

افزایش بازده تولید تخمیری اریترومايسين با استفاده از نانوذرات آهن اکسيد

غزل لبيكي^{۱*}، حسين عطار^۲، امير حيدري نسب^۳، سيد مهدي رضاي^۴ و عليمراد رشيدى^۵

- ۱- دانشجوی دکتری مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- ۲- استادیار مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- ۳- دانشیار مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- ۴- استاد گروه نانو فناوری پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران و
- ۵- دانشیار مهندسی شیمی، پژوهشکده کاتالیست و نانوفناوری، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران

دریافت: شهریور ۱۳۹۲، بازنگری: مهر ۱۳۹۲، پذیرش: آبان ۱۳۹۲

چکیده: در این پژوهش نانو ذرات مغناطیسی آهن اکسید به روش هم‌رسوبی تولید شده و اثر افزودن غلظت‌های متفاوت این نانوذرات در محیط کشت ساکاروپلی‌اسپورا اریتریا بر تولید اریترومايسين مورد بررسی قرار گرفته است. در طول فرایند تخمیر ناپیوسته، مقادارهای pH، زیست توده و اریترومايسين تولید شده سنجش و با مقادارهای به‌دست آمده از محیط کشت شاهد (بدون نانو ذرات آهن اکسید) مقایسه شده است. نتیجه‌های به‌دست آمده نشان داده است استفاده از غلظت‌های متفاوت نانوذرات مغناطیسی آهن اکسید با اندازه متوسط 3.7 ± 13.36 نانومتر می‌تواند مقدار تولید اریترومايسين را افزایش دهد، به طوری که با استفاده از غلظت 0.02 گرم بر لیتر از این نانوذرات در محیط کشت تخمیر، سطح اریترومايسين تولیدی 2.25 برابر نسبت به محیط کشت شاهد افزایش می‌یابد. تولید آسان و کم هزینه نانوذرات آهن اکسید در کنار اثر مثبت آن‌ها بر افزایش بازده تخمیر اریترومايسين، امکان استفاده اقتصادی آن‌ها در افزایش بازده تولید صنعتی آنتی بیوتیک را نوید می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: نانو ذرات آهن اکسید، روش هم‌رسوبی، تخمیر، اریترومايسين، ساکارو پلی اسپورا اریتریا

مقدمه

در نهایت کاهش وابستگی به سایر کشورها در این زمینه شود [۱]. با توجه به اهمیت افزایش تولید فراورده و کاهش هزینه‌های تمام شده فرایند در زیست فناوری و با توجه به کاربرد زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها، پژوهش‌های گسترده‌ای در جهت افزایش تولید این فراورده‌ها در حال انجام است که در آن‌ها یا سویه میکروارگانیسم و یا بهینه‌سازی شرایط تولید، محور پژوهش بوده است [۲]. از جمله این شرایط، می‌توان به ترکیب‌های محیط کشت اشاره کرد

امروزه آنتی بیوتیک‌ها جایگاه مهمی در پیشگیری و درمان بیماری‌ها داشته و همچنین در کشاورزی، دامپروری، دامپزشکی، گیاه‌پزشکی، صنایع غذایی و... کاربرد دارند. از این رو، مطالعات مربوط به این گروه از داروها از جمله بررسی فرایندهای تولید و مشخص کردن نقش عامل‌های مؤثر در تولید آن‌ها می‌تواند منجر به افزایش تولید فراورده و بازده، اقتصادی‌تر شدن فرایند و

که نقش مهمی در رشد میکروارگانیسم‌ها، قابلیت تولید و تنظیم متابولیت‌های ثانویه دارند. در سال ۲۰۰۴ حامدی نشان داد استفاده از روغن‌هایی مانند روغن آفتاب‌گردان، ذرت، زیتون، سویا و کلزا به عنوان منبع کربنی مناسب و بومی می‌تواند رشد میکروارگانیسم را تحت تأثیر قرار داده و باعث افزایش تولید اریترومایسین شود [۳]. در پژوهشی دیگر مشخص شده است پروپانول یکی از مواد مناسب به عنوان محرک رشد اریترومایسین بوده و افزودن ۱٪ از آن به محیط کشت تخمیر، با تأثیر بر نفوذپذیری غشا و افزایش انتقال جرم، موجب افزایش ۱۶٪ در مقدار اریترومایسین تولیدی می‌شود [۲]. پژوهش‌ها نشان داده است آهن یکی از عنصرهای مهم برای رشد میکروارگانیسم‌هاست و به‌عنوان یک کاتالیست در زندگی میکروارگانیسم‌ها عمل می‌کند، آهن قسمتی از آنزیم‌های فعال‌کننده اکسیژن است، نقش مهمی در فرایندهای اکسایش و کاهش دارد و به همین دلیل کاهش یا افزایش آن سبب اختلال در فرایندهای سوخت‌وسازی^۱ می‌شود. اریترومایسین آنتی‌بیوتیکی پرمصرف از گروه آنتی‌بیوتیک‌های ماکرولیدی و از جمله سالم‌ترین داروهاست، که جایگزین پنی‌سیلین در بیماران حساس به پنی‌سیلین بوده و دارای مشتقات مهم و پرمصرفی مانند آزیترومایسین، کلاریترومایسین، دیریترومایسین و تلیترومایسین است [۲]، به همین جهت بهینه‌سازی فرایند تولید این آنتی‌بیوتیک همواره مورد توجه پژوهشگران بوده است. اریترومایسین از فرایند تخمیر چند مرحله‌ای "ساکارو پلی اسپورا اریتریا" تولید شده و عوامل متعددی بر فرایند تولید تخمیری این متابولیت ثانویه و سینتیک آن مؤثر هستند که از جمله آن می‌توان به ترکیب‌های محیط کشت، افزودنی‌های تحریک‌کننده تولید فرآورده، دما، اکسیژن، مقدار و چگونگی همزدن، استریلیزاسیون و... اشاره کرد [۱]. در همین رابطه در سال ۱۹۸۵ کازنتسو اثر تغییر دما را بر رشد "ساکارو پلی اسپورا اریتریا" بررسی کرده و دمای بهینه را برای رشد سویه فوق ۳۳ °C به‌دست آورده است. در پژوهشی دیگر در سال ۱۹۹۶ حیدریان و همکارانش نشان داده‌اند که همزدن با دور بالا در محیط کشت تخمیر، منجر به آسیب دیدن میسلیم‌ها و

