افزایش تولید کلاولانیک اسید توسط *Streptomyces clavuligerus* با بهینه سازی میزان اکسیژن محلول و دور همزن

جواد حامدی*، حمید مقیمی و عباس عباسی روح اللهی

تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، بخش میکروبیولوژی

تاریخ دریافت: 86/4/13 تاریخ پذیرش: 87/11/27

چکیده

کلاولانیک اسید یک آنتی‌بیوتیک مفید تجاری است که توسط *Streptomyces clavuligerus* در فرمانتورهای همزن‌دار تولید می‌شود. این باکتری رشته‌ای، بشدت هوازی و حساس به نیروی برش است. با توجه به اهمیت فراوان میزان اکسیژن محلول(Dissolved oxygen tension-DOT) دور همزن در رشد سویه مولد و تولید کلاولانیک اسید، در این پژوهش اثر غلظتهای مختلف اکسیژن محلول و دورهای مختلف همزن در رشد*S. clavuligerus* DSM738 و تولید کلاولانیک اسید بررسی شده است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد میزان DOT 20 درصد و دور همزن 700 به ترتیب با 0/61 g/l و 0/85 موجب تولید بیشترین میزان کلاولانیک اسید شده‌اند. همچنین افزایش دور همزن بیشتر از 700 اثر منفی شدید در تولید آنتی-بیوتیک داشته است. افزایش میزان اکسیژن محلول از 20 درصد باعث افزایش رشد سلولی شده اما تولید آنتی‌بیوتیک را کاهش داده است. در 200 rpm و اکسیژن محلول 10 درصد ، رشد و تولید آنتی‌بیوتیک نیز بشدت کاهش یافته است.

واژه های کلیدی: دور همزن، اکسیژن محلول، کلاولانیک اسید، *Streptomyces clavuligerus*

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: 61113390کترونیک:jhamedi@khayam.ut.ac.ir

مقدمه

کلاولانیک اسید یک آنتی بیوتیک بتالاکتام ضعیف و در عین حال یک مهارکننده قوی آنزیمهای بتالاکتاماز است که از طریق اتصال غیر قابل برگشت به جایگاه فعال بتالاکتامازها از فعالیت آنها جلوگیری کرده و سبب محافظت آنتی بیوتیکهای بتالاکتام درمقابل هیدرولیز آنزیمی می‌شود (6). این آنتی‌بیوتیک در ابعاد صنعتی توسط *Streptomyces clavuligerus* تولید می‌شود که یک باکتری رشته‌ای و بشدت هوازی است (6 و16). رشد این میکروارگانیسم رشته‌ای در طی فرآیند تخمیر موجب افزایش شدید ویسکوزیته محیط تخمیری شده که می‌تواند در شاخصهای انتقال همچون انتقال اکسیژن، جرم و حرارت و همچنین همزدن مطلوب، ایجاد اختلال کند (12). به همین دلیل تأمین اکسیژن مورد نیاز باکتری جهت افزایش تولید آنتی بیوتیک اهمیت ویژه‌ای دارد. از طرف دیگر افزایش سرعت همزدن می‌تواند موجب توزیع بهتر اکسیژن و بهبود دسترسی باکتری به آن گردد، ولی این کار نیروی برشی زیادی ایجاد می‌کند، که با توجه به حساس بودن این باکتری نسبت به این نیرو، امکان تخریب میسلیوم‌ها در سرعتهای بالای همزن وکاهش بازده محصول و همچنین افزایش تجزیه محصول تولید شده وجود دارد (2 و 9). همچنین تخریب سلولها باعث بوجود آمدن مشکلات فراوان در فیلتراسیون محیط کشت در طی فرآیند خالص سازی محصول می‌شود (5).

اگرچه مطالعات زیادی در مورد اثر میزان اکسیژن محلول و اثر دورهای مختلف همزن در *S. clavuligerus* صورت

Archive of SID
www.SID.ir

گرفته است ولی بیشتر این مطالعات در مورد تولید دیگر متابولیتهای ثانوی این باکتری و بخصوص سفامایسین C و نه تولید کلاولانیک اسید بوده است (14، 15 و 18). به عنوان مثال در مطالعه انجام شده در این زمینه اثر میزان اکسیژن محلول در تولید سفامایسین C توسط *S. clavuligerus* بررسی شده و مشاهده شده که با کاهش میزان اکسیژن محلول، تولید این آنتی‌بیوتیک حدود 30 درصد کاهش می‌یابد (18). در مطالعه دیگر غلظت سفامایسین C تولید شده در حالت 50 درصد اکسیژن محلول دو برابر و در حالت 100 درصد اکسیژن محلول سه برابر افزایش یافته و نشان داده شده که افزایش غلظت سفامایسین C متعاقب افزایش میزان اکسیژن محلول به دلیل افزایش فعالیت ویژه دو آنزیم کلیدی مسیر بیوسنتز آنتی‌بیوتیک شامل دی استوکسی سفالوسپورین C سنتاز و ایزوپنی سیلین N سنتاز است (14و15).

همچنین اثر سرعت همزن در بازده بیوماس و مورفولوژی *S. clavuligerus* مطالعه شده و نشان داده که با افزایش سرعت همزن تغییرات مورفولوژیک شدیدی ایجاد می‌شود، ولی در این پژوهش رابطه ای بین مورفولوژی با بیوماس یا بازده تولید مشخص نشده است (3). از سوی دیگر در ضمن بررسی ارتباط بین سرعت همزن، رشد بیوماس و تجزیه روغنها برروی این باکتری نشان داده شده که در صورت افزایش دور همزن تا 900 rpm، غلظت بیوماس افزایش می‌یابد، ولی در دور همزن بالاتر از 700 rpm علاوه بر کاهش شدید تولید، رشد باکتری نیز کاهش می‌یابد (9). درتنها مقاله منتشر شده در مورد رابطه میزان اکسیژن و دور همزن با تولید کلاولانیک اسید اثر دورهای مختلف همزن در میزان ثابت هوادهی 0/5 vvm بررسی شده و بیشترین غلظت آنتی‌بیوتیک در 1000 rpm گزارش شده است (16). در این پژوهش دورهمزن متغیر بوده و سعی شده تا میزان اکسیژن محلول حداقل 28 درصد باشد. در بخش دیگری از این پژوهش نشان داده شده که با کنترل مقدار اکسیژن محلول در 50 درصد اشباع، میزان کلاولانیک اسید بشدت کاهش یافته است. همچنین نتایج این پژوهش نشان می دهد که میزان اکسیژن محلول تأثیر زیادی در میزان تولید کلاولانیک اسید نداشته و با غنی‌کردن 10 درصد میزان اکسیژن هوای ورودی، افزایشی در میزان آنتی‌بیوتیک تولیدی مشاهده نشده است (16).

