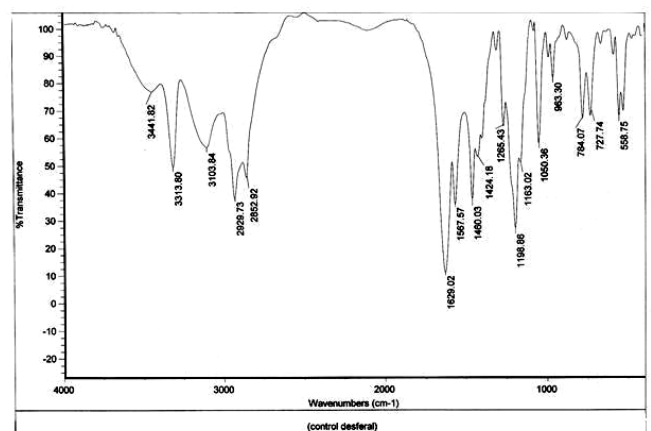
یافته‌ها

پس از خواندن جذب مربوط به دسفری اکسامین در محیط آرد سویا در فواصل زمانی ۸ ساعت و مقایسه آن با منحنی استاندارد جذب دسفری اکسامین (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 $0.003\% \text{ W/V}$ سدیم آزاید و غلظت $0.003\% \text{ W/V}$ کریستال ویوله مقاوم باشند. در این راستا، در گروه سدیم آزاید، ۱۷ سویه و در گروه کریستال ویوله، ۹ سویه انتخاب شدند که پس از انجام آزمایشات ضربدری، تنها دو سویه C7031 و S7011 برای ادامه آزمایش مناسب بودند.

بهینه کشت شده و سپس با مناسب‌ترین زمان سونیکه شدند. سپس با استفاده از آنزیم لیزوزیم با غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر 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 (Colony Forming Unit) CFU می‌گویند (۹). با در دست داشتن CFU، تعداد پروتوپلاست در واحد حجم و درصد سلول‌های زنده غیر پروتوپلاستی می‌توان فراوانی پروتوپلاست‌های قابل باززایی را به دست آورد (۱۰).



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



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

که مانند سویه اصلی و موتانت های C7031 و S7011، قسمت اعظم دسفری اکسامین تولید شده توسط این فوزانت از نوع دسفری اکسامین B است. از نظر مرفولوژی و قدرت اسپورزایی، فوزانت های PF9 و PF10 با سویه والد اصلی و موتانت ها هیچ تفاوتی نداشتند (۷-۱۱).

بحث

افزایش تولید در سویه های موتانت غیرمنتظره نیست، چون جهش های گسترده ای که توسط پرتو ماورای بنفش بر این سلولها اعمال شده، می توانسته بر بسیاری از ژن هایی که به نحوی در تنظیم تولید دسفری اکسامین نقش یا دخالت داشته باشند، اثر گذارد. به علاوه با تغییراتی که در دیواره سلول پدید می آید، برداشت مواد غذایی توسط سلول و برون ده متابولیت های آن نیز افزایش می یابد. 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 می گذارد و بالطبع فراوانی نوترکیبی را تحت تأثیر قرار می دهد (۱۱). حساسیت این مرحله باعث شده که محققان مجبور شوند، برای هر کدام از گونه های مورد مطالعه شان، شرایط تشکیل پروتوپلاست و متعاقب آن شرایط فیوژن و باززاد را به دقت مورد بررسی قرار دهند و این شرایط را برای آن گونه خاص بهینه نمایند. بنابر این هرگز کسی نمی تواند ادعا کند که روش ابداعی او برای تمامی باکتری ها عمومی دارد و همیشه قابل استفاده است. اما گاهی روش های کلی ابداع می شوند که می توان آنها را با تغییرات جزئی با شرایط باکتری مورد نظر، تطابق داد. سونیکاسیون سبب قطعه شدن میسلیمها و باز شدن کلاف بهم پیچیده کلنی استروپتومایسسها می شود و در این عمل، گلاپسین با سست کردن اتصالات بین میسلیمها، به جدا شدن آنها کمک می کند. به علاوه منافذی که در اثر سونیکاسیون در دیواره باکتری ایجاد می شوند، راه را برای نفوذ هرچه سریع تر آنزیم به داخل دیواره، باز می کند و البته وجود گلاپسین در ایجاد پیوندهای پپتیدوگلیکان دیواره و نفوذپذیر کردن آن نسبت به آنزیم بی تأثیر نیست (۱۰). هر کدام از ژنهایی که مسوول سرعت تکثیر، ویژگی های 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 سلول هایی که در اثر نوترکیبی چنین