کاهش بازده تولید می‌شود [۲].

از طرفی با پیشرفت روز افزون فناوری نانو مشخص شده است که با کاهش اندازه (و نه تغییر نوع ماده)، امکان تغییر برخی ویژگی‌های ماده وجود دارد. بدین معنی که ذرات در ابعاد نانو به دلیل نسبت بالای سطح به حجم، ویژگی‌های جدید و متفاوتی از خود نشان می‌دهند [۴]. این ویژگی‌های منحصربه‌فرد، سازگاری و انعطاف‌پذیری آن‌ها با مقیاس اجزای سلولی و ویژگی قوی آن‌ها در پیوند با مولکول‌های زیستی، تنوعی از کاربردهای گسترده را ممکن ساخته [۵] و باعث شده است تا از آن‌ها در بسیاری از مطالعه‌های زیستی، زیست‌محیطی، دارویی، پزشکی، غذایی، بسته‌بندی، آرایشی-بهداشتی، کشاورزی و... استفاده شود [۴]. نانو ذرات آهن اکسید به دلیل داشتن ویژگی مغناطیسی قوی، زیست‌سازگاری با شرایط محیط بدن، امکان تهیه آسان و ارزان قیمت بودن، پایداری و... اهمیت زیادی داشته و کاربردهای زیست پزشکی زیادی نسبت به سایر نانو ذرات مغناطیسی دارند [۶]. همچنین طی پژوهش‌هایی در زمینه بررسی مقدار سمیت نانوذرات مغناطیسی آهن اکسید بر روی سلول‌های یوکاریوتیک، این نتیجه به‌دست آمده است که استفاده از نانو ذرات مذکور در رشد سلول‌ها اثر مثبتی داشته‌اند، برای مثال، استفاده از غلظت‌های متفاوت نانوذرات آهن اکسید (از ۲۰ تا ۶۰ $\mu\text{g/ml}$) در محیط کشت مایع سویه *Bradyrhizobium japonicum* منجر به افزایش تعداد میکروارگانیسم‌ها و ثابت سرعت رشد واکنش شده است [۷]. در پژوهشی دیگر نشان داده شده است بیشترین سطح رشد سویه *Pseudomonas aeruginosa* در محیط کشتی حاوی ppm ۵۰۰ نانوذرات مغناطیسی آهن اکسید به‌دست آمده است [۸]. سازگاری با سامانه‌های زیستی [۹] و سمیت بسیار پایین نانوذرات مغناطیسی برای سلول‌های زنده، امکان استفاده و به‌کارگیری این ذرات را در انواع فرایندهای زیست‌فناوری ممکن و مطلوب ساخته است [۸]. از سایر کاربردهای نانوذرات آهن اکسید می‌توان به گرما درمانی مغناطیسی برای درمان بعضی سرطان‌ها، MRI (به عنوان عامل وضوح)، انتقال ژن، رهایش دارو در بدن [۱۰]، افزایش رشد

نانو ذرات آهن اکسید (مغناطیسی) به دلیل داشتن سازگاری با سامانه‌های زیستی [۹]، داشتن ویژگی‌های مغناطیسی و توانایی حمل مولکول‌های زیستی، از اهمیت و کاربردهای زیادی برخوردار هستند، به طوری که در دارورسانی هدفمند، درمان سرطان و بیماری‌های قلبی، مهندسی بافت، تصویرسازی تشدید مغناطیسی (MRI)، جداسازی اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها و... از آن‌ها استفاده می‌شود [۱۳].

در این پژوهش با توجه به کاربردهای نانوذرات مغناطیسی در فرایندهای زیستی، اثر غلظت‌های متفاوت نانوذرات مغناطیسی آهن اکسید بر مقدار تولید اریترومیسین بررسی شده است.

بخش تجربی

مواد و دستگاه

مواد استفاده شده در سنتز نانوذرات آهن اکسید که شامل $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ و NH_4OH هستند و مواد استفاده شده در ساخت محیط‌های کشت که شامل نشاسته، کلسیم کربنات، آمونیم سولفات، سدیم کلرید، آگار، مس سولفات، آهن سولفات، روی سولفات، منیزیم سولفات، کبات کلرید، هیدروکلریدریک اسید، گلوکز، گلیسرول، هیدروژن دی آمونیم فسفات و دکستروز هستند از شرکت مرک تهیه شده است. کنجاله سویا از شرکت مک سوی و روغن کلزا از شرکت آل ویتال تهیه شده است.

برای تولید اریترومیسین از سویه ساکارو پلی اسپورا اریتریا PTCC 1685 که از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران واقع در (IROST) به صورت آمپول لیوفیلیزه خریداری شده، استفاده شده است.

