

تأثیر مورفولوژی بر روی رئولوژی و تولید اریترومايسين در تخميرهای *Saccharopolyspora erythraea*

حسين قجاوند ، بابک بنکدارپور* ، سيد محمد حیدريان ، جواد حامدی

دانشگاه صنعتی امیرکبیر ، دانشکده مهندسی شیمی ، گروه صنایع غذایی و بیوتکنولوژی

* babakb@cic.aut.ac.ir

چکیده

در این تحقیق برای تولید آنتی‌بیوتیک اریترومايسين از باکتری رشته ای *S.erythraea* استفاده شده و مورفولوژی میسلیمی و خواص رئولوژیکی مایعات تخمیری *S.erythraea* و تولید اریترومايسين در کشتهای شیک فلاسک بررسی شده است. برای بدست آوردن مورفولوژیهای مختلف از غلظتهای مختلف مایه تلقیح (10^3 - 10^7 spore/ml) استفاده شده است. مورفولوژیهای مختلف *S.erythraea*، شامل پلت، کلامپ و میسلیوم پراکنده آزاد با استفاده یک روش آنالیز تصویری بطور کمی اندازه گیری شده اند. ارتباط بین مورفولوژی و رئولوژی کشتهای *S.erythraea* در غلظتهای بالاتر از 10^5 spore/ml که مورفولوژی بیشتر به شکل کلامپی بود توسط رابطه $\left(\frac{K}{DCW}\right) \alpha OL^{3.4}$ و در غلظتهای مایه تلقیح کمتر از 10^5 spore/ml که مورفولوژی بیشتر به شکل پلتی بود با رابطه $\left(\frac{\mu}{DCW}\right) \alpha d_p^{-0.183}$ بیان شده است. میزان تولید اریترومايسين در این غلظتهای مختلف مایه تلقیح و در زمانهای مختلف تخمیر اندازه گیری شده و با بررسی تغییرات میزان تولید ویژه اریترومايسين (تولید اریترومايسين بر واحد وزن خشک بیومس) مشخص شد که غلظت 10^6 spore/ml به بالا نسبت به بقیه غلظتهای مایه تلقیح بررسی شده، اریترومايسين بیشتری تولید کرده است و بنابراین مورفولوژی میسلیمی و کلامپی برای تولید اریترومايسين از مورفولوژی پلتی بهتر می باشند.

واژه های کلیدی: رئولوژی؛ مورفولوژی؛ اریترومايسين؛ *S.erythraea*؛ میکروارگانيسم های رشته ای

رشته ای تنها (شکل پراکنده: نوعا شاخه دار، با شاخه های بالاتر از طول چند صد میکرون و قطر $0.5-10 \mu m$) و کلنی های کروی بزرگ یعنی پلتها (از $100 \mu m$ تا چندین سانتیمتر) [۳]. علاوه بر این دو نوع، یک حالت مورفولوژی دیگر یعنی شکل رشد کلامپی که حاصل از پیچیده و درهم شدن میسلیمهای پراکنده است نیز در خیلی از تخمیرهای میکروارگانيسم های رشته ای مشاهده شده است [۴].

مقدمه

تخمیرهای صنعتی زیادی وجود دارد که از میکروارگانيسم های رشته ای مانند قارچها و استرپتومايستها برای تولید متابولیت های ثانویه بخصوص آنتی‌بیوتیکها استفاده می شود [۲۱]. میکروارگانيسم های رشته ای که در این تخمیرها استفاده می شوند بر حسب شرایط مختلف کشت، دو حالت حدی مورفولوژی را از خود ارائه می دهند که عبارتند از: میسلیمهای

شکل رشد میکروارگانیسمهای رشته‌ای و غلظت بیومس تاثیر مهمی روی خواص رئولوژیکی مایعات تخمیری و در نتیجه مفاهیم انتقال داخل بیوراکتورها دارد. بنابراین بهره وری این تخمیرها نه تنها به غلظت بیومس، بلکه به مورفولوژی میسلیمها نیز وابسته است [۵].

