Archive of SID

بهینه‌سازی شرایط تولید آنتی‌بیوتیک نئومایسین از *استرپتومایسس فرادیا* به روش تاگوچی

*منوچهر وثوقی**+، *اخترالملوک کاظمی*، *سارا طهرانیان*، *علی ضرابی*

تهران، دانشگاه صنعتی شریف، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، مرکز تحقیقات مهندسی بیوشیمی و کنترل محیط زیست

چکیده: *تولید آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از زمینه‌های مهم در بیوتکنولوژی (فناوری حیاتی) است و تلاش‌های زیادی برای بهینه‌سازی فرایند تولید آنتی‌بیوتیک‌های متفاوت صورت گرفته است. نئومایسین یکی از آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی مهم است که در صنایع دارویی به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این پژوهش، تولید آنتی‌بیوتیک نئومایسین از استرپتومایسس فرادیا مورد بررسی قرار گرفته است. فاکتورهایی که بررسی شده‌اند عبارت‌اند از: ترکیب محیط کشت که محیط نشاسته‌ای به دلیل وجود منبع کربن پلی‌ساکاریدی مناسب‌تر تشخیص داده شد، مقدار pH بهینه برابر ۷، دما ۳۰ درجه سانتی گراد به دست آمد و شدت هم‌زدن در تکان‌دهنده الکتریکی ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۷۲ ساعت ولی در فرمانتور ۵ لیتری دور هم‌زن معادل ۴۰۰ دور در دقیقه با شدت هوادهی ۰٫۵ VVM در مدت ۱۴۴ ساعت (با شرایط بهینه یکسان) در بهترین شرایط، بیشترین تولید به ۳۷۶۰ میلی‌گرم در لیتر. برای بهینه‌سازی شرایط تولید از روش آماری تاگوچی استفاده شده است. نتیجه‌های به‌دست‌آمده نشان دادند که فاکتورهای محیط کشت (کنجاله سویا، منیزیم سولفات ۷ آبه، نشاسته) و pH موثرترین فاکتورها در تولید این آنتی‌بیوتیک هستند.*

واژه‌های کلیدی: *نئومایسین، استرپتومایسس فرادیا، روش تاگوچی، تولید، بهینه‌سازی .*

KEY WORDS: *Neomycin, Streptomyces fradiae, Taguchi method, Production, Optimization.*

مقدمه

آنتی‌بیوتیک نئومایسین ابتدا از *استرپتومایسس فرادیه*(۱) توسط *Waksman* و *Lechevalier* [۱] جدا شد و در سال‌های اخیر یک نوع جدید *استرپتومایسس مارینیسس*(۲) که قابلیت تولید نئومایسین را دارد جدا شده است [۲].

نئومایسین یکی از آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی مهم است که مانند همه آمینوگلیکوزیدها به صورت ترکیبی از آنتی‌بیوتیک‌هایی با ساختار شیمیایی مشابه تولید می‌شود.

آمینوگلیکوزیدها، آنتی‌بیوتیک‌های الیگوساکاریدی مرکب از یک بخش آمینوسیکلوهگزانول(۳) (مانند داکسی‌استرپتامین(۴) یا استرپتیدین(۵)) هستند که به قندهای آمینه دیگر متصل می‌شوند. آمینوگلیکوزیدها در مقابل باکتری‌های گرم منفی به طور وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند. نئومایسین ترکیبی است از سه جز نئومایسین A، B و C که هر کدام فعالیت ضدمیکروبی می‌کند [۳-۵].

*عهده دار مکاتبات

+E-mail: vosoughi@sharif.edu

(۱) Streptomyces fradiae

(۲) S. marinensis

(۳) Aminocyclohexanol

(۴) Deoxystreptamine

(۵) Streptidine

www.SID.ir

Archive of SID

انجام پژوهش‌هایی مشابه این پژوهش در سطح دانشگاهی و استفاده از نتیجه‌های حاصل می‌تواند زمینه‌ساز کار و تحقیق بیشتر و گسترده‌تر روی تولید آنتی‌بیوتیک‌ها در ایران باشد.

