مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره یازدهم، شمارهٔ ۴، مهر- آبان ۱۳۸۸، صفحه ۱۸-۱۳

ارزیابی پتانسیل تولید استرپتوکیناز از استرپتوکوک گروه C سوش H46A در کشت بسته و بررسی دوز کشنده هگزیل ریزور سینول

محمدرضا نژاد مقدم[۱]، سیدمحمدحسین رضویان[۲]، محمد باباشمسی[*۱]

۱- عضو هیأت علمی پژوهشکده نانوتکنولوژی زیستی پژوهشگاه فناوری های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی ابن سینا
۲- استادیار گروه بیوشیمی دانشگاه آزاد واحد قم
۳- عضو پژوهشکده آنتی بادی منوکلونال پژوهشگاه فناوری های نوین علوم زیستی جها دانشگاهی ابن سینا

دریافت: ۸۷/۱۰/۲۵ ، اصلاح: ۸۷/۱۱/۳۰، پذیرش: ۸۸/۲/۲۳

خلاصه

سابقه و هدف: استرپتوکیناز به عنوان فعال کننده میکروبی پلاسمینوژن پلاسمائی در درمان بسیاری از بیماریها از جمله سکته قلبی، درمان لخته های ایجاد شده در مجاری مصنوعی هنگام دیالیز کلیه، پروستات و التهاب های مقاوم به آنتی بیوتیک کاربرد دارد. لذا این مطالعه به منظور تولید استرپتوکیناز در کشت بسته (Batch Culture) و بررسی فاکتورهای موثر بر تولید آن، همچنین میزان دوز کشنده هگزیل ریزورسینول جهت غیرفعال‌سازی باکتری انجام شد.

مواد و روشها: در این مطالعه از سوش استرپتوکوکی H46A پربازده از نظر تولید استرپتوکیناز استفاده شد. میزان رشد باکتری، مرحله رشد صعودی و میزان تولید استرپتوکیناز در دو وضعیت تلقیح ۱٪ و ۱۰٪ به روش کدورت سنجی در فواصل زمانی ۴ ساعت، در طول موج ۶۰۰ نانومتر و رنگ سنجی با سوبسترای S2251 ارزیابی شد. همچنین با طراحی یک فرمانتور، فاکتورهای موثر بر رشد باکتری و تولید استرپتوکیناز مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: در ۴ ساعت اول کشت، سلولها به صورت تصاعدی رشد کردند و از ساعت چهارم به بعد سرعت رشد باکتریها کاهش یافته و به مرحله سکون وارد شد و این وضعیت تا ساعت هشتم ادامه یافت. با استفاده از مقدار مایع تلقیح مناسب (۱۰٪) در شروع کشت و افزودن گلوکز بهمراه کنترل همزمان pH محیط کشت میزان تولید استرپتوکیناز تا ۳ برابر میزان شرایط عادی افزایش یافت. ضمناً غلظت کشنده موثر ماده هگزیل ریزورسینول بر این باکتری ۲ میلی گرم به ازای هر میلی لیتر بدست آمد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که بدلیل حساسیت بالای استرپتوکیناز به تغییرات pH و دما، همزمان با تولید آن مقداری نیز از بین می‌رود. بنابراین ایجاد شرایطی که سوش استرپتوکوکی H46A را در مدت زمان کوتاهتری وارد مرحله رشد صعودی کند و سرعت رشد این مرحله را افزایش دهد در افزایش برآیند تولید استرپتوکیناز موثر می‌باشد.