با توجه به محدود بودن مطالعات منتشر شده و عدم وجود یک نتیجه‌گیری کلی، در این پژوهش اثر غلظتهای مختلف اکسیژن محلول و دورهای مختلف همزن در رشد *S. clavuligerus* و تولید کلاولانیک اسید بررسی شده است. همچنین اثر مقادیر بالا و پایین غلظت اکسیژن محلول و اثر افزایش دور همزن در رشد و تولید آنتی‌بیوتیک نشان داده شده است.

مواد و روشها

سویه باکتری و محیطهای کشت: برای تولید کلاولانیک اسید از *Streptomyces clavuligerus* DSM 738 (دریافت شده از مرکز کلکسیون میکربی آلمان–DSMZ) استفاده گردید. برای کشت باکتری از محیط اسپورزایی آگاردار ISP2 با ترکیبات زیراستفاده شد (g/l): مالت10، گلوکز4، عصاره مخمر4، کربنات کلسیم 2 و آگار20. ترکیب محیط پیش کشت (seeding) به شرح زیر بوده است (g/l) : پپتون10، گلیسرول20 و مالت10 ، pH محیط روی 0/1 ±7/0 تنظیم شد. ترکیب محیط تولید (g/l) : مالت30، سویا5، گلیسرول5، سولفات آهن0/01 و سولفات منگنز 0/01. pH محیط کشت در 0/1 ± 6/8 تنظیم شد.

شرایط کشت: ابتدا *S. clavuligerus* در محیط ISP2 کشت ودر 28 درجه سانتی گراد به مدت 10–14 روز گرماگذاری شد. از این کشت یک سوسپانسیون دارای حدود $10^8 - 10^7$ اسپور در ml تهیه و 1 ml از آن در فلاسکهای ارلن مایر با حجم 1000 ml و حاوی 150 ml محیط پیش کشت تلقیح و به مدت 20 تا 22 ساعت دردمای 28 درجه سانتی گراد در شیکر دوار با دور rpm

Archive of SID

www.SID.ir

220 گرماگذاری شد. مقدار 250 ml از پیش کشت حاصل (5 درصد حجم محیط کشت فرمانتور) به فرمانتور دارای 10 لیتر محیط فرمانتاسیون تلقیح شد. فرآیند تخمیر در دمای 28 درجه سانتی گراد دور 400 rpm و غلظتهای مختلف اکسیژن محلول (10، 20، 30 و 40 درصد) به مدت140 ساعت انجام شد. در ادامه اثر دورهای مختلف همزن (200 rpm ، 400، 500، 600، 700 و 800) در غلظت بهینه اکسیژن محلول بررسی شد.

مشخصات فرمانتور: در این پژوهش از یک فرمانتور 14 لیتری آزمایشگاهی(New Microferm fermenter Brunswick, USA) با حجم کاری 10لیتر استفاده گردید. قطر داخلی فرمانتور 0/19 m و ارتفاع آن 0/48m بود. این فرمانتور دارای سه پروانه توربینی نوع راشتون (Rushton turbine) به قطر 0/075 m از هم بوده و کنترل اکسیژن محلول در محیط کشت به صورت خودکار و توسط یک سنسور گالوانیک قابل اتوکلاو (Inpro6800 series, Mettlet-Toledo, Switzerland) انجام شده است.

نمونه برداری: روزانه 50ml از فرمانتور نمونه‌گیری و میزان وزن خشک سلولی، pH ، میزان قند باقیمانده و کلاولانیک اسید تولید شده آن بررسی گردید.

مورفولوژی سویه: برای ارزیابی مورفولوژی نمونه‌های تهیه شده، از مایع فرمانتاسیون به روش گرم رنگ آمیزی شد. سپس با استفاده از میکروسکوپ (Carl Zeiss, Jena, Germany) به طور تصادفی حداقل 30 میدان دید بررسی و ثبت گردید. مورفولوژی غالب در بین این میدانهای دید انتخاب و به عنوان مورفولوژی نمونه گزارش شده است (شکل 9).

سنجش وزن خشک سلولی: برای اندازه گیری وزن خشک سلولی، مایع فرمانتاسیون به مدت 20 دقیقه در 4000 rpm سانتریفوژ شده و رسوب باقیمانده پس از یک بار شستشو با آب مقطر و سانتریفوژ مجدد با 2 ml اتانول شسته شده و به پلیت شیشه ای از قبل وزن شده منتقل گردید و به مدت 24 ساعت در 105 درجه سانتی گراد نگهداری شد. درصد وزن خشک به وزن مایع فرمانتاسیون محاسبه و به عنوان وزن خشک سلولی در نظر گرفته شد (11).

سنجش قند باقیمانده: برای سنجش قند در نمونه‌ها از روش فنل سولفوریک استفاده شد. برای این منظور رقتهای لازم از مایع فرمانتاسیون و نیز غلظتهای µg/ml 10–100 گلوکز بدون آب تهیه و محلولهای آماده شده فوق با محلول 5 درصد فنل و اسید سولفوریک مجاور شده و میزان جذب نمونه ها در طول موج 490 nm به کمک اسپکتروفتومتر (Shimadzu, UV160A, Japan) اندازه-گیری گردید. سپس غلظت تام قند در نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد حاصل از غلظتهای ذکر شده گلوکز محاسبه گردید (4).

سنجش کلاولانیک اسید: برای سنجش کلاولانیک اسید، با کمی تغییرات از روش تهیه مشتق ایمیدازولی کلاولانیک اسید استفاده شد (7). بدین منظور ابتدا نمونه‌های فرمانتاسیون به مدت 15 دقیقه در 4000 دور سانتریفوژ و مایع رویی جدا شده و به منظور پروتئین زدایی، با افزودن HCl (1N) pH آن در2/7 ± 0/1 تنظیم شد. سپس نمونه‌ها به مدت 15 دقیقه در 4000 دور سانتریفوژ شده تا اغلب پروتئینهای موجود در نمونه ته‌نشین شوند. به منظور تهیه مشتق ایمیدازولی کلاولانیک اسید در نمونه ها، 2ml از مایع رویی با 0/5 ml از محلول ایمیدازول ترکیب شده و به مدت 15 دقیقه در دمای آزمایشگاه گذاشته شد. سپس به دستگاه HPLC تزریق و غلظت مشتق ایمیدازولی کلاولانیک اسید در 311 nm سنجیده شده است. دستگاه HPLC به کار رفته از نوع (Adept 4900, Cecil, UK) مجهز به دتکتور UV (CE4200, Cecil, UK) وستون فاز معکوس C18 (250×4.6 Hichrom UK) بوده

Archive of SID

www.SID.ir

است. فاز متحرک، مخلوط متانول (30 درصد) و بافر فسفات (70 درصد) بوده و برای تهیه منحنی استاندارد از کلاولانیک اسید تهیه شده توسط شرکت دارو سازی کوثر، تهران، ایران استفاده شد.

