

بهینه سازی تولید تخمیری سفالوسپورین C بوسیله سویه آکرومونوم کریزوژنوم با استفاده از روش سطح پاسخ

سعید امید سیدوند^۱، غزل لیکی^{۲*}، اکبرزاده کلاهی^۳

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه

آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲-استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم دارویی و داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران،

ایران

۳-استادیار گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده علوم دارویی و داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی،

تهران، ایران

*صندوق پستی ۱۹۳۹۵/۱۴۹۵، تهران، ایران

labeiki@iaups.ac.ir

چکیده

استفاده از میکروارگانیسم های مولد در تولید متابولیت های اولیه و ثانویه زیرمجموعه دانش بیوتکنولوژی میکروبی است که با هدف استفاده از کارخانه های عظیم سلولی و با توجه به توانایی ذاتی و نهفته آنها برای تولید محصولات انجام می شود. بررسی و بهینه سازی عوامل موثر بر فرایند سنتز متابولیت ها، موجب افزایش رشد سویه و بازده تولید محصول می شوند. در همین راستا، در این پژوهش با استفاده از طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ (RSM) و طرح باکس بنکن، تولید تخمیری آنتی بیوتیک سفالوسپورین C توسط سویه آکرومونوم کریزوژنوم به شماره PTCC 5271، بررسی و اثر سه عامل موثر بر فرایند تخمیر شامل pH محیط کشت تخمیر، سبوس برنج و نانوذرات اکسید آهن مگنتیت، در سه سطح، مورد سنجش قرار گرفته است. نتایج به دست آمده نشان داد تغییرات غلظت نانو ذرات اکسید آهن مگنتیت و سبوس برنج در محیط کشت تخمیر به طور معنی داری بر مقدار آنتی بیوتیک تولید شده اثرگذار می باشند. بیشترین میزان سفالوسپورین C تولیدی (۲۲۴ میلی گرم بر لیتر) در محیط کشتی شامل ۰/۰۴ میلی گرم بر لیتر نانو ذرات اکسید آهن مگنتیت، ۲/۵ گرم بر لیتر سبوس برنج و pH برابر ۶/۵ به دست آمده است. مقادیر بهینه شده برای فاکتورها توسط برنامه مینی تب به ترتیب برابر ۰/۳۲۵ میلی گرم بر لیتر، ۲/۶۱۶۲ و ۶/۴۵۴۵ گرم بر لیتر محاسبه شده و در نهایت مدل ریاضی برای متغیر پاسخ به دست آمده است. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش نانوذرات اکسید آهن مگنتیت و سبوس برنج سوبستراهایی مناسب در محیط کشت تخمیر و فرایندهای زیستی می باشند.

کلید واژگان: تخمیر، سویه آکرومونوم کریزوژنوم، سفالوسپورین C، روش سطح پاسخ

۱-مقدمه

آنتی بیوتیک‌ها از مهمترین محصولات حاصل از تخمیر میکروارگانیسم‌ها هستند که در ایران و جهان دارای مصرف بالایی بوده، لذا همواره هزینه‌های زیادی برای تولید، سنتز و همچنین تحقیقات بر روی آنها صرف می‌شود. آنتی بیوتیک‌ها توسط باکتری‌ها، اکتینومایست‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شوند. از میان آنتی بیوتیک‌های قارچی، تعداد کمی مانند پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها از نظر پزشکی مهم می‌باشند. سفالوسپورین‌ها، جزو آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام هستند که اولین بار در سال ۱۹۵۳ از کشت سویه *سفالوسپوریوم آکرومونوم* که مدتی بعد به نام *آکرومونوم کریزورنوم* طبقه‌بندی شد، به دست آمده‌اند. سفالوسپورین‌ها نه تنها به لحاظ پایین بودن سمیت، بلکه به دلیل طیف گسترده اثرگذاری، ارزش زیادی در حوزه سلامت و همچنین اهمیت اقتصادی دارند. به طوری که تا مدت‌های مدید، از نظر فروش آنتی بیوتیک در جهان، سفالوسپورین‌ها در مقام اول و سپس آمپی سیلین و تتراسیکلین در مقام‌های بعدی قرار داشتند [۱]. سفالوسپورین C آنتی بیوتیکی از دسته سفالوسپورین‌ها است و از آن ماده اسید آمینو سفالوسپورانیک ساخته می‌شود که برای تولید سفالوسپورین‌های جدید کاربرد دارد. سفالوسپورین C، علاوه بر دارا بودن خاصیت آنتی بیوتیکی، از مواد اولیه مهم در تهیه آنتی بیوتیک‌های نیمه مصنوعی بتالاکتام نیز به شمار می‌رود [۲]. با توجه به کاربرد زیاد این آنتی بیوتیک و هزینه‌های بالای تولید و سنتز این دارو، نیاز به افزایش بازده و کاهش هزینه‌های تمام شده تولید، وجود دارد. در همین راستا مطالعاتی انجام شده است که تعدادی از آنها بر پایه تغییرات ژنتیکی بر روی سویه مولد محصول [۳ و ۴] و تعداد دیگری بر اساس بررسی شرایط عملیاتی و عوامل موثر بر فرایند تخمیر میکروبی استوار بوده‌اند. از جمله این عوامل می‌توان به ترکیبات مغذی

محیط کشت، محرک‌ها و بازدارنده‌های رشد، مقدار هوای در دسترس میکروارگانیسم، pH، دما، نوع بیوراکتور، نوع تخمیر و سایر موارد اشاره کرد. به طور مثال Tabaraie و همکاران طی مطالعه‌ای نشان دادند که تولید تخمیری سفالوسپورین C در محیط کشت جامد، بازده بالاتری نسبت به محیط کشت مایع دارد [۵]. در مطالعه‌ای دیگر Zafira و همکاران نشان دادند که تخمیر نیمه پیوسته همراه با خوراک دهی تدریجی^۱ سوبستراهای کربنی، منجر به تولید بیشتری از محصول سفالوسپورین نسبت به تخمیر غیرپیوسته^۲ می‌شود [۶]. از بین عوامل موثر بر تخمیر، ترکیبات مغذی مانند منابع کربنی و نیتروژنی و محرک‌های رشد مورد استفاده در محیط کشت اثر مهم و قابل توجهی بر رشد میکروارگانیسم، میزان محصول دهی آن، بازده کلی و هزینه‌های تمام شده فرایند دارند و بنابراین مطالعات زیادی بر پایه انتخاب نوع و مقدار این ترکیبات در فرایندهای تخمیری انجام می‌شود. به طور مثال Hamedی و همکاران اثر ۱۸ نوع روغن مختلف مانند روغن‌های ذرت، سویا، کلزا، آفتابگردان، هسته آلبالو و... را بر روی رشد سویه *Saccharopolyspora erythraea* بررسی کرده و نشان دادند که تغییر منبع کربنی محیط کشت، بر مقدار اریترومایسین تولید شده و راندمان فرایند اثر بسزایی دارد [۷]. Lotfy در پژوهشی از ملاس چغندر قند به عنوان منبع کربنی ارزان قیمت برای بالابردن بازده تولید سفالوسپورین C و رشد سویه *آکرومونوم کریزورنوم* استفاده کرد [۸] و در مطالعه دیگری در راستای اهمیت محیط کشت، نشان داده شد استفاده از اسید آمینه آل لیزین در محیط کشت تخمیر، منجر به کاهش مقدار سفالوسپورین تولید شده می‌شود [۹]. یکی از منابع کربنی مغذی قابل استفاده در فرایندهای زیستی سیبوس برنج است که حاوی پروتئین، چربی، فیبر، ویتامین و انواع مواد معدنی بوده و با داشتن ترکیبات موثر جهت رشد موجود