واژه های کلیدی: *استرپتوکیناز، استرپتوکوک H46A، کشت بسته، هگزیل ریزورسینول.*

مقدمه

استرپتوکیناز یکی از شناخته شده‌ترین عوامل ترمبولیتیک بالینی می باشد که توسط استرپتوکوکهای گروه A، G و خصوصاً C تولید شده و در درمان سکته قلبی مورد استفاده قرار می گیرد (۱). مطالعات نشان می دهند که استرپتوکیناز امتیاز کمتری نسبت به سایر داروهای ترمبولایتیک مثل یوروکیناز (uPA) و فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (tPA) ندارد (۵-۱). البته از استرپتوکیناز علاوه بر درمان انفارکتوس میوکارد حاد (AMI) جهت درمان لخته های ایجاد شده در مجاری مصنوعی هنگام دیالیز کلیه، درمان التهاب‌های مقاوم به آنتی بیوتیک، پروستات، درمان آنژین صدری شدید و ناپایدار و شستشوی زخمها نیز استفاده می شود. استرپتوکیناز بدلیل امکان تولید مقادیر زیاد با استفاده از روشهای نسبتاً کوتاه در یک کشت باکتریایی، ساده بودن تخلیص، ارزان‌تر بودن قیمت تمام شده آن نسبت به داروهای فیزیولوژیک (۱)، طولانی تر بودن نیمه عمر نسبت به t-PA (۳۰-۱۵ دقیقه به ۳ دقیقه) و قابل دسترس بودن آن برای اقشار مختلف

* مسئول مقاله:
آدرس: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، پژوهشکده ابن سینا
e-mail: babashamsi@avicenna.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.4.2.3]

هنوز هم بطور قابل توجه ای در لیست داروهای ضروری سازمان جهانی بهداشت (WHO) قرار دارد (۶). استرپتوکیناز تجاری مورد استفاده در پزشکی از استرپتوکوک‌های گروه C ترشح و تولید می‌شود. بواسطه اهمیت تجاری آن دسترسی به اطلاعات مربوط به تخمیر صنعتی استرپتوکیناز مشکل می‌باشد و تنها منابع اندکی در این ارتباط موجود می‌باشد (۱۰-۷).

هدف از این مطالعه بررسی شرایط رشد باکتری استرپتوکوکوس سوشequisimillis H46A جهت تولید بهینه استرپتوکیناز خارج سلولی مقرون به صرفه با استفاده از روش کشت بسته (Batch Culture)، همچنین تعیین اثر و میزان دوز کشندگی (Bactericidal Effect) ماده هگزیل ریزور سینول بر باکتری مذکور می باشد.

مواد و روشها

تهیه، تکثیر و نگهداری سوش باکتریایی: در این مطالعه برای اولین بار در ایران سوش استرپتوکوک equisimilis H46A (پر بازده از نظر تولید استرپتوکیناز) در غالب یک ویال لیوفلیزه به روش زیر تهیه شد. این سوش در شرایط استریل در محیط مایع حاوی ۵۰۰ گرم عصاره قلب، ۲۰ گرم پپتون بافت حیوانی، ۲ گرم گلوکز، ۲ گرم کلرید سدیم، ۰/۴ گرم فسفات دی سدیم و ۲/۵ گرم کربنات سدیم و ۱۴/۵ گرم کازئین پانکراتین، ۵ گرم پپتون سویا، ۵ گرم کلرید سدیم، ۱/۵ گرم فاکتورهای رشد و ۵ میلی لیتر خون گوسفندی استریل (برای مشاهده همولیز) در حجم کلی یک لیتر کشت و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد به لوله‌های حاوی محیط جامد شیب‌دار (محیط بالا به انضمام ۱۴g/Li آگار) پاساژ داده شد و پس از انکوباسیون و مشاهده کلنی‌های یکسان و عدم آلودگی، در محیط مایع حاوی ۴۰ درصد گلیسرول و داخل کرایو ویالهای یک میلی‌لیتری توزیع و در دمای۷۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد. در هر دور آزمایش یکی از کرایو ویالها از فریزر خارج و به تدریج به دمای اتاق رسانده شده و مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه گیری میزان فعالیت استرپتوکیناز با استفاده از S2251: این تست بر اساس روش Kulisek و همکارانش (۱۱) با اندکی تغییرات بمنظور قابل اجرا شدن در میکروپلیت الایزا انجام شد. میزان ۱۰ میکرولیتر از کشت باکتریایی را با۳۰ میکرولیتر از پلاسمینوژن (۰/۲ میلی گرم به ازای هر میلی لیتر) مخلوط کرده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد جهت تشکیل کمپلکس استرپتوکیناز پلاسمینوژن انکوبه شد سپس به آن مقدار ۶۰ میکرولیتر سوبسترای رنگزای S2251 (D-Vel-Leu-Lys-P-Nitroanilide dihydro chloride) (۵ میلی گرم به ازای هر میلی لیتر) اضافه شد و برای ۱۰ دقیقه دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد وجود استرپتوکیناز و تشکیل کمپلکس با پلاسمینوژن با هیدرولیز سوبسترا و تولید P-nitro anilide تأیید شد. جهت توقف واکنش به مخلوط نهایی ۱۰ میکرولیتر اسید استیک ۴ نرمال (Stoping) اضافه شد و شدت رنگ ایجاد شده در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر قرائت گردید.

