شماره ۸۴، پاییز ۱۳۸۸

نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)

افزایش تولید آنتی‌بیوتیک تایلوزین در باکتری *Streptomycess fradiae* با استفاده از روش موتاسیون

● **داود زارع**
عضو هیئت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی (نویسنده مسئول)
● **مهرداد آذین**
عضو هیئت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی
● **حسین راثی**
عضو هیئت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی
● **سیدسعید میردامادی**
عضو هیئت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی
تاریخ دریافت: تیرماه ۱۳۸۷ تاریخ پذیرش: خردادماه ۱۳۸۸
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۲۱۸۸۸۳۸۳۵۰
Email: davoodz@yahoo.com

چکیده

در این بررسی از دو موتاژن اشعه uv با طول موج ۲۸۰ nm و EMS (Ethylmethanesulfonate) با غلظت‌های متفاوت برای ایجاد موتاسیون و افزایش تولید تایلوزین در باکتری *Streptomycess fradiae* استفاده شد. منحنی مرگ برای هر دو موتاژن رسم گردید و شرایط بهینه برای ایجاد موتاسیون توسط اشعه uvبا فاصله ۲۰ سانتی‌متری و مدت زمان ۴۰ تا ۶۰ ثانیه و برای EMS مدت زمان ۳۰ دقیقه و غلظت (w/v) ۴ درصد تشخیص داده شد. در مرحله اول، موتاسیون با uv انجام شد و سویه‌های دارای تولید بالا به روش پلاک آگار ارزیابی شدند. در غربال‌گری ثانویه سویه ۲۴U با تولید ۰/۸۹۲ mg/ml تایلوزین و ۱/۲۸ برابر بیشتر از سویه وحشی به عنوان سویه مناسب انتخاب شد و در مرحله دوم تحت تیمار با EMS قرار گرفت. در نهایت سویه موتانتی با تولید ۲/۱۸ mg/ml تایلوزین و ۳/۱۲ برابر افزایش تولید نسبت به سویه وحشی بدست آمد.

کلمات کلیدی: *تایلوزین، Streptomycess fradiae، موتاسیون، پلاک آگار، EMS*

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 84 pp: 40-47

Enhancement of tylosin production in *Streptomyces fradiae* by Mutation

By:D. Zareh, Scientific Member of Biotechnology Institute (Corresponding Author; Tel: +982188838350) M. Azin, H. Rasi, S. Mirdamadi, Scientific Members of Biotechnology Institute.

In order to increase tylosin production by *Streptomyces fradiae*, two mutagens, i. e. uv and EMS (Ethylmethanesulfonate) were used. Death curves were plotted for these mutagens. Optimum condition for obtaining mutants by uv radiation was determined by using a uv source lamp at a distance of 20 cm for 40-60 seconds. When EMS was used at 4% (w/v) concentration, the best mutants were isolated after 30 minutes of exposure to the mutagen. In the first mutation step, which was done by uv radiation, high tylosin producing strains were isolated by Plaque Agar method as the first screening step. For the second step of screening, a mutant strain (U24) with a production of 0.892 mg tylosin per ml was isolated, which was 1.27 times more productive than the wild type. The secondary mutation step on this mutant strain was performed by EMS. Finally, a mutant strain (UE1) with a production of 2.18 mg tylosin per ml was obtained, which was 3.12 times more productive than the wild type.

Key words: Tylosin, Streptomycess fradiae, Mutation, Plaque Agar, EMS, UV

مقدمه

تایلوزین شانزدهمین عضو خانواده آنتی‌بیوتیک‌هاست که به صورت صنعتی تولید می گردد. این ماده یک آنتی‌بیوتیک ماکرولیدی است. تایلوزین اولین بار در سال ۱۹۶۱ شرح داده شده است و سپس آنتی‌بیوتیک‌های وابسته به آن ما نند ماکروسین شناسائی و معرفی شده‌اند. این آنتی بیوتیک علیرغم اینکه یک آنتی بیوتیک بسیار قدیمی است، اما هم‌چنان بطور وسیعی در دنیا تولید شده و مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱،۲،۷،۸،۹).

این آنتی بیوتیک مصرف انسانی نداشته و عمدتاً کاربرد دامی دارد. تایلوزین در دام‌ها به دو منظور مورد استفاده قرار می‌گیرد، یکی به عنوان دارو جهت درمان بسیاری از بیماری‌های دامی از قبیل بیماری‌های مایکوپلاسمائی و غیره، و دیگری به عنوان محرک رشد جهت افزایش پروتئین دامی در دام و طیور. البته امروزه به دلیل اهمیت درمانی این آنتی‌بیوتیک، استفاده آن به عنوان محرک رشد بسیار محدود گردیده است و علیرغم اینکه این آنتی بیوتیک داروی نسبتاً گرانی است، اما بدلیل اینکه تاکنون جایگزین مناسبی جهت درمان برخی بیماری‌ها برای این آنتی بیوتیک پیدا نشده است، این دارو هم‌چنان جزء پرمصرف‌ترین داروهای دامی می‌باشد (۷،۹،۱۱،۱۳).