بخش تجربی

مواد و روش‌ها

در این پژوهش برای تولید آنتی‌بیوتیک نئومایسین از *استرپتومایسس فرادیا* استفاده‌شد. این سوش از DSMZ به صورت آمپول لیوفیلیزه تهیه شد[۱].

محیط پیش کشت

ترکیب محیط پیش‌کشت مورد استفاده برای تولید نئومایسین به این صورت است [۷و۸] :

نشاسته	۴۰ گرم
کنجاله سویا	۱۰ گرم
شربت ذرت	۲۵ گرم
سولفات منیزیم ۷ آبه	۲ گرم
پتاسیم هیدروژن فسفات	۰/۵ گرم
آمونیم سولفات	۱ گرم
سدیم کلرید	۱ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی‌لیتر

pH محیط کشت با استفاده از NaOH یک نرمال در ۷ تنظیم شد.

طراحی آزمایش به روش تاگوچی

طراحی آزمایش‌ها در این پژوهش طبق روش آماری تاگوچی صورت گرفت. پیش از طراحی، فاکتورهای مؤثر شناسایی شده و سطوح مورد نظر آنها تعیین شدند.

فاکتورهایی که در فرایند تولید آنتی‌بیوتیک نئومایسین در این پژوهش در نظر گرفته شده‌اند عبارت‌اند از: ترکیب محیط کشت (شامل کنجاله سویا، منیزیم سولفات ۷ آبه، نشاسته، شربت ذرت، کلسیم کربنات، آمونیم سولفات ، سدیم کلرید و پتاسیم هیدروژن فسفات)، دما، pH و دور همزن. با توجه به زیاد بودن تعداد فاکتورهایی که باید بررسی می‌شدند، انجام یک مرحله غربال کردن ضروری بود. به این معنی که ابتدا این ۱۱ فاکتور در ۲ سطح مورد بررسی قرار گرفتند (آرایه متعامد مناسب در این قسمت L-۱۲ است که در جدول ۱ نشان داده شده است) و بعد از انجام آزمایش‌ها و مشخص شدن مؤثرترین فاکتورها، بررسی آن فاکتورها در ۳ سطح صورت گرفت. تجزیه و تحلیل نتیجه‌ها در تمام مراحل با استفاده از نرم‌افزار Qualitek-۴ انجام شد.

جدول ۱ـ آرایه متعامد L-۱۲ .

ردیف آزمایش	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۲	۱	۱	۱	۱	۱	۲	۲	۲	۲	۲	۲
۳	۱	۱	۲	۲	۲	۱	۱	۱	۲	۲	۲
۴	۱	۲	۱	۲	۲	۱	۲	۲	۱	۱	۲
۵	۱	۲	۲	۱	۲	۲	۱	۲	۱	۲	۱
۶	۱	۲	۲	۲	۱	۲	۲	۱	۲	۱	۱
۷	۲	۱	۲	۲	۱	۱	۲	۲	۱	۲	۱
۸	۲	۱	۲	۱	۲	۲	۲	۱	۱	۱	۲
۹	۲	۱	۱	۲	۲	۲	۱	۲	۲	۱	۱
۱۰	۲	۲	۲	۱	۱	۱	۱	۲	۲	۱	۲
۱۱	۲	۲	۱	۲	۱	۲	۱	۱	۱	۲	۲
۱۲	۲	۱	۱	۱	۲	۱	۲	۱	۲	۲	۱

A	Soybean meal	B	$MgSO_4.7H_2O$
C	Starch	D	Shaking speed
E	C.S.L	F	pH
G	$CaCO_3$	H	Temperature
I	$(HN_4)_2SO_4$	J	NaCl
K	K_2HPO_4		

اندازه گیری نئومایسین

برای اندازه‌گیری میزان آنتی‌بیوتیک تولید شده از روش توربیدیمتریک استفاده شد [۶]. به عنوان میکرواورگانیسم، سوش *باسیلوس‌سوبتیلیس* مورد استفاده قرارگرفت. این سوش از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به صورت آمپول لیوفیلیزه تهیه شد[۲].

