Archive of SID

مجله علمی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی

زمستان1388، دوره یکم، شماره سوم، صفحه 14 - 9

ترکیب اسیدهای چرب موجود در *Saccharopolyspora erythreae PTCC1685* رشد یافته در محیط معین

مرضیه رفیعی نیا[1]، حسین عطار[1]*

1- گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی مهندسی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: دکتر حسین عطار،گروه مهندسی شیمی گرایش صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران، ایران. attar.h@srbiau.ac.ir

دریافت: 88/7/19 پذیرش:88/11/17

چکیده

زمینه و هدف: *Saccharopolyspora erythreae* یک اکتینومیست هوازی و گرم مثبت و میکروارگانیسم صنعتی تولید اریترومایسین می باشد. بررسیها نشان داده است که تولید متابولیتهای ثانویه و همچنین ترکیب اجزاء بیومس در میکروارگانیسمها و از جمله آنها لیپیدها، بسیار به محیط کشت وابسته است.

روش بررسی: سوسپانسیون اسپوری *Saccharopolyspora erythraea PTCC1685* به محیط بذردهی تلقیح شده و در دمای 30 درجه به مدت 44 -40 ساعت با دور 180 rpm در شرایط هوازی گرما گذاری شد. مقداری از نمونه بذردهی که دارای شرایط مناسب مورفولوژی و pH و رشد کافی بود به فلاسکهای حاوی محیط تخمیر تعریف شده اضافه شد، فلاسکهای تلقیح شده در دمای 30 درجه به مدت 11 روز در شرایط هوازی با دور 180 rpm گرما گذاری شدند. برای تعیین ترکیب اسیدهای چرب، بیومس در فاز سکون توسط سانتریفوژ در 4000 rpm به مدت 20 دقیقه جدا شد و سپس به مدت 12 ساعت با حلال کلروفرم/متانول(1:2) بر روی شیکر قرار داده و هم زده شد. سپس مخلوط، به مدت 20 دقیقه در دور 4000rpm سانتریفوژ شد. فاز رویی و اضافات بیومس حذف و فاز کلروفرم زیر که حاوی لیپیدها بود جدا شد. پس از تبخیر کلروفرم ، لیپیدهای بدست آمده پس از متیله کردن با مخلوط هیدروکسید سدیم متانولی ، ترکیب اسیدهای چرب توسط GC-Mass تعیین شد.

یافته ها: 8 اسید چرب در این سویه تشخیص داده شد که حاوی 15 تا 18 اتم کربن بودند. بالاترین درصد اسیدهای چرب متعلق به 14-متیل پنتادکانوئیک اسید(36.25%) و کمترین درصد متعلق به پنتادکانوئیک اسید(5.2%) بود. اسیدهای چرب دیگر $C_{17:0}$(18.9%)، $C_{18:2}$ (14.99%)، $C_{16:0}$(8.85%)، $C_{18:1}$(8.67%)، $C_{18:0}$(5.47%) و $C_{15:0}$(5.2%) بودند. اسیدهای چرب با کمتر از 15 کربن در این پژوهش دیده نشد.

نتیجه گیری: ترکیب اسیدهای چرب و تولید اریترومایسین در *S.erythreae* کاملاً وابسته به ترکیب محیط کشت است.

واژه های کلیدی: اسیدهای چرب، GC-Mass، *Saccharopolyspora erythraea*

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

توانایی میکروارگانیسمها برای تولید متابولیتهای ثانویه با خواص مفید گوناگون در صنایع مختلف بطور گسترده مورد بهره برداری قرار گرفته است. محصولات عمده فرایندهای زیستی در حوزه های مواد شیمیایی، دارو، انرژی، مواد غذایی و کشاورزی هستند(1). از مهمترین متابولیتهای تولید شده توسط میکروارگانیسمها آنتی بیوتیکها هستند که بیش از 67% آنها توسط گونه اکتینومیست تولید می شوند(2). اکتینومیستها دارای دو مشخصه هستند که آنها را از باکتریهای دیگر متمایز می کند، توانایی این گروه برای سنتز میزان بالایی از متابولیتهای ثانویه و شکل رشد رشته ای این گروه حائز اهمیت است (3).