تعیین مراحل رشد استرپتوکوکوسequisimillis: یک کلنی از کشت جامد حاصل از باکتری‌های ذخیره شده در کرایوویال را به ۵ میلی لیتر محیط مایع جدید تلقیح کرده، پس از انکوباسیون شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ۱ میلی‌لیتر از آن را به ۱۰۰ میلی لیتر محیط مایع جدید درون ارلن ۵۰۰ میلی لیتری تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و عمل شیکینگ با دور rpm ۲۵۰ انکوبه گردید و در فواصل زمانی ۴ ساعت میزان کدورت کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر محاسبه شد. براساس نمودار رشد باکتری استرپتوکوکوس سوش Equisimillis H46A در کشت ۲۴ ساعته فاصله زمانی برای دو برابر شدن سلولهای باکتری (Generation Time, GT) با استفاده از فرمول ۶۰=۶۰- GT= t $_{(OD=0.4)}$ – t $_{(OD=0.2)}$ → GT= ۱۲۰ محاسبه شد و در آزمایش های بعدی فواصل نمونه گیری بر همین اساس برنامه ریزی شد.

تعیین میزان مناسب مایع تلقیح اولیه(inoculum): در دو ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری واجد ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت دو مقدار متفاوت از کشت شبانه استرپتوکوک یکی به مقدار ۱ میلی لیتر و دیگری ۱۰ میلی لیتر تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و عمل شیکینگ با دور rpm ۲۵۰ انکوبه شد و در فواصل زمانی ۱ ساعت میزان کدورت کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر محاسبه گردید. بدین‌وسیله تغییرات الگوی رشد باکتری در دو وضعیت تلقیح ۱٪ و ۱۰٪ بررسی شد.

تاثیرpH بر میزان تولید استرپتوکیناز: برای اینکه بتوانیم بطور همزمان چند عامل موثر بر رشد باکتری و تولید استرپتوکیناز را مورد بررسی قرار دهیم فرمنتور ساده‌ای طراحی شد (شکل ۱). این دستگاه شامل یک بالون دو لیتری که سه شیر ورودی برای ورود گلوکز، گاز و هیدروکسیدسدیم دارد، می باشد، همچنین دو محفظه برای ورود محور دستگاه همزن و الکترود pH متر و یک شیر خروجی برای آن طراحی شد. اضافه شونده های محیط کشت شامل گلوکز و هیدروکسیدسدیم ۵ نرمال، هر کدام توسط پمپ‌های پریستالتیک جداگانه به فرمنتور اضافه می‌شدند. در این آزمایش ۱۰ میلی لیتر از کشت شبانه باکتریایی را به ۱۰۰ میلی لیتر محیط جدید تلقیح و پس از ۵-۴ ساعت شیک در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد وقتی میزان کدورت کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۶ رسید. آنرا به ۱ لیتر محیط جدید موجود در فرمنتور تلقیح کردیم (تلقیح ۱۰٪). طی زمان انکوباسیون pH محیط همواره کنترل شد و به محض کاهش pH از نقطه ۷، مقداری هیدروکسیدسدیم به محیط افزوده گردید تا pH محیط همچنان ثابت باقی بماند.