(۱) Streptomyces fradiae DSMZ 40705

(۲) Bacillus subtilis PTCC 1023

www.SID.ir

Archive of SID

در گذشته برای ساخت مواد معلق استاندارد از میکرواورگانیسم آزمایش، از روش‌های متفاوتی استفاده می‌شده است. بعد از سال ۱۹۸۵ میلادی، روشی که *کریشبام*[۱]، *کرامر*[۲] و *گرت*[۳] پیشنهاد دادند، در آمریکا مورد قبول واقع شد. مطابق این روش، مواد معلق میکرواورگانیسم آزمایش تا جایی رقیق می‌شود که عبور نور از آن در ۵۸۰ نانومتر ۲۵ درصد باشد. ترکیب محیط کشت برای نگه‌داری *باسیلوس سوبتیلیس* به‌عنوان میکرواورگانیسم آزمایش نئومایسین به این صورت است [۴]:

پپتون	۶ گرم
کازئین پپتون	۴ گرم
عصاره مخمر	۳ گرم
عصاره گوشت	۱/۵ گرم
دکستروز	۱ گرم
آگار	۱۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی‌لیتر

pH محیط در (۶/۵ ±۰/۲) تنظیم شد.

بعد از تقسیم در لوله‌ها و استریل کردن در اتوکلاو و آماده کردن اسلنت‌ها، *باسیلوس‌سوبتیلیس* به وسیله‌ی لوپ انتقال، از اسلنت‌های مادر به این اسلنت‌ها منتقل شد. این اسلنت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۲ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارداده‌شدند. پس از گذشت این زمان، سطح هر یک از اسلنت‌های تهیه شده با ۳ میلی‌لیتر از محلول رینگر شسته شد. مواد معلق به‌دست آمده سانتریفوژ شده و رسوب حاصل جمع‌آوری شد. این رسوب به دمای ۵۰ تا ۷۰ میلی لیتر محلول رینگر ۱/۴ اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. این مواد معلق باید در یخچال نگه‌داری شود.

محیط کشت مورد استفاده در روش توربیدیمتریک برای اندازه‌گیری نئومایسین به صورت زیر تهیه شد [۶]:

پپتون	۵ گرم
عصاره مخمر	۱/۵ گرم
عصاره گوشت	۱/۵ گرم
کلرید سدیم	۳/۵ گرم
دکستروز	۱ گرم
مونوپتاسیم فسفات	۱/۳۲ گرم
دی پتاسیم فسفات	۳/۶۸ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

pH محیط در (۷/۹ ±۰/۱) تنظیم شد.

در این پژوهش از سولفات نئومایسین ۲۰ درصد (ساخت شرکت رازک) به عنوان استاندارد نئومایسین استفاده شد. برای رسم نمودار استاندارد، مطابق با مرجع [۶] غلظت‌های ۶/۴ ، ۸ ، ۱۰، ۱۲/۵ و ۱۵/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نئومایسین در بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر ۷/۹ ±۰/۱ تهیه شد.

۱۵ لوله آزمایش برداشته و به هر سطح استاندارد ۳ لوله اختصاص داده شد. در هر لوله ۱ میلی‌لیتر از استاندارد مربوطه، ۹ میلی‌لیتر از محیط‌کشت مورد استفاده در روش توربیدیمتریک و ۰/۱۸ میلی لیتر از مواد معلق *باسیلوس‌سوبتیلیس* اضافه شد. لوله‌ها برای مدت ۳ ساعت در دمای ۳۲ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از گذشت این زمان، ۰/۵ میلی‌لیتر فرمالدهید ۱۲ درصد برای متوقف کردن رشد میکرواورگانیسم‌ها به تک تک لوله‌ها اضافه شد و در نهایت جذب در ۵۳۰ نانومتر خوانده شد. (صفر دستگاه اسپکتروفتومتر با ۹ میلی‌لیتر از محیط کشت مورد استفاده در روش توربیدیمتریک و ۰/۵ میلی لیتر فرمالدهید ۱۲ درصد تنظیم شد.)