در تخمیرهای صنعتی شکل رشد پراکنده معمولا غالب است مایعات تخمیری محتوی این شکل رشد، همانطور که تخمیر پیشرفت می‌کند و بیومس افزایش پیدا می‌کند، غیر نیوتنی می‌شوند که این باعث مشکلاتی برای اختلاط مایه تخمیری در ظرف می‌گردد و در نتیجه اختلاط آنها تنها فقط در ناحیه همزن (یک ناحیه با پراکندگی انرژی بالا و ویسکوزیته ظاهری پایین تر) به خوبی انجام می‌شود به همین دلیل نزدیک دیواره ظرف که اختلاط به خوبی انجام نمی‌شود کمبود اکسیژن وجود دارد و میسلیمهای این ناحیه در نتیجه فقر اکسیژن می‌میرند و در نتیجه ضمن اینکه یک حجمی از بیومس داخل فرمانتور از دست می‌رود یک حجمی از فضای فرمانتور نیز بدون استفاده باقی می‌ماند [۳]. ویسکوزیته بالا و رفتار غیر نیوتنی همچنین منجر به انتقال حرارت ضعیف می‌شود. انتقال حرارت و اکسیژن ممکن است با افزایش سرعت همزن و مصرف توان بهبود پیدا کنند ولی این نیز منجر به آسیب زدن به هیفها هنگامی که آنها سرتاسر ناحیه پراکندگی انرژی بالا، نزدیک همزن گردش می‌کنند می‌گردد [۳]. این مشکلات هنگامی که مورفولوژیهای پلتی در تخمیرها بکار گرفته شده باشند کمتر است. رشد به شکل پلتی منجر به پایین آمدن ویسکوزیته می‌شود و ضریب حجمی کلی انتقال اکسیژن (k_{La}) را در مقایسه با رشد رشته‌ای افزایش می‌دهد [۶]. ولی به هر حال با رشد پلتها و بزرگ شدن آنها به علت محدودیتهای انتقال جرم و مواد مغذی به داخل پلتها، داخل پلتها و در نتیجه یک مقدار زیادی از بیومس در فرمانتور گرسنه مانده و لیز می‌شود و در نتیجه دوباره بهره‌وری تحت تاثیر قرار می‌گیرد [۳]. بنابراین واضحا مورفولوژی میکروارگانیسمهای رشته‌ای و تاثیر آنها روی شرایط داخل

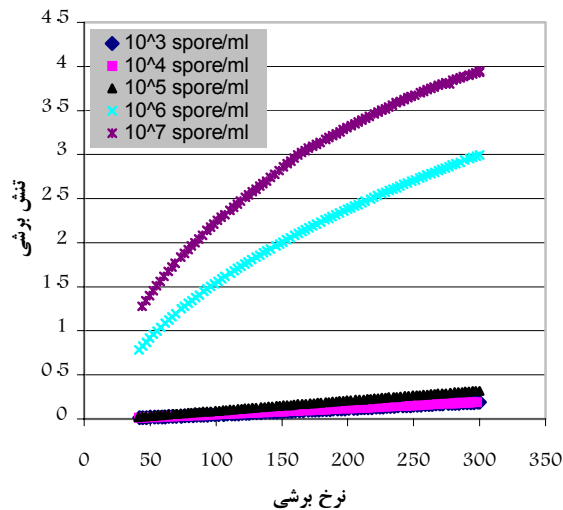
فرمانتور یک موضوع قابل توجه برای صنایع تخمیری است. علی‌رغم اهمیت موضوع، در بدست آوردن روابط مفید بین خواص رئولوژیکی مایعات تخمیری میسلیومی و مورفولوژی و غلظت بیومس پیشرفتهای کمی حاصل شده است که این به خاطر روشهای نامناسب مشخص کردن مورفولوژی بوده است [۳]. اخیرا روشهای آنالیز تصویری با اندازه‌گیری سریع و اتوماتیک پارامترهای مورفولوژیکی توسعه داده شده‌اند [۷].