تکرار پذیری و آنالیز داده ها: هر یک از تیمارهای انجام شده در شرایط یکسان و 3 بچ مستقل تکرار شده و میانگین داده‌ها پس از محاسبه انحراف معیار در شکلهای مربوطه نشان داده شده است. برای مقایسه معنادار بودن میانگین داده‌ها با یکدیگر از آنالیز یکطرفه واریانسها و آزمون توکی استفاده گردیده است. برای آنالیز داده‌های تخمیر از مدل موناد و روابط زیر استفاده شده است: شدت رشد ($r_x=$,dx/dt شدت ویژه رشد $\mu= r_x /\overline{x}$ ( )، شدت مصرف سوبسترا $r_s= -ds/dt$ ( )، شدت ویژه مصرف سوبسترا ($q_s= r_s /\overline{x}$) ، شدت تولید محصول ($r_p=dp/dt$)، شدت ویژه تولید محصول ($q_p= r_p/\overline{x}$)، بازده محصول تولید شده نسبت به بیوماس تولید شده ($Y_{p/x}=\Delta p/\Delta x$) و بازده محصول تولید شده نسبت به سوبسترای مصرف شده ($Y_{p/s}=\Delta p/-\Delta s$).

نتایج

در این پژوهش ابتدا اثر غلظتهای مختلف اکسیژن محلول (10، 20، 30 و 40 درصد اشباع) و سپس اثر دورهای مختلف همزن (200 rpm، 400، 500 ، 600، 700 و 800) دررشد *Streptomyces clavuligerus* DSM738 و تولید کلاولانیک اسید مورد مطالعه قرار گرفت.

بررسی اثر غلظتهای مختلف اکسیژن محلول روی رشد سلولی: بررسی رشد سلولی در غلظتهای مختلف اکسیژن محلول و دور همزن 400rpm، با اندازه‌گیری وزن خشک سلولی انجام و نتایج آن در شکل (1) نشان داده شده است. بیشترین میزان رشد سلولی در محیط دارای اکسیژن محلول 40 درصد (در پایان روز دوم) و کمترین آن در 10 درصد (در پایان روز سوم) به دست آمده است.

بررسی اثر دورهای مختلف همزن در رشد سلول: در شکل(2) اثر دورهای مختلف همزن در رشد سلول، در محیط دارای غلظت ثابت اکسیژن محلول 20 درصد مشاهده می‌شود. به جز حالت 200rpm، که حداکثر میزان رشد سلولی در روز سوم به دست آمده، در بقیه شرایط مطالعه شده، بیشترین میزان بیوماس تولید شده در پایان روز دوم تخمیر مشاهده شده است. همچنین دیده شده که با افزایش دور همزن، مقدار بیوماس به میزان قابل توجهی زیاد می‌شود. بیشترین مقدار بیوماس به مقدار (g/l) 1/96 در 800 rpm در روز دوم به دست آمده است. ولی در این شرایط در روزهای بعد مقدار بیوماس شدیداً کاهش می-یابد. کمترین میزان رشد سلولی به مقدار (g/l) 1/3 ، در 200 rpm و در پایان روز سوم به دست آمده است.

بررسی اثر غلظتهای مختلف اکسیژن محلول در تغییرات pH : تغییرات میزان pH محیط کشت در طول فرآیند در شکل(3) نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می-شود با تجزیه ترکیبات قندی محیط کشت در طی سه روز اول فرآیند pH محیط کاهش یافته و در حالت غلظت اکسیژن محلول 40 درصد با 1/1 واحد کاهش بیشترین مقدار کاهش را داشته است. میزان pH بتدریج در طی روزهای چهارم تا ششم افزایش یافته و با افزایش غلظت اکسیژن محلول، مقدار pH محیط کشت کاهش بیشتر و نیز میزان رشد سلولی افزایش بیشتر یافته است.

بررسی اثر دورهای مختلف همزن در تغییرات pH : در شکل(4) تغییرات pH مایع تخمیر طی رشد *S. clavuligerus* در دورهای مختلف همزن مشاهده می‌شود. کمترین تغییرات pH مربوط به 200 rpm و بیشترین آن مربوط به 800 rpm است. ولی تغییرات pH در دورهای 400-600 rpm در یک زمان معین (به عنوان مثال 48) با یکدیگر معنی دار نبوده است (P value<0.03).

Archive of SID

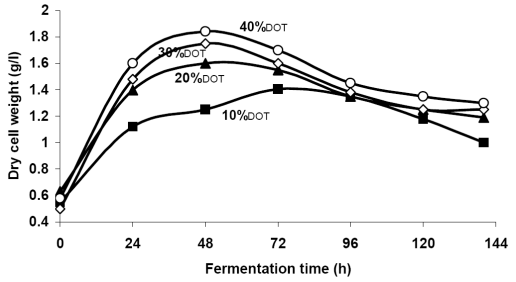
www.SID.ir

بررسی اثر غلظتهای مختلف اکسیژن محلول برروی سوبسترای باقیمانده: در شکل (5) میزان قند باقیمانده اندازه گیری شده در محیطهای دارای غلظتهای مختلف اکسیژن محلول نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود تغییرات قند باقیمانده متناسب با تغییرات pH و رشد سلولی بوده و در بین روزهای دوم و سوم همراه با کاهش شدید کربوهیدراتهای محیط کشت، افزایش بیوماس (شکل1) و کاهش pH (شکل3) مشاهده شده است. در روز چهارم، کمترین مقدار کربوهیدرات باقیمانده در غلظت اکسیژن محلول 40 درصد و بیشترین آن در 10 درصد مشاهده شد. ولی در روزهای بعد در همه شرایط دارای DOT 20 درصد و بالاتر مقدار سوبسترای باقیمانده ناچیز بوده است.

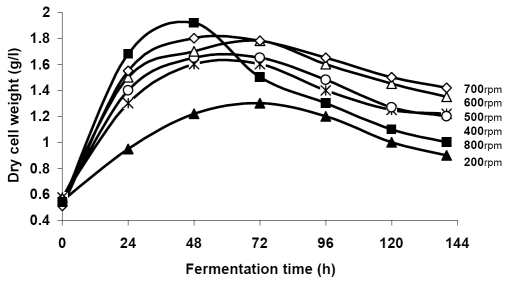
بررسی اثر دورهای مختلف همزن در سوبسترای باقیمانده: در شکل (6) تغییرات قند باقیمانده محیط کشت در دورهای مختلف همزن مشاهده می‌شود. با افزایش دور همزن سرعت مصرف سوبسترا افزایش پیدا کرده که با توجه به افزایش میزان انتقال جرم همزمان با افزایش دور همزن منطقی به نظر می‌رسد. بیشترین شدت مصرف کربوهیدرات در روزهای دوم و سوم تخمیر مشاهده شده که متناسب با کاهش pH (شکل 4) و افزایش رشد سلولی (شکل 2) در محیط تخمیر است.

