بررسی فرایند تولید اریترومایسین توسط باکتری ساکارو پلی اسپورا اریترا[1] به روش تخمیر بسته در غلظت‌های مختلف آرد سویا

غزل لبیکی[1]، حسین عطار[2]، جواد حامدی[*3]

۱- تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه مهندسی شیمی

۲- تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، گروه بیوتکنولوژی دارویی

۳- تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی

پیام نگار: **jhamedi@ut.ac.ir**

زمان دریافت: ۱۳۸۸/۶/۲۱

زمان پذیرش: ۱۳۸۹/۳/۲۷

چکیده

اریترومایسین، آنتی بیوتیکی ماکرولیدی است که از طریق تخمیر چند مرحله ای باکتری ساکارو پلی اسپورا اریترا تولید می‌شود. عوامل زیادی بر فرایند تولید اریترومایسین اثر دارند که از جمله آنها می‌توان به نوع و مقدار ترکیبات محیط کشت اشاره کرد که نقش مهمی در رشد و سنتز باکتری، زمان و میزان تولید محصول و هزینه های انجام فرایند تخمیر دارد. در این پژوهش به بررسی فرایند تولید اریترومایسین توسط باکتری فوق به روش تخمیر بسته در محیط‌های حاوی مقادیر مختلف آرد سویا به عنوان یک منبع نیتروژنی ارزان، در دسترس و بومی ایران، پرداخته شده است. در طول فرایند تغییرات ریخت‌شناسی (مورفولوژی) باکتری، pH، زیست توده، اریترومایسین تولید و پارامترهای تخمیر اندازه گیری شده است. میزان اریترومایسین تولید شده به روش طیف نورسنجی (اسپکتروفتومتری) سنجیده شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که غلظتهای مختلف آرد سویا در محیط کشت بر روی pH، زیست توده، اریترومایسین تولیدی و پارامترهای تخمیر تاثیر دارد. غلظت بهینه آرد سویا برای تولید محصول اریترومایسین ۳۰گرم بر لیتر به دست آمده است.

کلمات کلیدی: فرایندهای تخمیری، سیستم ناپیوسته، اریترومایسین، آرد سویا، *ساکارو پلی اسپورا اریترا*

۱- مقدمه

امروزه با ترکیب دانش زیست فناوری با علوم دارویی، شاخه جدیدی از علم به نام زیست فناوری دارویی شکل گرفته که به وسیلهٔ آن می‌توان به تولید داروهای جدید، افزایش عملکرد داروهای قدیمی، بهینه سازی فرایندهای تولید و کاهش قیمت تمام شده داروها، دست یافت. یکی از داروهایی که با استفاده از دانش زیست فناوری تولید و خالص‌سازی می‌شوند، آنتی بیوتیک‌ها هستند. امروزه آنتی بیوتیک‌ها جایگاه بسیار مهمی در پیشگیری و درمان بیماریها و همچنین درعلومی نظیر کشاورزی،گیاه پزشکی، دامپزشکی، صنایع غذایی و... دارند. از لحاظ اقتصادی آنتی بیوتیک ها مهمترین فراوردهٔ دنیای میکروبها هستند و به طوری که پیش‌بینی شده است مصرف

