مجله دنیای میکروب‌ها
سال هشتم شماره سوم (پیاپی ۲۴) پاییز ۱۳۹۴
صفحات ۲۳۰-۲۲۱

Original Article

بهینه سازی منبع نیتروژنی مناسب به منظور تولید اریترومایسین توسط سویه *ساکارو پلی اسپورا اریترا*

مریم فیروزبخت[۱]، سعید اکبرزاده کلاهی[۲]، غزل لبیکی[۳]، حسین عطار[۴*]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، گروه میکروب شناسی، [۲] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، دانشکده داروسازی، گروه فارماکولوژی و سم شناسی، [۳] مربی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، گروه بیوتکنولوژی، [۴] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده فنی، گروه مهندسی شیمی

چکیده

سابقه و هدف: افزایش بازده تولید محصول همراه کاهش هزینه های تمام شده، از جنبه های مهم تحقیقات زیست فناوری است. از آنجایی که آنتی بیوتیک ها از نظر مصرف سالیانه، مقام دوم را میان فرآورده های زیستی دارند، پژوهش های بسیاری به منظور افزایش تولید این فرآورده ها صورت گرفته است. این مطالعه با هدف بهینه سازی ترکیبات محیط کشت تخمیر از نظر منبع نیتروژنی، در تولید اریترومایسین انجام شد.

مواد و روش ها: این مطالعه تحقیقی با نمونه گیری منظم از متابولیت های تولید شده توسط سویه *ساکاروپلی اسپورا اریترا* در تهران انجام گرفت. پس از گذراندن مراحل اسپورزایی، بذردهی و تخمیر، تاثیر غلظت های مختلف پودر آب پنیر بر روی شاخص های مختلف مانند pH، وزن تر زیست توده، تغییرات ریخت شناسی سویه *ساکارو پلی اسپورا اریترا* مورد بررسی قرار گرفت. همچنین غلظت اریترومایسین تولید شده با روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد.

یافته ها: نتایج به دست آمده بیانگر تاثیر غلظت های مختلف پودر آب پنیر بر روی شاخص های تخمیر بود. استفاده از ترکیب کنجاله سویا و پودر آب پنیر باعث افزایش میزان تولید اریترومایسین، کاهش زمان تخمیر و در نتیجه کاهش هزینه های تولید گردید. غلظت بهینه منبع نیتروژنی در فرآیند تخمیر میکروبی به منظور تولید اریترومایسن معادل ٥٤ g/l پودر آب پنیر به همراه ۱۲ g/l کنجاله سویا محاسبه شد.

نتیجه گیری: پودر آب پنیر از جمله منابع ارزان قیمت نیتروژنی است و استفاده از آن می تواند ضمن کاهش هزینه ها، بازده تولید را افزایش داده و جایگزین مناسبی برای سایرمنابع نیتروژنی در ابعاد صنعتی باشد.

واژگان کلیدی: اریترومایسین، *ساکاروپلی اسپورا اریترا*، پودر آب پنیر.

دریافت مقاله: اردیبهشت ماه ۹٤ پذیرش برای چاپ: تیر ماه ۹٤

مقدمه

آنتی بیوتیک ها، یکی از مهم ترین متابولیت های ثانویه تولید شده توسط میکروارگانیسم ها هستند که اثر تخریب کنندگی و یا بازدارندگی از رشد بر روی سایر باکتری ها و قارچ ها دارند. تنوع، پیچیدگی و عملکرد زیستی خاص آنتی بیوتیک ها سبب شده است تا تحقیقات فراوانی درباره آن ها صورت گیرد. بیشتر این تحقیقات در زمینه بهینه سازی شرایط رشد و ترکیبات محیط کشت تولید آن ها بوده است (۱). اریترومایسین از جمله آنتی بیوتیک های پلی کتایدی وسیع طیفی است که به وسیله سویه *ساکاروپلی اسپورا اریترا* (*Saccharopolyspora erythraea*) به روش تخمیر صنعتی تولید می گردد (۲). اریترومایسین ترکیب مهم بالینی است که

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، گروه بیوتکنولوژی. تلفن: ۰۹۱۲۱۹۳۱۲۰۷ پست الکترونیک: Attar.h@srbiau.ac.ir

برای ساخت سایر مشتقات آن مانند کلاریترومایسین، آزیترومایسین، تلیترومایسین، روکسیترومایسین استفاده می شود (۳).

همچنین این آنتی بیوتیک پرمصرف ترین و انتخابی ترین دارو در درمان عفونت های مختلف تنفسی(٤)، درمان عفونت های حاد ایجاد شده توسط گونه های *استافیلوکوکوس* (*Staphylococci* sp.) و *نایسریا* (*Neisseria* sp.) (۵) و درمان عدم تحمل تغذیه در نوزادان نارس (٦) می باشد. فروش سالیانه اریترومایسین و مشتقات آن به بیلیون ها دلار می رسد. به همین دلیل تولید صنعتی آن اهمیت ویژه ای یافته است (۷). بدین ترتیب، بالا بردن کارایی گروه های آنتی بیوتیکی شناخته شده، بالا بردن بازده تولید و اقتصادی تر کردن فرآیند تولید آنتی بیوتیک ها از اهداف ضروری به شمار می آید.