هدف از این تحقیق بررسی رئولوژی مایعات تخمیری *S. erythraea* با مورفولوژیهای مختلف در زمانهای مختلف کشت و بدست آوردن روابطی مفید بین آنها جهت پیش‌بینی رفتار مایع تخمیری داخل فرمانتور در طی تخمیر و همچنین تاثیر این پارامترها روی تولید آنتی‌بیوتیک اریترومايسین می‌باشد.

مواد و روشها

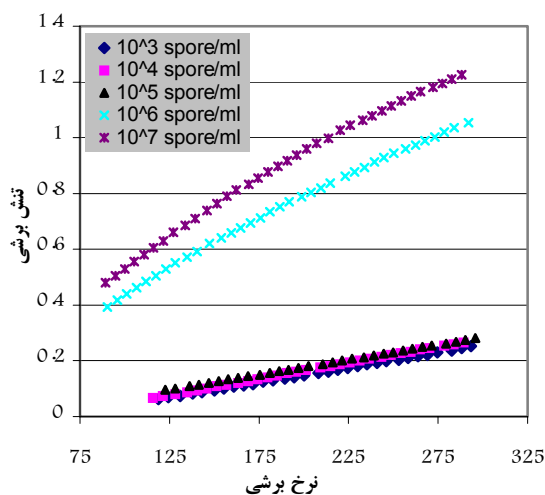
باکتری مورد استفاده در این کار *Saccharopolyspora erythraea* NUR001 از شرکت تولید آنتی‌بیوتیک شفای ساری تهران، تهیه شده بود. *S. erythraea* روی اسلنتهای آگار محتوی ۱۰ گرم مایع خیسانده ذرت، ۱۰ گرم نشاسته، ۲/۵ گرم $CaCO_3$ ، ۳ گرم $(NH_4)_2SO_4$ ، ۳ گرم NaCl، ۲۰ گرم آگار، ۲ میلی‌لیتر محلول میکروالمنت، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در $pH = 7 \pm 0.1$ جهت اسپورزایی به مدت ۱۰ الی ۱۳ روز در دمای $30^{\circ}C$ گرمخانه‌گذاری شد. محلول میکروالمنت از ۱۰۰ گرم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۲ گرم $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۲ گرم $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۰/۴ گرم $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ، ۰/۱ گرم $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ، ۱ میلی‌لیتر ۳۷٪ HCl و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تشکیل شده بود. کشت *S. erythraea* جهت تولید اریترومايسین در محیط کشت شامل ۳۰ گرم گلوکز، ۶ گرم عصاره مخمر، ۴ گرم پپتون، ۲ گرم گلايسین، ۰/۵ گرم $MgSO_4 \cdot H_2O$ و ۰/۶۸ گرم KH_2PO_4 و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر در $pH = 7 \pm 0.1$ در فلاسکهای ۲۵۰ میلی‌لیتری در

و مورفولوژی غالب در این غلظتهای مایه تلقیح نیز بیشتر به شکل پلتی می‌باشد [۹].



شکل ۱-رئولوژی محیطهای کشت با غلظتهای مختلف مایه تلقیح بعد از گذشت ۵ روز تخمیر

شکل (۲) منحنی‌های نرخ برشی - تنش برشی مایعات تخمیری کشتهای *S. erythraea* در روز هشتم تخمیر برای همین غلظتهای مختلف مایه تلقیح اسپوری را نشان می‌دهد.