الگوی XRD نانوذرات آهن اکسید در محدوده 2θ از 40° تا 70° درجه، با استفاده از دستگاه پراش سنج Bruker axS D 4، با تابش $\text{Cu K}\alpha$ تهیه و ریخت‌شناسی نانوذرات آهن اکسید با دستگاه TEM مدل Philips EM 208، 100KV ، cu ، $\text{grid } 200\text{mesh}$ ، مورد بررسی قرار گرفت. برای محاسبه مقدار مغناطیس اشباع نانوذرات آهن اکسید از دستگاه VSM ساخت شرکت مغناطیس

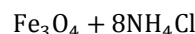
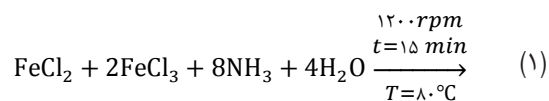
ماهیان [۶]، افزایش پاسخ و حساسیت حسگرهای زیستی [۱۱]، تشخیص مسمومیت خونی، درمان گرفتگی عروق قلب، ازدیاد برداشت نفت خام [۹]، بهبود ضریب انتقال حرارت در لوله‌های مسی [۱۲]، درمان بیماری‌های قلبی، مهندسی بافت، جداسازی اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها [۱۳]، افزایش انتقال جرم اکسیژن در بیوراکتورهای گاز-مایع [۱۴]، جذب، جداسازی و حذف آلاینده‌ها مثل مواد رنگی از آب و پساب [۱۵] و... اشاره کرد. فرایند تولید اریترومیسین یک فرایند تخمیر میکروبی سه فازی است که برهم‌کنش‌های بین فازهای مایع، گاز و جامد انجام می‌شود [۱۶]. در این فرایند نیز مانند سایر سامانه‌های چندفازی جذب گاز در مایع اهمیت زیادی دارد، زیرا نفوذ گاز در سطح مشترک گاز-مایع می‌تواند محدودکننده سرعت واکنش باشد [۱۴]. از طرفی در فرایندهای زیست‌فناوری هوازی، اکسیژن سوپسترای کلیدی است که به دلیل حلالیت کم در آب، عرضه و انتقال بهینه آن همواره مورد نیاز است و کمبود آن بروی بازده فرایند مؤثر است به طوری که افزایش تولید محصول در کشت‌های هوازی اغلب به وسیله انتقال اکسیژن محدود، کنترل می‌شود [۱۷]. در پژوهش فوق نیز سویه مولد آنتی بیوتیک اریترومیسین هوازی بوده، لذا بحث انتقال اکسیژن به عنوان مهم‌ترین سوپسترای گازی برای متابولیسم میکروبی بسیار حایز اهمیت است [۱۶]. پژوهش‌ها نشان داده است با توجه به تغییر ویژگی‌های مواد در مقیاس نانو، افزودن نانوذرات به سامانه‌ها، با تغییر ویژگی‌های سیال پایه، هیدرودینامیک سامانه را تحت تأثیر خود قرار داده و منجر به تغییر پدیده‌های انتقال می‌شود [۱۸]. برای مثال، اوولی در سال ۲۰۰۶ نشان داده است که استفاده از نانو ذرات آهن اکسید با روکش اولئیک اسید در سامانه سه فازی، ضریب انتقال جرم اکسیژن را تا ۶ برابر افزایش داده که این منجر به بهبود انتقال جرم اکسیژن می‌شود [۱۴] و یا در مثالی دیگر استفاده از نانوسیال آهن در لوله‌های مسی حرارت داده شده، به دلیل تغییر ویژگی‌های ترمودینامیکی به دلیل حضور نانوذرات آهن اکسید، ضریب انتقال گرمای جابه‌جایی را افزایش داده و باعث بهبود انتقال حرارت در این لوله‌ها می‌شود [۱۲].

دقیق کویر استفاده شده است.

بخشی از نانوذرات به دست آمده به مدت ۲۴ ساعت در آن ۸۰ °C قرار داده ده تا آمونیاک و مابقی آب آن تبخیر شود. مقداری از پودر سیاه رنگ به دست آمده برای شناسایی با XRD و TEM جدا و بقیه آن به دلیل پایداری در آب، دوباره با آب یون زدایی شده مخلوط شده و در ظرف درب بسته و در جای خنک نگهداری شد تا در محیط کشت تخمیر مورد استفاده قرار گیرد.

سنتز نانو ذرات مغناطیسی آهن اکسید

برای سنتز نانوذرات مغناطیسی آهن اکسید مورد استفاده در این پژوهش از روش هم‌رسوبی استفاده شده است. روش هم‌رسوبی یکی از متداول‌ترین روش‌های مورد استفاده برای تولید نانوذرات تک شکل و یک اندازه بوده و قابلیت کنترل اندازه نانوذرات با تنظیم pH و دما را داراست [۱۹]. در این روش که بر مبنای واکنش بین محلول‌های Fe^{2+} و Fe^{3+} به همراه افزودن یک باز و در نتیجه رسوب نانوذره مورد نظر است، به این صورت عمل شده است که ۴۷ گرم از $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ و 17.2 گرم از $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ در ۵۰ میلی لیتر آب یون زدایی شده در یک ظرف سر بسته (برای جلوگیری از ورود هوا به محیط واکنش) که دارای ورودی گاز نیتروژن است، تحت دمای ۸۰ °C با همزن مکانیکی (پلاستیکی) به شدت هم‌زده می‌شود [۱۴]. پس از گذشت ۱۵ دقیقه و تشکیل مخلوط غلیظ آجری رنگ، مقدار ۹۰ میلی لیتر آمونیاک ۲۸٪ به آهستگی و قطره قطره به ظرف واکنش افزوده و به شدت هم زده شده تا رنگ محیط واکنش از آجری به سیاه تغییر کند. تشکیل رسوب سیاه رنگ نشانه ایجاد نانو ذرات Fe_3O_4 است [۱۴ و ۱۹]. واکنش (۱) فرایند تولید نانوذرات مغناطیسی را نشان می‌دهد [۲۰].