شکل ۱. فرمنتور طراحی شده برای انجام آزمایشات بهینه سازی تولید استرپتوکیناز

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.4.2.3]

تاثیر افزودن گلوکز و تنظیم همزمان pH بر میزان محصول استرپتوکیناز: ۱۰ میلی لیتر از کشت شبانه باکتریایی را به ۱۰۰ میلی لیتر محیط جدید تلقیح کردیم و پس از ۵-۴ ساعت شیک در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد وقتی میزان کدورت کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۶ رسید آنرا به ۱ لیتر محیط جدید موجود در فرمنتور تلقیح کردیم (تلقیح ۱۰٪) و پس از ساعت چهارم کشت که سرعت رشد باکتری کند می‌شود و pH محیط نیز تنزل می‌یابد، قطره قطره محلول ۴۰٪ گلوکز به محیط اضافه شد و همزمان pH محیط نیز با استفاده از محلول هیدروکسیدسدیم ۵ نرمال در نقطه ۷ تنظیم شد.

تعیین بهترین غلظت اثر ماده باکتری کش: یکی از فرآیندهای مهم در تخمیر میکروبی، غیرفعال‌سازی میکروب مورد استفاده در انتهای عمل تخمیر است، بطوریکه محلول تخمیری جهت فرآیندهای پایین‌دستی تخمیر (مثل تخلیص) قابل استفاده باشد. برای این منظور در تحقیق حاضر برای اولین بار از ماده باکتری‌کش هگزیل‌ریزورسینول جهت از بین بردن استرپتوکوکوس equisimilis استفاده شد. برای این‌کار بطور جداگانه ۵ میلی لیتر از نمونه کشت باکتری مذکور (در انتهای تخمیر) را به ۵ لوله استریل اضافه کردیم و به هر لوله مقادیر متفاوت ۱۰۰و ۷۵ و ۵۰ و ۲۵ و ۱۰ میکرولیتر از محلول ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر میلی لیتر هگزیل ریزورسینول اضافه شد. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر نمونه از این لوله‌ها را در پلیت‌های حاوی محیط جامد (طرز تهیه آن در قسمت ۱-۲ توضیح داده شد) کشت داده، بمدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه کردیم. باکتری استرپتوکوکوس equisimilis در یکی از غلظت‌های تهیه شده از ماده سمی هگزیل‌ریزورسینول کلنی تولید نکرد که عدم ایجاد کلنی (وضعیت عدم رشد) در یکی از نمونه‌های کشت اشاره شده، حداقل غلظت کشندگی (Bacteriocidal) ماده هگزیل ریزورسینول در از بین بردن باکتری در نظر گرفته شد. میزان و رشد باکتری رشد صعودی میزان تولید استرپتوکیناز در دو وضعیت تلقیح ۱٪ و ۱۰٪ در فواصل زمانی ۴ ساعت ارزیابی شد.