1. *Saccharopolyspora erythraea*

آنها در جهان تا سال ۲۰۱۰ میلادی بازار ۴۰ میلیارد دلاری خواهد داشت[۵]. در ایران نیز ۵ داروی اول پر مصرف کشور آنتی بیوتیک‌ها هستند و تنها در سال ۱۳۸۵، درایران ۱۵۰ میلیارد تومان آنتی بیوتیک مصرف شده است [۱]. از این رو مطالعات مربوط به آنتی بیوتیک‌ها، بررسی و بهینه سازی فرایندهای تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و مشخص کردن نقش عوامل موثر بر تولید آنها می‌تواند منجر به افزایش بازدهی محصول، اقتصادی‌تر کردن فرایند و در نهایت کاهش وابستگی به سایر کشورها و رسیدن به خودکفایی در این زمینه گردد. امروزه آنتی بیوتیک‌ها از روش تخمیر ایجاد می‌شوند. عوامل متعددی وجود دارند که بر یک فرایند تخمیری اثر می‌گذارد، در همین رابطه تا کنون پژوهش‌های زیادی انجام گرفته است، نظیر بررسی ارتباط ریخت‌شناسی و رئولوژی محیط کشت تولید اریترومایسین توسط باکتری *ساکارو پلی اسپورا اریترا*[۲]، بررسی اثر اسیدهای چرب در رشد این باکتری و تولید اریترومایسین [۴]، بررسی اثر روغنهای مختلف در رشد باکتری *ساکارا پلی اسپورا اریترا* و تولید اریترومایسین [۷و۶]، بررسی استفاده از آلژینات در محیط‌های کشت تولید اریترومایسین [۸]، اثر ترکیبات محیط کشت تولید بذر در رشد باکتری *ساکارا پلی اسپورا اریترا* و تولید اریترومایسین [۹]، بررسی اثر شرایط محیط کشت نظیر اکسیژن محلول [1] در تولید اریترومایسین به صورت تخمیر بسته[۱۰]، بررسی اثر تنش برشی بر ریخت‌شناسی و رئولوژی محیط کشت تولید اریترومایسین[۱۱]، بررسی اثر روغن کلزا در رشد باکتری *ساکارا پلی اسپورا اریترا* و تولید اریترومایسین [۱۲] . در این پژوهش اثر غلظتهای مختلف آرد سویا به عنوان منبع نیتروژنی محیط کشت تخمیر در رشد باکتری مولد اریترومایسین و تولید محصول بررسی شده و غلظت بهینه این آرد در محیط کشت تخمیر به دست آمده است.

۲- مواد و روشها

۲-۱ باکتری

در این پژوهش برای تولید اریترومایسین از باکتری رشته ای *ساکارا پلی اسپورا اریترا* به شماره ۱۶۸۵[2] که به صورت آمپول لیوفیلیزه از پژوهشکده بیوتکنولوژی، مرکز کلکسیون قارچها و باکتری‌های صنعتی و عفونی ایران خریداری گردیده، استفاده شده است.

۲-۲ محیط کشت اسپورزایی

برای تهیه اسپور باکتری، از محیط محلول خیساندهٔ ذرت به همراه آگار استفاده شده است [۷و۶] ترکیبات محیط کشت فوق به صورت زیر است:

{ پودر شیرابه ذرت [3] (۱۰(g/L)، نشاسته[4] (مرک[5] خالص) (۱۰(g/L)، کربنات کلسیم (مرک ۹۸/۵٪) (۲/۵(g/L)، دی آمونیوم سولفات (مرک ۹۹٪) (۳(g/L)، کلرید سدیم (مرک ۹۹/۵٪) (۳(g/L)، آگار (۲۰(g/L)، محلول میکروالمنت (mL) ۱ (ساخته شده از نمک‌های منیزیم، آهن، روی، مس، کبالت و اسید کلریدریک ۳۷٪) }. pH محیط به وسیلهٔ سود بر روی ۷ تنظیم گردیده و به منظور تشکیل اسپور کافی، محیط به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوباسیون شده است[۶] .

۲-۳ محیط پیش کشت (بذردهی)

برای جوانه زدن اسپورها از محیط بذردهی[6] با ترکیبات زیر استفاده شده است: { آرد سویا (۳۰(g/L)، گلوکز (۱۰(g/L)، گلیسرول (مرک ۸۷٪) (۱۰(g/L)، دی آمونیوم سولفات (مرک ۹۹٪) (۱(g/L)، هیدروژن فسفات دی آمونیوم (۱(g/L)، کربنات کلسیم (مرک ۹۸/۵٪) (۵(g/L)}. pH محیط به وسیلهٔ سود بر روی ۷ تنظیم گردیده و سپس به اندازه ۱٪ حجم ارلن‌های بذردهی، از سوسپانسیون اسپوری به محیط تلقیح شده و ارلن‌ها به مدت ۴۰ الی ۴۴ ساعت در همزن انکوباتور ۲۰۰ دور در دقیقه[7] و دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شده‌اند [۷ و ۶]. پس از گذشت زمان فوق و بررسی محیط ها از نظر پارامترهایی نظیر عدم آلودگی میکروبی، شکل رشد باکتری، pH محیط، وزن تر زیست توده، بهترین ارلن به عنوان مایه تلقیح مناسب انتخاب شده است.