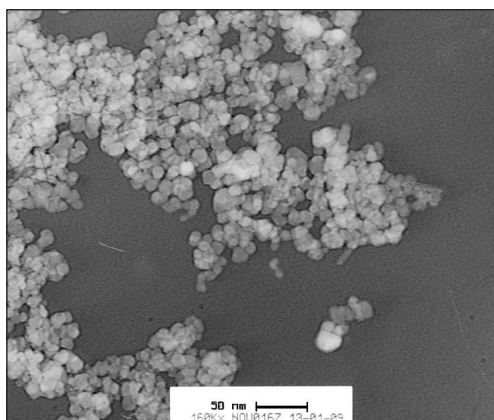
پس از تشکیل رسوب سیاه رنگ، سوسپانسیون در دمای اتاق خنک، سپس با توجه به مغناطیسی بودن نانو ذرات تشکیل شده، از آهنربا برای جدا کردن رسوب از مایع داخل ظرف استفاده شد، به این صورت که با قرار دادن آهنربا در کنار ظرف، نانو ذرات به سمت آهنربا تجمع پیدا کرده و فاز مایع به راحتی جدا و دور ریخته شد. رسوب باقی مانده ۳ بار به روش فوق با آب یون زدایی شده شست‌وشو داده شد تا یون‌های اضافی آن حذف شود [۲۱].

فرایند تولید تخمیری اریترومایسین

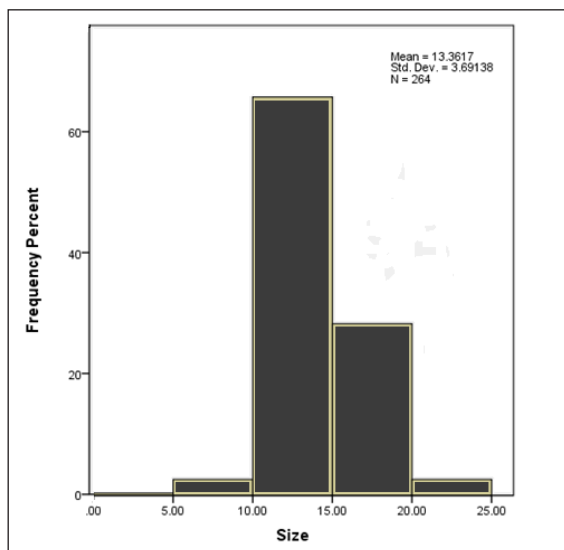
فرایند رشد "ساکاروپلی اسپورا اریتریا" و تولید اریترومایسین شامل چندین مرحله متفاوت بوده که در هر مرحله با توجه به نیازهای میکروارگانیسم و هدف‌های پژوهش از شرایط عملیاتی و محیط کشت‌های متفاوتی استفاده شده است. پس از باز شدن آمپول لیوفیلزه در شرایط استریل، سوبه روی محیط کشت اسپورزایی CSL آگار کشت داده شده و به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۰ °C نگهداری شد تا اسپوره‌های کافی و مناسب تولید شود. ترکیب‌های انتخاب شده برای این محیط کشت به طور عمده موجب رشد اسپورها می‌شود که یک لیتر آن شامل مواد زیر است: ۱۰ گرم عصاره خیسانده ذرت، ۱۰ گرم نشاسته، ۲٫۵ گرم کلسیم کربنات، ۳ گرم آمونیم سولفات، ۳ گرم سدیم کلرید، ۲۰ گرم آگار، ۲ میلی لیتر محلول میکروالمنت (حاوی مس سولفات، آهن سولفات، روی سولفات، منیزیم سولفات، کبالت کلرید و هیدروکلریدریک اسید) [۲]. پس از تهیه سوسپانسیون اسپوری از اسپورها و ساخت محیط کشت مایع بذردهی، ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون اسپوری به فلاسک‌های حاوی محیط بذردهی (۱۰٪ حجمی محیط کشت و ۹۰٪ حجمی هوا) انتقال داده شده تا در دمای ۳۰ °C با ۲۰۰ دور در دقیقه مخلوط شوند [۳]. ترکیب‌های انتخاب شده برای محیط کشت بذردهی باعث رشد میسلیمی سوبه شده و مایه تلقیح را از حالت اسپوری به میسلیمی تغییر می‌دهد که برای یک لیتر شامل مواد زیر است: ۳۰ گرم کنجاله سویا، ۱۰ گرم گلوکز، ۱۰ گرم گلیسرول، ۵ گرم کلسیم کربنات، ۱ گرم آمونیم سولفات، ۱ گرم دی آمونیوم هیدروژن فسفات [۲]. پس از گذشت ۴۰ تا ۴۴ ساعت، مایه تلقیح مناسب از نظر pH، زیست توده، آلودگی

نتیجه‌ها و بحث

شکل ۱ نشان دهنده تصویر گرفته شده با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نانو ذرات سنتز شده Fe_3O_4 است که با روش هم‌رسوبی تولید شده اند. همان‌طور که در شکل نیز دیده می‌شود سایز نانوذرات به تقریب یکنواخت است. شکل ۲ نمودار توزیع اندازه نانوذرات بوده که برای ۲۶۴ ذره به صورت تصادفی اندازه‌گیری شده است و با توجه به آن، اندازه متوسط نانوذرات تولید شده 13.36 ± 3.7 نانومتر است. از اندازه مشخصه‌های نانوذرات آهن اکسید، می‌توان به مغناطیس اشباع مغناطیسی اشاره کرد که بعد از اندازه‌گیری با دستگاه VSM، مقدار آن برابر با 46.7 emu/g به دست آمده است.