^۲ Batch^۱ Fed-Batch

زنده، می‌تواند به‌عنوان یک سوبسترای مناسب برای محیط کشت میکروارگانیسم‌ها در نظر گرفته شود [۱۰]. علاوه بر عوامل ذکر شده، استفاده از علم نانو می‌تواند کمکی در راستای بهبود و اصلاح فرایندها باشد، به طوری که امروزه با پیشرفت فراوان علم نانو تکنولوژی و ظهور خواص جدید و متفاوت از ذرات در مقیاس نانو، که ناشی از نسبت بالای سطح به حجم این ذرات است [۱۱]، همچنین سازگاری و انعطاف پذیری آنها با مقیاس اجزای سلولی و خاصیت قوی آنها در پیوند با مولکولهای زیستی، تنوعی از کاربردهای گسترده ممکن شده [۱۲] و امکان استفاده از آنها در بسیاری از مطالعات بیولوژیک، زیست محیطی، دارویی، پزشکی، غذایی، بسته بندی، آرایشی بهداشتی، کشاورزی فراهم شده است [۱۱]. از میان طیف وسیعی از نانو ذرات، نانو ذرات اکسید آهن مگنتیت به دلیل داشتن خاصیت مغناطیسی قوی، زیست سازگاری با شرایط محیط بدن و سیستم‌های بیولوژیک، امکان تهیه آسان و ارزان قیمت بودن، سمیت پایین برای سلول‌های زنده و پایداری، اهمیت زیادی داشته، کاربردهای زیست پزشکی زیادی نسبت به سایر نانو ذرات مغناطیسی دارند [۱۳] و امکان استفاده و به‌کارگیری این ذرات در انواع فرایندهای بیو تکنولوژیک ممکن می‌باشد [۱۴]. از مهمترین کاربردهای نانو ذرات اکسید آهن مگنتیت می‌توان به افزایش میزان انتقال جرم اکسیژن به محیط‌های کشت تخمیر [۱۵ و ۱۶]، تحریک رشد میکروارگانیسم‌ها [۱۴]، گرما درمانی مغناطیسی برای درمان برخی سرطان‌ها، MRI^۱ به‌عنوان عامل وضوح، انتقال ژن، رهایش دارو در بدن [۱۷]، افزایش رشد ماهیان [۱۳]، افزایش پاسخ و حساسیت بیوسنسورها [۱۸] اشاره کرد. با توجه به تعدد عوامل موثر بر فرایند تخمیر میکروبی و همچنین احتمال اثر گذاری تعدادی از متغیرها بر روی یکدیگر، استفاده از طراحی آزمایش^۲ (DOE) و روش

سطح پاسخ^۳ منجر به افزایش دقت در نتایج و همچنین تعیین اثرات برهمکنش متغیرها بر روی یکدیگر می‌شود. لازم به ذکر است روش سطح پاسخ، مجموعه‌ای از فنون ریاضی و آماری مفید برای مدلسازی و تجزیه و تحلیل فرایندهایی است که پاسخ مورد نظر تابعی از چندین متغیر باشد [۱۹]. این روش شامل طرح‌های مختلفی است که یکی از آنها طرح یا مدل باکس بنکن^۴ نام دارد. این مدل کاربرد زیادی در زمینه بهینه سازی متغیرها و فرایند داشته و در آن برای هر متغیر مستقل سه سطح کمینه، مرکزی و بیشینه با کد ۱-، ۰ و ۱ تعریف می‌شود. در این طرح در بازه ای از سطوح که برای هر پارامتر تعریف شده است مدل ریاضی پاسخ به‌دست می‌آید. تعداد آزمایشات در این طرح از رابطه $2K(K-1) + C$ به‌دست می‌آید که منظور از K تعداد متغیرهای مستقل و منظور از C تعداد نقاط مرکزی می‌باشند. به‌طور مثال برای فرایندی با ۳ فاکتور و ۳ نقطه مرکزی، تعداد آزمایشات ۱۵ عدد به‌دست می‌آید. بر همین اساس در این پژوهش اثر سه عامل pH محیط کشت، سوبسترای مغذی سبوس برنج (به‌عنوان منبع کربنی) و نانو ذرات اکسید آهن مگنتیت (به‌عنوان محرک رشد سویه و افزایش دهنده اکسیژن رسانی به محیط کشت) بر میزان سفالوسپورین C تولید شده توسط سویه آکرومونیوم کریزوژنوم به روش سطح پاسخ و طرح باکس بنکن با ۱۵ آزمایش سنجیده و در نهایت مقدار بهینه برای هر کدام از متغیرها به‌همراه مدل ریاضی پاسخ به‌دست آمده است.

۲- مواد و روش‌ها

در این پژوهش برای تولید سفالوسپورین C، از سویه آکرومونیوم کریزوژنوم PTCC 5271، تهیه شده به صورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی ایران، استفاده شده است. رشد و توسعه این

³ Response Surface Method

⁴ Box-Behnken

¹ Magnetic Resonance Imaging

² Design of Experiment

سویه طی سه مرحله اسپورزایی، بذردهی و تخمیر به صورت زیر انجام شده است.

۱-۲ مرحله اسپورزایی

ابتدا آمپول لیوفیلیزه تهیه شده در شرایط کاملاً استریل و در زیر هود میکروبی با کمک تیغ الماس شکسته شده و سپس با سرنگ استریل، ۲ میلی لیتر از محیط استریل ساپرو دکستروز براث (مرک)، به میکروارگانیسم داخل آمپول اضافه شده، چندین مرتبه محیط کشت مایع به آرامی درون آمپول پر و خالی شده تا میکروارگانیسم خشک شده و غیرفعال به درون سرنگ کشیده شود. در مرحله بعد محیط کشت اسپورزایی تهیه می شود. نوع و مقادیر ترکیبات محیط کشت اسپورزایی مورد استفاده در این پژوهش، شامل ۴ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۱۵ گرم بر لیتر نشاسته، ۱ گرم بر لیتر دی پتاسیم فسفات^۱، ۱۵ گرم بر لیتر آگار و ۰/۵ گرم بر لیتر سولفات منیزیم^۲ است. از مایع داخل سرنگ روی محیط کشت جامد اسپورزایی ریخته شده و به جهت تشکیل اسپور کافی بر روی سطح آگار، محیط های کشت به مدت ۱۴ روز در انکوباتور (SANA-SL-909F) با دمای ۲۶ درجه سانتی گراد، گرماگذاری شدند [۲۰ و ۲۱]. پس از رشد مناسب اسپورها، از توپین ۸۰ با غلظت ۰/۱ در صد برای تهیه سو سپانسیون اسپوری و انتقال آنها به مرحله بعد استفاده شد.

۲-۲ مرحله جوانی زنی یا بذردهی

مرحله دوم در فرایند تخمیر، بذردهی برای جوانه زنی اسپورها و آماده سازی تلقیح میکروبی می باشد [۲]. ترکیبات این محیط کشت به گونه ای طراحی شده است تا همه مواد مورد نیاز جهت رشد قارچ مانند منابع کربنی زود هضم (گلوکز) و منابع نیتروژنی دیر هضم (عصاره خیس شده ذرت) را داشته باشد تا جوانه زدن اسپورها به

بهترین حالت ممکن انجام شود و مایه تلقیح در مرحله رشد لگاریتمی برای دستیابی به دانسیته سلولی بالا ایجاد شود [۱۹ و ۲۰]. این ترکیبات شامل ۵/۲۵ گرم بر لیتر ساکارز، ۱ گرم بر لیتر گلوکز، ۵/۲ گرم بر لیتر عصاره خیس شده ذرت و ۴ گرم بر لیتر دی آمونیوم سولفات^۳ است [۲۰]. در ادامه از محلول سو سپانسیون اسپوری، به محیط کشت بذردهی منتقل شده و در نهایت ظروف حاوی محیط بذردهی به شیکر انکوباتور (SKIR-601 – SHINSEANG) با دمای ۲۶ درجه سانتی گراد و دور ۲۰۰ rpm منتقل شدند. پس از گذشت ۴۰ تا ۴۸ ساعت با سنجش پارامترهایی نظیر pH محیط، بیومس میکروارگانیسم و مورفولوژی سویه، مایه تلقیح حاوی قارچ جوانه زده به عنوان ورودی مرحله تخمیر به دست می آید. عدم آلودگی مایه تلقیح و رسیدن ر شد سویه تا حد مناسب از ملاک های رسیدن به مرحله بعد می باشد.

۳-۲ مرحله تخمیر

ترکیبات استفاده شده در این مرحله بایستی به گونه ای باشد که تحریک کننده تولید آنتی بیوتیک مورد نظر باشند. ترکیبات مصرفی در این مرحله شامل، ۳۶ گرم بر لیتر ساکارز، ۲۷ گرم بر لیتر گلوکز، ۸ گرم بر لیتر دی آمونیوم سولفات، ۸ گرم بر لیتر پتاسیم دی هیدروژن فسفات^۴، ۵ گرم بر لیتر متیونین، ۱/۶ گرم بر لیتر دی سدیم سولفات^۵، ۲/۳ گرم بر لیتر سولفات کلسیم^۶، ۲ گرم بر لیتر سولفات آمونیوم آهن^۷، ۱/۳ گرم بر لیتر سولفات منیزیم^۸ آب، ۰/۲۲ گرم بر لیتر سولفات روی^۹ آب، ۰/۲۲ گرم بر لیتر سولفات منگنز^{۱۰} آب و ۰/۰۵۵ گرم بر لیتر سولفات مس^{۱۱} است [۲۰ و ۲۲].