1. DOT
2. *Saccharopolyspora drythraea* PTCC 1685

3. Corn Steep Liqour
4. Starch
5. Merck
6. Seeding
7. RPM

۲-۴ محیط کشت تخمیر

در این مرحله برای تخمیر و تولید محصول اریترومایسین از محیط کشت با این ترکیبات استفاده شده است: {(دکسترین (مرک ۹۹٪)، سولفات دی آمونیوم (مرک ۹۹٪)، هیدروژن فسفات دی آمونیوم ، کربنات کلسیم (مرک ۹۸/۵٪) }. pH محیط با سود و یا اسید کلریدریک بر روی ۶/۸ تنظیم شد. ترکیبات این محیط به گونه ای هستند که بیشتر موجب تولید آنتی بیوتیک اریترومایسین می‌شوند. این محیط با افزودن غلظتهای مختلف (۱۰ تا ۶۰(g/L)) آرد سویا تکمیل شده است[1]. از مایه تلقیح به میزان لازم به فلاسکهای تخمیر تلقیح شد و سپس فلاسکها به مدت ۱۱ روز در همزن انکوباتور ۳۳ درجه سلسیوس و ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شده اند. تعداد پیمانه‌های انجام شده در این مرحله ۱۰ و هر پیمانه شامل ۶ فلاسک بوده است.

۲-۵ سنجش pH

برای سنجشpH محیط های کشت ، از دستگاه pH متر رومیزی[2] استفاده شده است.

۲-۶ سنجش زیست توده

برای تعیین وزن تر سلولی، از میکروتیوب های ۱ میلی لیتری استفاده شده است.. به این ترتیب که ابتدا وزن میکروتیوب خالی و سپس وزن همان میکروتیوب که حاوی (ml)۱از نمونهٔ گرفته شده از محیط است تعیین گردید. به این ترتیب وزن (ml) ۱نمونه محیط مشخص گشته است. سپس میکروتیوب حاوی محیط به مدت ۲۰ دقیقه و سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه در سانتریفیوژ[3] قرار داده شده تا زیست توده تشکیل شده از مایع به صورت یک فاز جدا رسوب کند. سپس فاز رویی دور ریخته شده و میکروتیوب دوباره وزن شد تا وزن رسوب به دست آید.

به این صورت با توجه به فرمول زیر درصد زیست توده محاسبه شده است:

(۱) ٪ زیست توده = (وزن رسوب / وزن محیط) × ۱۰۰

۲-۷ سنجش اریترومایسین تولید شده

اریترومایسین تولید شده توسط کلروفرم از مایع تخمیری استخراج شد، سپس با برموفنول بلو ترکیب می‌شود و کمپلکس رنگی تشکیل می‌دهد. جذب کمپلکس رنگی اریترومایسین-برموفنول بلو در هر کدام از فلاسکهای تخمیر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۴۱۵ نانومتر به دست آمد و سپس بر اساس مقایسه آن با منحنی اریترومایسین استاندارد به دست آمده از غلظتهای مختلف، غلظت اریترومایسین در نمونه های تخمیری محاسبه گردید.

۲- ۸ آنالیز داده‌های تخمیر

برای آنالیز داده‌های تخمیر، در طول فرایند برای هر کدام از فلاسکهای موجود تغییرات ریخت‌شناسی باکتری، pH، زیست توده و برخی پارامترهای تخمیر نظیر شدت تولید اریترومایسین (r_{ery})، شدت ویژه رشد (μ)، شدت ویژه تولید اریترومایسین(q_{ery})، بازدهی تولید اریترومایسین نسبت به زیست توده ($Y_{ery/bio}$) اندازه‌گیری و با استفاده از معادلات زیر (مدل پرت[4] ۱۹۷۵) محاسبه شد.

$$Y_{ery/bio} = \frac{dp}{dx} \qquad (۲)$$

$$q_{ery} = \frac{r_{ery}}{\overline{x}} \qquad (۳)$$

$$\mu = \frac{dx/dt}{\overline{x}} = \frac{r_x}{\overline{x}} \qquad (۴)$$

$$r_{ery} = \frac{dp}{dt} \qquad (۵)$$

۱. محیط شاهد حاوی ۳۵ گرم بر لیتر آرد سویا می‌باشد.