برای اندازه‌گیری آنتی‌بیوتیک تولید شده در هر روز، از محیط کشت نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها برای جداکردن میکرواورگانیسم و سایر مواد نامحلول موجود در محیط‌کشت، سانتریفوژ شده و مایع بالایی جدا شد. ۱ میلی لیتر از مایع بالایی برداشته شده و رقت‌های متفاوتی از آن تهیه شد. سپس در چند لوله آزمایش در هر یک ۱ میلی‌لیتر از این مایع رقیق شده، ۹ میلی‌لیتر از محیط‌کشت مورد استفاده در روش توربیدیمتریک و ۰/۱۸ میلی‌لیتر از مواد معلق استاندارد *باسیلوس‌سوبتیلیس* اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۲ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از گذشت این زمان، ۰/۵ میلی‌لیتر فرمالدهید ۱۲ درصد به تک‌تک آنها اضافه شد. محتوی برخی لوله‌ها به طور کامل شفاف به نظر می رسیدند. این به آن معنی بود که هیچ‌گونه رشد میکربی در آنها وجود نداشته است. بنابراین، باید از رقت‌های بیشتر استفاده می‌شد. دستگاه اسپکتروفتومتر در هر مـورد بـا مایع رقیق شـده (به همان نسبتی که در آن مورد

(۱) Krishbaum
(۲) Kramer
(۳) Gorth

www.SID.ir

Archive of SID

رقیق شده) و ۰/۵ میلی‌لیتر فرمالدهید ۱۲ درصد صفر شد. در نهایت جذب در ۵۳۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از نمودار استاندارد و با توجه به نسبت رقیق‌سازی، میزان آنتی‌بیوتیک تولید شده به دست آمد. مواد مورد استفاده در محیط تولید نئومایسین عبارت‌اند از: کنجاله سویا، منیزیم سولفات ۷ آبه، نشاسته، شربت ذرت، کلسیم کربنات ، آمونیم سولفات ، سدیم کلرید و پتاسیم هیدروژن فسفات.

در یک ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری، ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط‌پیش‌کشت برای تولید نئومایسین ساخته شد. پس از استریل کردن در اتوکلاو انتقال *استرپتومایسس فرادیا* از محیط‌کشت جامد به محیط‌کشت مایع صورت گرفت. این ارلن به مدت ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در همزن ۱۵۰ دور بر دقیقه قرارگرفت. برای هر یک از ۱۲ سری از آزمایش‌ها که مطابق روش آماری تاگوچی طراحی شدند، در ۶ ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری (نمونه برداری طی ۶ روز متوالی از این ارلن‌ها صورت گرفت) در هرکدام ۲۰ میلی‌لیتر محیط تولید با ترکیب مطابق جدول طراحی آزمایش‌ها ساخته شد (جدول ۱) و به هر ارلن ۲ میلی‌لیتر از محیط‌پیش‌کشت انتقال داده شد. ارلن‌ها به مدت ۶ روز در همزن با دما و دور مطابق با جدول طراحی قرارگرفتند. میزان آنتی‌بیوتیک تولید شده، روزانه اندازه‌گیری شد. برای دقت بیشتر هر یک از ۱۲ سری آزمایش دو مرتبه انجام شدند و در هر مرتبه میزان آنتی‌بیوتیک تولید شده دو بار اندازه‌گیری شد و میانگین دو مقدار به عنوان مقدار آنتی‌بیوتیک تولید شده در آن مرتبه گزارش شد. جدول ۲ سطوح در نظر گرفته شده برای هر کدام از فاکتورها در مرحله غربال‌سازی را نشان می‌دهد.