تنها سویه شناخته شده که امروزه به صورت صنعتی جهت تولید تایلوزین مورد استفاده قرار می‌گیرد سویه دست‌کاری شده‌ای از جنس (*S. fradiae*) با شماره NRRL ۲۷۰۲ می‌باشد اما تولید این آنتی‌بیوتیک بوسیله *S. rimosus* و *S. hygroscopius* نیز گزارش شده است (۱۵،۱۷،۱۸).

یکی از مباحث مهم در بیوتکنولوژی، بهینه‌سازی سویه‌ها جهت افزایش تولید محصولی خاص در میکروارگانیسم‌ها است. موتاسیون یکی از روش‌هایی است که به منظور افزایش تولید آنتی‌بیوتیک‌ها نظیر تایلوزین به کار گرفته می‌شود. امروزه به خوبی نشان داده شده است استفاده از عوامل موتاسیون‌زایی نظیر اشعه uv و ماده EMS می‌تواند باعث افزایش تولید فرآورده‌ها در سویه‌های جهش یافته گردد (۱۵،۱۷،۱۸).

در این تحقیق استفاده از روش موتاسیون با عوامل uv و EMS، و با هدف افزایش تولید تایلوزین در سویه *S. fradiae* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

میکروارگانیسم مولد

سویه مورد استفاده در این تحقیق، *S. fradiae* DSMZ ۴۰۹۴۰ تهیه شده از بانک میکروبی آلمان بود که به عنوان تولیدکننده تایلوزین به کار می‌رود.

سویه استاندارد مورد استفاده در آزمون زیستی Bioassay *Micrococcus lotcus* PTCC ۱۱۱۰ تهیه شده از بانک میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران.

نگهداری میکروارگانیسم: سویه *S. fradiae* در محیط کشت شیبدار PDA کشت شده و پس از نگهداری در دمای ۲۸ سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت، به دمای ۴ سانتی‌گراد منتقل شد. سویه *M. lotcus* بر روی محیط کشت آگار مغذی (N.A) کشت شده و پس از نگهداری در دمای ۳۷ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت به یخچال منتقل شد. کشت هر دو میکروارگانیسم هر دو هفته یکبار تجدید می‌گردید (۳،۴،۶،۸).

روش سنجش تایلوزین در محیط مایع

برای اندازه‌گیری تایلوزین در محیط مایع از روش فتومتری استفاده شد. با توجه به جذب نوری بالای تایلوزین در طول موج ۲۹۰ nm در حضور متانول، ابتدا مایع تخمیر سانتریفوژ شده و محلول رویی با نسبت ۱:۲ با متانول مخلوط شده و جذب نوری آن در ۲۹۰ و ۳۳۰ نانومتر خوانده شده و تفاضل دو جذب با منحنی استاندارد تایلوزین که با مقادیر ثابت تایلوزین خالص تحت شرایط بالا بدست آمده بود مقایسه گردید (۲، ۵).

روش کار

رسم منحنی مرگ توسط اشعه uv

ابتدا با استفاده از بافر HCl-Tris با pH، ۷٫۲، غلظت 10^{5}-10^{6} اسپور در میلی‌لیتر از محیط‌های شیب‌دار *S. fradiae* تهیه شد و با استفاده از لام نئوبار شمارش شد. سپس ۰/۱ ml از این سوسپانسیون در پلیت‌های حاوی محیط کشت استریل As-۱ آگار با ترکیب: عصاره مخمر(۱ گرم)، ال آلانین (۰/۲ گرم)، ال آسپاراژین (۰/۵ گرم)، ال آرژینین(۰/۲ گرم)، نشاسته محلول(۵ گرم)، کلرید سدیم ۲۵ گرم، سولفات کلسیم ۱۰ گرم، آگار ۲۰ گرم، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر، ریخته شده و کاملاً پخش گردید. سپس پلیت‌ها برای زمان‌های ۰-۲۰-۴۰-۶۰-۸۰ و ۱۰۰ ثانیه از فاصله ۲۰ سانتی‌متری در معرض اشعه uv ناشی از لامپ، Philips ۳۰w/۶۱۵ TB قرار گرفت و بلافاصله در شرایط تاریکی به مدت ۷- ۵ روز در ۲۸ سانتی‌گراد نگهداری شد تا موتانت‌ها رشد نمایند. پس از شمارش کلنی‌های رشد کرده، منحنی مرگ توسط اشعه uv رسم گردید (۴).

استفاده از روش uv در موتاسیون

بر اساس داده‌های منحنی مرگ، دامنه مرگ ۹۹ تا ۹۹/۹۱۱ درصد برای غربالگری سویه‌های موتانت به روش تصادفی انتخاب گردید.