۴-۲ طراحی آزمایش فرایند تخمیر به وسیله روش

سطح پاسخ

^۷ FeNH₄(SO₄)₂

^۸ MgSO₄·H₂O

^۹ ZnSO₄·7H₂O

^{۱۰} MnSO₄·H₂O

^{۱۱} CuSO₄

^۱ K₂HPO₄

^۲ MgSO₄

^۳ (NH₄)₂SO₄

^۴ KH₂PO₄

^۵ Na₂SO₄

^۶ CaSO₄

در این پژوهش برای بررسی اثر متغیرهای مستقل بر میزان تولید سفالوسپورین C و بهینه سازی فرایند زیستی از روش سطح پاسخ و طرح باکس بنکن استفاده شد. فاکتورهای مورد نظر شامل pH محیط کشت تخمیر، غلظت سبوس برنج (به عنوان منبع کربنی محیط کشت) و غلظت نانوذرات اکسید آهن مگنتیت (به عنوان محرک رشد و وکتور اکسیژن)، سطوح متغیرهای مستقل و کدهای آن به صورت جدول ۱ می باشد.

پس از ساخت محیط‌های تخمیر بر اساس ترکیبات ذکر شده و ماتریس طراحی آزمایش (جدول ۲)، مایه جوانه زده مرحله بذردهی به میزان ۵ تا ۱۰ درصد حجمی به محیط‌های کشت تخمیر تلقیح شده و به مدت ۱۰ روز در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه و دور ۱۸۰ rpm قرار داده می‌شوند. در طول این دوره ۱۰ روزه، عمل تخمیر میکروبی و تولید متابولیت ثانویه انجام می‌شود.

۲-۵ استخراج سفالوسپورین از نمونه تخمیری با استفاده از حلال اتیل استات

مایع صاف شده حاصل از تخمیر حاوی متابولیت‌های میکروبی بوده و برای بازیافت آنها می‌توان از روش‌های متعددی مانند استخراج با حلال استفاده کرد. در همین راستا پس از طی دوره تخمیر میکروبی، ابتدا می‌سیلیوم‌ها توسط کاغذ صافی از نمونه‌ها جدا شده، سپس برای جلوگیری از شکستن حلقه بتالاکتام موجود در ساختار سفالوسپورین تولید شده، pH نمونه با افزودن اسید

فسفریک به مقدار ۲ الی ۲/۵ رسانده شده و پس از آن به محلول مورد نظر حلال اتیل استات به نسبت ۱ به ۱ اضافه شده، سپس نمونه‌ها در دستگاه سانتریفوژ (-3-Sigma 30KHS) با دور ۴۰۰۰ در دقیقه قرار داده شدند. پس از گذشت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ، مایع رویی که فاز آبی است دور ریخته شده و از فاز پایینی برای آنالیز آنتی‌بیوتیکی سفالوسپورین استفاده شده است. از آنجایی که حلقه بتالاکتام حساس می‌باشد بایستی استخراج و آنالیز آنتی‌بیوتیک به سرعت انجام شود، زیرا حلقه بتالاکتام به سرعت شکسته شده و در صورت گذشت زمان مقدار تولید شده قابل اندازه گیری نمی‌باشد. جهت سنجش میزان تولید محصول از روش اسپکتروفتومتری و برای رسم منحنی استاندارد سفالوسپورین از غلظت‌های mg/l ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ سفالوسپورین استاندارد (تهیه شده از شرکت داروسازی دانا) استفاده شده است.

برای این منظور ۱۰ ml از محلول‌های فوق تهیه شده و به هر یک ۲ میلی‌لیتر از محلول ۰/۳۳ مولار اسید کلریدریک اضافه شده است. محلول حاصل به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور (SANA- SL-909F) ۶۰ درجه سانتیگراد قرار داده شده، سپس ۰/۲۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۰۵ مولار پتاسیم هگزا سیانوفرات III تهیه شد که محلول حاصل زرد رنگ می‌باشد. برای تهیه بافرهای مورد نیاز، ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۲۵ مولار کلرید آهن بدون آب نیز اضافه شده، این محلول نیز دارای رنگ زرد می‌باشد.

جدول ۱ نمایش متغیرهای مستقل فرایند و سطوح مورد استفاده

متغیر مستقل	نماد ریاضی	کد و سطح مورد استفاده		
		+۱	۰	-۱
pH	A	۷	۶٫۵	۶
غلظت سبوس برنج	B	۳	۲٫۵	۲
غلظت نانوذرات اکسید آهن مگنتیت	C	۰٫۰۶	۰٫۰۴	۰٫۰۲

جدول ۲ طراحی آزمایش بر اساس مدل باکس بنکن

تیمارهای تخمیر	سطوح کد بندی شده			سطوح عددی			پاسخ	
	pH	سبوس برنج	نانوذرات	pH	سبوس برنج ($\frac{g}{l}$)	نانوذرات ($\frac{mg}{l}$)	سفالوسپورین ($\frac{mg}{l}$)	جذب نوری
۱	۰	۰	۰	۶٫۵	۲٫۵	۰٫۰۴	۲۲۰	۰٫۶۱۹
۲	۰	۰	۰	۶٫۵	۲٫۵	۰٫۰۴	۲۲۲	۰٫۶۲۱
۳	-۱	+۱	۰	۶	۳	۰٫۰۴	۲۰۰	۰٫۵۹۱
۴	۰	-۱	+۱	۶٫۵	۲	۰٫۰۶	۱۸۸	۰٫۵۷۲
۵	۰	-۱	-۱	۶٫۵	۲	۰٫۰۲	۲۰۲	۰٫۵۹۳
۶	+۱	۰	+۱	۷	۲٫۵	۰٫۰۶	۱۹۰	۰٫۵۷۷
۷	+۱	۰	-۱	۷	۲٫۵	۰٫۰۲	۱۹۶	۰٫۵۸۵
۸	-۱	-۱	۰	۶	۲	۰٫۰۴	۲۰۴	۰٫۵۹۶
۹	-۱	۰	-۱	۶	۲٫۵	۰٫۰۲	۲۱۰	۰٫۶۰۵
۱۰	۰	۰	۰	۶٫۵	۲٫۵	۰٫۰۴	۲۲۴	۰٫۶۲۴
۱۱	۰	+۱	-۱	۶٫۵	۳	۰٫۰۲	۲۱۶	۰٫۶۱۳
۱۲	۰	+۱	+۱	۶٫۵	۳	۰٫۰۶	۱۸۸	۰٫۵۷۴
۱۳	+۱	+۱	۰	۷	۳	۰٫۰۴	۲۰۶	۰٫۵۹۹
۱۴	-۱	۰	+۱	۶	۲٫۵	۰٫۰۶	۱۸۰	۰٫۵۶۳
۱۵	+۱	-۱	۰	۷	۲	۰٫۰۴	۱۹۲	۰٫۵۷۹

است. میکروارگانیزم مورد استفاده برای تعیین فعالیت سفالوسپورین C، باکتری *Micrococcus luteus* ATCC 4698 است. ابتدا کدورتی معادل با نیم مک فارلند از میکروکوکوس لوتئوس تهیه شده، در مرحله بعدی از محیط کشت استریل مولر هیتون آگار داخل پلیت های قطر ۸ سانتی متر ریخته شده، و با استفاده از سوپ استریل، کشتی یکنواخت از سوپانسیون میکروارگانیزم روی پلیت ایجاد شد. سپس، با کمک پیت پاستور استریل، روی پلیت ۳ چاهک ایجاد شده و در چاهک اول ۷۰ ماکرولیتر از استاندارد سفالوسپورین تهیه شده از شرکت دارویی دانا با غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر، در چاهک دوم ۷۰ ماکرولیتر از نمونه استخراجی آنتی بیوتیک تولید شده با غلظت مشابه و در چاهک سوم ۷۰ ماکرولیتر اتیل استات به عنوان حلالی که اثر ضد میکروبی ندارد ریخته و پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از

سپس ۲۵۰ ماکرولیتر از محلول پتاسیم هگزا سیانوفرات و ۱ میلی لیتر از محلول کلرید آهن به هر یک از لوله های حاوی سفالوسپورین استاندارد اضافه شد و پس از چند ثانیه رنگ محلول به آبی تغییر کرده و بسته به غلظت سفالوسپورین، رنگ آبی با وضوح بیشتری نمایان شد. پس از تهیه بافرهای مورد نیاز و تغییر رنگ محلول سفالوسپورین، بعد از حدود ۱۵ دقیقه، میزان جذب در ۷۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Rigol Ultra-3660) خوانده شده است [۲۰]. مقادیر جذب نوری نمونه های تخمیری در جدول ۲ آورده شده است. در نهایت غلظت محصول تولید شده در تمامی نمونه ها مورد سنجش قرار گرفته است.

۲-۶ تعیین فعالیت آنتی بیوتیک تولید شده

برای سنجش فعالیت آنتی بیوتیک تولید شده از روش چاهک گذاری و اندازه گیری هاله عدم رشد استفاده شده

۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم با کولیس اندازه‌گیری شده است.