به طور کلی، میزان تولید متابولیت های میکروبی با تخمیر ارتباط تنگاتنگی دارد (۸) و عوامل متعددی مانند منابع کربن و نیتروژن بر فرآیند تولید آنتی بیوتیک اثر قابل ملاحظه ای دارند (۳). در این زمینه پژوهش های فراوانی صورت گرفته است و اصلاح سویه و بهینه سازی محیط کشت، محور اصلی این دسته از پژوهش ها بوده است. به دلیل کاربرد کمتر اصلاح ژنتیکی سویه در فرآیندهای صنعتی، بهینه سازی محیط کشت تولید آنتی بیوتیک اهمیت بیشتری یافته است. از جمله این پژوهش ها می توان به بررسی اثر آرد سویا و آرد کلزا در تولید اریترومایسین توسط *ساکاروپلی اسپورا اریترا* (۹)، بررسی اثر منابع کربن و نیتروژن محیط پیش کشت در رشد *ساکاروپلی اسپورا اریترا* و تولید اریترومایسین (۱۰) و بهبود تولید اریترومایسین با استفاده از ملاس توسط *ساکاروپلی اسپورا اریترا* به روش بهینه سازی محیط کشت (۳) اشاره نمود.

اگرچه آب پنیر به عنوان ماده زاید کارخانه جات لبنیات، منبع ارزشمند ترکیبات فعال زیستی است، با این حال مشکلات زیست محیطی فراوانی را ایجاد کرده و تلاش های فراوانی برای اصلاح زیستی آن صورت گرفته است (۱۱). هدف از این پژوهش، بهینه سازی ترکیبات محیط کشت تخمیر از نظر منبع نیتروژنی با استفاده از پودر آب پنیر به عنوان یک منبع ارزان، در دسترس و بومی ایران بود. همچنین سعی گردید ضمن به کارگیری این پساب مفید، گامی در راستای افزایش بازده تولید آنتی بیوتیک اریترومایسین و در نهایت رسیدن به خود کفایی کشور در تولید این محصول برداشته شود.

مواد و روش ها

الف) میکروارگانیسم: در این پژوهش سویه *ساکاروپلی اسپورا اریترا* مولد اریترومایسین با PTCC 1685 از مرکز کلکسیون میکروبی و صنعتی ایران تهیه گردید.

ب) مرحله اسپورزایی: با توجه به اینکه رشد *ساکاروپلی اسپورا اریترا* طی چندین مرحله صورت می گیرد و در هر مرحله با توجه به نیازهای میکروارگانیسم و هدف های پژوهش، به محیط های کشت متفاوتی نیاز است. به منظور تولید اسپورهای کافی و مناسب، از محیط کشت اسپورزایی CSL (Corn Steep Liquor) آگار با ترکیب زیر استفاده شد (گرم بر لیتر): شیرابه ذرت ۱۰، نشاسته ۱۰ (Merck)، آگار ۲۰ (Merck)، کلسیم کربنات ۲/۵ (Merck)، سدیم کلرید ۳ (Sigma)، آمونیوم سولفات ۳ (Merck) و ۲ میلی لیتر از محلول عنصرهای کمیاب (Merck)، شامل: (کبالت کلرید، مس سولفات، روی سولفات، آهن سولفات، منیزیم سولفات و کلریدریک اسید).

پس از استریل نمودن محیط کشت، سویه میکروارگانیسم در شرایط استریل از آمپول لیوفیلیزه به محیط کشت منتقل گردید و به منظور تولید اسپور به مدت ١٤ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شد (۱۲).

ج) مرحله بذردهی: این مرحله موجب تحریک رشد میسلیومی سویه شده و ترکیبات به کار رفته در محیط کشت بذردهی شامل (گرم بر لیتر): کنجاله سویا ٤۰ (Max soy)، گلوکز ۵ (Sigma)، گلیسرول ۱۰ (Sigma)، آمونیوم سولفات ۲/۵ (Merck)، دی آمونیوم هیدروژن فسفات ۰/٦ (Merck) و کربنات کلسیم ۸ (Merck) بود (۸). با تهیه سوسپانسیون

اسپوری از مرحله اسپورزایی، به میزان ۱ درصد حجم محیط کشت بذردهی، به آن تلقیح گردید و به مدت ٤٤-٤٠ ساعت در همزن انکوباتور با دور g ۲۰۰ و دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد (۱۳). پس از گذشت مدت زمان یاد شده، با بررسی عدم آلودگی میکروبی، درصد وزن تر زیست توده، شکل رشد سویه و pH آن، مایه تلقیح مناسب برای استفاده در مرحله تخمیر انتخاب گردید.