به این منظور غلظت 10^{6} اسپور تهیه شده و پس از کشت سطحی در محیط As-۱ آگار برای زمان‌های ۶۰ و ۴۰ ثانیه در معرض اشعه uv قرار گرفت و به مدت ۷- ۵ روز در تاریکی، در دمای ۲۸ سانتی‌گراد نگهداری شد (۴).

غربال‌گری اولیه سویه‌های موتانت به روش پلاک آگار

به منظور غربال‌گری اولیه، ابتدا از هر محیط As-۱ آگار در مرحله قبل، ۳۰ عدد کلنی به صورت تصادفی انتخاب شد و بر روی سیلندرهایی از محیط کشت آنتی بیوتیک شماره ۲، تهیه شده از شرکت دیفکو، حاوی ۲ درصد آگار که با استفاده از چوب پنبه سوراخ کن استریل از یک پلیت محیط کشت تهیه شده بود، کشت داده شد و به صورت دسته‌های ده تایی در یک پلیت حاوی آب استریل (به منظور جلوگیری از خشک شدن) برای مدت ۷ روز در دمای ۲۸ سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از این مرحله ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی میکروکوکوس لوتئوس بر روی محیط کشت آنتی بیوتیک ۱۱ تهیه شده از شرکت دیفکو، به روش کشت سطحی، کشت داده شد و به هر پلیت ۵ عدد سیلندر رشد یافته موتانتها از مرحله قبل انتقال داده شد. پلیت‌ها برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به عنوان شاهد، تمام موارد بالا برای ۲۰ کلنی مادر، بدون تابانیدن اشعهuv، تکرار شد و در نهایت سویه‌های موتانتی که قطر هاله آنها از میانگین قطر هاله در سویه مادر بیشتر بود، به عنوان سویه موتانت انتخاب و نگهداری شد (۱۱،۲).

غربالگری ثانویه

پس از این مرحله با توجه به کیفی بودن روش پلاک آگار، برای بدست آوردن مقدار دقیق تولید توسط سویه‌های موتانت، محیط کشت تولید به مقدار ۵۰ ml در ارلن‌های ۲۵۰ ml با ترکیب زیر تهیه شد. نشاسته نا محلول (۲۰ گرم)، گلوکز (۵ گرم)، سولفات آمونیوم (۱/۷ گرم)، لاکتات سدیم (۵/۵ گرم)، دی پتاسیم فسفات (۰/۵ گرم)، سولفات منیزیم ۷ آبه (۰/۵ گرم)، کلرید کلسیم (۳ گرم)، آب مقطر (تا ۱ لیتر)، عنا صر کمیاب (۱۰ ml). عناصر کمیاب که شامل: mg/l ۴۰ $ZnCl_2$، ۲۰۰mg/l $FeCl_3,6H_2O$، mg/l ۱۰ $CuCl_2,2H_2O$، ۱۰ $MnCl_2,4H_2O$ و ۱۰ mg/l $Na_2MoO_4,2H_2O$ می‌گردید، به صورت جداگانه تهیه شده و پس از استریلیزاسیون به محیط اصلی اضافه گردید. پس از استریلیزاسیون محیط کشت تولید، به مدت ۱۵ دقیقه و آماده سازی محیط تولید، 10^{5} اسپور از هر نمونه موتانت به هر ارلن مایه زنی شد و در شیکر- انکوباتور در دمای ۲۸ سانتی‌گراد با دور ۱۵۰ دور در دقیقه نگهداری شد. میزان تایلوزین تولید شده با روش فوتومتری اندازه‌گیری شد و با سویه مادر مقایسه گردید. غربالگری ثانویه برای همه سویه‌ها به صورت سه تکرار صورت پذیرفت (۱۴،۱۳،۱۲،۱۰).

رسم منحنی مرگ با ماده EMS

بهترین سویه موتانت بدست آمده از موتاسیون با اشعه uv با نام (U۲۴) *S. fradiae* برای این مرحله انتخاب شد. به این منظور سوسپانسیون اسپوری با غلظت 10^{5} اسپور در هر میلی‌لیتر در بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار، pH ۷/۲ تهیه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۸ سانتی‌گراد در مجاورت غلظت‌های ۱ الی (w/v) ۴ درصد موتاژن EMS قرار داده شد. سپس واکنش بوسیله رقیق کردن اسپورها به نسبت ۱:۱۰ با محلول تیوسولفات سدیم ۰/۱۶ مولار متوقف شد. ۰/۱ ml از محلول رقیق شده برروی سطح محیط As-۱ آگار به صورت سطحی کشت داده شد و به مدت ۵ روز در ۲۸ سانتی‌گراد نگهداری شد. در نهایت منحنی مرگ بر اساس تغییرات رشد سلول‌ها در مقایسه با نمونه شاهد (بدون EMS) رسم گردید (۱۶،۴).