یکی از مهمترین آنتی بیوتیکهای تولیدی توسط اکتینومیستها با خواص درمانی مختلف، اریترومایسین می باشد که در حال حاضر تولید صنعتی آن توسط میکروارگانیسم *S.erythreae* انجام می شود(4). *S.erythreae* یک اکتینومیست هوازی و گرم مثبت است و رشد آن از طریق هیفهای طویل با قطر 0/8-0/4 µm می باشد(5).

در فرایندهای زیستی وجود محیط کشت مناسب اهمیت بسزایی بر عملکرد فرایند دارد(6). بررسیها نشان داده که بیوسنتز آنتی بیوتیک اریترومایسین به میزان زیادی تحت تأثیر منبع کربن(7)، نیتروژن(8)، دما(9)، اکسیژن(10) ، دور همزن(11)، اریترومایسین تولید شده در محیط کشت(12) می باشد. همچنین افزودن روغنها و پروپانول به محیط کشت موجب افزایش میزان تولید آنتی بیوتیک می شود(13و14). غلظت بالای نوترینتهای سریع مصرف شونده مانند گلوکز میزان تولید آنتی بیوتیک را کاهش می دهد و شروع آنرا به تعویق می اندازد(15)، بنابراین تولید آنتی بیوتیک در تخمیرهای صنعتی در محیطهای کشت پیچیده و دیرهضم انجام می شود.

علاوه بر ارتباط محیط کشت و تولید آنتی بیوتیک، ترکیب اجزاء بیومس نیز کاملاً وابسته به اجزاء محیط کشت و شرایط تخمیر است. از جمله مهمترین اجزاء ساختاری موجود در میکروارگانیسمها لیپیدها می باشند که از اسیدهای چرب تشکیل شده اند(16). بسیاری از اسیدهای چرب پیش ساز ترکیبات مهمی از جمله آنتی بیوتیکها در میکروارگانیسمها می باشند(17).

بیشتر پژوهشهای انجام شده بر روی میکروارگانیسم *S.erythreae* مرتبط با بهینه سازی محیط کشت برای تولید آنتی بیوتیک بوده و در آنها از محیطهای پیچیده و غنی مناسب برای تولید استفاده شده است و به ندرت پیرامون رابطه بین اجزاء بیومس این میکروارگانیسم و ترکیب محیط کشت و رابطه بین اجزاء داخلی بیومس و تولید آنتی بیوتیک، پژوهشی صورت گرفته است. تا کنون پژوهشهایی پیرامون وجود اسیدهای چرب در محیط کشت *S.erythreae* و ارتباط آن با تولید اریترومایسین انجام شده است (5 و 13و18)، اما به رابطه بین ترکیب اسیدهای چرب موجود در داخل میکروارگانیسم و تولید اریترومایسین پرداخته نشده است. به همین دلیل و به علت عدم وجود گزارشی مبنی بر شناسایی ترکیب اسیدهای چرب *S.erythreae* رشد یافته در محیط معین، در این پژوهش از محیطی حتی الامکان ساده و معین حاوی حداقل نیازهای میکروارگانیسم برای رشد استفاده شد تا ترکیب اسیدهای چرب بدست آمده در این محیط به عنوان پایه ای برای بررسیها و تحقیقات بیشتر در آینده مورد استفاده قرار گیرد و بطور هدفمند با تغییر اجزاء محیط کشت ارتباط بین ترکیبات موجود در محیط و نوع و میزان اسیدهای چرب موجود در بیومس و ارتباط بین اجزاء و تولید آنتی بیوتیک بیشتر مورد بررسی قرار گیرد. همچنین مشخص شدن اجزاء بیومس در کنار استفاده از سوبستراهای معین و غیرپیچیده برای شناسایی مسیرهای متابولیک و مدلسازی میکروارگانیسمها بسیار کمک کننده است.