شکل ۲-رئولوژی محیطهای کشت با غلظتهای مختلف مایه تلقیح بعد از گذشت ۸ روز تخمیر

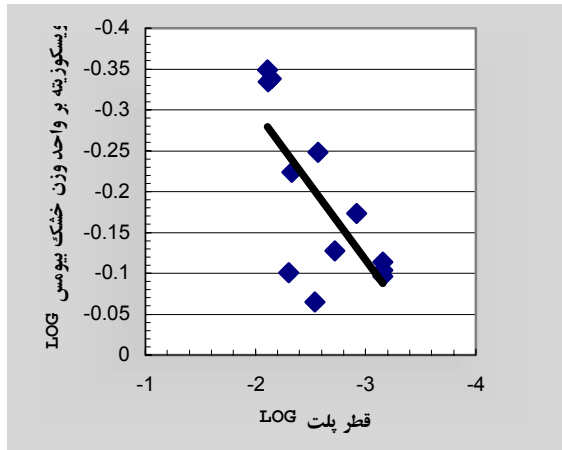
دمای 30°C روی یک شیکر چرخشی در 200 دور بر دقیقه انجام شد. نمکها، گلوکز و محلول میکروالمنت بطور جداگانه استریل شده و سپس اضافه گردیدند. برای شمارش تعداد اسپورها از دو روش، روش مستقیم (شمارش اسپورها با استفاده از لام نئوبار) و روش غیر مستقیم (شمارش کلونی‌ها بعد از کشت سوسپانسیون اسپوری روی پلیتهای آگار)، استفاده شده است. جهت تعیین وزن خشک بیومس، 5 میلی‌لیتر از هر نمونه مایع تخمیری از فیلترهای با غشاء 0.45 میکرون (میلی‌پور)، که از قبل در آون خشک شده بود، گذرانده شد و سپس فیلتر بعد از شستشو با 10 میلی‌لیتر آب مقطر، به مدت 24 ساعت در آون با دمای 100°C خشک گردید و نهایتاً وزن آن بعد از خنک شدن در دسیکاتور، اندازه‌گیری گردید. اندازه‌گیری پارامترهای مورفولوژیکی با استفاده از یک روش آنالیز تصویری انجام شد. جهت اندازه‌گیری خواص رئولوژیکی از دستگاه ویسکومتر Haake مدل CV100 و حسگر نوع استوانه‌های هم مرکز با مشخصه ZB15 استفاده گردید. برای سنجش غلظت اریترومايسين در نمونه‌های تخمیری از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد [۸].

نتایج و بحث

شکل (۱) منحنی‌های نرخ برشی - تنش برشی مایعات تخمیری کشتهای *S. erythraea* در روز پنجم تخمیر برای غلظتهای مختلف مایه تلقیح اسپوری را نشان می‌دهد. همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود منحنی نرخ برشی - تنش برشی برای مایعات تخمیری با غلظت مایه‌تلقیح 10^6 spore/ml و 10^7 spore/ml به شکل سودوپلاستیک شده است. اندازه‌گیریهای مورفولوژی نشان داد که مورفولوژی این مایعات بیشتر به شکل کلامپی و میسلومی است [۹].

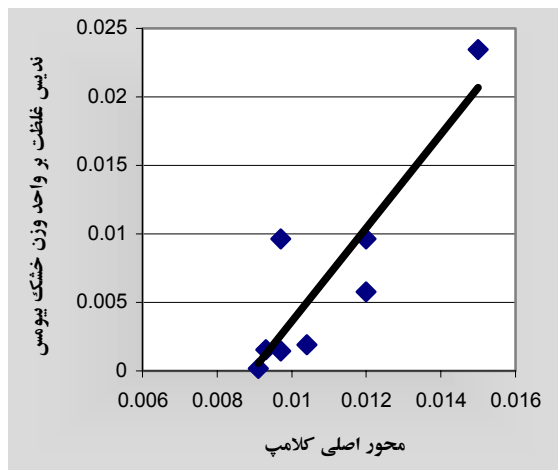
همچنین این منحنی‌ها برای مایعات تخمیری با غلظت مایه تلقیح 10^3 - 10^5 spore/ml به شکل منحنی نیوتنی شده است

همانطور که این مدل نشان می‌دهد ویسکوزیته با قطر پلت نسبت معکوس دارد و با خرد شدن پلتها و تبدیل آنها به پلت‌های کوچکتر، ویسکوزیته مایه تخمیری افزایش می‌یابد.



