AF ۱۹۲

✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۵۳، زمستان ۱۳۸۰

بهینه‌سازی تولید توکسین دیفتری با استفاده از روش تاگوچی

● **انوشیروان کاظم‌نژاد**، دانشیار گروه آمار زیستی دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
● **عبدالرضا موحدی**، عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی
● **مسعود صالحی**، دانشجوی کارشناسی ارشد آمار زیستی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: شهریور ماه ۱۳۸۰ تاریخ پذیرش: دیماه ۱۳۸۰

چکیده

در تولید انبوه توکسین دیفتری، باکتری دیفتری باید در یک محیط مغذی و مناسب کشت داده شود تا در شرایط مناسب کشت، باکتری توان تولید توکسین دیفتری را یافته و بتوان به مقدار زیاد توکسین دیفتری راکه ماده اولیه واکسن دیفتری است به دست آورد. برای یافتن حالتی که اجزاء مختلف محیط کشت در آن به گونه‌ای با یکدیگر ترکیب شده باشند تا حداکثر تولید توکسین دیفتری را داشته باشیم، نیاز به انجام آزمایش‌های مختلفی داریم. این آزمایش‌ها باید دارای یک طرح آماری مشخص و اصولی باشند تا بتوان عوامل مؤثر بر تولید توکسین و خطاها را شناسایی کرد. برای این منظور در میان طرح آزمایش‌های مختلف از طرح‌های متعامد تاگوچی بهره گرفته‌ایم. با در نظر گرفتن عوامل: غلظت N. Z. Amine (gr/lit)، غلظت آهن (ml/lit)، غلظت کلسیم (mg/lit)، غلظت محلول فسفات (ml/lit) و حجم محلول فاکتورهای رشد (ml/lit)، هر یک در چهار سطح، با استفاده از یک آرایه متعامد L´16 آزمایش‌هایی طرح و اجرا شد. پس از تحلیل نتایج، شرایط بهینه تولید و پاسخ آن برآورد گردید. با به کارگیری شرایط بهینه تولید در عمل پاسخ بهینه، توکسین تولیدی از ۱۲۰ lf/ml به مقدار ۲۰۰ lf/ml (بیش از ۶۰٪) افزایش یافت و در سطح استانداردهای جهانی قرار گرفت.

کلمات کلیدی: تولید توکسین دیفتری، طراحی بهینه، روش تاگوچی، محیط کشت استینر.

✓ **Pajouhesh & Sazandegi, No 53 PP:54-57**

Optimizing of diphtheria toxin production by using of taguchi method

By: Kazemnejad A. Associate professor of biostatistics, school of medical sciences, Tarbiat Modarres university, Tehran, Iran. Movahdi A. Member of scientific board of Razi serum and vaccination research institute, Karaj. Iran. Salehi M.M. Sc Student of biostatistics, school of mdical sciences, Tarbiat Modarres university, Tehran, Iran.

For large scale production of diphtheria toxin, *Coryneabactrium diphtheria* must be cultured in a nutrient medium, and optimum conditions. In this conditions coryneabactrium produces maximum amount of toxin, which is used for diphtheria vaccine production. For obtaining maximum yield, needed to find the optimum conditions and use a suitable statistical design to determine the effects of factors and errors. For this reason in different statistical experiment designs we used orthogonal taguchi method. For this expects the orthogonal array L'16 was used for the following five factors: Concenterations of 1- N. Z Amine (gr/lit), 2- Iron (mg/lit), 3- Calcium (mg/lit), 4- phosphate solution (ml/lit), 5- Growth factors solution (ml/lit) that all of them had four levels. Optimum condition and optimum response determined after analysis of experiment results. Final results showed in the optimum condition, toxin production level increased from 120lf/ml (over 60%) and comparable to other vaccine manufacturing of developed countries.

Keywords: Diphtheria toxin production, stainer medium, optimal design, Taguchi method.