2. pH 827MetrohmLab

3. Hettich (مدل)

4. Pirt

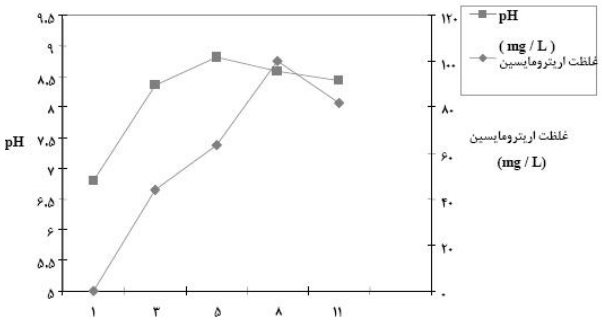
۳ - نتایج و بحث

جدول ۱- آنالیز ترکیبی آرد سویای افزوده شده به محیط کشت تخمیر استفاده شده در این پژوهش

نوع ماده	آرد سویا (مقدار به درصد)
روغن	۰/۸
پروتئین	۴۲/۷
رطوبت	۱۰
فیبر	۵/۱۰

۳-۱ بررسی محیط کشت تخمیر شاهد (کنترل)

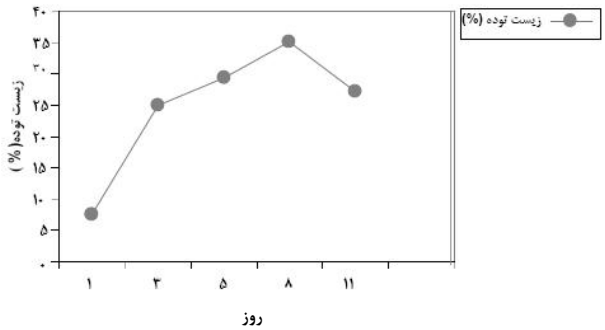
طی فرایند تخمیر باکتری *ساکارو پلی اسپورا اریترا* در محیط شاهد، ویژگی هایی نظیر ریخت‌شناسی باکتری، pH محیط، درصد زیست توده تولید شده و غلظت محصول نهایی (اریترومایسین) به عنوان مبنای مقایسه به دست آمده است.



شکل ۱- تغییرات pH و میزان اریترومایسین تولید شده در طول فرایند در محیط شاهد (کنترل)

غلظت اریترومایسین تولید شده از ابتدای فرایند تا روز هشتم روند صعودی داشته و پس از آن کاهش یافته است. درصد زیست توده محیط شاهد نیز در روز هشتم فرایند به بیشترین مقدار خود رسیده است.

ساکارو پلی اسپورا اریترا که یک اکتینومایست است به صورت رشته‌ای رشد می‌کند. رشد معمولاً از جوانه زدن یک اسپور شروع می‌شود، جوانه به واسطهٔ شاخه دار شدن به شکل میسلیوم تغییر شکل می‌یابد. با توجه به شکل (۳)، در روز سوم فرایند، اسپورها در حال جوانه زدن و تکثیر هستند و در محیط تعدادی هیف کوتاه نیز دیده می‌شود. در روز پنجم، میسلیوم‌ها رشد کرده و انشعاب پیدا کرده‌اند. در روز هشتم رشد میسلیوم‌ها کامل می‌شود و همهٔ آنها طول بلندی دارند و در روز انتهایی فرایند، تمامی آنها تجزیه و قطعه قطعه شده و طول اندکی دارند.

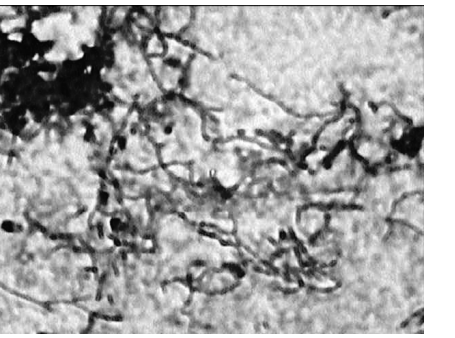


شکل ۲- تغییرات درصد زیست توده تولید شده در طول فرایند در محیط شاهد (کنترل)
(منحنی رشد باکتری *ساکارو پلی اسپورا اریترا*)