۷-۲ محاسبات آماری

آنالیز آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها با سطح اطمینان ۹۵ درصد به روش سطح پاسخ و رسم نمودارها با نرم‌افزار مینی تب ورژن ۱۹ انجام شده است.

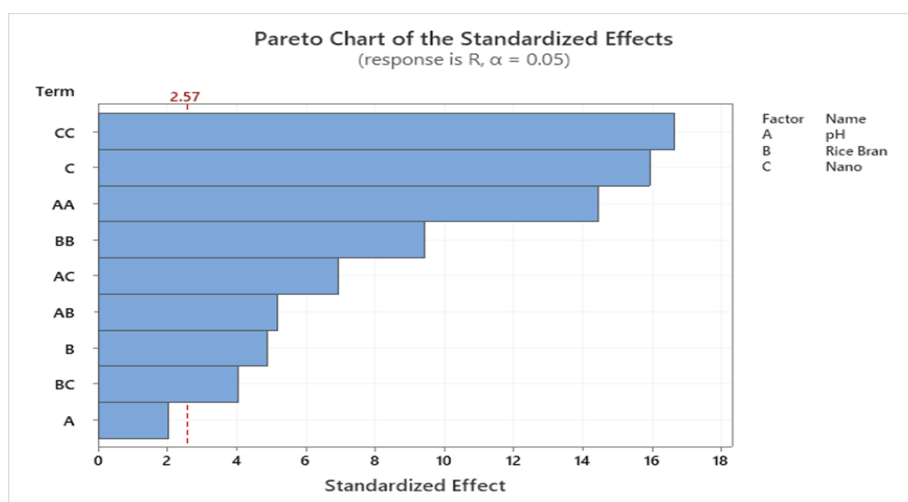
۳- نتایج

در این پژوهش اثر مقادیر مختلف سه متغیر مستقل pH، غلظت سبوس برنج و غلظت نانوذرات اکسید آهن مگنتیت بر روی متغیر وابسته مقدار تولید سفالوسپورین C با روش سطح پاسخ مورد سنجش قرار گرفته و ماتریس طراحی آزمایش و نتایج پاسخ در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

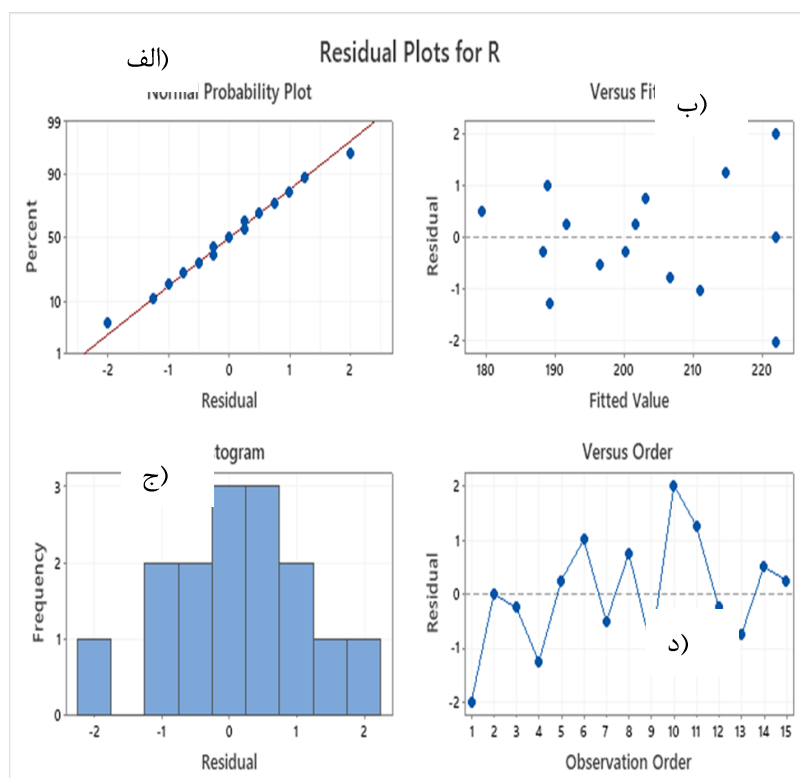
نمودار Pareto (نمودار ۱) بیانگر تاثیر فاکتورهای مورد استفاده در فرایند تولید تخمیری محصول بوده به طوری که از بالا به پایین نمودار، اثرگذاری متغیر مورد نظر کاهش می‌یابد. بر این اساس همان‌طور که در نمودار مشاهده می‌شود از بین سه فاکتور، بیشترین اثرگذاری مربوط به

فاکتور C یعنی نانوذرات اکسید آهن مگنتیت ($P < 0.05$) و سپس فاکتور B یعنی سبوس برنج ($P < 0.05$) و کمترین اثرگذاری مربوط به فاکتور A یا به عبارتی تغییرات pH ($P > 0.05$) می‌باشد.

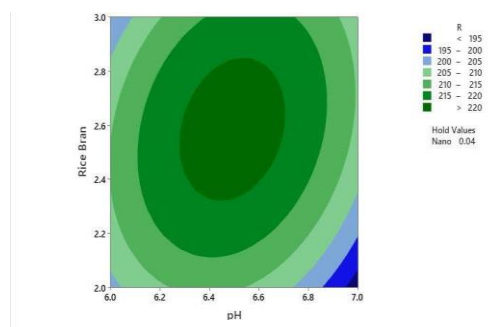
نمودارهای باقی مانده مورد استفاده برای بررسی کفایت مدل ریاضی در نمودار ۲ آورده شده‌اند. همان‌طور که از نمودارها مشخص است نقاط نرمال و تصادفی و بدون روند خاص می‌باشند؛ به این صورت که قسمت الف شکل، بیانگر نرمال بودن داده‌ها است یعنی هرچه نقاط به‌دست آمده به خط نزدیک‌تر باشند، داده‌ها نرمال‌تر می‌باشند. شکل ب، تصادفی بودن داده‌ها را نشان می‌دهد، به طوری که هرچه نقاط دارای پراکندگی بدون روند باشند واریانس‌ها ثابت‌تر می‌باشند. در قسمت ج نمودار هیستوگرام است و حالت زنگوله‌ای شکل، بیانگر نرمال بودن جمعیت داده‌ها می‌باشد و شکل د، استقلال داده‌ها را نسبت به زمان نشان داده است که بایستی تصادفی و بدون روند باشند، به این معنا که داده‌های به‌دست آمده مستقل از زمان بوده و با تغییرات زمان به‌طور جهت‌دار تغییر نمی‌کنند.



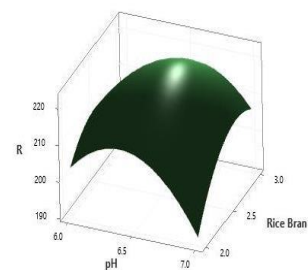
نمودار ۱ نمودار Pareto برای سه فاکتور pH، سبوس برنج و نانوذرات اکسید آهن مگنتیت (اثرگذاری فاکتورهایی که سمت چپ خط چین قرمز قرار گرفته‌اند از نظر آماری غیرمعنی دار در نظر گرفته می‌شود.)



نمودار ۲ نمودارهای باقیمانده (رسم شده با استفاده از برنامه مینی تب ورژن ۱۹)



(ب) نمودار دو بعدی کانتر



(الف) نمودار سه بعدی سطح پاسخ

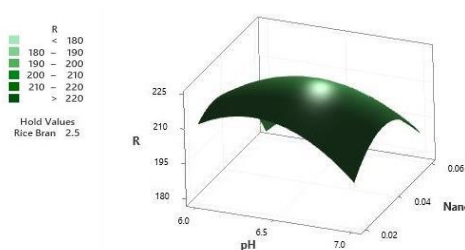
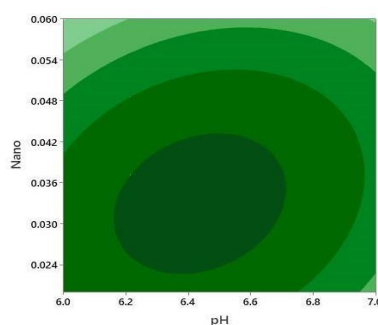
نمودار ۳ نمودارهای مرتبط برای نشان دادن رابطه بین متغیر پاسخ (R) و متغیرهای مستقل pH و سبوس برنج

نمودار ۳، اثر همزمان pH و سبوس برنج را روی متغیر پاسخ R به دو حالت سه بعدی (شکل الف) و دو بعدی (شکل ب) نشان می‌دهد. مقدار نانوذرات در نقطه میانی ثابت در نظر گرفته شده است. با توجه به نمودارهای بالا بیشترین نرخ R در منطقه pH از ۶/۴ تا ۶/۶ و منطقه

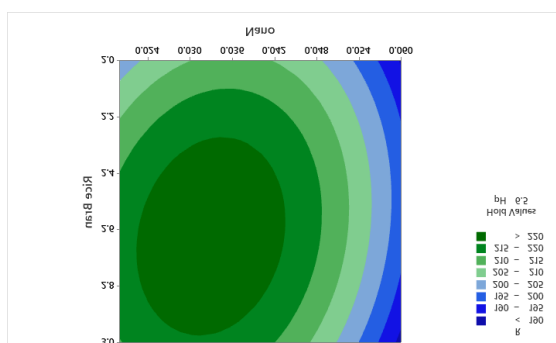
سبوس برنج از ۲/۵ تا ۲/۷ گرم بر لیتر قرار گرفته است. لازم به ذکر است نمودار کانتر دید از بالای نمودار رویه را نشان می‌دهد و در قسمت ب هر چه شکل به سمت رنگ سبز پررنگ برود، متغیر پاسخ افزایش خواهد داشت.