مقدمه

برای تولید انبوه واکسن دیفتری لازم است که ابتدا کشت اختصاصی انبوه از سویه واکسینال باکتری دیفتری تهیه گردد. باکتریها برای رشد به منابع ازت، کربن و انرژی نیاز دارند. عموم باکتریها در محیط‌هایی که از نظر شیمیایی در بردارنده اسیدهای آمینه، قند، املاح، ویتامین‌ها و فاکتورهای رشد هستند، رشد می‌کنند.

در تولید انبوه توکسین دیفتری، باکتری دیفتری باید در یک محیط مغذی و مناسب کشت داده شود تا در شرایط مناسب کشت، باکتری توان تولید واکسن دیفتری را یافته و بتوان به مقدار زیاد توکسین دیفتری راکه ماده اولیه یا پادگن اولیه مورد نیاز برای دیفتری است، به‌دست آورد.

افراد زیادی از جمله Muller (۷)، Linggood (۲، ۳)، Mitsuhashi (۴) و Seamer (۱۱) بر روی محیط کشت‌های مختلف تحقیقات فراوانی انجام داده‌اند تا محیط کشتی راکه حداکثر تولید توکسین را ایجاد می‌کند، کشف نمایند. اما در این میان کارها و محیط کشت استینر[1] از ویژگی‌های خاصی برخوردار است. وی در اواسط دهۀ شصت به دنبال ساخت محیط کشت مناسبی بود تا عاری از هر گونه پادگن‌های حساسیت‌زای گاوی باشد و بتوان از آن برای تولید توکسین در فرمانتور بهره گرفت. وی با به‌کارگیری هضم آنزیمی کازئین به جای هضم اسیدی و سپس با افزودن مقادیر مناسبی از کلسیم و فسفات، اندازه‌گیری و بهینه‌سازی غلظت آهن، فاکتورهای رشد و مالتوز توانست محیط کشت مناسبی ایجاد نماید (۱۲، ۱۳، ۱۴). سپس بار دیگر با بهینه‌سازی عوامل به کار رفته در محیط کشت حاصل که اینک به نام خود وی نامیده می‌شود، فرمول محیط کشت خود را اصلاح نمود (۱۵، ۱۶). در ایران بر روی محیط کشت‌هایی به غیر از محیط کشت استینر، مطالعاتی انجام شده است (۵، ۶) در این تحقیق نیز مهمترین عوامل محیط کشت استینر (اجزاء تشکیل دهنده) به منظور تولید حداکثر توکسین دیفتری در شرایط آزمایشگاهی با روش تاگوچی در بخش تحقیق و تولید واکسن‌های باکتریایی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی مورد بررسی قرار گرفت تا

جدول ۱. عوامل و سطوح موردبررسی آنها

ردیف	عامل	واحد	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳	سطح ۴
A	غلظت N. Z. Amine	gr/lit	۲۹/۳	۳۱/۳	۳۳/۳	۳۵/۳
B	غلظت آهن	mg/lit	۰/۷۵	۱	۱/۲۵	۱/۵
C	غلظت کلسیم	mg/lit	۸/۶	۱۰/۶	۱۲/۶	۱۴/۶
D	غلظت محلول فسفات	ml/lit	۲/۸	۳	۳/۲	۳/۴
E	حجم محلول فاکتورهای رشد	ml/lit	۶	۸	۱۰	۱۲

جدول ۲. آرایه متعامد L'16، پنج عامل در چهار سطح

شماره آزمایش	عامل ۱	عامل ۲	عامل ۳	عامل ۴	عامل ۵
۱	۱	۱	۱	۱	۱
۲	۱	۲	۲	۲	۲
۳	۱	۳	۳	۳	۳
۴	۱	۴	۴	۴	۴
۵	۲	۱	۲	۳	۴
۶	۲	۲	۱	۴	۳
۷	۲	۳	۴	۱	۲
۸	۲	۴	۳	۲	۱
۹	۳	۱	۳	۴	۲
۱۰	۳	۲	۴	۳	۱
۱۱	۳	۳	۱	۲	۴
۱۲	۳	۴	۲	۱	۳
۱۳	۴	۱	۴	۲	۳
۱۴	۴	۲	۳	۱	۴
۱۵	۴	۳	۲	۴	۱
۱۶	۴	۴	۱	۳	۲

عوامل مؤثر بر تولید و حالت بهینه محیط کشت مشخص شوند.