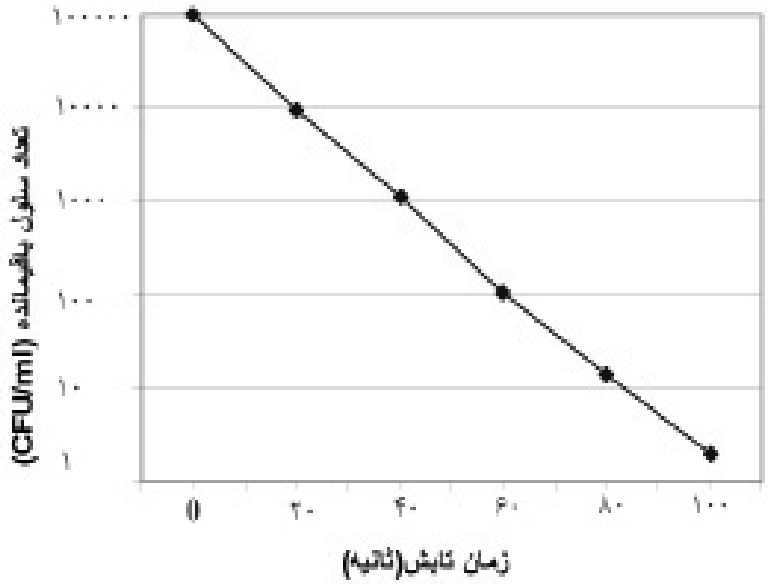
انجام موتاسیون با EMS

در این مرحله یک سوسپانسیون اسپوری از سویه S. fradiae(U۲۴) با غلظت 10^{5} اسپور در بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار pH ۷/۲ تهیه شد. سپس ۵ ml از آن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ سانتی‌گراد درمجاورت غلظت (w/v) ۴٪ از EMS قرار گرفت و پس از توقف واکنش با تیوسولفات سدیم، ۰/۱ ml از آن بر روی محیط As-۱ آگار به صورت سطحی کشت شد و به مدت ۷- ۵ روز در دمای ۲۸ سانتی‌گراد نگهداری شد. میزان تولید تایلوزین توسط موتانت‌های ایجاد شده به روش پلاک آگار و فتومتری بررسی شد (۱۶،۴).

نتایج

روند مرگ و میر *S. fradiae* با اشعه uv در نمودار (۱) مشاهده می‌گردد. همانگونه که ملاحظه می‌گردد ۹۹ درصد اسپورها پس از ۴۰ ثانیه و حدود ۹/۹۹ درصد از اسپورها پس از ۶۰ ثانیه قرار گرفتن در معرض اشعه uv از بین رفته‌اند.

به این ترتیب با حفظ فاصله ۲۰ سانتیمتری در مورد لامپ uv فوق‌الذکر، مدت زمان ۴۰ و ۶۰ ثانیه جهت ایجاد موتاسیون بر روی تعداد



نمودار ۱- منحنی مرگ سلولی تحت اثر اشعه uv در *S. fradiae*

10^5 اسپور پخش شده در سطح پلیت‌ها انتخاب شد.