نمودار ۵، اثر همزمان سبوس برنج و نانوذرات اکسید آهن مگنتیت را روی متغیر پاسخ R به دو حالت سه بعدی (شکل الف) و دو بعدی (شکل ب) نشان می‌دهد و مقدار pH در نقطه میانی ۶/۵ ثابت در نظر گرفته شده است. با توجه به دو نمودار بالا بیشترین نرخ R در منطقه سبوس برنج از ۲/۶ تا ۲/۸ گرم بر لیتر و منطقه نانوذرات اکسید آهن مگنتیت از ۰/۳۰ تا ۰/۳۶ میلی گرم بر لیتر قرار گرفته است.

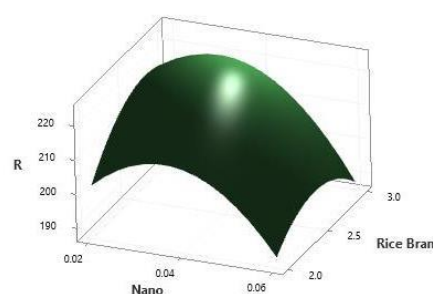
نمودار ۴، اثر همزمان pH و نانوذرات اکسید آهن مگنتیت را روی متغیر پاسخ R به دو حالت سه بعدی (شکل الف) و دو بعدی (شکل ب) نشان می‌دهد و مقدار سبوس برنج در نقطه میانی ۲/۵ ثابت در نظر گرفته شده است. با توجه به نمودارهای بالا بیشترین نرخ R در منطقه pH از ۶/۴ تا ۶/۶ و منطقه نانوذرات اکسید آهن مگنتیت از ۰/۳۰ تا ۰/۳۶ میلی گرم بر لیتر قرار گرفته است. بیشینه مقدار پاسخ در نمودار رویه‌ای (شکل الف) به صورت منطقه نورانی نشان داده شده است.



نمودار ۴ نمودارهای مرتبط برای نشان دادن رابطه بین متغیر پاسخ (R) و متغیرهای مستقل pH و نانوذرات اکسید آهن مگنتیت



ب) نمودار دو بعدی کانتور



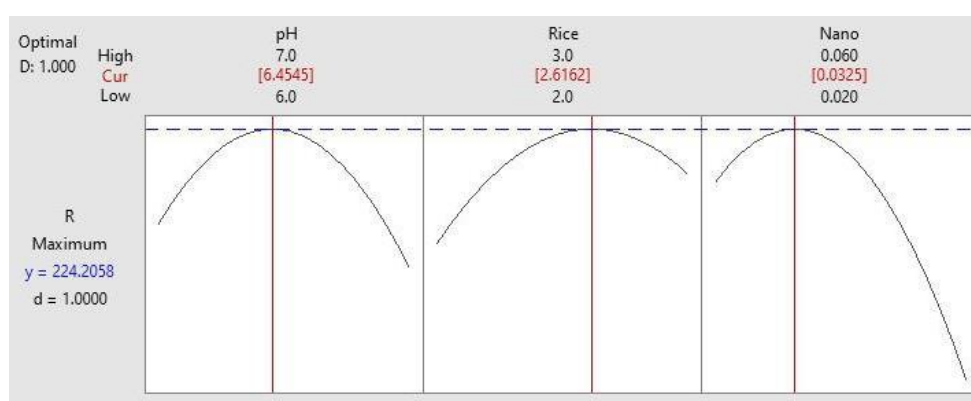
الف) نمودار سه بعدی سطح پاسخ

نمودار ۵ نمودارهای مرتبط برای نشان دادن رابطه بین متغیر پاسخ (R) و متغیرهای مستقل سبوس برنج و نانوذرات اکسید آهن مگنتیت

۱-۳ بهینه سازی متغیرهای مستقل

برای تعیین نقطه بهینه مقادیر فاکتورهای مورد استفاده در این پژوهش، از روش بهینه یابی عددی نرم افزار مینی تب و برنامه RSM استفاده شده و نتیجه به صورت نمودار ۶ به دست آمده است. مقادیر قرمز رنگ در نمودار بیانگر بهترین مقدار برای هر متغیر می باشند. به این صورت که

مقدار بهینه برای غلظت نانوذرات ۰/۰۳۲۵ میلی گرم بر لیتر، برای سبوس برنج ۲/۶۱۶۲ گرم بر لیتر و برای pH ۶/۴۵۴۵ گرم بر لیتر می باشد. مقدار پاسخ در حالت بهینه، به بیشترین مقدار یعنی ۲۲۴/۲۰۵ میلی گرم بر لیتر رسیده است. نتایج آنالیز واریانس برای مدل سطح پاسخ در جدول ۳ آورده شده است.



نمودار ۶ مقادیر بهینه برای فاکتورهای مورد آزمایش (ترسیم شده با نرم افزار مینی تب ورژن ۱۹)

جدول ۳ جدول آنالیز واریانس ANOVA

برای سه متغیر A (pH)، B (غلظت سبوس برنج) و C (غلظت نانوذرات اکسید آهن مگنتیت)

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقدار F	مقدار P	معنی داری
مدل	۹	۲۶۲۸,۷۳	۲۹۲,۰۸۱	۹۷,۳۶	<۰,۰۰۰۱	✓
A	۱	۱۲,۵	۱۲,۵	۴,۱۷	۰,۰۹۷	✗
B	۱	۷۲	۷۲	۲۴	۰,۰۰۴	✓
C	۱	۷۶۰,۵۰	۷۶۰,۵۰	۲۵۳,۵	<۰,۰۰۰۱	✓
A.A	۱	۶۲۴	۶۲۴	۲۰۸	<۰,۰۰۰۱	✓
B.B	۱	۲۶۶,۷۷	۲۶۶,۷۷	۸۸,۹۲	<۰,۰۰۰۱	✓
C.C	۱	۸۳۰,۷۷	۸۳۰,۷۷	۲۷۶,۹۲	<۰,۰۰۰۱	✓
A.B	۱	۸۱	۸۱	۲۷	۰,۰۰۳	✓
A.C	۱	۱۴۴	۱۴۴	۴۸	۰,۰۰۱	✓
B.C	۱	۴۹	۴۹	۱۶,۳۳	۰,۰۱۰	✓
فقدان برازش	۳	۷	۲,۳۳۳	۰,۵۸	۰,۶۸۱	✓

توصیف یک فرایند با سه فاکتور، با معادله رگرسیون
 به‌دست آمده از طرح باکس بنکن، که رفتار درجه دو
 (Quadratic) کاسته شده دارد، توسط معادله زیر بیان
 می‌شود:

$$R=b^0+b_1A+b_2B+b_3C+b_{11}A^2+b_{22}B^2+b_{33}C^2+b_{12}AB+b_{13}AC+b_{23}BC$$

بین متغیرهای A و B، AC برهمکنش بین متغیرهای A و C، و منظور از BC برهمکنش بین متغیرهای B و C می‌باشد [۲۳]. مدل برازش برای پاسخ در این پژوهش به‌صورت زیر به‌دست آمده است:

که در این معادله R بیانگر پاسخ، b_1 ها نشان‌دهنده ضرایب رگرسیون است. همچنین، b_1 و b_2 و b_3 به‌ترتیب برای بیان اثرات اصلی، b_{11} و b_{22} و b_{33} برای بیان اثرات غیرخطی فاکتور ها و b_{12} و b_{23} و b_{13} برای بیان اثرات برهمکنش بین فاکتورها می‌باشد. منظور از AB برهمکنش

$$R=-1813+73B-512C-52A^2-34B^2-37500C^2+18AB+600AC-350BC$$

شکل ۷ مورفولوژی قارچ مورد نظر را طی روزهای مختلف تخمیر نشان می‌دهد. همانطور که در شکل قابل مشاهده است، میسلیم‌های سویه در روزهای اولیه تخمیر، تازه و جوان، کم تراکم و باریک هستند (شکل ۷-الف)، با پیشرفت عملیات تخمیر مورفولوژی قارچ تغییراتی پیدا کرده به طوری که در روزهای میانی میسلیمها ضخیم و بلند بوده (شکل ۷-ب و ۷-ج) و در روز دهم با لیز شدن میسلیمها، قارچ از بین رفته و فرایند تخمیر پایان می‌پذیرد (شکل د).