مواد و روشها

سویه واکسینال

از باکتری *Coryneabacterium diphtheria* سویه PW-8 تحت سویه C.N ۲۰۰۰ به عنوان باکتری مولد توکسین استفاده شد.

محیط کشت

محیط کشت مورد بررسی، حاصل از هضم آنزیمی (تریپسین) کازئین شیر می‌باشد که توسط املاح، ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه و مالتوز به عنوان منبع انرژی غنی‌شده است.

فرمانتور آزمایشگاهی

از فرمانتور شیشه‌ای ۲۰ لیتری به منظور انجام کشت‌ها پایلوت استفاده گردید.

روش تاگوچی

این روش که یکی از روش‌های آماری معتبر در طراحی آزمایش‌ها است نوعی از طرح‌های آزمایشی عامی کسری[۲] است که به دلیل تعامد از دو ویژگی مهم بهره می‌برد. اول این که تعداد آزمایشها مورد نیاز را به حداقل می‌رساند و دوم این که توان تعیین شرایط بهینه و پیش‌بینی مقدار پاسخ بهینه تحت آن را دارد. از این رو زمان اجرای طرح‌ها و هزینه‌های اجرایی آنها را نیز بهینه می‌کند (۱، ۸، ۹، ۱۰).

اولین گام تعیین سطوح متفاوت برای مهمترین عوامل تشکیل دهنده محیط کشت استینر براساس مطالعه منابع مرتبط با تولید توکسین دیفتری و همچنین تجربیات گذشته در بخش واکسن‌های باکتریایی مصرف پزشکی مؤسسه رازی بود. در این مرحله مهمترین عوامل شناسایی و سطوح در نظر گرفته برای انجام آزمایش‌ها تعیین شدند که در جدول ۱ ارائه گردیده‌اند.

گام بعد تعیین آرایه متعامد[۳] مناسب به روش تاگوچی بود تا شرایط ویژه هر آزمایش مشخص شود. با توجه به خصوصیات آماری طرح (عوامل و سطوح آنها)، آرایه L'16 که در آن پنج عامل چهار سطحی مورد بررسی قرار می‌گیرند، انتخاب شد و با در نظر گرفتن سطرهای آن شرایط ویژه ۱۶ آزمایش مناسب تعیین گردید. این آرایه متعامد در جدول ۲ ارائه شده است.

پس از تعیین شرایط ویژه هر آزمایش نسبت به فرمولاسیون هر یک از محیط‌های کشت در شرایط آزمایشگاه به این ترتیب اقدام شد که برای هر فرمول تعداد چهار شیشه کشت سه لیتری انتخاب و در شرایط استریل، ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت استریل به هر یک از آنها اضافه گردید. پس از تنظیم pH و اطمینان از سترون بودن هر یک از محیط‌های کشت به هر شیشه دو میلی لیتر از بذر ۲۴ تا ۴۸ ساعته *C. diphtheria* اضافه شد. سپس شیشه‌های کشت در شیکر انکوباتور در شرایط ۳۵ درجه سانتیگراد با ۲۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. در طول مدت رشد ۴۸ ساعته به فواصل ۱۲ ساعت اقدام به نمونه‌برداری از شیشه‌های کشت شد، میزان توکسین تولید شده هر محیط کشت با استفاده از