شکل ۳- تغییرات ویسکوزیته بر واحد وزن خشک بیومس با قطر پلت

در مایعات تخمیری با غلظت مایه تلقیح 10^6 spore/ml و 10^7 spore/ml نیز برای ارائه مدلی که رابطه بین رئولوژی مایه تخمیری و مورفولوژی کلامپی را نشان دهد تغییرات اندیس غلظت بر واحد وزن خشک بیومس با محور اصلی کلامپ در شکل (۴) رسم شده است.



شکل ۴- تغییرات اندیس غلظت بر واحد وزن خشک بیومس با محور اصلی کلامپ

همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود منحنی نرخ برشی - تنش برشی برای مایعات تخمیری با غلظت مایه تلقیح 10^6 spore/ml و 10^7 spore/ml به شکل سودوپلاستیک است ولی نسبت به روز پنجم تخمیر انحای منحنی کمتر شده و کم کم به حالت نیوتنی نزدیک می‌شود و این به خاطر لیز شدن میسلومها و کلامپها که مورفولوژی غالب هستند در روزهای انتهایی تخمیر است و برای مایعات تخمیری با غلظت مایه تلقیح 10^3 - 10^5 spore/ml منحنی‌های نرخ برشی - تنش برشی به شکل منحنی نیوتنی ولی با شیب بالاتر نسبت به روز پنجم شده است و این به علت افزایش وزن خشک پلتها که مورفولوژی غالب هستند و همچنین خرد شدن آنها در روزهای انتهایی تخمیر و تبدیل آنها به پلت‌های کوچکتر می‌باشد. خرد شدن پلتها در روزهای انتهایی تخمیر نیز در اثر محدودیت نفوذ مواد مغذی و اکسیژن داخل پلتها به علت رشد آنها و بزرگ شدن آنها و در نتیجه پوک شدن آنها و در نهایت خرد شدن در اثر غلبه نیروهای تنشی اعمال شده به پلتها بر نیروی کشش سطحی پلتها می‌باشد و این در تطابق با مکانیزمهای فرض شده توسط Taguchi و همکارانش (۱۹۶۸) می‌باشد [۱۰].

در مایعات تخمیری با غلظت مایه تلقیح 10^3 - 10^5 spore/ml به منظور ارائه مدلی که رابطه بین رئولوژی مایه تخمیری و مورفولوژی را نشان دهد تغییرات ویسکوزیته بر واحد وزن خشک بیومس با قطر پلت در مقیاس لگاریتمی در شکل (۳) رسم شده است.

مدل زیر که از رگرسیون خطی داده‌های تجربی حاصل شده است و ارتباط بین رئولوژی مایه تخمیری و مورفولوژی پلتی را تا حدودی پیش‌بینی می‌کند

$$\left(\frac{\mu}{DCW}\right) \propto d_p^{-0.183} \quad (1)$$

تلقیح اسپوری بررسی شده در این تحقیق ($10^3 10^7 \text{ spore/ml}$) بالاتر می‌باشد و به نظر می‌رسد که غلظت مایه تلقیح 10^6 spore/ml و مورفولوژی کلامپی و میسلومی که نتیجه این غلظت مایه تلقیح هستند برای تولید اریترومايسين بهینه می‌باشند.

اختصارات

μ	ویسکوزیته
K	اندیس غلظت
DCW	وزن خشک بیومس
d_p	قطر پلت
OL	محور اصلی کلامپ
K_{La}	ضریب کلی انتقال جرم

تقدیر و تشکر

از کمکهای شرکت آنتی‌بیوتیک شفای ساری به خاطر در اختیار قرار دادن مواد و سویه میکروبی صمیمانه قدردانی و تشکر نموده و از خداوند منان توفیق روز افزون را برای آن شرکت محترم خواستاریم.