بررسی اثر غلظتهای مختلف اکسیژن محلول در تولید کلاولانیک اسید: کلاولانیک اسید یک آنتی‌بیوتیک ناپایدار است که در ضمن تولید و بعد از آن بسرعت در مایع فرمانتاسیون تجزیه می شود (5). به همین منظور میزان کلاولانیک اسید تولید شده به صورت روزانه اندازه گیری شد. شکل(7) میزان تولید کلاولانیک اسید را در غلظتهای مختلف اکسیژن محلول در دور همزن 400rpm نشان می دهد. حداکثر میزان تولید در پایان روز چهارم ودر غلظتهای 20 درصد و 30 درصد اکسیژن محلول به ترتیب با g/l 0/61 و 0/48 و کمترین مقدار آن در غلظت‌های ٪40 و ٪10 اکسیژن محلول به ترتیب با g/l 0/39 و 0/28 به دست آمده است.

بررسی اثر دورهای مختلف همزن در تولید کلاولانیک اسید: در شکل (8) میزان تولید کلاولانیک اسید در دورهای مختلف همزن نشان داده شده است. با افزایش دور همزن تا 700 rpm میزان تولید آنتی‌بیوتیک افزایش پیدا کرده و بیشترین غلظت کلاولانیک اسید mg/l 0/85 در روز پنجم و در 700 rpm به دست آمده است. اما در دور همزن 800 rpm اثر منفی شدیدی بر رشد باکتری و تولید آنتی‌بیوتیک خصوصاً از روز دوم به بعد مشاهده شد. در دورهای همزن 400 rpm و 500 حداکثر میزان تولید کلاولانیک اسید در پایان روز چهارم و در 600 و 700 rpm در پایان روز پنجم مشاهده شده است.



شکل 1- اثر غلظت‌های مختلف اکسیژن محلول در رشد *S. clavuligerus* DSM738 در دور همزن 400rpm. (■) DOT:40%. (○) DOT: 30% (◇) DOT: 20% (▲)، DOT:10%



شکل 2- اثر دورهای مختلف همزن در رشد *S. clavuligerus* DSM738 در محیط دارای ٪20 اکسیژن محلول rpm:200(▲).rpm:800(■), rpm:700(◇), rpm:600(Δ), rpm:500(O), rpm:400(∗),

www.SID.ir

بررسی اثر دورهای مختلف همزن و میزان اکسیژن محلول در مورفولوژی *S.clavuligerus* : مورفولوژی *S. clavuligerus* عامل مهمی در فرآیند تخمیر بوده و وجود مورفولوژی مطلوب برای تولید حداکثر آنتی‌بیوتیک لازم است. نتایج بررسی رابطه مورفولوژی *S. clavuligerus* و ارتباط آن با تغییر میزان اکسیژن محلول و دور همزن در شکل (9) ارائه شده است. در غلظت اکسیژن محلول 10 درصد مورفولوژی میسلیوم‌ها به شکل متراکم (Pellet) دیده شده است. با افزایش میزان دور همزن و افزایش رشد سلول (شکل2) کاهش محسوسی در طول میسلیوم اصلی *S. clavuligerus* مشاهده شده که احتمالاً نتیجه شکسته شدن میسلیوم‌ها در اثر افزایش نیروی برش حاصل از همزن است. مورفولوژی متراکم در دور همزن 200 rpm و 400 rpm نیز دیده شده ولی مقدار آن در دور همزن rpm 400 بسیار کمتر از مقدار مشاهده شده در 200 rpm بوده است. مورفولوژی در دور همزن بیش از 400 rpm به شکل پراکنده (disperse) بوده است. به استثنای شرایط دارای اکسیژن محلول 10 درصد و دور همزن 200 rpm ، در بقیه شرایط مطالعه شده، بیشترین میزان بیوماس در پایان روز دوم مشاهده شده که در این حالت میسلیوم اصلی به همراه شاخه‌های اطراف آن کاملاً رشد کرده و یک منظره کلاف‌مانند را ایجاد کرده اند. همچنین مشاهده شده که با افزایش میزان اکسیژن محلول، دوره سکون (lag phase) رشد از 8 ساعت در 20 درصد اکسیژن محلول به 4 ساعت در 40 درصد اکسیژن محلول کاهش یافته و همزمان با افزایش بیوماس طول میسلیوم اصلی کاهش یافته و در مقابل بر تعداد انشعابات آن افزوده شده است.

جدول 1- مقایسه عوامل مختلف تخمیر کلاولانیک اسید توسط *S. clavuligerus* در شرایط مختلف دورهمزن و غلظت اکسیژن محلول

بچ	V_{tip}	DOT	rpm	r_x	r_s	r_p	μ	q_s	q_p	$Y_{p/x}$	$Y_{p/s}$
1	1/6	٪10	400	0/468	2/6	56	3/28	4/41	95/08	237/69	21/54
2	1/6	٪20	400	0/8	4	152/5	5/93	5/92	225/93	361/85	38/12
3	1/6	٪30	400	0/875	5	160	6/68	6/25	200	300	32
4	1/6	٪40	400	0/92	5/2	130	7/08	6/12	152/94	229/41	23/46
5	0/8	٪20	200	0/43	2/1	30	2/46	4/2	60	115/38	14/29
6	1/6	٪20	400	0/8	4	150/11	5/33	5/71	214/44	375/28	37/53
7	2	٪20	500	0/83	3/875	157/5	6/64	5/24	212/84	381/82	38/18
8	2/4	٪20	600	0/85	4/3	162/5	7/08	5/38	203/12	382/35	36/52
9	2/8	٪20	700	0/9	4/3	187/5	7/2	5/22	227/27	416/67	42/13
10	3/2	٪20	800	0/95	6	116/66	9/6	8	155/54	182/29	19/44

V_{tip} سرعت نوک پروانه، DOT میزان اکسیژن محلول، rpm میزان دور همزن، r_x شدت رشد، r_s شدت مصرف سوبسترا، r_p شدت تولید محصول، μ شدت ویژه رشد، q_s شدت ویژه مصرف سوبسترا، q_p شدت ویژه تولید محصول، $Y_{p/x}$ بازده تولید محصول تولید شده نسبت به بیوماس تولید شده، $Y_{p/s}$ بازده تولید محصول تولید شده نسبت سوبسترای مصرف شده. این داده ها مربوط به زمانهای ابتدای تخمیر (t_0) و زمان رسیدن به حداکثر تولید آنتی‌بیوتیک است که در بیشتر موارد روز چهارم تخمیر (t_{96}) بوده است.