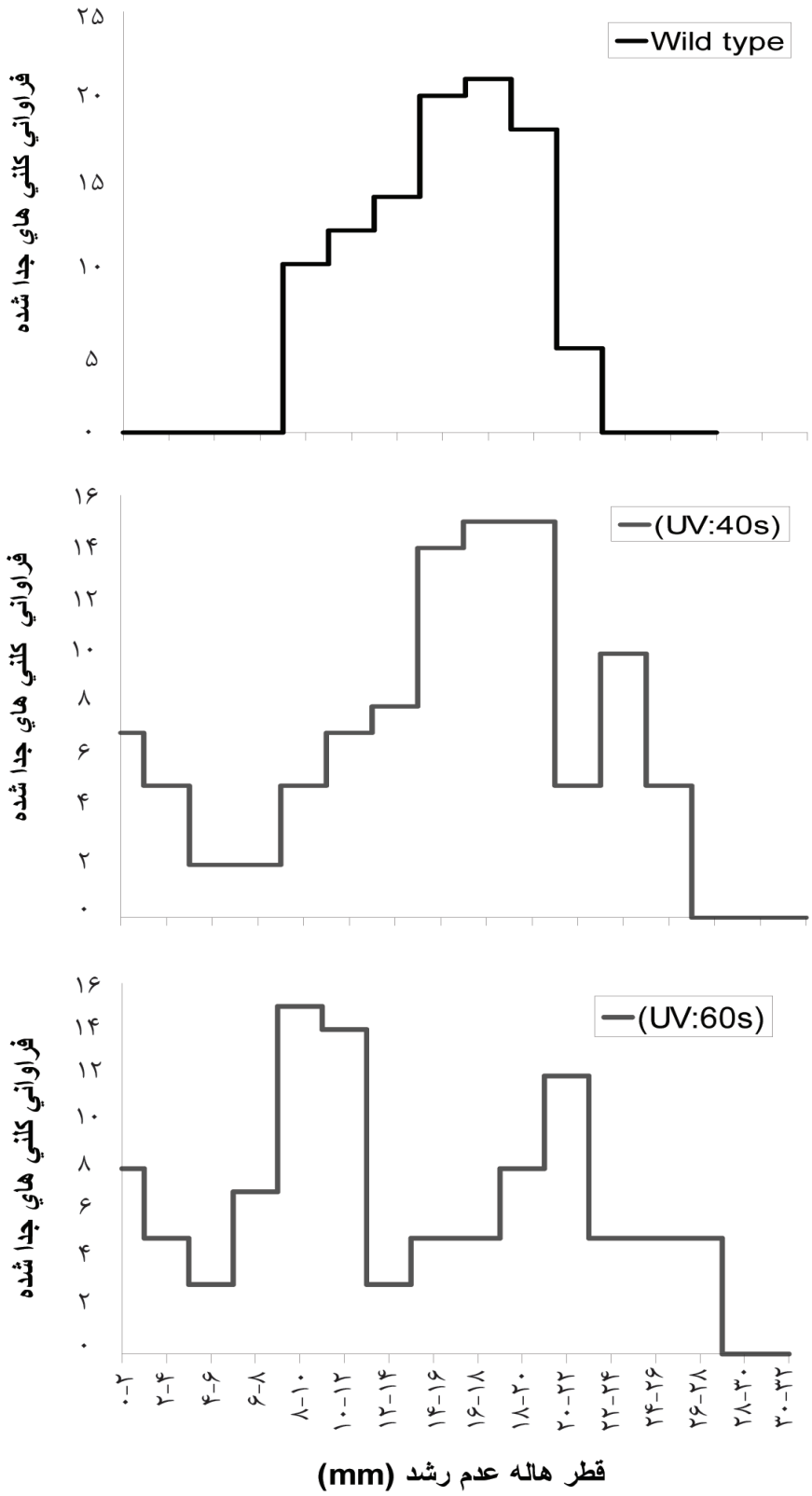
نتایج غربالگری اولیه در جداسازی موتانت‌های ایجاد شده با اشعه uv در جدول ۱ و توزیع فراوانی آنها در نمودار ۲ نشان داده شده است. همان‌گونه که ملاحظه می‌گردد هاله‌های ایجاد شده در کلنی‌های سویه والد در دامنه بین ۸ الی ۲۰ میلی‌متر می‌باشد و بیشترین مقدار آن مربوط به ۱۴ تا ۱۸ میلی‌متر می‌گردد. بررسی موتانت‌های حاصل پس از ۴۰ ثانیه اشعه‌دهی نشان داد این شرایط باعث ایجاد موتانت‌هایی گردیده است که بسیاری از آنها قابلیت تولید تایلوزین را از دست داده و یا مقدار تولید در آنها کاهش یافته است و فقط ۱۵درصد از موتانت‌ها قابلیت تولید مقدار تایلوزینی بیش از سویه والد را داشته‌اند. در مورد سویه‌های موتانت در زمان ۶۰ ثانیه نیز همان‌گونه که ملاحظه می‌گردد دامنه ایجاد هاله از ۰ تا ۲۸ میلی‌متر کشیده شده است اما توزیع آن در مقایسه با سویه والد و موتانت‌های ۴۰ ثانیه از پراکندگی بیشتری برخوردار است و بویژه درصد موتانت‌های با تولید کمتر تایلوزین، بیشتر شده است و ۶۰ درصد از موتانت‌های جداشده، تولیدی کمتر از میانگین تولید سویه والد (حدود ۱۵ mm) داشته‌اند و فقط ۱۵ درصد از سویه‌های موتانت از حد اکثر هاله ایجاد شده توسط سویه والد، هاله بزرگتری ایجاد کرده‌اند که با شرایط موتاسیون ۴۰ ثانیه از نظر درصد تفاوتی نداشته و فقط تعداد کلنی معدودی (۵ درصد) هاله بزرگتر ایجاد نموده است.

پس از غربالگری ثانویه، سویه موتانت U۲۴ با تولید ۰/۸۹۲ mg/ml تایلوزین با افزایشی حدود ۱/۲۷ برابر نسبت به سویه وحشی، به عنوان بهترین موتانت در محیط تخمیری سنتتیک شناخته شد (جدول ۲).