روش بررسی

سویه : در این پژوهش از سویه *Saccharopolyspora erythrear PTCC1685* استفاده شده است. این سویه از پژوهشکده بیوتکنولوژی ایران، مرکز کلکسیون قارچها و باکتریهای صنعتی و عفونی تهیه شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

محیط کشت: در این پژوهش برای محیط بذردهی و تشکیل میسلیوم از محیط کشت زیر استفاده شد:

گلوکز 10گرم، آرد کنجاله سویا 30 گرم، گلیسرول 10 گرم، دی آمونیوم فسفات 1 گرم، آمونیوم سولفات 3/5 گرم، کربنات کلسیم 5 گرم، آب مقطر 1000 میلی لیتر . pH محیط کشت پیش از اتوکلاو بر روی 7 تنظیم شد. محیط معین برای تولید اریترومایسین در این پژوهش دارای ترکیب زیر می باشد:

گلوکز 50 گرم، نیترات سدیم، 18/53گرم، دی پتاسیم هیدروژن فسفات 7 گرم، پتاسیم دی هیدروژن فسفات 3 گرم، آب مقطر 1000 میلی لیتر، سولفات منیزم 7 آبه 0/25 گرم، کلرید مس 0/5 میلی گرم، سولفات آهن 7 آبه 0/25 گرم، کلرید کلسیم دوآبه 0/0138 گرم، مولیبدات سدیم 0/3 میلی گرم، کلرید منگنز 6/2 میلی گرم، کلرید روی 0/0104 گرم، کبرید کبالت 0/55 میلی گرم. گلوکز، نمکها و محلول عناصر ناچیز، بطور جداگانه اتوکلاو شدند و سپس در شرایط استریل با هم مخلوط شدند.کلیه اجزاء محیط کشت از شرکت مرک[1] آلمان تهیه شده است.

روش کشت: سوسپانسیون اسپوری به فلاسکهای ارلن مایر 500 ml حاوی 50 ml محیط بذردهی تلقیح شده و در دمای 30° C به مدت 44 -40 ساعت با دور 180 rpm در شرایط هوازی گرما گذاری شد. (v/v) % 5 از محیط بذردهی که دارای شرایط مناسب مورفولوژی و pH و رشد کافی بود به فلاسکهای ارلن مایر 500 ml حاوی 50ml محیط تخمیر اضافه شد و فلاسکهای تلقیح شده در دمای 30 درجه به مدت 11 روز در شرایط هوازی با دور 180rpm گرما گذاری شد. در روزهای مختلف از محیط نمونه گیری می شود و pH محیط، میزان بیومس و مورفولوژی مورد بررسی قرار می گیرد. همه آزمایشات با سه بار تکرار انجام شد.

استخراج لیپیدها: به منظور استخراج لیپید از بیومس، ابتدا محیط کشت سانتریفوژ (4000 rpm به مدت 20 دقیقه) شد و مایع رویی حذف و رسوب بیومس جدا شد. سپس بیومس با کلروفرم/متانول(1:2) به حجمی 20 برابر نمونه رسانده شد و مخلوط به مدت 12 ساعت توسط شیکر اربیتال در دمای اتاق کاملاً هم زده شد. برای جداسازی لیپید از روش فولک استفاده شد(19). لیپیدهای جامد بدست آمده در C °70- برای آنالیزهای بعدی نگهداری شد.

تهیه متیل استر اسیدهای چرب موجود در لیپیدها: برای جداسازی و تعیین اسیدهای چرب، معمولاً از متیل استر آنها استفاده می شود که نقطه جوش پایین تری دارند. جهت متیله کردن اسیدهای چرب موجود در لیپیدهای استخراج شده، 0/5 گرم از نمونه لیپید را با 2 میلی لیتر هگزان نرمال و 2 میلی لیتر محلول متانولی هیدروکسید پتاسیم 2 نرمال مخلوط کرده، محلول را به مدت 20 دقیقه توسط همزن برقی تکان داده و پس از این مدت و تشکیل 2 فاز، از فاز رویی حاوی متیل استر اسیدهای چرب برای تزریق به دستگاه گاز GC-Mass جرمی استفاده شد.