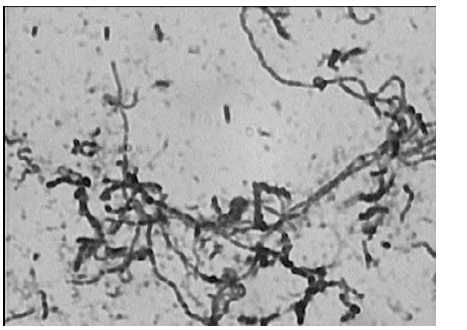
با توجه به شکل (۳- ج) در روز هشتم میسلیوم ها به بلندترین طول خود در طول فرایند رسیده‌اند و در نتیجه درصد زیست توده تولیدی در این روز بیشتر از روزهای دیگر فرایند بوده است. همچنین بیشترین تولید محصول اریترومایسین در روز هشتم فرایند حاصل شده است. یعنی در محیط کشت شاهد، رشد باکتری مورد نظر و تولید اریترومایسین با یکدیگر همراه بوده و همزمانی داشته‌اند. همزمانی یا عدم همزمانی تولید اریترومایسین و افزایش غلظت زیست توده، تابع شرایط تخمیر و همچنین ترکیبات محیط کشت است. میسلیوم های کوتاه محصول کمتر و میسلیوم‌های بلند محصول بیشتری تولید کرده اند.

۳-۲ بررسی محیط های حاوی غلظتهای مختلف آرد سویا

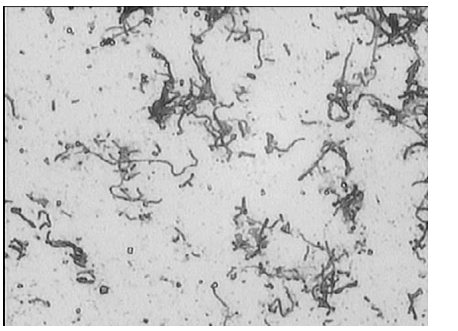
با توجه به اینکه بیشترین محصول در روز هشتم فرایند به دست آمده است، نمونه‌گیری‌های این مرحله در روزهای اول، هشتم و یازدهم صورت گرفته است.



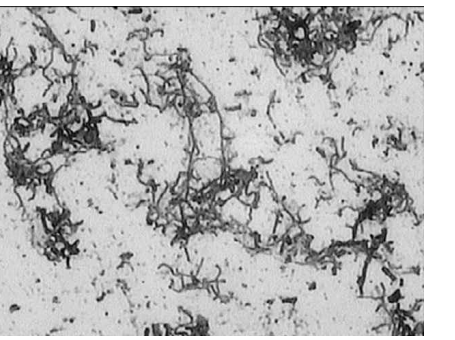
(الف)



(ب)



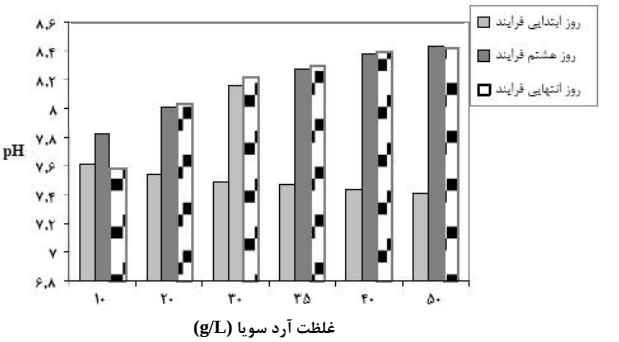
(ج)



(د)

شکل ۳ – ریخت‌شناسی باکتری *ساکارو پلی اسپورا اریترا* در محیط کشت شاهد

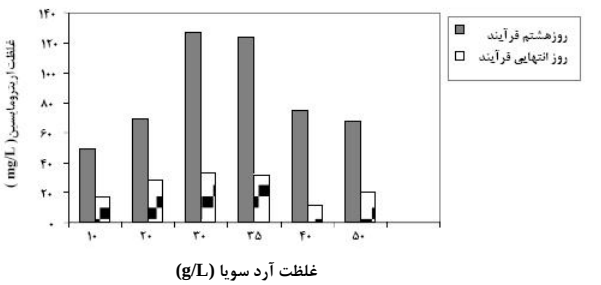
(الف – روز سوم فرایند، ب – روز پنجم فرایند، ج – روز هشتم فرایند، د- روز یازدهم فرایند)