بحث

اثر میزان اکسیژن محلول بر تولید کلاولانیک اسید: باکتری *S. clavuligerus* بشدت هوازی و حساس در برابر

Archive of SID
www.SID.ir

نیروی برش حاصل از همزن حساس است (9). با توجه به اهمیت فراوان اکسیژن محلول و میزان دور همزن در رشد و تولید کلاولانیک اسید، بهینه سازی این عوامل برای رسیدن به حداکثر میزان رشد و تولید از جمله مهمترین پیش نیازهای تولید صنعتی در فرمانتور به شمار می‌آید. در تنها مطالعه مستقیم انجام شده دراین ارتباط توسط Rosa و همکاران، اثر اکسیژن محلول در دو حالت بدون کنترل غلظت اکسیژن محلول وغلظت اکسیژن محلول 50 درصد در یک محیط کمپلکس حاوی پروتئینهای سویا و عصاره مالت به عنوان ترکیبات اصلی بررسی و عنوان شده که میزان اکسیژن محلول تأثیر چندانی بر روی تولید کلاولانیک اسید ندارد (16). ولی در سایر پژوهشهای انجام شده روی *S. clavuligerus* اکسیژن محلول یک عامل کلیدی دانسته شده است (3، 14، 15و18). با توجه به اینکه در اغلب این گزارشها هدف تولید آنتی بیوتیک سفامایسین C بوده و با توجه به محدود بودن شرایط مطالعه شده در پژوهش Rosa و همکاران (2005)، در پژوهش کنونی اثر غلظتهای مختلف اکسیژن محلول در تولید کلاولانیک اسید بررسی شده است. که در جدول (1) تأثیر این عوامل به اختصار آورده شده است.

با مقایسه داده های مربوط به شدت رشد و شدت ویژه رشد *S. clavuligerus* با میزان DOT در جدول (1) می توان نتیجه گرفت که رشد سلولی با میزان اکسیژن محلول رابطه مستقیم دارد و با افزایش غلظت اکسیژن میزان بیوماس نیز بیشتر می شود. به گونه ای که شدت ویژه رشد در غلظت اکسیژن محلول 40 درصد به ترتیب 6 و 19 درصد از داده های مربوط به غلظتهای 30 و 20 درصد بیشتر است. ولی مقایسه داده های فوق با داده های مربوط به شدت تولید محصول و شدت ویژه تولید محصول در جدول (1) نشان می دهد که این افزایش رشد الزاماً همراه با افزایش تولید آنتی‌بیوتیک نیست و شدت ویژه تولید محصول در غلظت اکسیژن 20 درصد به ترتیب 13 و 47 درصد از داده های مربوط به غلظتهای اکسیژن محلول 30 و 40 درصد بیشتر است. مقایسه داده های بازده تولید به سوبسترای مصرف شده نشان می دهد که افزایش غلظت اکسیژن محلول بیش از 20 درصد موجب کاهش $Y_{p/s}$شده است. همچنین مقایسه میزان قند باقیمانده در شرایط مختلف نشان می‌دهد که مصرف بیشتر سوبسترای کربوهیدراتی در سه روز اول فرآیند دلیل اصلی کاهش pH همراه با افزایش اکسیژن محلول و رشد سلولی بیشتر در غلظتهای اکسیژن بالاتر بوده است (شکل 5). با توجه به شکل 5 و 7 می‌توان نتیجه گرفت که شروع سنتز سریع آنتی‌بیوتیک در روز دوم فرایند همراه با شروع کاهش شدید و محدود شدن سوبسترای کربوهیدراتی است. همچنین در نتایج به دست آمده قبلی اشاره شده که اکسیژن محلول در القاء آنزیمهای بیوسنتز سفامایسین C نقش مهمی دارد (15). همچنین یافته‌ها نشان می دهد که سه مرحله از 8 مرحله بیوسنتز کلاولانیک اسید، که توسط آنزیم کلاوامینات‌سنتتاز(CAS) کاتالیز می شود، نیازمند اکسیژن مولکولی است (10). نتایج به دست آمده در این پژوهش نیز نشانگر اهمیت فراوان غلظت اکسیژن محلول در تولید کلاولانیک اسید است. ولی بر خلاف بیوسنتز سفامایسین C که مقدار تولید با غلظت اکسیژن محلول رابطه مستقیم دارد در بیوسنتز کلاولانیک اسید این رابطه خطی نیست. در هر صورت برخلاف نتایج فوق، Rosa و همکاران (2005) گزارش کرده اند که میزان اکسیژن محلول تأثیر چندانی در تولید کلاولانیک اسید ندارد (16). ولی این نتیجه گیری فقط با مقایسه میزان کلاولانیک اسید تولید شده در دو حالت بدون کنترل غلظت اکسیژن محلول و غلظت اکسیژن محلول 50 درصد به دست آمده است. در پژوهش آنها برای کنترل میزان اکسیژن محلول، دور همزن در طول فرایند متغیر بوده شده است.

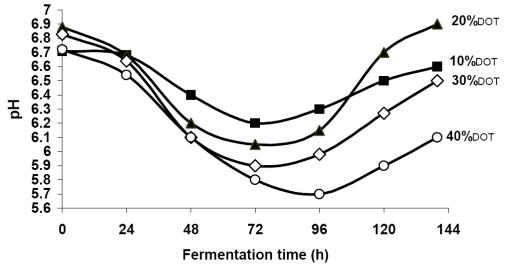
از جمله عوامل دیگر در مورد کاهش میزان کلاولانیک اسید در غلظت اکسیژن محلول زیاد، می‌توان به تشکیل کف و ناهمگن شدن محیط در شرایط هوادهی شدید و

Archive of SID

www.SID.ir

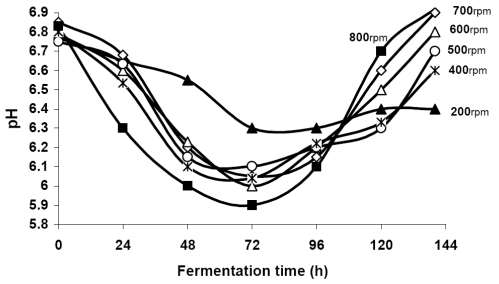
مصرف سوبسترای محیط کشت در جهت رشد سلول بیشتر به جای سنتز آنتی‌بیوتیک اشاره کرد.

اثر دورهای همزن مختلف در تولید کلاولانیک اسید: همزدن مطلوب مایع تخمیر با تأثیر مستقیم بر شاخصهای انتقال مواد در فرمانتور اهمیت زیادی در افزایش تولید فرآورده های بیوتکنولوژیک دارد. اما نیروی حاصل از همزدن شدید می‌تواند با شکستن سلولها تأثیر منفی زیادی در رشد و تولید محصول به ویژه در تخمیرهای حاوی میکروارگانیسم‌های رشته‌ای داشته باشد (8). اگرچه Rosa و همکاران (2005) اعلام کرده اند که *S. clavuligerus* به برش حساس نیست و با افزایش دور همزن حتی تا rpm 1000 نیز تولید افزایش پیدا می‌کند (16)، ولی گزارشهای دیگر نشانگر حساسیت *S. clavuligerus* به نیروی برش است (9 و13).