د) مرحله تخمیر: ترکیبات به کار رفته در محیط کشت تخمیر محرک تولید آنتی بیوتیک بوده و شامل (گرم بر لیتر): دکسترین ٤۰ (Sigma)، نشاسته ۳۰ (Merck)، دی آمونیوم سولفات ۲/۵ (Sigma)، دی آمونیوم هیدروژن فسفات ۰/۱۵ (Merck)، کربنات کلسیم ۱۰ (Merck) و روغن کلزا ۵۰ (شرکت ال ویتال) می باشد (۱٤). این محیط با غلظت های مختلف کنجاله سویا (Max soy) و پودرآب پنیر (شرکت پگاه) تکمیل گردید (جدول ۱). پس از تنظیم pH و استریلیزاسیون آن، از مایه تلقیح مناسب مرحله قبل به میزان ۵ درصد حجمی محیط کشت تخمیر به آن ها افزوده و به مدت ۱۱ روز در همزن-انکوباتور با دور g ۲۲۰ و دمای ۳۳ درجه سلسیوس داده شد (۱٤). نمونه گیری در روزهای ٤، ٦، ۸، ۱۰ و ۱۱ تحت شرایط استریل به میزان ۱۰ میلی لیتر انجام گرفت و تغییرات شکل رشد سویه، میزان وزن تر بیومس، pH و میزان اریترومایسین تولیدی مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی آزمایش ها با ٦ بار تکرار انجام گردید.

جدول ۱: مقادیر کنجاله سویا و پودر آب پنیر استفاده شده در محیط های کشت تخمیر.

شماره نمونه	مقدار کنجاله سویا گرم در لیتر (درصد)	مقدار پودر آب پنیر گرم در لیتر (درصد)
۱ (کنترل)	۳۰ (۱۰۰)	-
۲	۲۱ (۷۰)	۲۷ (۳۰)
۳	۱۸ (٦۰)	۳٦ (٤۰)
۴	۱۵ (۵۰)	٤۵ (۵۰)
۵	۱۲ (٤۰)	۵٤ (٦۰)
۶	۹ (۳۰)	٦۳ (۷۰)
۷	-	۹۰ (۱۰۰)

ه) سنجش pH در پایان تخمیر از هریک از محیط های کشت تخمیر، به میزان ۵ میلی لیتر برداشته و میزان pH، درصد وزن تر زیست توده، تغییرات ریخت شناسی سویه و میزان تولید اریترومایسین آن سنجیده شد. به منظور سنجش pH محیط های کشت، از دستگاه pH متر رومیزی مدل HORIBA M-12 استفاده گردید.

و) سنجش وزن تر زیست توده تشکیل شده (Packed Mycelium Weight): به منظور اندازه گیری وزن تر زیست توده، از نسبت وزن رسوب سلولی به وزن محیط کشت به عنوان تخمینی از رشد میسلیومی استفاده شد (۱۵).

ز) سنجش میزان اریترومایسین تولید شده: برای این منظور پس از رقیق سازی نمونه های تخمیر با بافر کربنات-بی کربنات (Merck)، با pH معادل ۹/٦، برای استخراج اریترومایسین تولید شده، از کلروفرم استفاده گردید. پس از تکمیل شدن استخراج اریترومایسین با کلروفرم (مرک، آلمان)، به منظور ایجاد فاز آلی-آبی، محیط به مدت ۵ دقیقه با ٤۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز آلی که حاوی اریترومایسین است با محلول رنگی برموفنل بلو (مرک، آلمان)، ترکیب گردید. تشکیل رنگ زرد به معنای تولید اریترومایسین می باشد. در نهایت با اندازه گیری میزان جذب کمپلکس رنگی اریترومایسین-برموفنل بلو با استفاده از دستگاه طیف سنج در طول موج ٤۱۵ نانومتر و مقایسه آن با منحنی استاندارد به دست آمده از غلظت های مختلف، غلظت اریترومایسین تولید شده در نمونه های تخمیری محاسبه گردید (۱۳ و ۱٤).

یافته ها

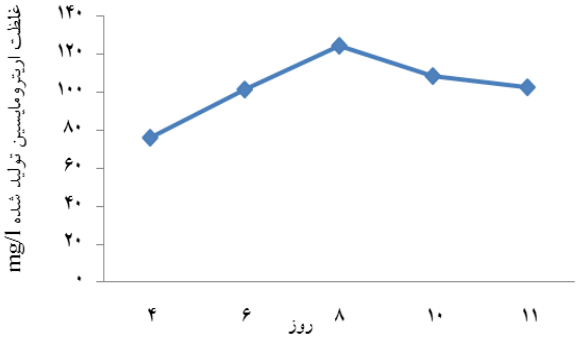
الف) بررسی اثر کنجاله سویا بر روی شاخص های مختلف محیط کشت شاهد (کنترل): به منظور فراهم آوردن مبنای مقایسه، ویژگی های ریخت شناسی باکتری *ساکارو پلی اسپورا اریترا*، pH محیط کشت تخمیر، درصد زیست توده و غلظت اریترومایسین تولید شده در روزهای مختلف، در محیط کشت شاهد بررسی گردید. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که میزان pH، درصد زیست توده تولید شده و غلظت

اریترومایسین تولید شده در طول فرآیند تخمیر همراه با تغییراتی بوده است. به طوری که از روز چهارم تا روز هشتم روندی صعودی و پس از آن روال نزولی داشت (نمودارهای ۱ تا ۳).