نتیجه‌ها و بحث

بررسی روند تولید نئومایسین نشان داد که در تمام آزمایش‌ها، بیشترین مقدار تولید آنتی‌بیوتیک در روز چهارم بوده است. جدول ۳ بیشترین مقدارهای تولید آنتی‌بیوتیک در هر یک از ۱۲ سری آزمایش مرحله غربال‌سازی (برحسب میلی‌گرم بر لیتر)، و نسبت‌های S/N را نشان می‌دهد.

جدول ۴ اثر تغییر سطح هر یک از فاکتورها در مرحله غربال‌سازی را نشان می‌دهد. بررسی جدول ۴ نشان می‌دهد که سطح ۱ برای فاکتورهای دما (H) و پتاسیم هیدروژن فسفات (K) مناسب‌تر بوده در حالی‌که برای سایر فاکتورها، سطح ۲ مناسب‌تر از سطح ۱ است. با توجه به سطوح درنظرگرفته‌شده برای فاکتور

جدول ۲ـ سطوح در نظر گرفته شده برای هر کدام از فاکتورها در مرحله غربال سازی.

فاکتورهای موثر	سطح ۱	سطح۲
A	۲۰ g/l	۳۰g/l
B	1 g/l	۲ g/l
C	۰ g/l	۳۰ g/l
D	۱۵۰ rpm	۲۰۰ rpm
E	۱۰ g/l	۱۵ g/l
F	۷	۸
G	۰ g/l	۲ g/l
H	۳۰ °C	۳۵ °C
I	۲ g/l	۲ g/l
J	۰ g/l	۳ g/l
K	۰ g/l	۱ g/l

جدول ۳ـ بیشترین مقدارهای تولید آنتی‌بیوتیک در هر یک از ۱۲ سری آزمایش برحسب میلی گرم بر لیتر و نسبت‌های S/N.

ردیف آزمایش	نمونه ۱ (y_1)	نمونه ۲ (y_2)	S/N*
۱	۱۸۲	۱۹۷	۴۵/۵۳۱
۲	۲۹۱	۳۱۳	۴۹/۵۸۲
۳	۱۰۷۱	۱۰۹۴	۶۰/۶۹
۴	۳۴۱	۴۱۷	۵۱/۴۴۱
۵	۱۵۶۳	۱۴۱۰	۶۳/۴۰۸
۶	۱۶۸۷	۱۷۳۶	۶۴/۶۶۴
۷	۱۷۹۸	۱۷۰۳	۶۴/۸۵۳
۸	۲۲۳۰	۲۲۶۸	۶۷/۰۳۸
۹	۹۳۰	۸۸۸	۵۹/۱۶۴
۱۰	۲۱۲۵	۲۰۶۱	۶۶/۴۱۲
۱۱	۱۱۹۱	۱۲۷۷	۶۱/۸۱
۱۲	۱۲۰۰	۱۱۲۲	۶۱/۲۸۱

$$* \; MSD = 0.5\,((1/y_1)^2 + (1/y_2)^2)$$

$$(S/N) = -10 \log(MSD)$$

نشاسته و با دقت به نتیجه‌ها مشخص می‌شود که اضافه کردن منبع کربن به محیط‌کشت بیشترین تاثیر را بر تولید نئومایسین داشته است.

براساس جدول تجزیه واریانس داده‌ها بعد از عمل پولینگ [۷]، موثرترین فاکتورها شناسایی شدند. این فاکتورها عبارتند از: کنجاله سویا، سولفات منیزیم ۷ آبه، نشاسته و pH با درصدهای تاثیر ۳۰/۶۲۳، ۶/۷۶۲ ، ۵۱/۲۷۹ و ۲/۸۹۷ درصد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴ـ اثر تغییر سطح هر یک از فاکتورها در مرحله غربال سازی.