شکل ۴ – اثر غلظتهای مختلف آرد سویا بر pH محیط کشت تخمیر تولید اریترومایسین

در روز هشتم فرایند، pH تمام نمونه ها افـزایش پیـدا کـرده اسـت. علت افزایش pH محیط در روز هشتم نسبت به روز اول، اتمام منابع کربنی محیط و تولید یک‌سری ترکیبات قلیایی اسـت کـه از تجمـع متابولیت‌های حاصل از مصرف آرد سویا و آمونیوم در محـیط ایجـاد شده است. در این پژوهش از کربنات کلسیم در محیط کشت تخمیر استفاده شده است. این ماده علاوه بر تامین نیاز کلسیم مـورد نظـر، به صورت یک بافر عمل می‌کند و متابولیت‌هـای اسـیدی حاصـل از تجزیه کربوهیدراتها را خنثی می‌نماید و به این ترتیب مانع اسـیدی شدن محیط به دلیل رشد باکتری می‌شود.

نوع و مقدار ترکیبات محیط کـشت، نقـش مهمـی در سـرعت رشـد باکتری و قابلیـت تولیـد متابولیـت‌هـای ثـانوی نظیـر تولیـد آنتـی بیوتیک‌ها دارند. استفاده از غلظتهای مختلف آرد سویا باعـث تولیـد مقادیر متفاوتی از محصول اریترومایسین در مقایسه با محیط شـاهد شده است. با توجه به شکل (۵)، محیط دارای ۳۰ گـرم در لیتـر آرد سویا، بیشترین مقدار محصول اریترومایسین را تولید کرده است. بـه این ترتیب غلظت بهینهٔ آرد سویا ۳۰ گرم در لیتر بدست آمده است.



شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف آرد سویا بر میزان تولید اریترومایسین

۳-۳ بررسی محیط کشت تخمیر حاوی غلظت بهینه آرد سویا

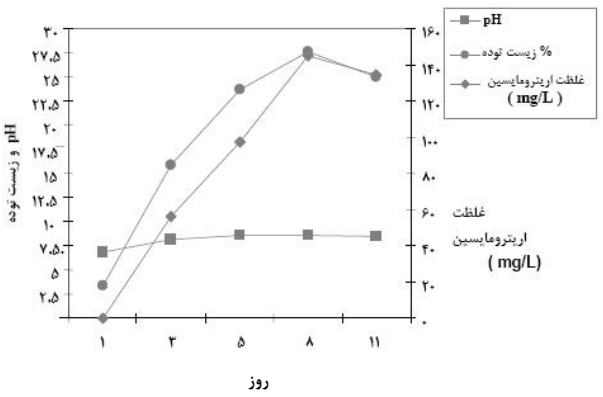
با توجه به شکل (۶)، بیشترین میزان رشد باکتری، تولید زیست توده و محصول نهایی اریترومایسین به طور همزمان در روز هشتم فرایند انجام شده و سپس روند نزولی پیدا کرده است.

۳-۴ پارامترهای تخمیر

برای محیط های حاوی غلظتهای بهینه آرد سویا ((۳۰(g/L)) و محیط شاهد، پارامترهای تخمیر محاسبه شده‌اند.

جدول ۲ - پارامترهای تخمیر آنتی بیوتیک اریترومایسین در محیط کشت شاهد و محیط دارای آرد سویا با غلظت بهینه ۳۰ گرم در لیتر

محیط	μ	r_x	r_{ery}	q_{ery}	$Y_{ery/bio}$
سویا ((g/l)۳۰)	۰/۲۱	۳/۴۶	۰/۰۲۰	۰/۰۷۶	۰/۵۲
شاهد ((g/l) ۳۵)	۰/۱۹	۳/۹۴	۰/۰۱۴	۰/۰۳۹	۰/۳۶



شکل ۶ - تغییرات pH، درصد زیست توده و میزان اریترومایسین تولید شده در طول فرایند در محیط حاوی غلظت بهینهٔ آرد سویا