مراجع

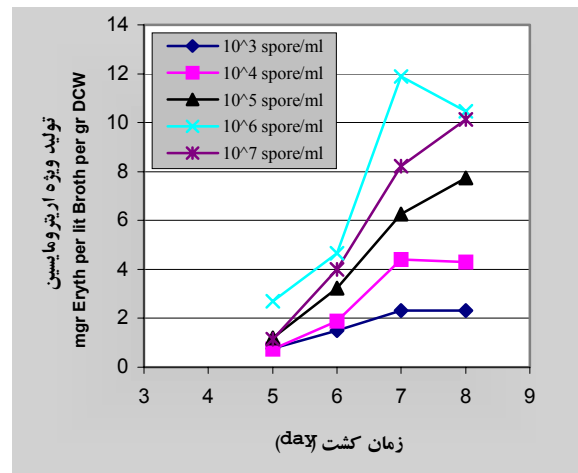
- Kim , E.Y. , Yoo , J.Y. , Analysis of broth rheology with cell morphology in *cephalosporium* fermentation, *Biotechnology techniques*, **6**(6): 501-506 , 1992.
- Thomas , C.R. , *TIBTECH* , **10**: 343-348 , 1992
- Tucker , K.G. , Ohan , P. and Thomas, C.R. , The influence of mycelial morphology on the rheology of filamentous fermentation broths , 1992.
- Heydarian , S.M. , The influence of agitation on morphology , rheology and erythromycin production in *saccaropolyspora erythraea* culture , PhD thesis , 1998.

مدل زیر نیز از رگرسیون خطی داده‌های تجربی حاصل شده و ارتباط بین رئولوژی مایه تخمیری و مورفولوژی کلامپی را تا حدودی پیش‌بینی می‌کند.

$$\left(\frac{K}{DCW} \right) \propto OL^{3.4} \quad (2)$$

این رابطه نیز نشان می‌دهد که رئولوژی مایه تخمیری با مورفولوژی کلامپی ارتباط خیلی قوی با اندازه کلامپها دارد و با افزایش اندازه کلامپها ، ویسکوزیته مایه تخمیری به شدت افزایش می‌یابد و این بدان علت است که با افزایش اندازه کلامپها ، کلامپها همچون یک شبکه توری مانندی جلوی حرکت آزادانه لایه‌های سیال را می‌گیرند و باعث افزایش ویسکوزیته خواهند شد.

به منظور بررسی اثر مورفولوژیهای مختلف روی تولید اریترومايسين و بدست آوردن مورفولوژی بهینه برای تولید اریترومايسين ، تغییرات تولید ویژه اریترومايسين یعنی تولید به ازای وزن خشک بیومس ، بر حسب زمان تخمیر در غلظتهای مختلف مایه تلقیح اسپوری در شکل (5) رسم شده است.



شکل ۵- تغییرات تولید ویژه اریترومايسين در طی

تخمیر در غلظتهای مختلف مایه تلقیح اسپوری

همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود تولید ویژه اریترومايسين در غلظت 10^6 spore/ml از تمام غلظتهای مایه

5. Heydarian , S.M. , Ison , A.P. , Ayazi shamlou , P. , Rheology of filamentous microorganisma , submerged culture ,2278-2289 ,2000.
 6. Bader , F.G. , Physiology and fermentation development. In: The bacteria : A treatise on structure and function. IX , Antibiotic producing streptomycets, 1986.
 7. Packer , H.L. and Tomas , C.R. , Biotechnol. Bioeng. , **35**: 870-881 , 1990.
 8. Regosz , A. et al. , Methods of determination of erythromycin , Sci. Pharm. **50** : 17-25 , 1982.
۹. حسین قجاوند ، بررسی ارتباط مورفولوژی با رئولوژی و تولید اریترومایسین با استفاده از باکتری رشته‌ای *Saccharopolyspora erythraea* ، پایان‌نامه کارشناسی ارشد ، دانشگاه صنعتی امیر کبیر ، اردیبهشت ۸۲
9. 10. Cui , Y.Q. , Van DerLans , K.C.A.M. Luben. Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. Biotechnology and Bioengineering. **5** : 715-726 , 1997.