شکل 3- اثر غلظت‌های مختلف اکسیژن محلول روی تغییرات pH در طی تخمیر *S. clavuligerus* DSM738 . در دورهمزن 400rpm. DOT: 30% (◇) .DOT: 20% (▲). DOT:10% (■) . DOT:40% (O)

خلاصه نتایج اثر دور همزن در رشد و تولید کلاولانیک اسید در جدول (1) ارائه شده است. بر اساس یافته های این پژوهش می توان عنوان کرد که دور همزن 700rpm با بیشترین میزان بازده تولید کلاولانیک اسید نسبت به بیوماس تولید شده ($Y_{p/x}$=416/67) و بالاترین بازده تولید آنتی بیوتیک نسبت در مقابل سوبسترا مصرف شده ($Y_{p/s}$= 42/13) حالت بهینه برای تولید کلاولانیک است. از سوی دیگر سرعت رشد در دور 800rpm پس از روز دوم کاهش سریعی می‌یابد (شکل2) که می‌تواند ناشی از اثر منفی نیروی برش روی رشد سلولی باشد (1). بررسی مورفولوژی باکتری در این دور همزن نیز ادعای فوق را تایید می‌کند (شکل9). متلاشی شدن رشته‌ها در 800rpm موجب کاهش شدید بازده تولید محصول به ازای بیوماس تولید شده، به طوری که این نسبت ($Y_{p/x}$) به میزان 2/3 برابر نسبت به دورهمزن 700rpm کاهش یافته است (جدول 1). بر اساس نتایج به دست آمده مشخص شده است که کاهش شدید قند باقیمانده در اوایل فرآیند تخمیر منجربه کاهش pH محیط کشت شده است (شکلهای3 تا 6). افزایش pH مشاهده شده از روز سوم به بعد می‌تواند نتیجه مصرف سوبستراهای پروتئینی محیط کشت باشد (17). از سوی دیگر مقایسه شکلهای (6) و (8) نشان می دهد که شروع سنتز سریع آنتی‌بیوتیک با کاهش شدید قند باقیمانده همراه است. این مشاهده با نتایج به دست آمده در مطالعات سایر پژوهشگران نیز مطابقت دارد (16).

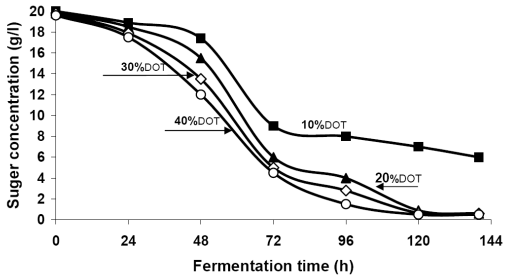


شکل 4- اثر دورهای مختلف همزن روی تغییرات pH در تخمیر *S. clavuligerus* DSM738 در محیط دارای 20٪ اکسیژن محلول rpm:200(▲).rpm:800(■), rpm:700(◇), rpm:600(Δ), rpm:500(O) rpm:400(∗),

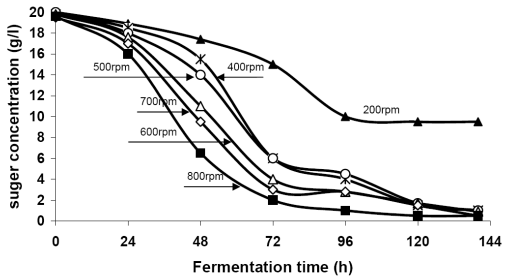
مطالعات مختلفی در مورد اثرات فیزیولوژیک و مورفولوژیک دورهای مختلف همزن در رشد *S. clavuligerus* و تولید کلاولانیک صورت گرفته و نتایج متفاوتی نیز ارائه شده است (3، 9، 13 و16). در بیشتر این مطالعات بین رشد سلولی *S. clavuligerus* و افزایش دورهمزن یک ارتباط مستقیم گزارش شده است که با توجه اینکه افزایش دورهمزن موجب افزایش مواد غذایی

www.SID.ir

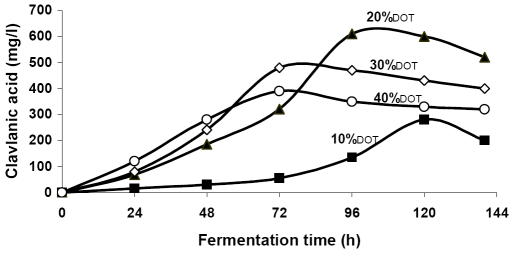
در دسترس و انتقال حرارت و اکسیژن بهتر به میکرارگانیسم‌ها می‌شود این روند منطقی به نظر می‌رسد. ولی باید توجه داشت که در بیشتر این مطالعات نیز در دورهای بالای همزن یک ارتباط معکوس بین دور همزن و رشد سلولی گزارش شده است که این حالت می‌تواند در نتیجه مستقیم نیروی منفی برش حاصل از همزن در دورهای بالا باشد (3،9 و 13).



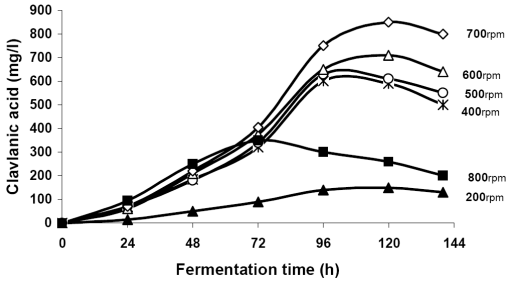
شکل 5- اثر غلظت‌های مختلف اکسیژن محلول در تغییرات سوبسترای باقیمانده در تخمیر *S. clavuligerus* DSM738 در دورهمزن 400rpm. (■) DOT:10% (▲) DOT: 20% (◇) DOT: 30% (O) DOT:40%.



شکل 6- اثر دورهای مختلف همزن روی تغییرات قند باقیمانده در تخمیر *S. clavuligerus* DSM738 در محیط دارای 2٪ اکسیژن محلول. rpm:200(▲).rpm:800(■), rpm:700(◇), rpm:600(Δ) rpm:500(O), rpm:400(∗).



شکل 7- اثر غلظت‌های مختلف اکسیژن محلول در تولید کلاولانیک اسید در تخمیر *S. clavuligerus* DSM738 در دورهمزن 400rpm. DOT: 20% (▲). DOT:10% (■). DOT: 30% (◇). DOT:40% (O).