مقایسه منحنی تولید دسفری اکسامین توسط سویه والد اصلی و C7031 و S7011 در نمودار ۴ نشان داده شده است. نتایج مربوط به تولید دسفری اکسامین توسط موتانت ها پس از استخراج و کروماتوگرافی کاغذی و در مقایسه با استاندارد نوارتیس، نشان دهنده تولید دارو توسط موتانت ها می باشد که در شکل ۳ نشان داده شده است. همچنین طیف IR دسفری اکسامین تولید شده توسط بخش پایلوت بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران، با طیف IR دسفری اکسامین B شرکت نوارتیس به عنوان استاندارد در نمودارهای ۲ و ۳ جهت مقایسه با یکدیگر نشان داده شده است. هیچ فرقی بین دسفری اکسامین تولید شده در این بخش با دسفری اکسامین شرکت نوارتیس وجود نداشت، به عبارتی دسفری اکسامین تولید شده از نوع B بود.

بهترین زمان کشت موتانت S7011، برای رسیدن به حداکثر پروتوپلاست، ۴۰ ساعت و برای موتانت C7031، ۶۰ ساعت برآورد شد. زمان مجاورت با ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر لیزوزیم برای دو موتانت به ترتیب ۴۰ و ۲۵ دقیقه بود (۷-۱۱). در جدول ۱ فراوانی سویه های به دست آمده نشان داده شده است.

جدول ۱- فراوانی سویه ها جهت تولید دسفری اکسامین

نوع سویه ها	فراوانی (درصد)
سلولهای باززاد شده سویه S7011	۴۷/۵
سلولهای غیر پروتوپلاستی باززاد شده سویه S7011	۱۵/۸
پروتوپلاستهای باززاد شونده سویه S7011	۳۱/۷
سلولهای باززاد شده سویه C7031	۳۹/۴
سلولهای غیر پروتوپلاستی باززاد شده سویه C7031	۱۱/۴
پروتوپلاستهای باززاد شونده سویه C7031	۲۸

دمای رشد سلول ها 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 دسفری اکسامین تولیدی توسط فوزانت PF10 و مقایسه Rf و IR آن با استاندارد و دسفری اکسامین سویه اصلی S. griseoflavus، مشخص شد

که از یکصد بار کشت در اشل آزمایشگاهی و در فرمانتورهای نیمه‌صنعتی بخش پایلوت بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران 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 بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران در حال اجرای آن می‌باشد.

توانایی را پیدا کرده باشند، قابل غربال کردن هستند. سویه‌های نو ترکیب، تنوع وسیعی را در تولید دسفری‌اکسامین نشان می‌دهند. 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 و کنترل کمی و کیفی آنها و نیز تکرارپذیر نمودن آنها و جمع‌آوری کلیه داده‌ها

REFERENCES

۱. آذرکیوان آ. ارزیابی روش جدید در تجویز ماده آهن زدای دفروکسامین. مجله تالاسمی (دو فصلنامه انجمن تالاسمی ایران)، ۱۳۷۶؛ شماره ۱۲: صفحات ۴۱ الی ۴۳.
۲. آذرکیوان آ. عوارض تزریق خون. مجله تالاسمی (دو فصلنامه انجمن تالاسمی ایران)، ۱۳۷۶؛ شماره ۱۲: صفحات ۳۳ 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.