در دومین مرحله از موتاسیون، اثر EMS بر روی بهترین موتانت حاصل از مرحله پیشین (U۲۴) مطالعه شد. بررسی اثر EMS، بر روی موتانت فوق نشان داد استفاده از غلظت (w/v) ۴ درصد این موتاژن در

جدول ۱- نتایج موتاسیون با uv و توزیع فراوانی کلنی‌های جدا شده پس از غربالگری اولیه

موتانت‌های ۶۰ ثانیه (درصد)	موتانت‌های ۴۰ ثانیه (درصد)	سویه والد (درصد)	هاله عدم رشد (mm)
۸	۷	۰	۰-۲
۵	۵	۰	۲-۴
۳	۲	۰	۴-۶
۷	۲	۰	۶-۸
۱۵	۵	۱۰	۸-۱۰
۱۴	۷	۱۲	۱۰-۱۲
۳	۸	۱۴	۱۲-۱۴
۵	۱۴	۲۰	۱۴-۱۶
۵	۱۵	۲۱	۱۶-۱۸
۸	۱۵	۱۸	۱۸-۲۰
۱۲	۵	۵	۲۰-۲۲
۵	۱۰	۰	۲۲-۲۴
۵	۵	۰	۲۴-۲۶
۵	۰	۰	۲۶-۲۸
۰	۰	۰	۲۸-۳۰
۰	۰	۰	۳۰-۳۲



نمودار۲-توزیع فراوانی تولید تایلوزین توسط باکتری *S. fradiae* قبل و بعد از تیمار با uv پس از غربالگری اولیه

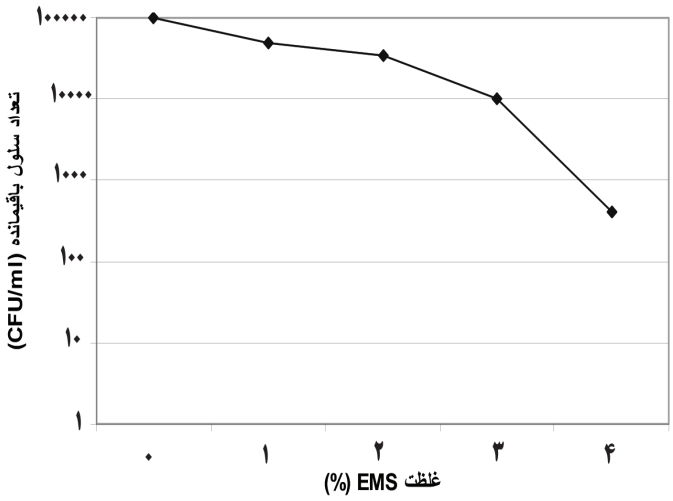
مدت زمان ۳۰ دقیقه باعث کاهش بیش از ۹۹ درصد از سلول‌های اولیه شده است (نمودار ۳). بنابراین غلظت (w/v) ۴ درصد این موتاژن در مدت زمان ۳۰ دقیقه برای مرحلهٔ دوم موتاسیون انتخاب شد.

نتایج حاصل نشان داد در مجموع، موتانت‌های ایجادشده توسط EMS از نظر میزان تولید آنتی بیوتیک از تنوع وسیع‌تری برخوردار بودند (نمودار ۴).

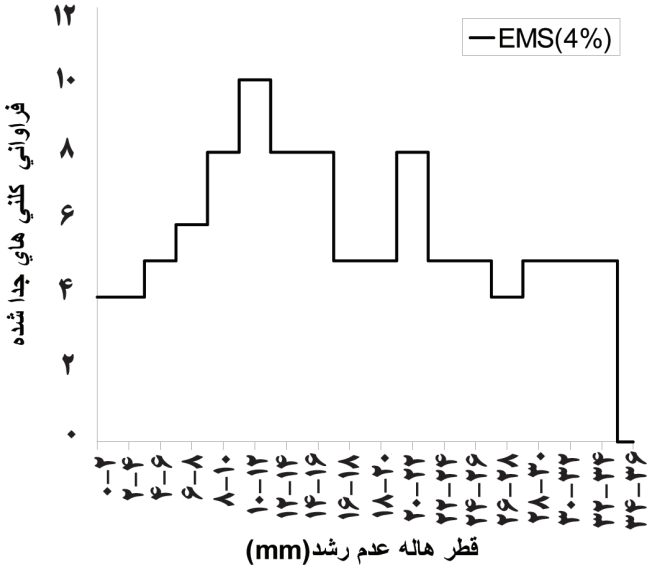
در مرحله دوم موتاسیون که از موتاژن EMS به عنوان عامل شیمیایی استفاده گردید، پس از غربالگری ثانویه سویه موتانت UE۱ با تولید ۲/۱۸ mg/ml تایلوزین به عنوان بهترین موتانت در محیط تخمیری سنتتیک شناخته شد (جدول۳).

جدول۲- نتایج غربال‌گری ثانویه در تولید تایلوزین توسط سویه وحشی و موتانت‌های ناشی از اشعه uv

سویه	میزان تولید تایلوزین (mg/ml)
والد (سویه وحشی)	۰/۶۹۸
U ۴۳	۰/۷۴۲
U ۶۴	۰/۷۰۱
U ۱۸	۰/۷۷۲
U ۷	۰/۸۴
U ۱۴	۰/۶۱
U ۹۳	۰/۷
U ۲۴	۰/۸۹۲
U ۱۱	۰/۵۶



نمودار۳- منحنی مرگ سویه U۲۴ در حضور موتاژن EMS



نمودار۴- توزیع فراوانی تولید تایلوزین توسط موتانت‌های ناشی از جهش‌زایی با EMS برروی سویه U۲۴ پس از غربال‌گری اولیه