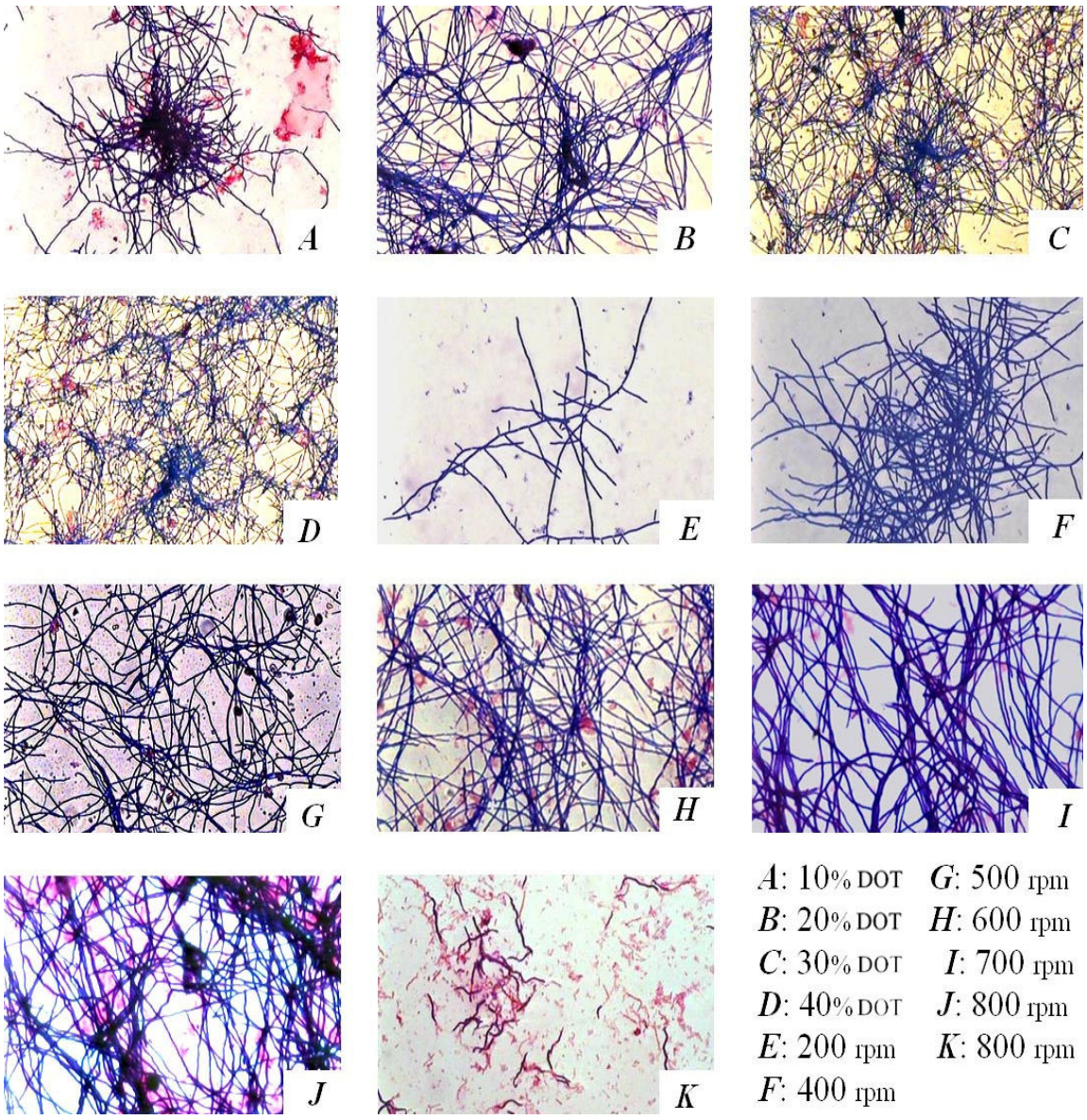


شکل 8- اثر دورهای مختلف همزن در تولید کلاولانیک اسید در تخمیر *S. clavuligerus* DSM738 در محیط دارای 2٪ اکسیژن محلول. rpm:200(▲).rpm:800(■), rpm:700(◇), rpm:600(Δ), rpm:500(O) rpm:400(∗).

ارتباط دورهای همزن مختلف و غلظتهای مختلف اکسیژن محلول با مورفولوژی: در این مطالعه مورفولوژی باکتری در دورهای مختلف همزن بررسی شده است (شکل9). بیشترین مقدار آنتی‌بیوتیک در روز چهارم و پنجم مشاهده شده که باکتری در پایان دوره رشد خود قرار گرفته و میسلیوم اصلی به قطعات کوچکتر شکسته شده بودند که اندازه آن با افزایش دور همزن کاهش بیشتری نشان داده است. براساس نتایج به دست آمده لیز سلولی ناشی از برش در دورهای همزن بیشتر از 600 rpm مشاهده شد ولی در دور همزن 800 rpm پس از رشد سریع و تراکم بسیار بالای میسلیوم‌های باکتری در دو روز اول، در روزهای بعد میسلیوم‌ها بسرعت قطعه قطعه شده است. دلیل کاهش شدید تولید آنتی‌بیوتیک در این دور

Archive of SID
www.SID.ir

همزن (800 rpm) می تواند ناشی از همین تجزیه شدن گسترده میسلیوم‌ها در اثر دور همزن بالا باشد (1و12). بر اساس نتایج مورفولوژیک می‌توان نتیجه گرفت که شکستن میسلیوم‌های جوان دارای قطر زیاد و طول میسلیومی بالا و کاملاً رنگ‌پذیر و با انشعابات کم که معمولاً در طول و انتهای فاز رشد باکتری دیده می‌شوند منجربه کاهش قابل ملاحظه تولید کلاولانیک اسید می‌شود. لازم به ذکر است که برای شکستن این میسلیوم‌های جوان نیاز به نیروی برش بالایی است که در این پژوهش فقط در دور همزن 800 rpm چنین حالتی مشاهده شد.



شکل9- بررسی اثر دورهای مختلف همزن و میزان اکسیژن محلول در مورفولوژی *S. clavuligerus* DSM738 . A-J نمونه های گرفته شده در پایان روز دوم فرایند، K میسلیوم‌های لیز شده در روز چهارم در دور همزن 800 rpm.