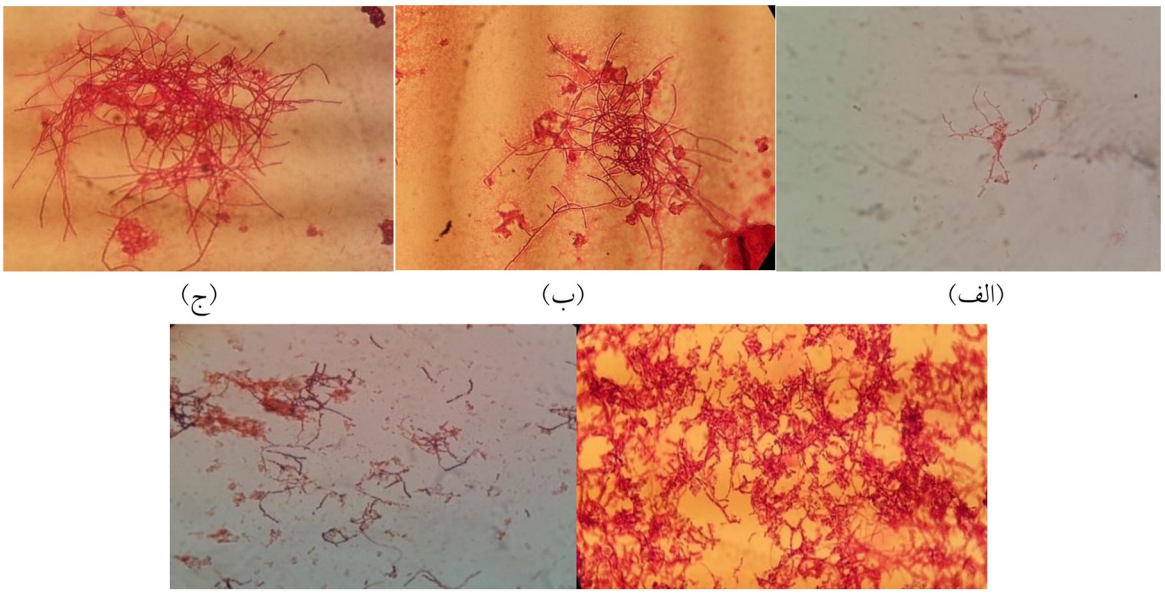
ساکاروپلی اسپورا اریترا اکتینومایستی است که به صورت رشته ای رشد می کند. بر اساس یافته های به دست آمده از این پژوهش که در شکل ۱- الف آمده و مربوط به روز چهارم فرآیند تخمیر می باشد، رشد میسلیومی به طور کامل صورت نگرفته و هیف های کوتاه نیز دیده می شوند. در شکل ۱-ب

نمودار ۱: تغییرات pH در محیط کشت کنترل.

نمودار ۲: تغییرات درصد زیست توده در محیط کشت کنترل.



نمودار ۳: تغییرات غلظت اریترومایسین تولید شده در محیط کشت کنترل.



شکل ۱: ریخت شناسی باکتری *ساکاروپلی اسپورا اریترا* در محیط کشت کنترل در طول تخمیر. الف) روز چهارم فرآیند، ب) روز ششم فرآیند، ج) روز هشتم فرآیند، د) روز دهم فرآیند، ه) روز یازدهم فرآیند.

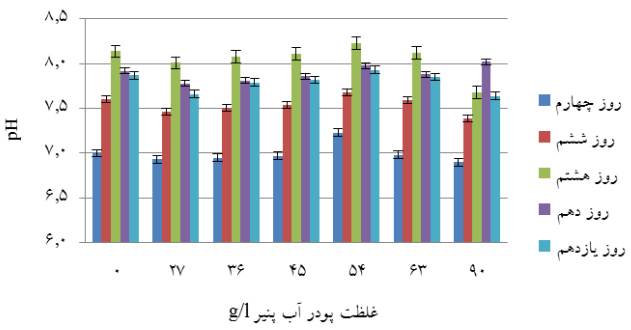
(روز ششم فرآیند تخمیر)، میسلیوم ها رشد کرده، منشعب هستند و طول بلندی دارند. در شکل ۱-ج (روز هشتم فرآیند تخمیر)، با کامل شدن رشد، تمامی میسلیوم ها منشعب و طول بلندی داشتند. در شکل ۱-د (روز دهم فرآیند تخمیر)، میسلیوم ها طول کمتری نسبت به روز هشتم داشتند و در برخی قسمت ها قطعه قطعه شدن آن ها و کاهش طول و انشعابات نسبت به روز هشتم فرآیند مشاهده شد. در شکل ۱-ه (روز یازدهم فرآیند تخمیر)، تمامی میسلیوم ها تجزیه شدند، هیچ طول بلند یا حالت انشعابی قابل رویت نبود و تنها قطعه های مجزا و پراکنده میسلیوم های دارای طول کوتاه قابل مشاهده بود.

با توجه به اینکه میسلیوم ها در روز هشتم فرآیند تخمیر به بلندترین طول خود رسیدند، بیشترین میزان درصد زیست توده تولید شد. همچنین بیشترین میزان تولید اریترومایسین متعلق به همین روز بود. این امر نشان دهنده همزمانی این دو پارامتر می باشد. به طوری که تا روز هشتم فرآیند تخمیر، روند صعودی و پس از آن روند نزولی داشت.