بحث

به منظور بهینه‌سازی تولید تایلوزین، آنتی بیوتیکی که در صنعت پرورش دام و طیور مورد استفاده قرار می‌گیرد، روش موتاسیون کلاسیک با بکار گیری دو نوع موتاژن فیزیکی (اشعهٔ uv) و شیمیایی (اتیل- متیل سولفونات یا EMS) مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی خصوصیات مورفولوژیکی موتانت‌ها نشان داد سویه‌هایی که تولید تایلوزین در آنها باقیمانده بود و یا افزایش داشت از نظر فنوتیپ مشابه با سویه والد بودند و از نظر رنگ و شکل کلنی تفاوت چندانی نداشتند در حالی‌که موتانت‌هایی که تولید تایلوزین نداشتند از نظر فنوتیپ و بویژه اسپورزایی با سویه والد تفاوت داشتند.

در اکتینومیست‌ها تولید برخی مواد و از جمله بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها توسط عوامل تنظیم‌کننده درونی کنترل می‌گردد. برای مثال در استرپتومیسس گریزئوس تنظیم اسپورزایی و تولید استرپتومایسین هر دو توسط یک ژن تنظیم کننده درونی کنترل می‌گردد. و موتانت‌هایی که فاقد خاصیت اسپورزایی باشند عمدتاً قادر به تولید استرپتومایسین نیز نیستند. به نظر می‌رسد ژن tylp در *S. fradiae* نیز که در تولید

جدول۳- نتایج غربالگری ثانویه در تولید تایلوزین توسط سویه U۲۴ و موتانت‌های ناشی از EMS

سویه	میزان تولید تایلوزین (mg/ml)
والد (U۲۴)	۰/۸۹۲
UE۲۳	۱/۰۸۵
UE۱۱	۱/۵۳۵
UE۵۵	۰/۹۶۴
UE۱۷	۰/۸۰۲
UE۴۶	۱/۲۳۰
UE۱	۲/۱۸
UE۳۴	۰/۹۰۴
UE۱۶	۱/۸۰۰
UE۶۱	۰/۹۲۳

تایلوزین نقش مهمی دارد از چنین مکانیسمی تبعیت می‌کند (۲).

هم‌چنین مقایسه منحنی مرگ باکتری در حضور دو موتاژن فوق نشان می‌دهد، EMS در غلظت بکار گرفته شده (w/v۴ درصد) اثر کشندگی کمتری بر روی این میکروارگانیسم دارد و در نتیجه پراکندگی موتاسیون‌های ایجاد شده برای بدست آوردن صفت مورد نظر در موتانت‌ها بیشتر می‌باشد. اثر موتاژن‌ها بر روی *S. fradiae* توسط Baltz و همکارانش بررسی شده است. در بررسی فوق، اثر موتاژن NTG (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine) ۱۰۰۰ برابر بیشتر از uv گزارش شده است (۳،۲) اما گزارشی از میزان تاثیر EMS بر روی این باکتری دیده نمی‌شود. از آنجا که در بررسی حاضر، موتاژن‌های uv و EMS بطور همزمان برروی سویه والد اثر داده نشده است، نمی‌توان مقایسه‌ای مشابه با نتایج ارائه شده توسط Baltz و همکاران (۲) انجام داد، اما در این تحقیق، موتاسیون با uv افزایشی در حدود ۱/۲۸ برابر نسبت به سویه والد را موجب شد و در مرحلهٔ بعدی، موتاسیون با EMS، برروی سویه U۲۴ باعث افزایش فراتر ۲/۴ برابری تولید تایلوزین گردید. شازی و همکارانش نیز در یک بررسی اثر اشعه uv را در ایجاد موتاسیون و افزایش تولید تایلوزین بررسی کرده‌اند. آنها به تنهایی با موتاسیون توسط اشعه uv تولید تایلوزین در این باکتری را ۲،۷ برابر نسبت به سویه والد افزایش داده اند و در نهایت به سویه موتانتی با تولید mg/ml ۳/۸ تایلوزین دست یافته‌اند (۱۶). از مسائل جالب توجه در مورد این دو موتاژن این بود که *S. fradiae* تحت تاثیر uv با شرایط اعمال شده در این تحقیق، پس از حدود ۶۰ ثانیه از بین رفت (۹۹/۹۹ درصد) در حالی‌که EMS با شرایط اعمال شده در این تحقیق اثر کشندگی کمتری داشت اما فراوانی موتاسیون در آن بیشتر بود.