جدول ۳. نتایج حاصل از هر آزمایش برحسب lf/ml

شماره آزمایش	تکرار				شماره آزمایش	تکرار			
	۱	۲	۳	۴		۱	۲	۳	۴
۱	۷۵	۶۰	۷۰	۷۰	۹	۸۰	۶۰	۸۰	۶۰
۲	۸۰	۶۰	۷۰	۷۰	۱۰	۶۰	۶۰	۷۰	۵۰
۳	۵۵	۵۰	۷۰	۷۰	۱۱	۷۰	۷۰	۷۵	۶۰
۴	۶۵	۳۰	۷۰	۷۰	۱۲	۷۰	۷۰	۸۰	۶۰
۵	۷۵	۵۰	۴۵	۴۵	۱۳	۷۰	۷۰	۷۵	۶۰
۶	۹۰	۶۰	۸۰	۷۰	۱۴	۶۰	۷۰	۶۰	۶۰
۷	۷۰	۷۰	۵۵	۵۰	۱۵	۷۵	۶۰	۹۰	۵۰
۸	۷۰	۵۰	۶۵	۳۰	۱۶	۸۰	۷۰	۹۰	۶۰

جدول ۴. شرایط بهینه و مقدار بهینه پیش‌بینی شده حاصل از تحلیل‌های دو و سه تکراری

دو تکرار، حالت (۱)		سه تکرار، حالت (۲)	
سطح	عامل	سطح	عامل
۴	غلظت N.Z.Amine	۴	غلظت N.Z.Amine
۱	غلظت آهن	۲	غلظت آهن
۱	غلظت کلسیم	۱	غلظت کلسیم
۱	غلظت محلول فسفات	۴	غلظت محلول فسفات
۲	محلول فاکتورهای رشد	۲	محلول فاکتورهای رشد
۸۴/۹۹۶		۸۶/۲۴۷	: مقدار بهینه پیش‌بینی شده
۸۴/۹۹۶±۱۳/۷۰۷۳		۸۶/۲۴۷±۱۰/۱۸۴۹	: بازه اطمینان ۹۰٪

آزمایش فلوکولاسیون رامون[۴] اندازه‌گیری و نتایج ثبت گردید. باتوجه به مشکوک بودن نتایج آزمایش‌های چهارمین تکرار، در تحلیل نتایج تنها سه سری از داده‌ها به‌کار رفت.

نتایج

میزان توکسین تولید شده در هر یک از تکرار آزمایش‌ها در جدول ۳ نشان داده شده است.

نتایج حاصل توسط نرم‌افزار Qualitek-4 مورد تحلیل قرار گرفتند. در تحلیل واریانس تکرارهای اول و دوم (دو تکرار) و تحلیل واریانس تکرارهای اول تا سوم (سه تکرار) به دلیل حجیم شدن مجموع مربعات خطا هیچ یک از عوامل مورد بررسی معنی‌دار نشد. و به دلیل این که طرح فقط اثرات اصلی را در نظر می‌گرفت اثرات متقابل بررسی نشد. اما در هر دو حالت شرایط بهینه تعیین گردید و مقدار بهینه تولید پیش‌بینی شد که در جدول ۴ نشان داده شده‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری

تحلیل واریانس‌های انجام شده در هر دو حالت دو و سه تکراری سهم خطا را زیاد نشان دادند. در حالی که با کنترل تمامی شرایط آزمایشگاهی خطایی وجود نداشت فرض در نظر نگرفتن عامل مهمی در اجزاء محیط کشت نیز مردود بود. پس به مطالعه رفتار اثرات متقابل بین عوامل پرداخته شد. اما به دلیل این که طرح در نظر گرفته شده با فرض بی اثر بودن اثرات متقابل، تنها به بررسی اثرات اصلی می‌پردازد و از تعیین اثر هر یک از اثرات متقابل ناتوان است، فقط رفتار اثرات متقابل بررسی شد. اما دلیل این که طرح تنها به تعیین اثرات اصلی می‌پردازد این است که برای در نظر گرفتن اثرات متقابل مرتبه دوم عوامل به آرایه متعامدی با ۶۴ آزمایش یا بیشتر نیاز داشتیم که آزمایش‌های بیشتری را می‌طلبید و از توان اجرایی طرح خارج بود. در مطالعه رفتار اثرات متقابل پیچیدگی‌های زیادی مشاهده شد. در نمودار ۴ به عنوان نمونه‌ای از اثرات متقابل مرتبه دوم، اثر متقابل فاکتورهای رشد و فسفات را مشاهده می‌کنیم.