شکل ۱ تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذرات آهن اکسید



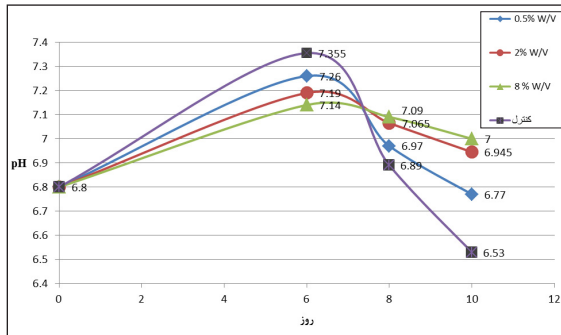
شکل ۲ نمودار هیستوگرام توزیع اندازه نانوذرات

کنترل شده، سپس به اندازه ۵٪ حجمی محیط کشت تخمیر، به فلاسک‌های تخمیر (۱۵٪ حجمی محیط کشت و ۸۵٪ حجمی هوا) تلقیح می‌شود [۱]. ترکیب‌های استفاده شده در محیط کشت تخمیر به گونه‌ای است که تحریک‌کننده تولید آنتی‌بیوتیک‌ها باشند. همچنین غلظت‌های متفاوتی از نانو ذرات سنتز شده (۰٫۰۰۵، ۰٫۰۲ و ۰٫۰۸ گرم بر لیتر) به محیط کشت تخمیر افزوده شده است. ترکیب‌های استفاده شده برای یک لیتر محیط کشت تخمیر بدین صورت هستند: ۵۰ گرم روغن کلزا، ۳۰ گرم کنجاله سویا، ۱۰ گرم کلسیم کربنات، ۲٫۵ گرم آمونیم سولفات، ۰٫۱۵ گرم هیدروژن دی آمونیوم فسفات، ۳۰ گرم نشاسته، ۴۰ گرم دکسترین [۲]. طول دوره تخمیر ۱۰ روز، دمای واکنش $33^\circ C$ و دور شیکر برای اکسیژن رسانی به سویه ۲۲۰ دور در دقیقه در نظر گرفته شده است [۱]. در طول دوره تخمیر، در روزهای ۶، ۸ و ۱۰ در شرایط استریل از تمامی محیط‌های تخمیر نمونه‌گیری به عمل آمده و مقدار اریترومایسین موجود در همه نمونه‌ها سنجش گردیده و با محیط شاهد (فاقد نانوذرات) مقایسه شده است. تمامی آزمایشات در ۴ بیج و هر بیج با ۳ بار تکرار انجام گرفته است.

سنجش اریترومایسین

برای سنجش اریترومایسین تولیدی، نمونه‌های محیط تخمیر با بافر کربنات- بی کربنات با pH ۹٫۶ رقیق شده و با کلرفرم واکنش داده شده اند تا اریترومایسین تولید شده با کلرفرم استخراج شود. پس از کامل شدن استخراج اریترومایسین با کلرفرم، محیط به مدت ۵ دقیقه با $4000 \times$ دور در دقیقه سانتریفوژ شده تا دو فاز آلی و آبی تشکیل شود، فاز آلی که حاوی اریترومایسین بوده نگهداری و فاز آبی جدا و دور ریخته شده است. سپس فاز آلی با محلول رنگی آبی برموفنل ترکیب داده شده و تشکیل رنگ زرد به معنای تولید اریترومایسین است. در نهایت جذب کمپلکس رنگی اریترومایسین - آبی برموفنل در طول موج ۴۱۵ نانومتر و با استفاده از دستگاه طیف‌سنج سنجیده شده و مقدار غلظت اریترومایسین تولیدی با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمده است [۱ و ۲].

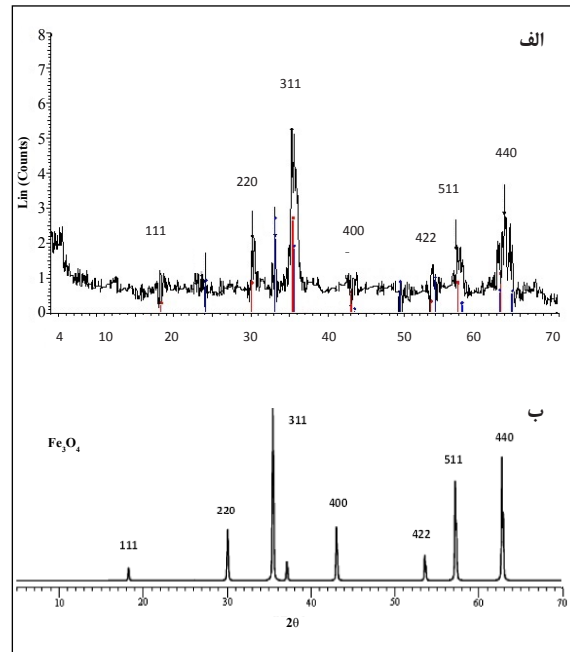
میکروارگانيسم نزولی بوده است. بیشترین مقدار pH در تمامی محیطها (0ها) در روز ششم فرایند به دست آمده است. تمامی محیطها از روند فوق (افزایش تا روز ۶ و سپس کاهش تا روز ۱۰) تبعیت کرده و افزودن نانوذرات در این روند تغییری ایجاد نکرده است. هم‌چنین افزایش غلظت نانوذرات باعث کاهش مقدار بیشینه pH شده است، به طوری که در $\emptyset = 0$ ، بیشینه pH برابر با ۷٫۳۵۵ و در $\emptyset = ۰٫۰۸$ بیشینه pH برابر با ۷٫۱۴ به دست آمده است. با افزایش غلظت نانوذرات، تغییرهای pH در روزهای متفاوت تخمیر کمتر شده است. نانو ذرات آهن اکسید به دلیل تأثیر بر ضریب انتقال جرم اکسیژن، محدودیت عرضه اکسیژن را کمتر کرده و در این شرایط، میکروارگانيسم هوای روند رشد یکنواخت تری خواهد داشت. لذا هر چقدر محیط از نظر نانوذرات غلیظتر باشد، آهنگ تغییرهای pH که وابسته به رشد میکروارگانيسم بوده از روز ۶ تا روز ۱۰، کندتر و یا به عبارتی روند تغییرها یکنواخت تر شده است. نتیجه‌های فوق هم‌چنین نشان می‌دهد افزودن نانوذرات آهن اکسید می‌تواند pH محیط کشت تخمیر را در حد pH بهینه (بین ۶٫۸ تا ۷) نگه دارد که این امر در تولید فراورده مؤثر است [۳].