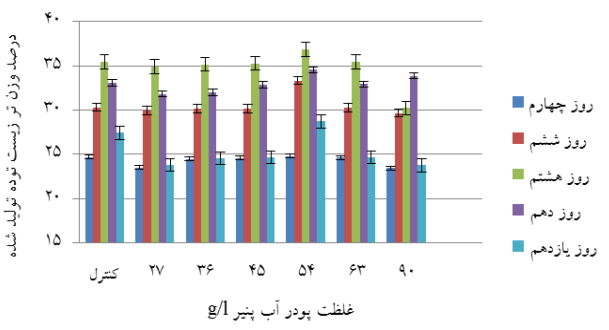
ب) اثر غلظت های مختلف پودر آب پنیر بر شاخص های مختلف تخمیر: در تمامی غلظت های مختلف پودر آب پنیر (به استثنای غلظت g/l ۹۰)، تمامی شاخص های تخمیر شامل: pH، درصد زیست توده تولید شده و میزان اریترومایسین تولیدی، همانند محیط کشت کنترل از روز چهارم تا روز هشتم روندی صعودی و پس از آن با روندی نزولی همراه بود. با این وجود در غلظت g/l ۹۰ پودر آب پنیر، روند صعودی تا روز دهم ادامه داشت.

۱- اثر غلظت های مختلف پودر آب پنیر بر pH: مقدار pH از جمله شاخص های نشان دهنده رشد یک میکروارگانیسم است که در غلظت های مختلف از پودر آب پنیر و کنجاله سویا، طی یک دوره ۱۱ روزه تخمیر تغییراتی را داشت (نمودار ٤). در طول دوره تخمیر در تمامی غلظت ها (به استثنای غلظت g/l ۹۰)، به دلیل مصرف مواد غذایی و آزاد شدن ترکیبات بازی مانند آمونیاک و همچنین تولید محصول قلیایی اریترومایسین، روند تغییرات pH از ابتدا با مقدار ٦/۸ تا روز ششم صعودی و از روز ششم تا پایان فرآیند به دلیل ترشح مواد اسیدی ناشی از رشد میکروارگانیسم نزولی بود.

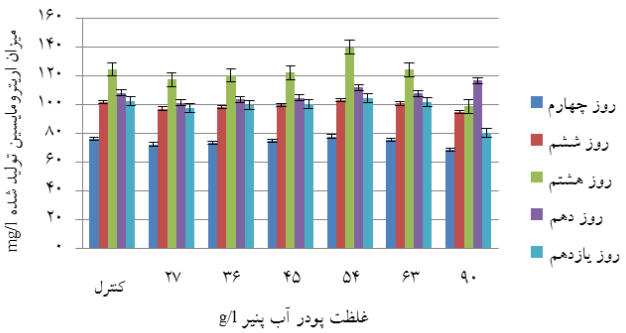
۲- اثر غلظت های مختلف پودر آب پنیر بر درصد زیست توده: با توجه به نمودار ۵، در روزهای اول فرآیند تخمیر، به دلیل قرار داشتن سویه مورد نظر در فاز تاخیری و سازگاری سلول ها با شرایط محیط کشت جدید، میسلیوم ها به صورت قطعات کوتاه و غیرمنسجم مشاهده شدند و درصد وزن ترِ زیست توده در این حالت پایین بود. پس از اتمام فاز تاخیری و سازگاری سلول ها با شرایط جدید، با آغاز فاز لگاریتمی سرعت رشد افزایش یافت. بنابراین انشعابات بلند و فراوانی در میسلیوم ها دیده شد، که این تغییر در فاز رشد سویه موجب افزایش ناگهانی و شدید مقدار زیست توده گردید. این افزایش صعودی در میزان زیست توده، بسته به میزان و نوع ترکیبات به کار رفته در محیط کشت تخمیر، در طی روز چهارم تا هشتم متفاوت بود. تنها در غلظت g/l ۹۰ پودر آب پنیر، افزایش صعودی درصد وزن ترِ زیست توده تا روز دهم ادامه داشت. پس از روز هشتم و در انتهای فرآیند به دلیل متابولیزه شدن مواد غذایی،



نمودار ۴: تغییرات pH تمامی غلظت ها در روزهای مختلف.



نمودار ۵: تغییرات درصد زیست توده تولید شده تمامی غلظت ها در روزهای مختلف.

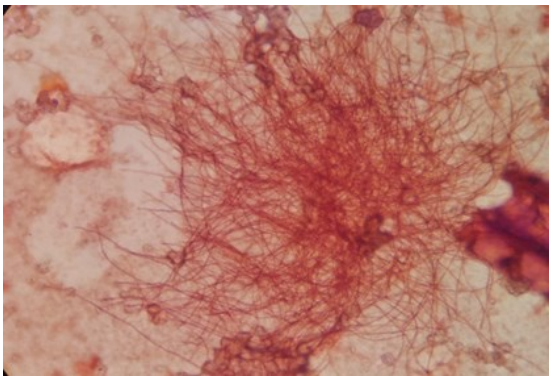


نمودار ۶: تغییرات غلظت اریترومایسین تولید شده تمامی غلظت ها در روزهای مختلف.