همانگونه که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، پیچیدگی‌های رفتاری زیادی در سطوح مختلف این دو عامل وجود دارد. برای سایر عوامل نیز این پیچیدگی وجود دارد. از این رو این فرضیه شکل گرفت که اثرات متقابل معنی‌داری در مدل وجود دارد که به دلیل در نظر گرفته نشدن در طرح، باعث افزایش مجموع مربعات خطا شده‌اند. خطای حجیم شده نیز باعث شده تا نسبت واریانس‌ها در آماره فیشر کوچک شود و از معنی‌دار شدن اثرات اصلی جلوگیری کند.

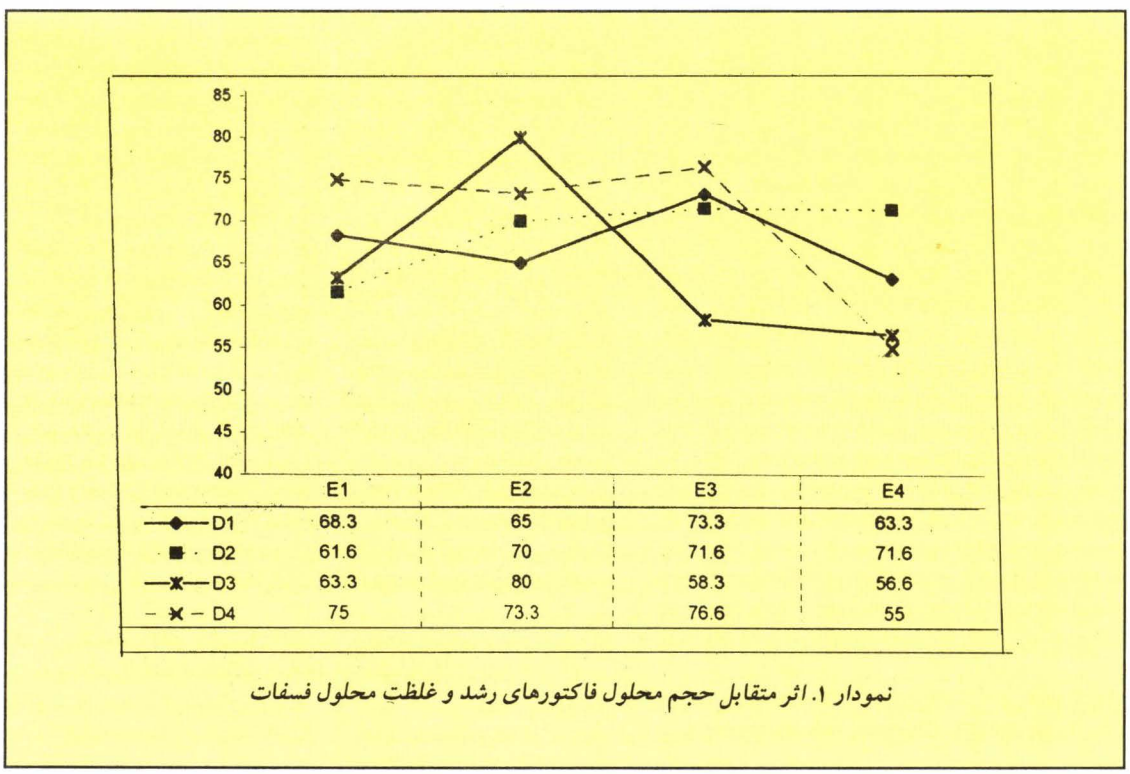
اما نکته قدرت این طرح، به دست آوردن پاسخ‌های بسیار عالی و در حد استانداردهای جهانی تحت هر یک از شرایط بهینه جدول ۴ است. با اجرای تولید انبوه تحت شرایط بهینه به پاسخ‌های ۱۸۰ lf/ml و ۲۰۰lf/ml برای هر حالت رسیده‌ایم که باتوجه به رکوردهای قبلی ۱۲۰ lf/ml، محصول تولیدی را بیش از ۶۰٪ افزایش می‌دهد. تنها تفاوت این دو وضعیت بهینه سرعت رسیدن به پاسخ است یعنی حالت (۱) پس از ۴۰ ساعت به حداکثر مقدار خود می‌رسد و حالت دوم پس از گذشت ۴۴ ساعت به حداکثرمقدار خود می‌رسد. با توجه به اهمیت بهینگی در هزینه مواد مصرفی یا زمان، یکی از دو حالت فوق را می‌توان انتخاب کرد و به کار گرفت.