در نهایت، با انجام دو مرحله موتاسیون با uv و EMS مجموعا مقدار تولید تایلوزین در سویه والد، با ۳/۱۲ برابر افزایش، از mg/ml ۰/۶۹۸ به mg/ml ۲/۱۸ بالغ گردید. هم اکنون تولید تایلوزین توسط سویه‌های موتانت مورد استفاده محققان، به حدود ۵ تا ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بالغ می گردد (۱۶،۱۰،۳). بنابراین تولید تایلوزین در سویه موتانت بدست آمده در این بررسی مقدار قابل توجهی بوده و می‌تواند برای ادامه کار امیدوارکننده باشد. استفاده از روش موتاسیون و انتخاب مستلزم تداوم کار بر روی موتانت‌ها در نسل‌های متوالی است تا آنجا که موتانت‌هایی با میزان تولید اقتصادی بدون از دست رفتن صفات مثبتی چون پایداری، نحوه رشد، میزان راندمان، بهره‌دهی و غیره حاصل گردد.

قدردانی

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی و فنی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به عمل آمده است و در اینجا از آن نهایت سپاسگزاری به عمل می‌آید.

منابع مورد استفاده

1- Andrew, R. B., Neil, B., Eric. C., (1999) Impact of thioesterase activity on tylosin biosynthesis in Streptomyces fradiae. *Chemistry and Biology*. 6: 287-292

2- Baltz, R. H. & Seno, E. T., (1981) Properties of Streptomyces fradiae mutants blocked in biosynthesis of the macrolide antibiotic tylosin. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*. 20: 214-225

3- Baltz, R. H., Seno, E. T., Stonesifer, J. & Wild, G. M., (1982) Biosynthesis of the macrolide antibiotic tylosin a preferred pathway from tylactone to tylosin. *The Journal of Antibiotics*. 36: 131-141

4- Baltz, R. H., (1986) Mutagenesis in Streptomyces. In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. DeMain, A. and Solomon, N. eds., *American Society for Microbiology*. pp. 184-190

5- British pharmacopoeia, (1993) London: HMSO, Appendix XIV, A 165-170

6- Christopher, D. R., Shannon, L. W., Revill, W. P., Hideki, S., Matthew, M., Oleg, V. P., Saul, M., Hong, F., Steven, D. D. & Leonard. K., (2004) Production of hybrid 16-Membered macrolides by expressing combinations of polyketide synthase genes in engineered Streptomyces fradiae hosts. *Chemistry and Biology*. 11: 1465-1472

7- Cruger, W. & Cruger, A., (1990) Antibiotics In: Biotechnology

13- Omura, S., Sadakane, N. & Matsubara, H., (1982) Bioconversion and biosynthesis of 16-membered macrolid antibiotic. *Chemical Pharmacology Bulletin*. 30: 223-229

14- Omura, S., (1984) Macrolid antibiotics In: Chemistry, Biology and Practice. *Academic press*. pp. 1-35.

15- Roberto, F., Marta, R., Encarnación, M., Bruno, D., José. L. B., (2000) Conjugation and transformation of Streptomyces species by tylosin resistance. *FEMS Microbiology Letters*, 186: 319-325

16- Shazia, K,, Kalsoom, A, , Muhammad, A. G. Ruqia, I. Ahmad M. K. and Muhammad, M., Change in colony morphology and kinetics of tylosin production after UV and gamma irradiation mutagenesis of Streptomyces fradiae NRRL-2702. *Microbiological Research* (in press)

17- Stephen, D., Pamela, F. C., Mingfu, L., Jacob. P., (2004) The tylosin-resistance methyltransferase RlmAII (TlrB) modifies the N-1 position of 23 S rRNA nucleotide G748. *Journal of Molecular Biology*, 337: 1073-1077

18- Stephen, D., Lene, J., Satoko, Y., Dominique. F., (2008) Interaction of the tylosin-resistance methyltransferase RlmAII at its rRNA target differs from the orthologue RlmAI. *Journal of Molecular Biology*, 378: 969-975

a Textbook of Industrial Microbiology. *Sinauer Associates*, Inc. pp. 256-258

8- Cundliffe, E., Louise, A. & Mersone, D., (1993) Aspect of tylosin production and resistance in S. fradiae. In: Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics. Baltz, R. H., Hegeman, G. D., and Skatrud, P. L. (eds.) Washington, D.C.: *American Society for Microbiology*, pp. 235-243 Academic Press.

9- Cundliffe, E., Larg, S. L. & Gandecha, A. R., (1997) Analysis of four biosynthetic genes from the tyl LM region of the *Streptomyces fradiae. Gene*, 184: 197-203

10- Du, B. C., Enoch. Y. P. & Mitsuyasu. O. (1998) Improvement of tylosin production from *Streptomyces fradiae* culture by decreasing the apparent viscosity in an Air-lift bioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 86: 413-417.

11- Ikenda, H., Inoue. M. & Omura, S. (1983) Improvement of macrolide antibiotic producing streptomycete strains by the regeneration of protoplast. *Journal of Antibiotics*. 36: 283-288

12- Lee, K. J. & Lee, H. S., (1991) Relationship between threonine dehydratase and biosynthesis of tylosin in *Streptomyces fradiae. Journal of General Microbiology*. 137: 2547-2553.