در نهایت می توان گفت بهترین غلظت اکسیژن محلول 20 درصد حالت اشباع و بهترین دور همزن 700rpm است. *S. clavuligerus* مثل سایر اکتینومایست‌ها یک باکتری حساس به برش است و دور همزن بیشتر از 700 rpm

www.SID.ir

باعث اثرات نامطلوب روی رشد باکتری و کاهش شدید تولید آنتی‌بیوتیک می‌شود. بهترین مورفولوژی برای تولید کلاولانیک اسید حالت میسلیوم‌های پراکنده است. افزایش دور همزن و غلظت اکسیژن از حدود بهینه موجب افزایش بیوماس به هزینه کاهش تولید آنتی بیوتیک می شود. همچنین طول دوره فرآیند با در نظر گرفتن داده های فوق و ارزش افزوده بسیار بالای کلاولانیک اسید نسبت به مواد اولیه مورد استفاده در فرآیند، 4 روز پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی: این پژوهش با استفاده از اعتبارات طرح پژوهشی مصوب دانشگاه تهران به شماره 6104001/1/01 انجام شده، که بدینوسیله قدردانی و تشکر می شود. از شرکت داروسازی کوثر برای در اختیار گذاشتن کلاولانیک اسید استاندارد سپاسگزاری می گردد.

منابع

1- حامدی، ج.، مقیمی، ح.، صرافزاده، م.، کفاشی، ب.، (1378) سنجش میزان رشد Streptomyces clavuligerus در محیط تولید کلاولانیک اسید با استفاده از معیار ثابت غلظت، فصل نامه علمی- پژوهشی شیمی و مهندسی ایران، پذیرش نهایی برای چاپ.

2 - Baptista, Neto, A., Gouveia, E. R., Badino, A.C., Hokka, C.O., (2000) *Phenomenological model of the clavulanic acid production process utilizing Streptomyces clavuligerus*. Braz. J. Chem. Eng. **17**:809–818

3 - Belmar-Beiny, M.T,. Thomas, C. R,. (1991) *Morphology and clavulanic acid production of Streptomyces clavuligerus: effect of stirrer speed in batch fermentations.* Biotechnol. Bioeng. **37**:456– 462

4 - Benslimane, C., Lebrihi, A., Lounes, A., Lefebvre, G., and Germain, P., (1995) "*Influence of dextrin on the assimilation of yeast extract amino acids culture of Streptomyces ambofaciens producer of spiramycin*", Enz. Microbial Technol**. 17**: 1003-1013

5 - Bersanettia P.A., Almeidab R.M.R.G., Barbozac M., Araujoa M.L.G.C., Hokkab CO., (2005*) Kinetic studies on clavulanic acid degradation.* Biochem Eng J. **23**: 31-36.

6 - Bushell, ME., Kirk, S., Zhao, HJ., Avignone-Rossa, C.A., (2006) "*Manipulation of the physiology of clavulanic acid biosynthesis with the aid of metabolic flux analysis*" Enzyme Microb Technol**. 39**: 149-157

7 - Foulstone, M., Reading, C., (1982) *Assay of amoxicillin and clavulanic acid, the components of Augmentin, in biological fluids with HPLC*. Antimicrob. Agents. Chemother. **22**: 753–762

8 - Joshi, J. B., Elias, C. B,. Patole M. S,. (1996) *Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells***.** Chem. Eng. J**,**. **62**: 121-141

9 - Large, K. P,. Ison, A. P,. Williams, D.J,. (1998) *The effect of agitation rate on lipid utilisation and clavulanic acid production in Streptomyces clavuligerus*. J Biotechnol **63**:111–119

10 - Liras, P,. Rodriguez-Garcia, A,. (2000) *Clavulanic acid a beta-lactamase inhibitor: biosynthesis and molecular genetics*. Appl Microbiol Biotechnol**. 54**:467-475

11 - O'Cleirig, C,. Casey, JT., Walsh, PK., O'Shea., (2005) "*Morphological engineering of Streptomyces hygroscopicus var. geldanus: regulation of pellet morphology through manipulation of broth viscosity*" Appl. Microbiol. Biotechnol, **68**: 305-31

12 - Pinto, L.S., Vieira, L.M., Pons, M. N., Fonseca, M. M. R., Menezes, J. C., (2004) *Morphology and viability analysis of Streptomyces clavuligerus in industrial cultivation systems*. Bioprocess. Biosyst. Eng. **26**: 177–184

13 - Roubos, J. A,. Krabben, P,. Luiten, R. G. M,. Verbruggen, H. B,. Heijnen, J. J,. (2001) *A quantitative approach to characterizing cell lysis caused by agitation of Streptomyces clavuligeurs*. Biotechnol. Prog. **17**:336–347

14 - Rollins, M.J., Jensen, S.E., Westlake, D.W.S., (1988) *Effect of aeration on antibiotic production by Streptomyces clavuligerus*. J. Ind. Microbiol. **3**: 357–364

15 - Rollins, M.J., Jensen, S.E., Westlake, D.W.S., (1991) *Effect of dissolved oxygen level on the ACV synthetase synthesis and activity during growth of Streptomyces clavuligerus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **35**: 83–88

Archive of SID
www.SID.ir

by Streptomyces clavuligerus. Process Biochem **40**:1161-1166.

18 - Yegneswaran, P.K., Gray, M.R., Westlake, D.W.S., (1988) *Effects of reduced oxygen on growth and antibiotic production in Streptomyces clavuligerus*. Biotechnol. Lett. **10:** 479–484

16 - Rosa, J. C., Baptista Neto, A., Hokka, C. O., Badino.A. C., (2005) *Influence of dissolved oxygen and shear conditions on clavulanic acid production by Streptomyces clavuligerus.* Bioprocess. Biosyst. Eng. **27**: 99–104

17 - Wang Y.H., Yang B., Ren J., Dong M. L, Liang D, Xu A. L., (2005) *Optimization of medium compostion for the production of clavulanic acid*

Enhancing of clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* by optimization of dissolved oxygen concentration and agitation rate

Hamedi J., Moghimi H., and Abbasi Rohollahi A.

Microbiology Dept., School of Biology, College of Sciences, University of Tehran, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Clavulanic acid (CA) is a useful antibiotic that is produced by *Streptomyces clavuligerus*, in conventional agitated and aerated fermenters. This filamentous bacterium is strictly aerobic and very sensitive to shear force. Dissolved oxygen tension (DOT) level and mixing have remarkable effect on CA production. In the present study, the effect of various stirrer speeds and DOT concentrations on CA production by *S. clavuligerus* DSM738 was investigated. The results showed that the highest CA production (0.61g/l) was obtained when the DOT was controlled at 20% DOT. The highest CA production (0.85 g/l) was obtained when the agitation rate was controlled at 700 rpm. When stirrer speed was increased than 700 rpm, the CA production was decreased drastically. In the medium containing more than 20% DOT, more growth of the strain was seen, but the concentration of the antibiotic was decreased. In the media with 200 rpm and DOT 10%, the growth of the strain and CA production was decreased drastically.

Keywords: Clavulanic acid, *Streptomyces clavuligerus*, Dissolved oxygen tension, Agitation rate

Archive of SID

www.SID.ir