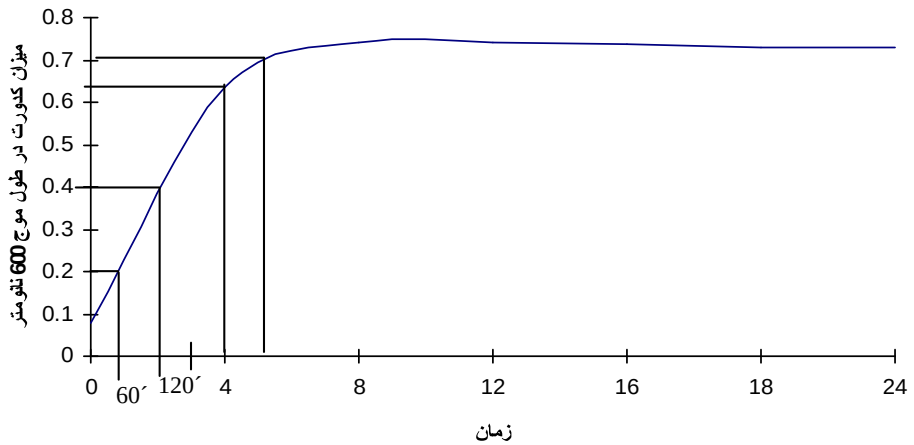
یافته‌ها

در چهار ساعت اول کشت، سلولها به صورت تصاعدی رشد یافته‌اند (فاز رشد لگاریتمی) و از ساعت چهارم به بعد سرعت رشد باکتری کاهش یافته و به اصطلاح باکتری وارد مرحله سکون شد (فاز شروع سکون)، این وضعیت تا ساعت هشتم ادامه داشت، بعد از این ساعت باکتریها وارد مرحله‌ایی شدند که تعداد سلول‌های زنده تقریباً برابر با تعداد سلول‌هایی هستند که در حال مرگند (مرحله سکون) (نمودار ۱).

با استفاده از این نمودار و استفاده از فرمول ذکر شده در قسمت مواد و روشها برای محاسبه GT، زمان دو برابر شدن سلولهای باکتری ۶۰ دقیقه بدست آمد. مطابق نمودار ۱ OD=۰/۶ در طول موج۶۰۰ نانومتر نقطه اوج (اپتیمم) مرحله صعودی (لگاریتمی) رشد را نشان می دهد. در نتیجه همواره این زمان از رشد باکتری مناسبترین زمان جهت تلقیح محیط کشت به محیط کشت جدید دیگر می‌باشد، بطوریکه می توان مایع تلقیح (inoculum) برای شروع عملیات کشتهای بعدی را ابتدا به این OD از رشد رساند و سپس به محیط جدید تلقیح کرد. مقایسه نمودار رشد باکتری در دو وضعیت شروع تلقیح ۱٪ و ۱۰٪ نشان داد که افزایش میزان مایع تلقیح اولیه باعث ورود سریعتر باکتری‌ها به مرحله رشد صعودی و کوتاهتر شدن فاز تأخیری رشد (Lag phase) نسبت به تلقیح ۱٪ می‌شود. در وضعیت تلقیح ۱٪ میزان رشد حداکثر باکتری در انتهای مرحله رشد صعودی بر حسب محاسبه تورببیدیتی محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر حدود ۰/۳ و در وضعیت تلقیح ۱۰٪ تا مقدار ۰/۷ افزایش یافته است.

میزان تولید استرپتوکیناز در شرایط کنترل pH محیط کشت طی فاز لگاریتمی رشد در مقایسه با شرایط عدم تنظیم pH افزایش قابل توجه‌ای داشت و تا ۲۶۵۰۰۰۰U/L افزایش یافت. حداکثر میزان استرپتوکیناز تولیدی در شرایط تنظیم pH مربوط به ساعت ششم کشت می‌باشد و از مقدار آن تا ساعت دهم کشت نیزکاسته نمی‌شود. افزودن گلوکز به محیط کشت و تنظیم همزمان pH نیز موجب افزایش بازده تولید استرپتوکیناز تا ۶۰۰۰۰۰۰U/L شد، حداکثر میزان این افزایش نیز مربوط به ساعت ششم کشت می‌باشد ولی با ادامه کشت از میزان آن کاسته می‌شود (جدول ۱).

مقایسه میزان تراکم سلولی که بر اساس تورببیدیتی محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومنر محاسبه گردید نشان داد افزایش استرپتوکیناز در وضعیت ایده آل افزودن گلوکز و تنظیم همزمان pH با افزایش تراکم سلولی نیز همراه می‌باشد. همچنین غلظت‌های کمتر از ۲ میلی گرم به ازای هر میلی لیتر از ماده سمی هگزیل ریزورسینول اثر کشندگی بر باکتری استرپتوکوکوس equisimilis نداشت بنابراین غلظت ۲ میلی گرم به ازای هر میلی لیتر از ماده سمی هگزیل ریزورسینول، بعنوان کمترین غلظت مورد نیاز برای غیرفعال کردن باکتری استرپتوکوکوس equisimilis گزارش گردید.