تشکیل مواد سمی و ورود باکتری به فاز سکون و پس از آن فاز مرگ، میسلیوم ها کاملاً تجزیه شدند و درصد وزن تر زیست توده تولیدی کاهش یافت.

۳- *اثر غلظت های مختلف پودر آب پنیر بر میزان تولید اریترومایسین:* با توجه به نمودار ٦، استفاده از غلظت های مختلف کنجاله سویا و پودر آب پنیر به عنوان منبع نیتروژن، منجر به تولید مقادیر متفاوتی از اریترومایسین شد. در تمامی غلظت ها بیشترین میزان غلظت اریترومایسین تولید شده متعلق به روز هشتم تخمیر بود. به جز غلظت ۹۰ g/l پودر آب پنیر که بیشترین میزان اریترومایسین در روز دهم تولید شد. بنابراین غلظت های متفاوت پودر آب پنیر و کنجاله سویا نه تنها بر میزان اریترومایسین تولید شده اثر داشتند، بلکه بر مدت زمان فرآیند نیز تاثیر گذار بودند.

ج) اثر محیط کشت حاوی غلظت بهینه پودر آب پنیر و کنجاله سویا بر تخمیر: منظور از غلظت بهینه سوبسترا در محیط کشت، مقداری از سوبسترا است که به ازای استفاده از آن، بیشترین میزان محصول تولید شود. بر اساس نتایج به دست آمده، می توان نتیجه گرفت که غلظت بهینه کنجاله سویا و پودر آب پنیر که سبب بیشترین میزان تولید اریترومایسین می شود شامل ترکیب ۱۲ g/l کنجاله سویا و ٥٤ g/l پودر آب پنیر می باشد. همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، از نظر ریخت شناسی سویه *ساکارو پلی اسپورا اریترا* در محیط کشت بهینه نسبت به محیط کشت کنترل، میسلیوم های متراکم تری داشت.



شکل ۲: تغییرات ریخت شناسی سویه در محیط کشت تخمیر بهینه در روند تولید.

با توجه به نتایج به دست آمده، غلظت بهینه برای منابع نیتروژنی، ٥٤ g/l پودر آب پنیر به همراه ۱۲ g/l کنجاله سویا می باشد که منجر به تولید ۲۱/۱٤۰ mg/l آنتی بیوتیک اریترومایسین شد. این در حالی است که استفاده از ۳۰ g/l کنجاله سویا به عنوان منبع نیتروژنی اصلی که در صنعت مورد استفاده قرار می گیرد، ۱۲٤/٥۱ mg/l اریترومایسین تولید می کند. میزان اریترومایسین تولیدی توسط ٦۳ g/l پودر آب پنیر به همراه ۹ g/l کنجاله سویا برابر با ۱۲٤/٤۸ mg/l بود که تقریباً مشابه با میزان اریترومایسین تولیدی در غلظت ۳۰ g/l کنجاله سویا می باشد.

مقایسه نتایج به دست آمده نشان می دهد که میزان تولید اریترومایسین در یک محیط کشت بسته(Batch) ۱۰۰۰۰۰ هزار لیتری صنعتی از ۱۲٤٥۱ گرم در محیط کشت کنترل به ۱٤۰۲۱ گرم در محیط کشت بهینه افزایشی یابد (۱٥۷۰ گرم افزایش میزان تولید). علاوه بر آن، هزینه تولید یک گرم اریترومایسین از ۳۳۷۰ ریال در محیط کشت کنترل به ۱۱۹۸ ریال در محیط کشت بهینه کاهش می یابد (٦٤ درصد کاهش هزینه).

بحث

با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش، جایگزین نمودن پودر آب پنیر به جای کنجاله سویا و استفاده از ترکیب این دو ماده در غلظت های مختلف، موجب تولید مقادیر مختلف اریترومایسین می گردد.

بر اساس نتایج این پژوهش، بهینه سازی منبع نیتروژنی بر تولید

اریترومایسین با ایجاد اثر مثبت، افزایش بازده تولید را به دنبال داشت. گارسیا (Garcia) و همکاران نیز در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که افزایش بازده تولید اریترومایسین در صنعت از طریق بهینه سازی شرایطی مانند دما، pH و غلظت سوبسترا امکان پذیر است (١٦). همچنین یانگ (Xiang) و همکاران در مطالعات خود در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که بهینه سازی منبع نیتروژنی اثر مثبتی بر تولید اریترومایسین دارد (۱۷).

با توجه به نتایج به دست آمده، تنها در غلظت مشخصی از منبع بهینه سازی شده، بیشترین میزان اریترومایسین تولید می شود. این امر نشان دهنده مناسب و کافی بودن مقدار منبع نیتروژنی برای رشد باکتری می باشد. در حقیقت، در این غلظت ها، مواد غذایی در زمان مقرر به اتمام رسیده و باکتری در زمان مناسبی با کمبود آن مواجه شده و شروع به تولید آنتی بیوتیک می نماید. همان گونه که الانشاسی (El-Enshasy) و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که استفاده از مقدار مشخصی از ملاس می تواند موجب افزایش تولید اریترومایسین شود (۳).