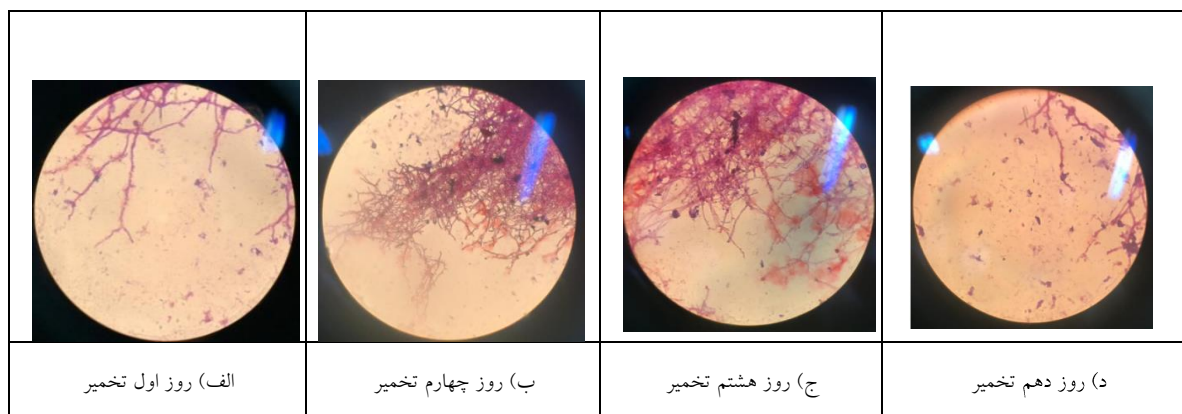
۳-۳ فعالیت سفالوسپورین تولید شده

شکل ۸، هاله عدم رشد میکروکوکوس لوتئوس را برای سفالوسپورین تولیدی در مقایسه با سفالوسپورین استاندارد و حلال اتیل استات نشان می‌دهد. به‌طور کلی هرچه اندازه قطر این هاله بر حسب میلی‌متر بالاتر باشد نشان‌دهنده قدرت بالاتر دارو در از بین بردن میکروارگانیسم مربوطه می‌باشد. مقادیر قطر این هاله به ترتیب برای نمونه استاندارد حدود ۳۰ میلی‌متر و برای نمونه تولید شده در این پژوهش ۲۵ میلی‌متر به‌دست آمد که نشان‌دهنده اثر ضدباکتریایی آنتی‌بیوتیک تولید شده می‌باشد.

لازم به ذکر است عبارت‌های غیر معنی‌دار (که در اینجا شامل فاکتور A می‌باشد) از مدل ریاضی حذف شده‌اند. برای اینکه مدل ریاضی توانایی مناسبی جهت برازش اطلاعات داشته باشد بایستی ضرایب R^2 مقدار بالایی داشته باشند. به طور کلی هر چه این ضرایب به عدد ۱ نزدیکتر باشند قدرت مدل برازش یافته در توصیف تغییرات پاسخ به‌عنوان تابعی از متغیرهای مستقل بیشتر می‌باشد.

یک مدل با برازش خوب دارای R^2 حداقل ۰/۸ می‌باشد [۲۴]. مقادیر ضرایب R^2 در این پژوهش به ترتیب برای Adjusted R^2 و Predicted R^2 ، ۹۸/۱۴٪ و ۹۵/۰۸ درصد به‌دست آمده است. همچنین، مقدار P Value برای آزمون فقدان برازش ۰/۶۸۱ به‌دست آمده که عدم معنی داری آن حاکی از اعتبار مدل ریاضی می‌باشد، به این معنا که مدل به خوبی با نتایج آزمایشگاهی برازش شده است [۱۹].

۲-۳ مورفولوژی سویه آکرو مونیوم کریزوزنوم در دوره تخمیر



شکل ۷ تصویر میکروسکوپیک سویه آکرومونیم کریزوژنوم در طول فرایند تخمیر (به ترتیب از چپ به راست زمان تخمیر در حال افزایش است)



شکل ۸ هاله عدم رشد برای سفالوسپورین تولیدی (غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر) در مقایسه با سفالوسپورین استاندارد (غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر)

۴- بحث

متابولیت‌های ثانویه ترکیباتی هستند که توسط تعداد محدودی از میکروارگانیسم‌ها در فاز سکون رشد تولید شده و از ویژگی‌های مهم آنها وابستگی شدید آنها به شرایط محیطی و عملیاتی می‌باشد [۱]. به همین دلیل شناسایی عوامل موثر بر رشد میکروبی و تولید محصول، و همچنین بهینه‌سازی آنها تاثیر بسزایی در افزایش بازده کلی فرایند زیستی داشته و بنابراین مورد توجه محققین قرار دارد. از جمله عوامل موثر بر تخمیرهای هوازی می‌توان به

میزان اکسیژن محلول در محیط کشت اشاره کرد، زیرا اکسیژن در این فرایندها مهمترین سوبسترای گازی محسوب شده و با اتمام آن به صورت عامل محدود کننده واکنش بیوشیمیایی عمل کرده که محصول دهی را دچار اختلال می‌کند. لذا با توجه به نیاز مبرم سویه های هوازی به اکسیژن و حلالیت پایین اکسیژن در محیط‌های کشت آبی و همچنین کاهش بیشتر حلالیت اکسیژن با افزایش غلظت سایر مواد حل شده در آب، یافتن راه حلی برای نگه داشتن مقدار اکسیژن در سطح مورد نیاز از جمله

دغدغه‌های مهم طراحی یک بیوراکتور و یک تخمیر هوازی می‌باشد. این مساله در محیط کشت‌های قارچی که ویسکوزیته محیط بواسطه رشد میسلیم‌ها زیاد می‌شود بیشتر به چشم می‌خورد [۲۵ و ۱]. به همین جهت تاکنون مطالعات زیادی بر روی افزایش مقدار اکسیژن محیط کشت‌های انجام شده است که در برخی از آنها طراحی سیستم‌های هوادهی و همزدن جدید مورد توجه بوده و در بعضی دیگر از وکتورهای اکسیژن برای افزایش هوا رسانی استفاده شده است. مطالعات پیشین نشان داده است نانوذرات اکسید آهن مگنتیت دسته‌ای از وکتورهای اکسیژن بوده که در غلظت‌های پایین، خاصیت سمی برای موجود زنده نداشته و از طرفی می‌تواند با حمل مولکول‌های اکسیژن در توده مایع تخمیری، منجر به افزایش ضریب انتقال جرم اکسیژن شده و به این ترتیب باعث بالا رفتن راندمان فرایند زیستی هوازی شوند. به‌طور مثال Labbeiki و همکاران در پژوهشی در رابطه با اثر نانوذرات اکسید آهن مگنتیت بر روی فرایند تخمیری ساکاروپلی اسپورا ایترا، نشان دادند با افزودن ۰/۰۲ میلی‌لیتر بر میلی‌لیتر (حجمی به حجمی) از این نانوذرات به‌عنوان حامل اکسیژن، ضریب انتقال جرم حجمی اکسیژن در محیط کشت تخمیر ۱/۸۹ برابر و تولید آنتی‌بیوتیک تخمیری اریترومایسین ۲/۲ برابر شده است [۱۶]. Shahidzade و همکاران نیز در پژوهشی نشان دادند با استفاده از ۰/۰۴ گرم بر لیتر از نانوذرات اکسید آهن مگنتیت در محیط کشت، رشد سویه آکرومونوم کریزوژنوم ۶۰ درصد بیشتر شده است [۲۰]. در نتیجه‌ای همراستا با نتیجه پژوهش حاضر، افزایش رشد سویه *Bradyrhizobium japonicum* در حضور نانوذرات اکسید آهن گزارش شده است. نتایج پژوهش مربوطه نشان داده است افزودن نانوذرات اکسید آهن مگنتیت از ۲۰ تا ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به محیط رشد میکروارگانیسم فوق، باعث افزایش ثابت رشد، افزایش تعداد میکروارگانیسم و

کاهش زمان متوسط تولید میکروارگانیسم شده و به‌طور کلی بر روی فرایند زیستی اثر مثبت داشته است [۲۶]. در پژوهشی دیگر نشان داده شده است میزان رشد *Pseudomonas aeruginosa* در محیط کشت حاوی ۵۰۰ ppm نانوذرات اکسید آهن مگنتیت نسبت به محیط بدون نانوذره افزایش یافته است. نتایج این پژوهش همچنین نشان داده است در غلظت‌های بالای ۵۰۰ ppm تا ۱۰۰۰۰ رشدی برای میکروارگانیسم مشاهده نمی‌شود [۱۴].