نمودار1: نمودار رشد باکتري streptococcus equisimilis در کشت 24 ساعته

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.4.2.3]

جدول ۱. مقایسه تغییرات تراکم سلولی (کدورت) در طول موج ۶۰۰ نانومتر و همچنین میزان فعالیت استرپتوکیناز بر حسب U/L در سه شرایط ۱٪، ۱۰٪ مایع تلقیح و تنظیم pH در نقطه ۷ وحالت افزودن گلوکز و تنظیم همزمان pH.

زمان	t_0	t_2	t_4	t_6	t_8	t_{10}
تراکم سلولی هنگام مایع تلقیح ۱٪	۰,۰۳	۰/۱	۰/۲	۰/۴	۰/۶	۰/۶۷
تراکم سلولی هنگام مایع تلقیح ۱۰٪	۰/۱	۰/۳	۰/۶	۰/۶۵	۰/۶۸	۰/۷
تراکم سلولی هنگام مایع تلقیح ۱۰٪ و تنظیم pH	۰/۱	۰/۴	۰/۶۴	۰/۵۶	۰/۵۴	۰/۵۴
تراکم سلولی هنگام مایع تلقیح ۱۰٪ تنظیم pH و گلوکز	۰/۱	۰/۵۶	۰/۸۹	۰/۹۲۵	۰/۹۲۵	۰/۹۲۵
میزان استرپتوکیناز* هنگام مایع تلقیح ۱۰٪	۸۷۴	۳۰۰۰۰۰	۳۷۰۰۰۰	۱۱۰۰۰۰۰	۲۲۵۰۰۰۰	۱۹۰۰۰۰۰
میزان استرپتوکیناز هنگام مایع تلقیح ۱۰٪	۳۰۰۰۰۰	۷۵۰۰۰۰	۲۲۵۰۰۰۰	۲۴۰۰۰۰۰	۲۱۰۰۰۰۰	۱۹۰۰۰۰۰
میزان استرپتوکیناز هنگام مایع تلقیح و تنظیم pH	۳۰۰۰۰۰	۱۰۵۰۰۰۰	۲۲۵۰۰۰۰	۲۶۵۰۰۰۰	۲۶۵۰۰۰۰	۲۶۵۰۰۰۰
میزان استرپتوکیناز هنگام inoculum 10%، تنظیم pH و گلوکز	۳۰۰۰۰۰	۲۲۵۰۰۰۰	۵۶۰۰۰۰۰	۶۰۰۰۰۰۰	۵۶۰۰۰۰۰	۴۵۰۰۰۰۰

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از کشت مقدماتی نشان داد که در چهار ساعت اول کشت، باکتری‌ها به صورت تصاعدی رشد یافته ولی به مرور با کاهش شرایط ایده‌آل فضا، غذا و pH، از میزان رشد آنها کاسته می شود. مطالعات میکروبیولوژی صنعتی مقدار مناسب مایع اولیه تلقیح برای کشت باکتری‌های مورد استفاده در صنعت را ۳-۰/۱ درصد گزارش کردند (۱۰). مطالعه ما نشان می‌دهد مقدار مایع تلقیح ۱۰٪ موجب افزایش برآیند تولید استرپتوکیناز در انتهای کشت می‌شود. احتمالا دلیل این امر به کاهش زمان فاز تأخیر رشد ارتباط دارد. بطوریکه افزایش مایع تلقیح اولیه، زمان ورود باکتری‌ها را به فاز صعودی رشد کاهش می‌دهد و سرعت رشد و تکثیر باکتری‌ها را در مرحله فاز لگاریتمی افزایش می‌دهد کاهش زمان دستیابی به رشد حداکثر باکتری (کاهش فاز تأخیر رشد)، می‌تواند در جلوگیری از تخریب استرپتوکیناز در طول مدت کشت بسیار موثر واقع شود. استرپتوکیناز متابولیتی ناپایدار و بسیار حساس به دما است (۱). گزارش مطالعات قبلی که با هدف اثر pH بر تولید استرپتوکیناز انجام گرفته pH های ۷ و ۶/۵ و ۶/۳ را pH بهینه جهت افزایش برآیند تولید استرپتوکیناز گزارش کرده‌اند (۹و۸)، در این مطالعه pH برابر با ۷ بهترین نقطه pH برای افزایش برآیند تولید استرپتوکیناز گزارش شد. احتمالا تنظیم pH باعث می‌شود باکتری از محتویات محیط کشت به نحو بهینه‌تری استفاده کند که نتیجه آن افزایش برآیند تولید استرپتوکیناز تا میزان ۲/۶۵۰/۰۰۰U/L شده است.

نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که برآیند همزمان افزودن گلوکز به عنوان منبع انرژی در کنار تنظیم pH، افزایش استحصال استرپتوکیناز تا میزان ۶۰۰۰۰۰۰U/L را باعث شده است که حدود ۳ برابر بیشتر از گزارشات قبلی می‌باشد (۹). از نکات جالب در این تحقیق طراحی و ساخت یک دستگاه فرمانتور بود. این دستگاه سهم بسزائی در دقت نتایج بدست آمده در کشت‌های مکرر داشت. بعلت قیمت تمام شده نسبتاً مناسب استرپتوکیناز نسبت به دیگر داروهای فیبرینولیتیک و قابل دسترس بودن آن برای قشرهای مختلف بیماران (۱) هنوز هم این دارو در لیست داروهای ضروری سازمان جهانی بهداشت (WHO) قرار دارد (۶). بواسطه اهمیت تجاری استرپتوکیناز دسترسی به اطلاعات مربوط به تخمیر صنعتی استرپتوکیناز مشکل می‌باشد (۷). نتایج این مطالعه حاکی از کاهش زمان فاز تأخیری رشد باکتری و افزایش سرعت رشد در فاز صعودی کشت می‌باشد. استرپتوکیناز پروتئینی حساس به دما و pH بوده و به هر میزان که در شرایط pH اسیدی یا بازی قرار گیرد به همان میزان دچار تخریب و زوال می‌شود. کاهش زمان مربوط به فاز تأخیری رشد به منزله کاهش زمان دستیابی به رشد حداکثر می‌باشد، بنابراین بهینه‌سازی شرایطی همچون مایع تلقیح اولیه، تنظیم pH و یا اضافه کردن گلوکز که بتواند باعث کاهش زمان مربوط به فاز تأخیری یا کاهش سرعت تخریب استرپتوکیناز تولیدی در طول مدت کشت شود سبب می‌شود که باکتری از حداقل محتویات درون محیط کشت به نحو بهینه‌تری استفاده کند و نتیجه آن افزایش برآیند تولید استرپتوکیناز خواهد بود.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از حمایت‌های معنوی و مالی ریاست محترم پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن‌سینا و آقای دکتر آخوندی تشکر و قدردانی می‌گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.4.2.3]

Evaluation of Streptokinase Production Potential by Group C Streptococcal Strain H46A in Batch Culture and Bactericidal Effect of Hexyl Resorcinol

M.R. Nejadmoghaddam (MSc) [1], M.H. Razaviyan (PhD) [2], M. Babashamsi (PhD) [3*]

1. Faculty Member of Recombinant Technology, Nanobiothecnology Research Center (NBRC), Avicenna Research Institute (ARI), ACECR, Tehran, Iran
2. Assistant Professor of Biochemistry, Qom Branch of the Islamic Azad University.
3. Member of Antigen and Antibody Engineering, Monoclonal Antibody Research Center (MARC), Avicenna Research Institute (ARI), ACECR, Tehran, Iran.