پاورقی‌ها

1- D.W. Stainer.
2- Fractional factorial design.
3- Orthogonal array.
4- Ramon.

منابع مورد استفاده

1- Elsayed A. & Hisong T.C., 1989. Qualityengineering in production systems. New York: McGraw - Hill Book co.
2- Linggood F.V. & Fenton E.L., 1947. Production of diphtheria toxin by submerged culture in shaking flasks. Brit, J. exptl. Pathol. 28: 354-364.
3- Linggood F.V., Matthews A.C., Pinfield S., Pope C.G., Sharland T.R. Submerged 1954. Culture production of diphtheria toxin. Nature, 174: 557.
4- Mitsuhashi S., Kurokawa M. & Kojima Y., 1949. Studies on the production of the toxin by *Coryneabactrium diphtheria*. I. Conditions for method. Japan. J. Exptl. Med., 20: 261-269.
5- Movahedi A., 1997. Production of diphteria toxin by submerged culture in fermentor. First international congress on Asia pacific association of medical toxicoloxy. Sep.
6- Movahedi A., 1999. Study in presence of bovin sentisizing antigens in diphtheria toxoids. 6th Iranian congress of toxicology & posioning. Nov.
7- Mueller J.H., 1993. A simplified formula for diphtheria toxin broth. J. Immunol., 37: 103-112.
8- Park S.H., 1996. Robust design and analysis for quality. Calendra pron.
9- Ross P.J., 1997. Taguchi techniques for quality engineering. New York: McGraw - Hill Book co.
10- Roy R.K., 1990. A primer on the taguchi method New York: Van Nostrand reinhold.
11- Seamer P.A., 1959. Stimation of microgram quantities of Iron culture medium using bathophenan throline. Nature, 184: 636-637.
12- Stainer D.W., 1967. Preparation and properties of diphtheria toxoids in submerged culture. I. Presence of bovine antigens. Can. J. Microbiol., 13: 963-963.
13- Stainer D.W., 1967. Separation of bovine sensitizing material from papin digest of broth. Can. J. Microbiol., 13: 1001-1008, 1967.
14- Stainer D.W., Corkill J.M.C. & Scholte M.J., 1968. Preparation and properties of diphtheria toxoids in submerged culture. III. Development of a new semisynthetic medium. Can. J. Microbiol., 14: 155-1160.
15- Stainer D.W., Robb L.A., Scholte M.J. 1970. Preparation of a semisynthetic medium. Can. J. Microbiol., 16: 639-648.
16- Stainer D.W. & Scholte M.J. Teh., 1973. production of High potency diphtheria toxin in submerged culture in relatively simple equipment using a semisynthetic medium. Biotechnol. & Bioeng. Symp., 4: 283-293.



نمودار ۱. اثر متقابل حجم محلول فاکتورهای رشد و غلظت محلول فسفات