آنالیز GC-Mass: مشخصات دستگاه GC-Mass مورد استفاده در این پژوهش بدین صورت می باشد: مدل GC-6840 ساخت کمپانی HP ، گاز حامل هلیم با خلوص 99/999% و شدت جریان آن 1 میلی لیتر در دقیقه و ستون کاپیلاری به قطر 0/25 میلی متر. دمای تزریق 250 درجه سانتی گراد. مشخصات دستگاه اسپکترومتر جرمی متصل به دستگاه گازکروماتوگراف به این صورت است: مدل 5973 ساخت کمپانی HP، ولتاژ یونیزاسیون 70 الکترون ولت، زمان بازداری مربوط به هر اسید چرب با اسیدهای چرب استاندارد موجود در کتابخانه دستگاه مقایسه و شناسایی شد.

یافته ها: نمودار گازکروماتوگرافی- طیف سنجی جرمی متیل استر اسیدهای چرب موجود در *S.erythreae* در شکل 1 و نتیجه اطلاعات بدست آمده در مورد نوع و درصد اسیدهای چرب موجود در لیپیدهای *S.erythreae* در جدول 1 آورده شده است. هشت اسید چرب شناسایی شد. وجود تعدادی اسید چرب ایزو و تعدادی اسید چرب غیر ایزو از خصوصیات استرپتومایستهاست که در این پژوهش هم دیده می شود(8).

[1] Merck

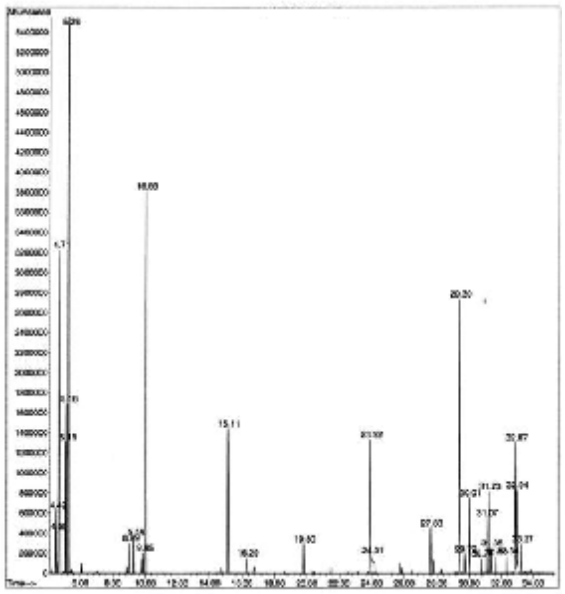
www.SID.ir

Archive of SID

جدول 1.ترکیب اسیدهای چرب موجود در لیپیدهای *S.erythreae* در محیط معین

Fatty acid	(aC17:0)	iC16:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:2	C18:0	C18:1
%	1.64	36.25	5.2	8.85	18.9	14.99	5.47	8.67

اسیدهای چرب تعیین شده اسیدهای 15 تا 18 کربنه بودند. همانطور که در جدول نشان داده شده است اسیدهای چرب پالمیتیک(C_{16}) بالاترین مقادیر را به خود اختصاص دادند که از میان آنها 14-متیل پنتادکانوئیک اسید(iC16:0) بیشترین مقدار (36.25%) را دارا بود و کمترین مقدار اسیدهای چرب شناسایی شده متعلق به 14-متیل هگزادکانوئیک اسید (aC17:0) بود. همچنین میزان تولید اریترومایسین به روش HPLC طی روزهای مختلف در طول تخمیر مورد سنجش قرار گرفت و بررسیها نشان داد که اریترومایسین طی تخمیر تولید نشده است.