فاکتورهای موثر	سطح ۱	سطح ۲	تفاوت سطوح
A	۵۵٫۸۸۶	۶۳٫۴۲۶	۷٫۵۳۹
B	۵۷٫۸۱	۶۱٫۵۰۳	۳٫۶۹۲
C	۵۴٫۸۰۲	۶۴٫۵۱۱	۹٫۷۰۸
D	۵۸٫۸۷۶	۶۰٫۴۳۷	۱٫۵۶
E	۵۸٫۸۰۹	4۶۰٫۵۰۴	۱٫۶۹۵
F	۵۸٫۳۶۸	۶۰٫۹۴۵	۲٫۵۷۶
G	۵۹٫۵۰۳	۵۹٫۸۱	۰٫۳۰۷
H	۶۰٫۱۶۹	۵۹٫۱۴۳	۱۰٫۰۲۶
I	۵۹٫۰۱۴	۶۰٫۲۹۹	۱٫۲۸۴
J	۵۹٫۰۴۲	۶۰٫۲۷۱	۱٫۲۲۸
K	۵۹٫۸۱۷	۵۹٫۴۹۶	−۰٫۳۲۱

جدول ۵ ـ سطح بهینه فاکتورها پس از مرحله غربال کردن.

فاکتورهای موثر	مقادیر کمی	سطح
A	۳۰ g/l	۲
B	۲ g/l	۲
C	۳۰ g/l	۲
D	۲۰۰ rpm	۲
E	۱۵ g/l	۲
F	۸	۲
G	۲ g/l	۲
H	۳۰°C	۱
I	۴ g/l	۲
J	۳ g/l	۲
K	۰ g/l	۱

جدول ۵ سطح بهینه فاکتورها را پس از مرحله غربال‌کردن نشان می‌دهد. طبق پیش‌بینی نرم‌افزار، در صورتی که مقدار درصد Confidence Level = ۹۵ باشد، نتیجه به دست آمده از کشت تایید بر مبنای S/N باید در محدوده ۲٫۴۶۵ ± ۷۱٫۴۱۴ قرار گیرد. به این معنی که میزان آنتی‌بیوتیک تولید شده در کشت تایید می‌تواند بین ۲۸۰۱٫۸۸ و ۴۹۴۲٫۵۴ میلی‌گرم بر لیتر باشد. در آزمایش تایید مرحله غربال‌سازی بیشترین مقدار تولید آنتی‌بیوتیک، مربوط به روز چهارم و ۳۰۰۶ میلی‌گرم بر لیتر بود که در محدوده ذکرشده قرار دارد.

در مرحله بعدی، فاکتورهای کنجاله سویا، منیزیم سولفات ۷ آبه، نشاسته و *p*H که طبق نتیجه‌های آزمایش‌های مرحله غربال‌سازی، موثرترین فاکتورها شناخته شدند، در ۳ سطح مورد بررسی قرارگرفتند. به این منظور از یک آرایه متعامد L-۹ استفاده شد (جدول ۶).

جدول ۷ سطوح در نظر گرفته شده برای هر کدام از فاکتورها در مرحله بهینه‌سازی فاکتورهای مهم را نشان می‌دهد. سطوح به گونه‌ای تعیین شدند که سطح بهینه مرحله غربال‌سازی، سطح میانی باشد. مقدار در نظرگرفته شده برای سایر فاکتورها، مقدار بهینه آنها در مرحله غربال‌سازی است. در این مرحله هم مانند مرحله غربال‌سازی، هریک از ۹ آزمایش دو مرتبه انجام گرفتند و در هر مرتبه میزان آنتی‌بیوتیک تولید شده دو بار اندازه‌گیری شد و میانگین دو مقدار به عنوان مقدار آنتی‌بیوتیک تولید شده در آن مرتبه گزارش شد. بررسی روند تولید نئومایسین نشان می‌دهد که در تمام این آزمایش‌ها، همانند مرحله غربال‌سازی، بیشترین مقدار تولید آنتی‌بیوتیک در روز چهارم بوده است.