در پژوهش حاضر از مقادیر جزئی و اندک نانوذرات اکسید آهن مگنتیت در محیط کشت‌های تخمیر سویه آکرومونوم کریزوژنوم استفاده شده و همانطور که از نمودار ۱ مشخص است، از بین متغیرهای انتخابی در این پژوهش، این فاکتور اثر گذارترین عامل بر روی فرایند تخمیر بوده و تغییرات آن اثر معناداری بر افزایش متغیر پاسخ تولید سفالوسپورین C داشته است ($P < 0.05$). تغییرات متغیر پاسخ بواسطه تغییرات غلظت نانوذرات اکسید آهن مگنتیت در نمودارهای ۴ و ۵ نمایش داده شده است. نانوذرات اکسید آهن مگنتیت بخاطر داشتن میزان سمیت پایین در غلظت‌های کم، زیست‌سازگاری بالا، توانایی برای اتصال و حمل بیومولکول‌ها، خواص مغناطیسی و جداسازی راحت از محیط و همچنین مقدار اندک مورد نیاز برای بهبود و افزایش بازده فرایند‌های زیستی، کاربردهای زیادی داشته و چون روش تهیه آسان و مقرون به صرفه نیز دارند استفاده از آنها رواج پیدا کرده است [۲۷].

ترکیبات مغذی محیط کشت از جمله سایر عوامل مهم بر روی رشد میکروبی و محصول‌دهی میکروارگانیسم بوده که نقش موثری بر بازده فرایند تخمیر ایفا می‌کنند. در این زمینه تاکنون پژوهش‌های متنوعی انجام گرفته تا اثر سوبستراهای مختلف بر روی فرایندهای زیستی و هزینه تمام شده آن سنجیده شود. به‌طور مثال، نتایج پژوهشی نشان داد افزودن دو مرحله‌ای گلوکز و ساکارز، در مقابل

افزودن یک مرحله ای گلوکز باعث رشد بهتر سویه سفالوسپوریوم آکرومونیم و تولید سفالوسپورین C می‌شود [۲۸]. در پژوهش حاضر با توجه به نقش مهم سوبستراهای کربنی به عنوان تامین کننده اصلی انرژی میکروارگانیسم‌ها از غلظت‌های مختلف سبوس برنج در محیط کشت تخمیر استفاده شده و همانطور که از نمودار ۲ مشخص است، سبوس برنج به طور معنی داری بر تولید محصول اثرگذار می‌باشد. تغییرات متغیر وابسته (پاسخ) بدلیل تغییرات غلظت سبوس برنج به ترتیب در نمودارهای ۳ و ۵ آورده شده است. در نتیجه‌ای همراستا با نتایج این پژوهش، Gao و همکاران نشان دادند که افزودن سبوس برنج به محیط کشت *Lactobacillus rhamnosus* تولید تخمیری اسید لاکتیک را ۱/۶ برابر افزایش می‌دهد [۲۹]. مطالعه دیگری نشان داده است استفاده از عصاره سبوس برنج در محیط کشت *Lactobacillus sakei* منجر به افزایش تولید آلفا آمینو بوتیریک اسید و افزایش بازده فرایند زیستی شده است [۳۰].

pH محیط کشت از جمله شاخص‌های نشان دهنده رشد میکروارگانیسم‌ها بوده چون متابولیسم سلولی سبب تغییر آن می‌شود [۳۲]. بر همین اساس مطالعات زیادی برای تعیین pH بهینه در محیط‌های کشت تخمیری انجام گرفته است. به طور مثال، Adinarayana و همکاران در پژوهشی نشان دادند pH بهینه برای رشد سویه سفالوسپوریوم آکرومونیم در محیط کشت تخمیر جامد ۶/۵ می‌باشد [۳۳]. در پژوهش حاضر نیز از مقادیر مختلف pH در محیط کشت تخمیر سویه فوق استفاده شد و نتایج حاصل نشان داد بیشترین محصول در pH برابر با ۶/۵ به دست آمده است.

آکرومونیم که در این پژوهش برای تولید آنتی‌بیوتیک مورد استفاده قرار گرفته است، قارچی از خانواده Hypocreaceae بوده که به علت کاربرد زیاد در تولید سفالوسپورین‌ها، در ابتدا با نام سفالوسپوریوم شناخته می

شده است. تراکم، طول و ضخامت میسلیم‌های این قارچ، حایز اهمیت بوده و بیانگر این است که میکروارگانیسم در کدامیک از مراحل چندگانه رشد خود (فاز تاخیر، فاز رشد لگاریتمی، فاز سکون و فاز مرگ) قرار دارد. در ابتدای تخمیر، رشته‌ها کوتاه، نازک و جوان هستند و هرچه از زمان تخمیر بیشتر می‌گذرد در روزهای چهارم و هشتم تخمیر به تراکم و طول میسلیم‌ها اضافه شده، یعنی قارچ در این بازه زمانی در فاز سکون رشد خود قرار گرفته و تولید متابولیت‌های ثانویه مانند آنتی‌بیوتیک در این مرحله رخ می‌دهد. در نهایت در روزهای پایانی تخمیر با وارد شدن سویه به فاز مرگ، میسلیم‌ها قطعه قطعه شده و از بین می‌روند.

۵- نتیجه گیری

علیرغم تولید وسیع و مطالعات متعددی که تاکنون بر روی تولید آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام صورت گرفته است، به دلیل کاربرد زیاد این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها بخصوص پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها، تلاش برای توسعه و بهبود این فرایندها به طور مستمر ادامه دارد. شناسایی عوامل موثر بر مسیر سنتز متابولیت ثانویه و پارامترهای تخمیر مانند سوبستراهای مغذی و ترکیبات محیط کشت از جمله پارامترهای تاثیر گذار در فرایند می‌باشد [۳۲]. در کنار تامین نیازهای رشد توسط ترکیبات مورد استفاده کربنی و نیتروژنی و مواد محرک، هزینه تهیه منابع غذایی در تولید فرآورده‌های میکروبی فوق العاده حایز اهمیت است و می‌تواند تجاری شدن آن فرآورده را تحت تاثیر قرار بدهد [۹]. در همین راستا استفاده از ضایعات مواد غذایی، مواد مغذی بومی و ارزان قیمت به عنوان سوبسترا اثر مثبت و مهمی را بر روی بهبود فرایند زیستی و کاهش هزینه‌ها دارد. در این پژوهش از سوبسترای مغذی، ارزان قیمت و در دسترس سبوس برنج و همچنین از نانوذرات اکسید آهن مگنتیت به عنوان محرک رشد سویه آکرومونیم کریزوژنوم و نیز وکتور اکسیژن استفاده شده و بر اساس

statistical experimental designs. Bioresource technology, 98(18), 3491-3498.

۹. ملک زاده، ف.، صعودی، م. ر.، ملک زاده، ش.، ۱۳۸۸. بیوتکنولوژی میکروبی، جلد اول، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ص ۳۳-۴۴۹.

۱۰. رئیسی، ف.، رضوی، ه.، حجت الاسلامی، م.، محمدیان، م. (۱۳۹۳). بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و رئولوژیکی عصاره سبوس برنج. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، ۴۲(۱۱)، ص ۹-۱۸.

۱۱. شجاع الساداتی، ع.، صالحی، زاده، ح.، ۱۳۹۵، اصول مفاهیم و کاربردهای نانوبیوتکنولوژی، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ص ۱۱-۱۴۵.

۱۲. صالحی زاده، ح. و بایندری، ل. (۱۳۸۷). نانوذرات مغناطیسی: کاربرد و اهمیت آنها در زیست فناوری. مهندسی شیمی ایران، سال ۷، شماره ۳۳، ص ۴۰-۵۰.

۱۳. شبه رنگ، م. و میرواقفی، ع. (۱۳۹۱). کاربردهای فناوری نانو در شیلالات. مجله فناوری نانو. سال ۱۱، شماره ۶ (۱۷۹) ص ۱۳.

14. Kafayati, M. E., Raheb, J., Torabi Angazi, M., Alizadeh, S., Bardania, H. (2013). The effect of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles on the growth of genetically manipulated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* (PTSOX4). Iranian Journal of Biotechnology, 11(1), 41-46.