شکل 1.گاز کزوماتوگرافی-طیف سنجی جرمی متیل استر اسیدهای چرب موجود در *S.erythreae*

بحث

چندین پژوهش مشابه بر روی ترکیب اسیدهای چرب در گونه های *Saccharopolyspora* انجام گرفته است که در تمامی آنها از محیط کشت کمپلکس استفاده شده است. پژوهش انجام شده توسط امبلی و همکاران که بر روی 4 سویه *Saccharopolyspora hirsuta* و در محیط کشت نوترینت براس[2] انجام گرفت نشان دهنده وجود اسیدهای چرب 15 تا 18 کربنه در این میکروارگانیسم بود. البته مقادیری ناچیز از اسیدهای چرب 12 و 14 کربنه نیز مشاهده شد. در تمام این 4 سویه iC17:0 بالاترین میزان اسیدهای چرب و aiC15:0 کمترین میزان را دارا بودند(20).

در پژوهشی دیگر که توسط گامین[3] و همکاران انجام شده، تنها به بررسی ترکیب اسیدهای چرب گلیکولیپیدهای چهار گونه *Saccharopolyspora* از جمله *S.erythreae* پرداخته شده است. در این پژوهش از محیط کشت کمپلکس دکستروز-عصاره مخمر استفاده شده است. ترکیب اسیدهای چرب گلیکولیپیدهای این چهار سویه در فاز سکون شامل اسیدهای چرب 16 تا 18 کربنه می باشد(21). بررسی انجام شده توسط چرنوا[4] و همکاران، که در آن از محیط کشت کمپلکسTSB[5] استفاده شده است، مقادیر اندکی اسیدهای چرب 13 و 14 کربنه تشخیص داده شد(22). در این پژوهش، اسیدهای چرب با بیش از 17 کربن، مقدار اندکی را نشان می دهد (% 2/9) درحالیکه در

[2] Nutrient broth

[3] Gamian

[4] Tcherneva

[5] Trypton soya broth

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهش حاضر، میزان بالایی از اسیدهای چرب 18 کربنه (% 29/13) شناسایی شد. هر دو پژوهش در فاز رشد میکروارگانیسم صورت گرفته است و تمام شرایط کشت به جز محیط کشت، یکسان هستند با این وجود تفاوت موجود در ترکیب اسیدهای چرب نشان دهنده وابستگی شدید این ترکیب به ترکیبات محیط کشت می باشد.

تا کنون پژوهشی مبنی بر ترکیب اسیدهای چرب *S.erythreae* رشد یافته در محیط کشت معین گزارش نشده است که این مهمترین ویژگی پژوهش حاضر است. البته به دلیل عدم تولید اریترومایسین، رابطه بین ترکیب اسیدهای چرب *S.erythreae* و اریترومایسین قابل بررسی نبود اما این پژوهش، منجر به تعیین این ترکیب در شرایط عدم تولید اریترومایسین شد. لازم است در آینده با طراحی محیط کشتی معین که همراه با تولید اریترومایسین باشد بررسیهایی انجام گیرد و همچنین با تغییر شرایط و اجزاء محیط کشت، ارتباط هر یک با زمان و میزان تولید اریترومایسین مورد بررسی قرار گیرد. همچنین پیشنهاد می شود ترکیب اسیدهای چرب در طول دوره های مختلف رشد از فاز رشد تا سکون ومرگ مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه گیری

نتایج این بررسی مؤید این موضوع است که ترکیب اسیدهای چرب و تولید اریترومایسین در *S.erythreae* کاملاً وابسته به ترکیب محیط کشت می باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاران گرامی در مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات به خاطر کمکهایشان تشکر و قدرانی می شود.