جدول ۸ ، بیشترین مقدارهای تولید آنتی‌بیوتیک در هر یک از ۹ سری آزمایش (بر حسب میلی‌گرم بر لیتر)، و نسبت‌های S/N را نشان می‌دهد. جدول ۹ اثر تغییر سطح هر یک از فاکتورها در مرحله بهینه‌سازی فاکتورهای مهم را نشان می‌دهد.

بررسی جدول ۹ نشان می‌دهد که سطح ۲ فاکتورهای کنجاله سویا (A) و منیزیم سولفات ۷ آبه (B)، سطح مناسب‌تر بوده در حالی‌که برای دو فاکتور دیگر یعنی نشاسته (C) و*p*H (F) سطح ۱ مناسب‌تر از دو سطح دیگر است. به این ترتیب، سطح بهینه فاکتورهای کنجاله سویا، منیزیم سولفات ۷ آبه، نشاسته و*p*H نیز به دست می‌آید.

جدول ۱۰ سطح بهینه این فاکتورها را نشان می‌دهد. طبق پیش‌بینی، نتیجه به دست آمده از کشت تایید بر مبنای S/N، باید ۷۱٫۸۰۱ باشد. به این معنی که میزان آنتی‌بیوتیک تولید شده در کشت تایید باید ۳۸۹۰٫۹۰۱ میلی‌گرم بر لیتر باشد. در آزمایش تایید مرحله بهینه‌سازی فاکتورهای مهم، بیشترین مقدار تولید آنتی بیوتیک ۳۷۶۰ میلی‌گرم بر لیتر بود که با نتیجه پیش بینی شده هم‌خوانی دارد.

نتیجه‌گیری نهایی

مقایسه نتیجه به دست آمده از کشت تایید مرحله بهینه‌سازی فاکتورهای مهم که در آن بیشترین مقدار آنتی‌بیوتیک تولیدشده ۳۷۶۰ میلی‌گرم بر لیتر بود با مراجع [۸–۱۰] که در آنها نیز تولید این آنتی‌بیوتیک از *استرپتومایسس فرادیا* مورد بررسی قرار گرفته

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۶ ـ آرایه متعامد L-۹.

ردیف آزمایش	A	B	C	F
۱	۱	۱	۱	۱
۲	۱	۲	۲	۲
۳	۱	۳	۳	۳
۴	۲	۱	۲	۳
۵	۲	۲	۳	۱
۶	۲	۳	۱	۲
۷	۳	۱	۳	۲
۸	۳	۲	۱	۳
۹	۳	۳	۲	۱

جدول ۷ـ سطوح در نظر گرفته شده برای هر کدام از فاکتورها در مرحله بهینه‌سازی فاکتورهای مهم.

فاکتورهای موثر	سطح ۱	سطح۲	سطح۳
A	۲۵ g/l	۳۰ g/l	۳۵ g/l
B	۱٫۵ g/l	۲ g/l	۲٫۵ g/l
C	۲۵ g/l	۳۰ g/l	۳۵ g/l
F	۷٫۵	۸	۸٫۵

جدول ۸ ـ بیشترین مقدارهای تولید آنتی‌بیوتیک در هریک از ۹ سری آزمایش برحسب میلی‌گرم بر لیتر و نسبت‌های S/N.

ردیف آزمایش	نمونه ۱	نمونه ۲	S/N
۱	۲۱۸۵	۲۱۱۷	۶۶٫۵۹۶
۲	۱۱۱۱	۱۱۴۲	۶۱٫۰۳۲
۳	۲۰۱	۱۴۹	۴۴٫۵۷۲
۴	۲۸۷	۳۱۱	۴۹٫۴۹۲
۵	۳۰۰۰	۲۹۲۶	۶۹٫۴۳۲
۶	۱۴۱۳	۱۳۴۸	۶۲٫۷۹۳
۷	۳۷۷	۳۶۵	۵۱٫۳۸۴
۸	۱۲۹	۱۶۳	۴۳٫۱۱
۹	۵۷۰	۴۸۷	۵۴٫۳۸

جدول ۹ـ اثر تغییر سطح هر یک از فاکتورها در مرحله بهینه‌سازی فاکتورهای مهم.