شکل ۴ اثر غلظت‌های متفاوت نانوذرات اکسید آهن بر pH محیط کشت تخمیر

اثر غلظت‌های متفاوت نانوذرات آهن اکسید در مقدار زیست‌توده با توجه به شکل ۵ مقدار زیست‌توده تولید شده در محیط کشت شاهد از روز ۶ تا روز ۱۰ فرایند روند نزولی داشته و کاهش پیدا کرده است که نشان‌دهنده این است که میکروارگانيسم در فاز رشد لگاریتمی قرار دارد. به‌طور کلی عواملی مانند هوادهی، شرایط کشت، نوع و مقدار ترکیبات محیط کشت و رشد میکروارگانيسم در مقدار

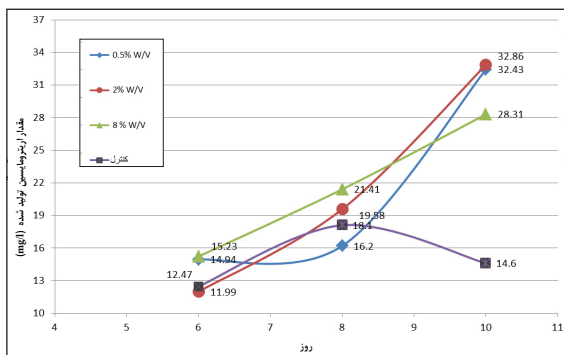
الگوی پراش پرتو X مربوط به نانوذرات سنتز شده در شکل ۳ نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود پیک‌های شاخص مغناطیسی در زوایای ۱۸٫۲۷۰، ۳۰٫۰۳۵، ۳۵٫۴۲۳، ۴۳٫۰۵۳، ۵۳٫۳۹۲، ۵۶٫۹۴۴ و ۶۲٫۵۱۶ مشاهده می‌شوند که منطبق با صفحه‌های (۱۱۱)، (۲۲۰)، (۳۱۱)، (۴۰۰)، (۴۲۲)، (۵۱۱) و (۴۴۰) مغناطیسی هستند.



شکل ۳ الگوهای XRD نانو ذرات مگنتیت سنتز شده، و (ب) مگنتیت استاندارد (الف)

اثر غلظت‌های متفاوت نانوذرات آهن اکسید در pH محیط‌های تخمیر مقدار pH که از جمله شاخص‌های نشان‌دهنده رشد یک میکروارگانيسم است در محیط‌های کشت تخمیر دارای غلظت‌های متفاوت نانوذرات و محیط کشت شاهد، طی یک دوره تخمیر ۱۰ روزه، دارای تغییرهایی بوده است که در شکل ۴ نشان داده شده است. در طول دوره تخمیر در تمامی محیطها، به دلیل مصرف مواد غذایی محیط کشت و در نتیجه آزاد شدن مواد بازی مانند آمونیاک و هم‌چنین تولید فراورده بازی اریترومايسين، روند تغییرات pH از روز اول (با مقدار ۶٫۸) تا روز ششم صعودی و از روز ششم تا پایان فرایند به دلیل ترشح مواد اسیدی ناشی از رشد

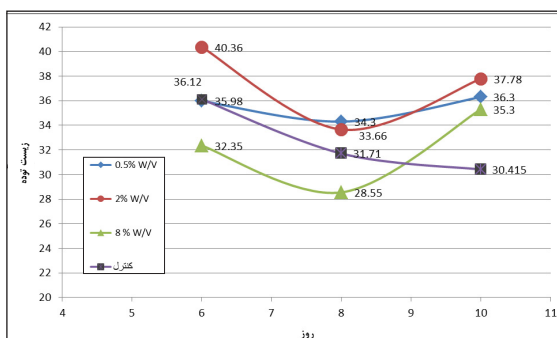
[۲۱]. در محیط کشت تخمیر هوازی ناپیوسته، اکسیژن نخستین سوبسترای است که مصرف شده و به دلیل بسته بودن سامانه (عدم داشتن ورودی و خروجی به ظرف انجام واکنش)، کمبود اکسیژن رشد را تحت تأثیر قرار می‌دهد. نانو ذرات آهن اکسید بر مقدار انتقال جرم اکسیژن در محیط تخمیر اثر گذاشته که این روند از نتیجه مطالعه‌های پیشین، پیروی می‌کند [۱۴]. با اثر مثبت نانوذرات بر مقدار اکسیژن عرضه شده در محیط، میکروارگانیسم رشد طولانی‌تری داشته و در نتیجه زمان رسیدن به فراورده بیشینه نیز از روز ۸ به روز ۱۰ تغییر می‌کند. غلظت بهینه نانوذرات آهن اکسید در محیط کشت تخمیر ۰,۰۲ به دست آمده است که در روز دهم منجر به تولید ۳۲,۸۶ mg/l فراورده شده است و بعد از آن محیط حاوی ۰,۰۰۵ و ۰,۰۰۸ دارای بیشترین مقادیرهای اریترومایسین تولیدی بوده‌اند که به ترتیب ۲,۲۵، ۲,۲۲ و ۱,۹۳ برابر مقدار تولید اریترومایسین در محیط کشت شاهد بوده است.