Received: Jan 14th 2009, Revised: Feb 18th 2009, Accepted: May 13th 2009.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Streptokinase (SK) is a microbial plasminogen-activator that is used in the treatments, especially at Acute ischemic stroke, declotting of dialysis shunts and inflammatory antibiotic-resistant prostatitis. The aim of this study was production of streptokinase in batch culture system and evaluation of some effective factors on SK production. Moreover, the effect of Hexyl Resorcinol as a bactericidal material on Streptococcus equisimillis H46A is determined.

METHODS: We used Streptococcus equisimillis strain H46A. The log phase of bacterial growth and streptokinase production for two inoculation conditions, 1% and 10% were determined at an interval of 4 hours by turbidity test at 600nm and colorimetric assay using S2251 chromogenic substrate, respectively. Moreover, effective factors on bacterial growth and streptokinase yield were evaluated by using a manual fermentor designed in our laboratory.

FINDINGS: Bacterial cells proliferated logarithmically in the first four hours and after that, the rate of proliferation decreased. It means bacterial cells are being entered to the stationary phase, this condition extended to the 8th hour. Streptokinase production increases up to 3-fold with use of 10% inoculum, adding glucose and adjusting pH simultaneously. In addition, Hexyl Resorcinol bactericide effective dose is reported to be 2 mg/ml.

CONCLUSION: Because of high sensitivity of streptokinase to pH and temperature change, some produced streptokinase is degraded at the same time. Therefore, conditions that decrease lag phase period and increase the growth rate of logarithmic phase, results in higher SK yield.

KEY WORDS: *Streptokinase, Streptococcus H46A, Batch culture, Hexyl resorcinol.*

[*] **Corresponding Author;**

Address: Nanobiothecnology Research Center (NBRC), Avicenna Research Institute (ARI), ACECR, Tehran, Iran. PO Box: 19615-1177, Iran
E-mail: Babashamsi@avicenna.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.4.2.3]

References

1. Banerjee A, Chisti Y, Banerjee UC. Streptokinase- a clinically useful thrombolytic agent. Biotechnol Adv 2004; 22(4): 287-307.
2. C?ceres-L?riga FM. History of streptokinase use in acute myocardial infarction. Tex Heart Inst J 2008; 35(1): 91.
3. Burlova-Vasyl'ieva NK, Krasnobryzha IeM, Savchuk OM, Volkov HL. Process of platelets activation by streptokinase. Ukr Biokhim Zh 2007; 79(6): 60-4.
4. Abed Abdelghani TT, Kunamneni A, Ellaiah P. Isolation and mutagenesis of streptokinase producing bacteria. Am J Immunol 2005; 1(4): 125-9.
5. Kunamneni A, Ravuri BD, Saisha V, Ellaiah P, Prabhakhar T. Urokinase-a very popular cardiovascular agent, Recent Pat Cardiovasc Drug Discov. 2008, 3, 1, 45-58
6. World Health Organization. The WHO model list of essential medicines, 14th ed, March 2005. http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/a87017_eng.pdf, (10 February 2007).
7. Patnaik PA. Neural optimization of fed-batch streptokinase fermentation in a non-ideal bioreactor. Canadian J Chem Eng 2002; 80(5): 920-6.
8. Ogburn CA, Harris TN, Harris S. Extracellular antigens in steady-state cultures of the hemolytic streptococcus: production of proteinase at low pH. J Bacteriol 1958; 76(2): 142-51.
9. Holmstrom.B. Production of streptokinase in continuous culture. Appl Microbiol 1968; 16(1): 73-7.
10. Davies E, Demain L. Manual of industrial microbiology and biotechnology. ASM Press, Washington DC 1992; pp: 332-47.
11. Kulisek ES, Holm SE, Johnston KH. A chromogenic assay for the detection of plasmin generated by plasminogen activator immobilized on nitrocellulose using a para-nitroanilide synthetic peptide substrate. Med Anal Biochem 1989; 177(1): 78- 84.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.4.2.3]

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.4.2.3]