فاکتورهای موثر	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳	تفاوت سطوح ۱و۲
A	۵۷٫۴	۶۰٫۵۷۲	۴۹٫۶۲۴	۳٫۱۷۲
B	۵۵٫۸۲۴	۵۷٫۸۵۸	۵۳٫۹۱۵	۲٫۰۳۳
C	۵۷٫۵	۵۴٫۹۶۸	۵۵٫۱۲۹	−۲٫۵۳۲
F	۶۳٫۴۷	۵۸٫۴۰۳	۴۲٫۷۲۴	−۵٫۰۶۸

جدول ۱۰ـ سطح بهینه فاکتورها پس از مرحله بهینه‌سازی فاکتورهای مهم.

فاکتورهای موثر	مقدارهای کمی	سطح
A	۳۰ g/l	۲
B	۲ g/l	۲
C	۲۵ g/l	۱
F	۷٫۵	۱

جدول ۱۱ـ مقدارهای بهینه همه فاکتورها.

فاکتورهای موثر	مقدارهای کمی
A	۳۰ g/l
B	۲ g/l
C	۲۵ g/l
D	۲۰۰ rpm
E	۱۵ g/l
F	۷٫۵
G	۲ g/l
H	۳۰ °C
I	۴ g/l
J	۳ g/l
K	۰ g/l

www.SID.ir

Archive of SID

نشان می‌دهد که میزان تولید در پروژه حاضر نسبت به کارهای گذشته بـه طـور قابل ملاحظه ای افزایش یافته است. روش بهینه‌سازی بـه کاررفته در این پـروژه و همچنین ترکیب محیط تولید می‌تواند عامل این افزایش باشد. شرایط بهینه برای تولید نئومایسین که در بخش نتیجه‌ها آورده شده است با مراجع بسیار متفاوت بوده و انتظار می‌رود که فاکتور دما از سایر پارامترهای موثری باشد که نیاز به طرح و بررسی بیشتری دارد. افزون بر این امکان دستیابی به راندمان بالاتر تولید نئومایسین در صورت استفاده از سوش‌های اصلاح شده ژنتیکی و یا گونه‌های دیگر انتظار می‌رود.

تاریخ دریافت: ۸٤/ ۱/۲۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۵/ ۹/۲۷

مراجع

[1] Waksman, S.A. and Lechevalier, H.A., *Science*, **19,** p. 305 (1949).

[2] Sambamurthy, K. and Ellaiah, P., *Hindustan Antibiot. Bull.*, **17,** p. 24 (1974).

[3] Kucers, A., Crowe, S., Grayson, M. L. and Hoy, J., "The Use of Antibiotics", 5th edition, Butterworth-Heinemann (1997).

[4] Vandamme, E. J, "Biotechnology of Industrial Antibiotics", Marcel Dekker INC. (1984).

[5] Lancini, G. and Lorenzetti, R., "Biotechnology of Antibiotics and Other Bioactive Microbial Metabolites", Plenum press (1993).

[6] Sancho Valls, J., Baldris Nacente, R., Sanchez Coll, M., "Handbook of Microbiological Culture Media", 6th edition, Scharlau Chemie (2001).

[7] Roy, R. K., "Design of Experiments Using the Taguchi Approach, 16 Steps to Product and Process Improvement", John Wiley & Sons (2001).

[8] Park, Y. S., Ohta, N. and Okabe, M., *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, p. 265 (1994).

[9] Ohta, N., Park, Y. S., Yahiro, K. and Okabe, M., *J. Ferment. Bioeng.*, **79**, p. 443 (1995).

[10] Flickinger, M.C. and Perlman, D., *J. Appl. Biochem.*, **2**, p. 280 (1980).

www.SID.ir