افزایش بیش از حد غلظت پودر آب پنیر، نه تنها موجب کاهش میزان تولید می گردد، بلکه افزایش طول مدت زمان تخمیر را نیز به همراه داشت. این حالت در غلظت ۹۰ g/l پودر آب پنیر در نمودار ٦ نشان داده شده است. به همین دلیل در غلظت ۹۰ g/l پودر آب پنیر، فرآیند تخمیر طولانی تر شد و بیشترین میزان اریترومایسین در روز دهم این غلظت تولید گردید.

به عبارت دیگر، در غلظت های بالای پودر آب پنیر، به دلیل بالا بودن میزان لاکتوز موجود در پودر آب پنیر، چند مرحله تاخیر در روند رشد به وجود آمد که به این پدیده رشد دومرحله ای (Diauxic growth) گفته می شود. این حالت در مواقعی که بیش از یک منبع کربن در محیط کشت وجود داشته باشد، رخ می دهد.

به این صورت که با اتمام یکی از منابع کربنی، سلول باید خود را برای مصرف منبع کربن جدید آماده کند. این عمل مستلزم صرف مقداری زمان است که در نتیجه باعث طولانی شدن مرحله تاخیری خواهد شد (۱۸).

یاوری (Yavari) و همکاران نشان دادند که استفاده همزمان نیتروژن معدنی و نیتروژن آلی موجب افزایش تولید اریترومایسین می گردد (۱۹). در این پژوهش نیز استفاده همزمان سولفات آمونیوم (نیتروژن معدنی) به همراه پودر آب پنیر (نیتروژن آلی) سبب افزایش تولید اریترومایسین گردید.

یافته های این مطالعه نشان می دهد که بین رشد سلولی سویه و تولید اریترومایسین تطابق وجود دارد. این یافته با نتایج حاصل از مطالعات حامدی (Hamedi) و همکاران مطابقت دارد (۸). نتایج حاصل از مطالعات باشل (Bussell) و واردل (Wardell) نشان داده است که بین ریخت شناسی سویه *ساکارو پلی اسپورا اریترا* و میزان اریترومایسین تولید شده رابطه مستقیم وجود دارد (۲۰ و ۲۱). نتایج حاصل از این پژوهش با یافته های مطالعات ایشان مطابقت دارد.

انشعابات بیشتر و طویل تر هیف ها در محیط کشت بهینه نسبت به محیط کشت کنترل بیانگر تاثیر ترکیبات محیط کشت بر ریخت شناسی سویه *ساکارو‌پلی اسپورا اریترا* می باشد. این یافته با نتایج به دست آمده در مطالعه حامدی (Hamedi) و همکاران مطابقت دارد (۲۲).

نتیجه گیری

با توجه به اینکه، آب پنیر به مقدار زیاد در کشورمان تولید شده و یک منبع بومی تلقی می گردد و دفع آن موجب بروز مشکلات زیست محیطی می شود، استفاده بهینه از آن نه تنها باعث صرفه اقتصادی در تولید اریترومایسین و رسیدن کشور به خودکفایی می شود، بلکه معضل تخریب زیست محیطی حاصل از تولید انبوه آب پنیر را نیز برطرف می نماید. به طور کلی استفاده از پودر آب پنیر ضمن کاهش مدت زمان تخمیر و کاهش هزینه ها، سبب تولید بیشتری اریترومایسین در مقایسه با استفاده برابر از سایر منابع نیتروژنی مورد استفاده در صنعت (ترکیب کنجاله سویا و نمک های آمونیوم) می شود. بنابراین پیشنهاد می شود که استفاده از آن، در تولید سایر آنتی بیوتیک ها نیز موردبررسی و ارزیابی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پرسنل آزمایشگاه میکروب شناسی و بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Rafieenia R. Effect of nutrients and culture conditions on antibiotic synthesis in *Streptomycetes*. Asian J Pharm Health Sci. 2013; 3(3): 810-815.

2. Chen Y, Huang M, Wang Z, Chu J, Zhuang Y, Zhang. Controlling the feed rate of glucose and propanol for the enhancement of erythromycin production and exploration of propanol metabolism fate by quantitative metabolic flux analysis. Bioprocess Biosyst Eng. 2013; 36 (10): 1445-1453.

3. El-Enshasy HA, Mahamed NA, Farid MA, El-Diwany AI. Improvement of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* in molasses based medium through cultivation medium optimization. Bioresour Technol. 2007; 99(2008): 4263-4268.

4. Hoyt JC, Robbins RA. Macrolides antibiotics and pulmonary inflammation. FEMS Microbiol Lett. 2001; 205(1): 1-7.

5. Lesmana M, Lebron CI, Taslim D, Tjaniadim P, Subekti D, Wasfiy MO, Campbell JR, Oyofo BA. In vitro antibiotic susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Jakarta, Indonesia. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 359-362.

6. Nuntnarumit P, Kiatchoosakun P, Tantiprapa W, Boonkasidech S. Efficacy of oral erythromycin for treatment of feeding intolerance in preterm infants. J Pediatr. 2006; 148: 600-605.

7. Chng C, Lumn AM, Vroom JA, Kao CM. A key of developmental regular controls the synthesis of the antibiotic erythromycin in *Saccharopolyspora erythraea*. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105(32): 11346-11351.