15. Olle, B., Bromberg, L., Hatton, T. A., Wang, D. I. C. (2019). Enhancement of oxygen transfer in fermentation by use of functionalized magnetic nanoparticles. In 2007 Cleantech Conference and Trade Show Cleantech 2007, 270-273.

16. Labbeiki, G., Attar, H., Heydarinasab, A., Sorkhabadi, S., Rashidi, A. (2014). Enhanced oxygen transfer rate and bioprocess yield by using magnetite nanoparticles in fermentation media of erythromycin. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 22(1), 1-7.

17. Ito, A., Shinkai, M., Honda, H., Kobayashi, T. (2005). Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. Journal of bioscience and bioengineering, 100(1), 1-11.

18. Loh, K. S., Lee, Y. H., Musa, A., Salmah, A. A., Zamri, I. (2008). Use of Fe₃O₄ nanoparticles for enhancement of biosensor response to the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. Sensors, 8(9), 5775-5791.

نتایج به‌دست آمده استفاده از این مواد در محیط کشت تخمیر، مقدار تولید متابولیت ثانویه را افزایش داده، لذا می‌توان از آنها به‌عنوان سوبسترایی مناسب جهت تولید فرآورده‌های میکروبی استفاده کرد.

۶- منابع

۱. کروگر، و.، کروگر، آ.، ۲۰۱۷، بیوتکنولوژی میکروبیولوژی صنعتی. ترجمه علی مرتضوی و سایرین (۱۳۸۱). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ص ۱۰۳-۴۳۹.

۲. هوگو، و.ب.، راسل، آ. د.، ۱۹۸۷، میکروب شناسی دارویی. ترجمه صدیقه فضلی بزاز (۱۳۶۷). انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ص ۱۱۳-۱۵۷.

3. Hu, Y., Zhu, B. (2016). Study on genetic engineering of *Acremonium chrysogenum*, the cephalosporin C producer. Synthetic and Systems Biotechnology, 1(3), 143-149.

۴. ساروخانی، م.معظمی، ن. آذرنوش، م. (۱۳۸۲). دستکاری ژنتیکی سویه آکرومونومی تولید کننده سفالوسپورین C به منظور افزایش تولید این آنتی‌بیوتیک. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایران. سال دهم. شماره ۳۴. ص ۲۲۹-۲۳۴.

5. Tabaraie, B., Ghasemian, E., Tabaraie, T., Rezazarandi, M., Parvizi, E. (2012). Comparative evaluation of Cephalosporin-C production in solid state fermentation and submerged liquid culture. Journal of microbiology, biotechnology and food sciences, 2(1), 83-94.

6. Zafira, I. Z., Nandong, J. (2019, April). Optimal feeding strategy of Cephalosporin C fermentation. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering (Vol. 495, No. 1, p. 012107). IOP Publishing.

7. Hamed, J., Malekzadeh, F., Saghaei-Nia, A. E. (2004). Enhancing of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* with common and uncommon oils. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 31(10), 447-456.

8. Lotfy, W. A. (2007). The utilization of beet molasses as a novel carbon source for cephalosporin C production by *Acremonium chrysogenum*: optimization of process parameters through

تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، تهران، ص ۱۳۹-۲۴۱.

26. Ghalamboran, M. R., Ramsden, J. J., Ansari, F. (2009). Growth rate enhancement of *Bradyrhizobium japonicum* due to magnetite nanoparticles. *Journal of Bionanoscience*, 3(1), 33-38.

27. McBain, S. C., Yiu, H. H., Dobson, J. (2008). Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International journal of nanomedicine*, 3(2), 169-180.

28. Cruz, A. J. G., Silva, A. S., Araujo, M. L. G. C., Giordano, R. C., Hokka, C. O. (1999). Modelling and optimization of the cephalosporin C production bioprocess in a fed-batch bioreactor with invert sugar as substrate. *Chemical Engineering Science*, 54(15-16), 3137-3142.

29. Gao, M. T., Kaneko, M., Hirata, M., Toorisaka, E., Hano, T. (2008). Utilization of rice bran as nutrient source for fermentative lactic acid production. *Bioresource Technology*, 99(9), 3659-3664.

30. Kook, M. C., Seo, M. J., Cheigh, C. I., Pyun, Y. R., Cho, S. C., Park, H. (2010). Enhanced production of Alfa aminobutyric acid using rice bran extracts by *Lactobacillus sakei* B2-16. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20(4), 763-766.

31. Hafrichter, M., 2010, *Industrial Application the Mycota*. Germany, Springer, PP 103-110.

۳۲. جانسون، پ. ۲۰۰۲، مقدمه ای بر بیوتکنولوژی مواد غذایی، ترجمه محمد باقر حبیبی نجفی و سایرین، ۱۳۸۶، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ص ۳۲۹-۳۵۹.

33. Adinarayana, K., Prabhakar, T., Srinivasulu, V., Rao, M. A., Lakshmi, P. J., Ellaiah, P. (2003). Optimization of process parameters for cephalosporin C production under solid state fermentation from *Acremonium chrysogenum*. *Process Biochemistry*, 39(2), 171-177.

۱۹. شجاع الساداتی، ع.، اسدالهی، م. ع.، ۱۳۸۷، بیوتکنولوژی صنعتی، انتشارات آثار علمی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ص ۷۴ - ۳۵۴.

20. Shahidzadeh, H., Labbeiki, G., Attar, H. (2017). Enhanced fermentative production of Cephalosporin C by magnetite nanoparticles in culture of *Acremonium chrysogenum*. *IET Nanobiotechnology*, 11(6), 644-649.

21. Dasari, V. R. R. K., Donthireddy, S. R. R., Nikku, M. Y., Garapati, H. R. (2009). Optimization of medium constituents for Cephalosporin C production using response surface methodology and artificial neural networks. *Journal of biochemical technology*, 1(3), 69-74.

22. Wajid, A., Malik, F., Shafaat, S., Hussain, S., Parveen, G., Roohi, S., Ismail, M. (2012). Effective extraction of Cephalosporin C from whole fermentation broth of *Acremonium chrysogenum* utilizing aqueous two phase systems. *African Journal of Biotechnology*, 11(31), 7973-7979.

۲۳. سلیمانی، س.، شریفی، ا.، آرمین، م.، محمد. (۲۰۱۷). بهینه سازی دما و فرمولاسیون تولید پودر خرمالو به روش سطح پاسخ. نوآوری در علوم و فناوری غذایی، ۸(۴)، ص ۲۷-۳۶.

۲۴. میلانی، آ.، پورآذرنگ، ه.، وطن خواه ش.، وکیلان ح. (۲۰۱۰). بهینه سازی استخراج اینولین از غده‌ی سیب زمینی ترشی به کمک روش سطح پاسخ (RSM). نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران، ۶(۳)، ص ۱۷۶-۱۸۳.

۲۵. پرایمرز، س.، ۱۹۹۲، بیوتکنولوژی مولکولی. ترجمه مجتبی طباطبایی و سایرین (۱۳۷۲). انتشارات مرکز ملی

Optimization of Fermentative Production of Cephalosporin C by *Acromonium chrysogenum* Strain using Response Surface Method

Omid Seyedvand¹, Ghazal Labbeiki^{2*}, Saeid Akbarzadeh Kolahi³

1.MsC of Microbial Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Assistant Professor, Department of Food Sciences and Technology, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Assistant Professor, Department of Pharmacology & Toxicology, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

labeiki@iaups.ac.ir

Receipt: 2022/12/23

Accepted: 2023/06/25

Abstract

The use of productive microorganisms in the production of primary and secondary metabolites is part of the knowledge of microbial biotechnology, which is carried out with the aim of using huge cellular factories and considering their inherent and latent ability to produce products. Investigating and optimizing the factors affecting the synthesis of metabolites will increase the growth of the strain and the yield of the product. In this regard, in this research, by using the response surface method (RSM) and Box-Behnken design, the fermentation production of cephalosporin C by *Acromonium chrysogenum* PTCC 5271, and the effect of three factors on the fermentation process, including pH of Fermentation culture media, rice bran and magnetite iron oxide nanoparticles have been measured at three levels. The obtained results showed that changes in the concentration of magnetite iron oxide nanoparticles and rice bran in the fermentation media significantly affect the amount of antibiotics produced. The highest amount of Cephalosporin C produced (224 mg/l) was obtained in the culture containing 0.04 mg/l magnetite iron oxide nanoparticles, 2.5 g/l rice bran and pH of 6.5. The optimized values for the factors were calculated as 0.0325 mg/l, 2.6162 g/l, and 6.4545 respectively by the Mini Tab program, and finally the mathematical model for the response variable was obtained. Based on the results of this research, magnetite iron oxide nanoparticles and rice bran are suitable substrates in fermentation culture media and biological processes.

Keywords: Fermentation, *Acromonium chrysogenum* strain, Cephalosporin C, Response Surface Method