Refrences

1- Najafpour GD. *Industrial Microbology*, Biochemical Engineering and Biotechnology. 1th eds. Amsterdam. Elsevier; 2007:1-12.
2- Hamedi J, Khodagholi F, Hassani-Nasab A. *Increased erythromycin production by alginate as a medium ingredient or immobilization support in cultures of Saccharopolyspora erythrae.* Biotechnol. Lett 2005; 27: 661–664.
3- Bushell ME, Growth, product formation technology, in : Good flow m, Williums S.T, Mondarsli M, eds. Actinomycetes biotechnology, London, Academic press. 1998:185-217.
4- 4 - El-Enshasy HA, Mohamed NA, Farid MA, El-Diwany AI. *Improvement of erythromycin production by Saccharopolyspora erythraea in molasses based medium through cultivation medium optimization*. Bioresource Technol. 2008; 99:10:4263-4268.
5- Mirjalili N, Zormpaidis V, Leadlay PF, Andrew IP. *The effect of rapeseed oil uptake on the production of erythromycin and triketide lactone by Saccharopolyspora erythraea.* Biotechnol Prog .1999; 15:911-918.
6- 6 - Dunn GM, Nutritional requirements of microorganisms. In: mooyung M. eds, *Comprehensive biotechnology,*Vol 1, Pergaman Press, Oxford; 1985:113-126.
7- Trilli A, Crossley M, Kontakou M. *Relation between growth rate and erythromycin production in Streptomyces erythreus.* Biotechnol. Lett 1987; 9: 765-770.
8- Potvin J, Peringer P. *Ammonium regulation in Saccharopolyspora erythraea.I: Growth and antibiotic production.* Biotechnol. Lett 1994; 16: 63-68.
9- Kuznetsove LE. *Effect a temperature on erythromycin biosynthesis.* Antibiot .Med. Biotechnol. 1985; 30:7:485-489.
10- Heydarian SM, Lilly MD, Ison AP. *The effect of culture conditions on the production of erythromycin by Saccharopolyspora erythraea in batch culture*. Biotechnol. Lett 1996;18:10:1181-1186.
11- Wardell JN, Bushell ME. *Kinetics and manipulation of hyphal breakage and its effect on antibiotic production*. Enzyme and Microbial Technology 1999; 25: 404–410.
12- Listvinova SN, Demitrieva SV, Zalavskaia PL, Orlova NV. *Action of erythromycin on its own producer in cultivation on broth media.* antibiotiki. 1983; 28:3:177-187.
13- Hamedi J, Malekzadeh F, Saghafi-nia AE. *Enhancing of erythromycin production by Saccharopolyspora erythraea with common and uncommon oils*, J.Microbiol Biotechnol. 2004 ; 31: 447–456.
14- 14 - Potvin J, Peringer P. *Influence of n-propanol on growth and antibiotic production by an industrial strain of*

www.SID.ir

Archive of SID

Streptomyces erythreus under different nutritional conditions. Biotechnol.Lett 1993, 15:455-460.

15- Martin J, Demain A. *Control of antibiotic biosynthesis*. Microbiol.Rev. 1980; 44: 230-251.

16- Pupin A, Messias C, Piedrabuena A, Roberts D. *Total lipids and fatty acids of strains of Metarhizium anisopaliae*. Braz J microbiol 2000; 31:121-128.

17- Mc Demott JF, Lethbridge G, Bushell ME. *Estimation of the kinetic constants and elucidation of trends in growth and erythromycin production in batch and continuous culture of Saccharopolyspora erythraea using curve fitting techniques.* Enz Microb Technol. 1993:15:8:657-663.

18- Hamedi J, Makhdoumi Kakhki A, Darabi HR. *Suitable Nonionic Surfactants For the Erythromycin Production by Saccharopolyspora erythraea.* JUST. 2006; 32:1:41-4.

19- Folch, J, Lees M, Sloane-Stanley GA. *Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues*. J Biol Chem.1957; 226: 497-509.

20- Embley TM, Wait R, Dobson G, Goodfellow M. *Fatty acid composition in classification of Saccharopolyspora hirsute*. FEMS Microbiol. Lett.1987; 41:131-135.

21- Tcherneva E, Todorov T. *Fatty acid composition of auxotrophic mutants of Streptomyces erythreus.* Acta Microbiologia Bulgaria.1989;24:45-52.

22- Gamian A, Mordarska H, Ekiel I, Ulrich J, Szponar B, Defaye J. *Structural studies of the major glycolipid from Saccharopolyspora genus*. Carbohydrate Research. 1996; 296:55-67.

www.SID.ir