8. Rostamza M, Noohi A, Hamedi J. Enhancement in production of erythromycin by *Saccharopolyspora erythraea* by the use of suitable industrial seeding-media. Daru. 2008; 16(1): 13-17.

9. Labbeiki Gh. 2008. Survey effect of soybean meal and rape seed meal in erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea.* M.Sc. Thesis. Department of engineering. Science and Research University [In Persian].

10. Rostamza M. 2005. Survey effect of carbon and nitrogen of pre-seeding in growth of *Saccharopolyspora erythraea* and production of erythromycin. Ph.D. Thesis. Department of Science. Tehran University [In Persian].

11. Guimarães PMR, Teixeira JA, Domingues L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts

as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. Biotechnol Adv. 2010; 28(3): 376-384.

12. Hamedi J, Malekzadeh F, Niknam V. Improved production of erythromycin by *Saccharopolyspora erythraea* by various plant oils. Biotechnol Lett. 2002; 24(9): 697-700.

13. Labbeiki Gh, Attar H, Hamedi J. Survey erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* by batch culture in different concentration of soybean meal. J Appl Res Child. 2010; 9(50): 15-21. [In Persian]

14. Hamedi J. 2002. Survey effect of oils in growth of *Saccharopolyspora erythraea* and erythromycin production. Ph.D. Thesis. Department of Science. Tehran University [In Persian].

15. Xiang Z, Wie Z, Chang-Fa C, Xia Chng Q, Jiang-cha Q, Ju C, Ying-Ping Z, Si-Liang Z, Wan-Ju L. Fermentation optimization and industrialization of recombinant *Saccharopolyspora erythraea* strains for improved erythromycin A production. Biotechnol Bioprocess Eng. 2010; 15: 959-968.

16. Garcia-Ochoa F, Gomez E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An over view. Biotechnol Adv. 2009; 27: 153-176.

17. Xiang Z, Hani-Feng H, Ju C, Ying-Ping Z, Si-Liang Z. Enhancement of erythromycin production A with feeding available nitrogen sources in erythromycin biosynthesis phase. Bioresour Technol. 2009; 100(2009): 3358-3365.

18. Blanch HW, Clark DS. Biochemical Engineering, New York: Marcel Dekker. CRC PRESS; 1996.

19. Yavari S, Rafieenia R. Effect of medium composition fermentation conditions on erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea*. Clin Biochem. 2011; 44(13): 310.

20. Bussell ME. Effect of small scale culture vessel type on hyphal fragment size and erythromycin production in *Saccharopolyspora erythraea*. Biotechnol Lett. 1977; 19: 849-852.

21. Wardell JN, Stocks SM, Thomas CR, Bushell ME. Decreasing the hyphal branching rate *Saccharopolyspora erythraea* NRLL2338 leads to increased resistance to breakage and increased antibiotic production. Biotechnol Bioeng. 2002; 78(2): 141-146.

22. Hamedi J, Malekzadeh F, Saghafi-nia AE. Enhancing of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* with common and uncommon oils. J Ind Microbiol Biotechnol. 2004; 31(10): 447-456.

Journal of Microbial World
Volume 8, No. 3, September 2015

Original Article

Optimization of suitable nitrogen sources for the production of erythromycin by *Saccharopolyspora erythraea*

Maryam Firoozbakht[1], Saeed Akbarzadeh Kolahi[2], Ghazal Labbeiki[3], Hossein Attar[4]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Faculty of Advanced Sciences & Technology, Pharmaceutical Science branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [2]Assistant Professor, Department of Pharmacology & Toxicology, Faculty of Pharmacy, Pharmaceutical Science branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [3]Instructor, Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences & Technology, Pharmaceutical Science Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [4]Assistant Professor, Department of Chemical Engineering, Faculty Of Technical, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Increase in the yield while reducing costs is one of the most important aspects of researches in biotechnology. Considering the amount of bioproducts consumed annually, antibiotics stand at second place, and therefore there has been considerable research to increase their production. This study was aimed to optimize the media used in fermentation process in terms of nitrogen source.

Materials & Methods: This study was conducted in Tehran, based on a continuously sampling from the metabolites produced by *Saccharopolyspora erythraea*. After sporulation, seeding and fermentation, the role of whey powder on several indicators such as pH, biomass production percentage morphological changes in the strain was analyzed. The concentration of the produced erythromycin were examined by spectrophotometry.

Results: The results of this study showed the effectiveness of different concentrations of whey powder on fermentation indices. Also, according to the results, the use of soybean meal with whey powder had positive impacts on the amount of erythromycin produced, duration of fermentation and the production costs. The optimized concentration of nitrogen nitrogen for production of this antibody was a combination of 54g/l whey powder with 12g/l soybean meal.

Conclusion: Since whey powder is an inexpensive source of nitrogen, it can be used to reduce costs, and increase the yield. Therefore, whey powder can be used as an alternative source of nitrogen in industrial production.

Keywords: Erythromycin, *Saccharopolyspora erythraea*, Whey powder.

Correspondence to: Hossein Attar

Tel: +989121931207

E-mail: Attar.h@srbiau.ac.ir

Journal of Microbial World 2015, 8(3): 221-230.