شکل ۶ اثر غلظت‌های متفاوت نانوذرات اکسید آهن بر مقدار اریترومایسین تولید شده

شکل ۶ نشان می‌دهد که در تمامی محیط‌های حاوی نانوذرات، روند تولید فراورده بین روزهای ۶ تا ۱۰ صعودی بوده درحالی‌که محیط شاهد از این روند پیروی نکرده، از روز ۶ تا ۸ صعودی و پس از آن روند نزولی در پیش گرفته است. هم‌چنین مقدار فراورده تولیدی روزهای ۱۰ و ۸ در محیط‌های حاوی نانوذرات دارای تفاوت زیادی با یکدیگر است به طوری که در محیط حاوی ۰,۰۰۲ و ۰,۰۰۵ مقدار اریترومایسین تولید شده در روز ۱۰ به ترتیب ۱,۶۷ و ۲ برابر روز مقدار فراورده در روز ۸ است. با توجه به شکل

زیست توده تأثیر گذار است. در همین راستا افزودن نانوذرات بر روند تغییرهای زیست‌توده تأثیر گذاشته به صورتی که در تمامی محیط‌ها زیست‌توده از روز ۶ تا ۸ کاهش پیدا کرده، از روز ۸ با کاهش مواد مغذی محیط کشت و تجمع مواد سمی، میکروارگانیسم از فاز لگاریتمی وارد فاز سکون و سپس مرگ می‌شود. در این حالت تعداد سلول‌های مرده رو به افزایش است. بنابراین، زیست‌توده از روز ۸ تا روز ۱۰ زیاد شده است. اما به طور کلی همان‌طور که مشاهده می‌شود مقادیرهای زیست‌توده در محیط‌های کشت شاهد و حاوی نانوذرات آهن اکسید دارای تغییرهای قابل توجهی نبوده است. هم‌چنین بین مقدار زیست‌توده تولیدی و مقدار فراورده دهی در بیشترین روز تولید، ارتباط مستقیم وجود دارد.



شکل ۵ اثر غلظت‌های متفاوت نانوذرات اکسید آهن بر مقدار زیست‌توده تولیدی

اثر غلظت‌های متفاوت نانوذرات آهن اکسید در مقدار اریترومایسین تولید شده

تغییرات غلظت اریترومایسین تولید شده در محیط‌های کشت تخمیر که با استفاده از روش نور طیف‌سنجی سنجیده شده است، در شکل ۶ نشان داده شده است. نتیجه‌ها نشان می‌دهد در محیط کشت شاهد بیشترین مقدار اریترومایسین در روز ۸ فرایند به دست آمده است. اما در محیط‌های حاوی نانوذرات، بیشترین مقدار اریترومایسین در روز دهم فرایند به دست آمده است. لازم به ذکر است نانو ذرات آهن اکسید به دلیل بزرگ بودن نسبت سطح به حجم، بسیار فعال بوده و به سرعت با مواد دیگر واکنش می‌دهد، برای مثال، به سرعت با اکسیژن ترکیب شده که از این ویژگی می‌توان برای بهبود کارایی برخی فرایندها استفاده کرد

هم‌رسوبی تولید و شناسایی شده است [۱۹]. هم‌چنین با توجه به نتیجه‌های به‌دست آمده از پژوهش فوق مشخص می‌شود افزودن مقدار اندکی از نانوذرات آهن اکسید (۰٫۰۰۵ و ۰٫۰۲ گرم بر لیتر) به محیط کشت تخمیر سوبه "ساکارو پلی اسپورا اریتریا" باعث افزایش مقدار تولید فراورده نهایی اریترومايسين می‌شود. به‌طور کلی با توجه به قیمت بالا و ارزش افزوده بالای اریترومايسين، و هم‌چنین با توجه به افزایش بهره‌وری تولید، استفاده از نانوذرات مغناطیسی آهن اکسید، در محیط کشت تولید اریترومايسين مناسب و اقتصادی بوده و می‌تواند با افزایش بازده فرایند، گامی در راستای خودکفایی کشور در زمینه تولید این دارو باشد.

غلظت بهینه نانوذرات آهن اکسید در محیط کشت تخمیر تولید اریترومايسين ۲٪ گرم بر لیتر به‌دست آمده است.