۴- نتیجه گیری

استفاده از مقادیر مختلف سوبستراهای مغذی در محیط‌های کشت بر سرعت رشد سویه، تولید محصول و پارامترهای تخمیر موثر است و از این طریق می‌توان شرایط تولید را بهینه کرد. در این پژوهش پس از بررسی اثر غلظت‌های مختلف سوبسترای نیتروژنی (آرد سویا) در محیط کشت تولید آنتی بیوتیک و تعیین بهترین و موثرترین غلظت سوبسترا، محیط کشت تخمیر با افزودن ۳۰ گرم در لیتر آرد سویا بهینه سازی شد. لازم به ذکر است که تفاوت میزان بهینه با مقدار مورد استفادهٔ متداول ۵ گرم در هر لیتر خوراک می‌باشد که در شرایط تولید صنعتی بسیار حائز اهمیت است و منجر به کاهش هزینه قابل توجهی می‌شود. در این شرایط، بازدهی از ۰/۳۶ محیط شاهد به ۰/۵۲ و میزان شدت رشد ویژه سویه از ۰/۱۹ شاهد به ۰/۲۱ افزایش پیدا کرد. از طرفی در صورت استفاده از آرد کنجاله سویا، بین تولید محصول و رشد رشته ای سویه مورد نظر، همزمانی برقرار شده و این باعث می‌شود تا محصول بیشینه در روز هشتم فرایند حاصل شود که این خود باعث کوتاه شدن مدت فرایند و در نتیجه کم شدن هزینه های تولید می‌گردد. همچنین در انتهای هر فرایند تولید آنتی بیوتیک، بایستی زیست توده از محصول جدا و در موقع تصفیه پساب حذف شود و در صورت استفاده از آرد کنجاله سویا، عملیات جداسازی و خالص سازی آسان‌تر و با هزینه کمتر (نسبت به استفاده از منابع مرسوم فعلی نظیر روغن‌ها) انجام می‌گیرد.

بطور کلی استفاده از آرد سویا، علاوه بر نکات مثبتی که عنوان شد و با توجه به قیمت بالا و ارزش افزوده بالای محصول (اریترومایسین) در مقایسه با مواد اولیه و همچنین با توجه به افزایش بهره‌وری تولید، مناسب و اقتصادی بوده و می‌تواند جایگزین مناسبی برای مقادیر و محیط های مرسوم پیشین گردد.

مراجع

[۱] دیناروند ر.، روزنامه ایران، شماره ۳۶۲۰، (۱۳۸۶).

[۲] قجاوند ح.، "بررسی ارتباط مورفولوژی، رئولوژی و تولید اریترومایسین با استفاده از باکتری ساکارو پلی اسپورا اریترا"، پایان نامه کارشناسی ارشد ، دانشگاه صنعتی امیر کبیر، دانشکده مهندسی شیمی ، تهران، ۳۰-۲، (۱۳۸۲).

[۳] کروگر و.، ترجمه مرتضوی ع.و همکاران ، "بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی صنعتی"، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۸-۴۶۸، (۱۳۸۱).

[۴] مخدومی ع.، "بررسی اثر اسیدهای چرب در رشد ساکاروپلی اسپورا اریترا و تولید اریترومایسین"، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، دانشکده علوم، تهران، ایران، (۱۳۸۴).

[5] Deutsche, "Global pharmaceutrical drug compendium "Bank Global, pharmaceutical report, (2001).

[6] J.Hamedi et al, "Imoroved production of erythromycin by *Saccharopolyspora erythraea* by various plant oils", Biotechnology letters, 24, 697-700, (2002).

[7] J.Hamedi et al, "Enhancing of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* with common and uncommon oils", Microbial biotechnol, 31, 447- 456, (2004).

[8] J.Hamedi et al, "Increased erythromycin Production by alginate as a medium ingredient or immobolization support in cultures of *Saccharopolyspora erythraea*", Biotechnology letters, 27, 661-664, (2005).

[9] J.Hamedi et al," Enhancement in production of erythromycin by *Saccharopolyspora erythraea* by the use of suitable industrial seeding-media " Daru, 16, (2008).

[10] M.Heydarian et al, "The Effect of Culture Condition on the Production of Erythromycin by *Saccharopolyspora erythraea* in BatchCulture", Biotechnology Letters, 13, No 10, 1181-1186, (1996).

[11] M.Heydarian et al, "The Influence of Agitation on Morphology, Rheology and Erythromycin Production in *Saccharopolyspora erythraea* Culture", Dept of Biochemical Engineering, university of London,UK, (1996).

[12] N.Mirjalili et all, "The Effect of Rapesdee Oil Uptake on the Production of Erythromycin and Triketide Lacton by *Saccharopolyspora erythraea*", Biotechnol.Prog, 911-918, (1999).