نتیجه گیری

در این پژوهش با توجه به نتیجه‌ها و گزارش‌های منتشر شده در رابطه با امکان افزایش انتقال جرم اکسیژن توسط نانو ذرات آهن اکسید، از غلظت‌های متفاوت این نانوذره در محیط کشت تخمیر استفاده شده است و نتیجه‌های به‌دست آمده نشان می‌دهد استفاده از این نانوذرات در محیط کشت تخمیر منجر به افزایش تولید اریترومايسين می‌شود. در این پژوهش نانوذرات آهن اکسید با توزیع اندازه یکنواخت با روش آسان، سریع و ارزان،

مراجع

- [۱] لیبکی، غزل؛ عطار، حسین؛ حامدی، جواد؛ مهندسی شیمی ایران، ۵۰، ۱۵-۲۱؛ ۱۳۸۹.
- [۲] حامدی، جواد؛ پایان نامه دکتری تحت عنوان بررسی اثر روغن‌ها در رشد *S. erythraea* و تولید اریترومايسين، دانشگاه تهران، دانشکده علوم تهران، ۱-۶۵، ۱۳۸۱.
- [3] Hamed, J.; Malekzadeh, F.; Saghafi-nia, A.E.; *Microbial Biotechnol*, 31, 447-456, 2004.
- [۴] محمودیان، محمد؛ پایان نامه کارشناسی ارشد تحت عنوان تهیه نانوذرات اکسید روی بهینه شده برای کاربرد در کرم ضد آفتاب، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، تهران، ۲-۸۰، ۱۳۹۲.
- [۵] صالحی زاده، حسین؛ بایندری، لیلا؛ مهندسی شیمی ایران، ۳۳، ۴۰-۵۰، ۱۳۸۷.
- [۶] شبه رنگ، میترا؛ میرواقفی، علیرضا؛ فناوری نانو، ۱۷۹، ۱۳-۱۵، ۱۳۹۱.
- [7] Ghalamboran, M.R.; Ramsden, J.J. ; Ansari, F.; *Journal of Bio nano Sciences*, 3, 1-6, 2009.
- [8] Kafayati, M.E.; Raheb, J.; Torabi-Angazi, M.; Alizadeh, Sh.; Bardania, H.; *Iran Journal of Biotech*, 11(1), 41-46, 2013.
- [9] Meng-Lin, M.; *Nano Reviews*, 1, 1-17, 2010.
- [10] Ito, A.; Shinkai, M.; Honda, H.; Kobayashi, T.; *Biosci. Bioeng*, 100, 1-11, 2005.
- [11] Loh, K.Sh.; Lee, Y.H.; Musa, A.; Salmah, A.A.; Zamri, I.; *Sensors*, 8, 5775-5791, 2008.
- [12] Lajvardi, M.; Moghimi-Rad, J.; Hadi, I.; Gavili, A.; Dallali-Isfahani, T.; Zabini, F.; Sabbaghzadeh, J.; *Magnetism and Magnetic Materials*, 322, 3508-3513, 2010.
- [۱۳] زرنگار، زهره؛ صفری، جواد؛ دنیای نانو، ۲۳، ۹-۱۳، ۱۳۸۱.
- [14] Olle, B.; Bromberg, L.; Hatton, T.A.; Wang, D.I.C.; *NSTI-Nanotech*, 1, 411-414, 2006.
- [15] Shaker, S.; Zafarian, Sh.; Chakra, Ch.Sh.; Rao, K.V.; *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 2, 2969-2973, 2013.

- [۱۶] کروگر، ولف؛ کروگر، آنالیز؛ بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی صنعتی، مترجم سید علی مرتضوی و همکاران، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، چاپ دوم، ۱۵۱-۱۶۷، ۱۳۸۱.
- [17] Garcia-ochoa, F.; Gomez, E.; *Biotechnology Advanced*, 27, 154-176, 2009.
- [۱۸] سعید نیا، لیلیا؛ هاشمی پور رفسنجانی، حسن؛ افضلی، داریوش؛ مهندسی شیمی ایران، ۶۶، ۵۷-۵۰، ۱۳۹۲.
- [19] Figuerola, A.; Di-Corato, R.; Manna, L.; Pellegrino, T.; *Pharmacological Research*, 62, 126-143, 2010.
- [20] Gilardo, L.; Moreno-Pirajan, J.C.; *Eur. Chem. Bull*, 2(7), 445-452, 2013.
- [۲۱] کمال، زهرا؛ پایان نامه کارشناسی ارشد تحت عنوان جداسازی باکتری شیگلا سونئی توسط نانوذرات مغناطیسی فعال شده، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، تهران، ۲-۱۶، ۱۳۹۰.

Increasing the yield of erythromycin fermentation using iron-oxide nanoparticles

Gh. Labbeiki^{1,*}, H. Attar², A. Heydari-Nasab³, M. Rezayat⁴ and A.M. Rashidi⁵

1. Ph.D student in Chemical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Assistant prof. of Chemical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Associate prof. of Chemical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4. Prof. of Medical Nanotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran &
Prof. of Pharmacology, Pharmaceutical Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
5. Associate prof. of chemical engineering, Catalyst and Nanotechnology Division, Research Institute of Petroleum Industry, Tehran , Iran

Received: January 2013, First Revised: February 2013, Second Revised: March 2013, Accepted: April 2013

Abstract: In this work, Iron-oxide nanoparticles of 13.36 ± 3.7 nm were synthesized using co-precipitation method and the effect of their presence in *Saccharopolyspora erythraea* culture on the titer of erythromycin was investigated. During the fermentation, the pH, biomass and erythromycin level were measured and compared with those in the control media. Our results indicated that supplementation of the fermentation media with different concentration of Iron-oxide nanoparticles could increase the titer of erythromycin produced. The level of antibiotic production in a medium containing 0.02 w/v nanoparticles was 2.25 times higher than that in the control medium. The straightforward and inexpensive production of Iron-oxide nanoparticles, along with their positive impact on erythromycin titer promises the economically viable use of these substances to enhance the industrial production of antibiotics.

Keywords: Iron-oxide nano particles (NPs), Co-precipitation, Fermentation, Erythromycin, *Saccharopolyspora erythraea*