A Study on the Production of Clavulanic Acid by *Streptomyces clavuligerus* using Carbon Resources such as Glucose, Glycerol, and Wheat Bran

Parisa Akhavan Modares
Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Scince and Research Branch, Tehran, Iran, parisaakhavan14@gmail.com
Fatemeh Ashrafi*
Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran, f_ashrafi@iau-tnb.ac.ir
Taher Nejadsattari,
Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran, nejadsattari_t@yahoo.com

Abstract

Introduction: Clavulanic acid is the first B-Lactamase inhibitor that has been used clinically since 1981. This inhibitor is the natural product of the fermentation of *Streptomyces clavuligerus* and is useful for protecting B-lactams against lots of important B-lactamases such as Group A B-lactamases and Group D Cloxacillin lysis enzymes. The aim of this study was to optimize the composition of the fermentation medium in terms of the carbon source in the production of clavulanic acid.

Materials and Methods: In this experiment, the influence of different concentrations of glycerol 15 g/L, wheat bran 17 g/L, and glucose 18.1 g/L on the production of clavulanic acid was tested. After passing the levels of sporulation, seeding, and fermentation, the influence of different concentrations of glucose, wheat bran, and glycerol on pH rates, biomass, and morphology of *Streptomyces clavuligerus* was tested by the light microscope. The concentration of clavulanic acid produced was measured by spectrophotometry.

Results: According to the results, the highest production of clavulanic acid in all substrates was on the eighth day. The use of glycerol at a concentration of 15 g/l produced 238.3 mg/l clavulanic acid, which had the highest production rate and also reduced production costs.

Discussion and Conclusion: Due to the price, availability, and also increasing the production of glycerol and wheat bran (compared to corn oil), the production of clavulanic acid in environments containing glycerol and wheat bran is easier and more convenient.

Key words: Clavulanic Acid, Beta-lactamase, Biomass, *Streptomyces clavuligerus*

* Corresponding author
Received: March 6, 2020 / **Accepted:** November 4, 2020

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)
سال یازدهم، شماره ۴۱، بهار ۱۴۰۱ ، صفحه ۲۰ - ۹
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۱۶ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۱۴
Doi: 10.22108/BJM.2021.128199.1382

بررسی تولید کلاولانیک‌اسید توسط *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* با استفاده از منابع کربنی گلوکز، گلیسرول و سبوس گندم

پریسا اخوان مدرس: دانشجوی کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران، parisaakhavan14@gmail.com
فاطمه اشرفی*: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران، f_ashrafi@iau-tnb.ac.ir
طاهر نژادستاری: دانشیار گروه علوم گیاهی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران، nejadsattari_t@yahoo.com

چکیده

مقدمه: کلاولانیک‌اسید، نخستین مهارکنندهٔ بتالاکتامازی است که استفادهٔ بالینی یافته و مصرف آن از سال ۱۹۸۱ آغاز شده است. این مهارکننده محصول طبیعی تخمیر *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* است و در محافظت از بتالاکتام‌ها مهم ازجمله بتالاکتامازهای گروه A و آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ کولکساسیلین در گروه D مؤثر است. مطالعهٔ حاضر با هدف بهینه‌سازی ترکیبات محیط‌کشت تخمیر ازنظر منبع کربن در تولید کلاولانیک‌اسید انجام شد.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، اثر غلظت‌های ۱۵ گرم‌برلیتر گلیسرول، ۱۷ گرم‌برلیتر سبوس گندم و ۱/۱۸ گرم‌برلیتر گلوکز روی تولید کلاولانیک‌اسید بررسی شد. پس‌از گذراندن مراحل اسپورزایی، بذردهی و تخمیر، تأثیر غلظت‌های مختلف گلیسرول، سبوس گندم و گلوکز روی شاخص‌های اسیدیته، وزن تر زیست‌توده و تغییرات ریخت‌شناسی سویهٔ *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* با میکروسکوپ نوری بررسی شد. غلظت کلاولانیک‌اسید تولیدشده به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد.

نتایج: نتایج نشان دادند بیشترین میزان تولید کلاولانیک‌اسید با تمام پیش‌ماده‌ها در روز هشتم رخ می‌دهد. استفاده از ۱۵ گرم‌برلیتر گلسیرول سبب تولید ۲۳۸/۳ میلی‌گرم‌برلیتر کلاولانیک‌اسید شد که بیشترین میزان تولید را داشت و سبب کاهش هزینه‌های تولید شد.

بحث و نتیجه‌گیری: باتوجه‌به قیمت، دردسترس‌بودن و همچنین افزایش تولید بازده گلیسرول و سبوس گندم (در مقایسه با روغن ذرت)، تولید کلاولانیک‌اسید در محیط‌های حاوی گلیسرول و سبوس گندم آسان تر انجام می‌شود.

واژه‌های کلیدی: کلاولانیک‌اسید، بتالاکتاماز، وزن تر زیست‌توده، *استرپتومایسس کلاولی جروس*

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

2322-5181/ © 2022 The Authors. Published by University of Isfahan
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

مقدمه

استرپتومایسس‌ها، گروه بزرگی از ریزموجودات هستند که به‌علت تولید ترکیبات باارزش، توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌اند. یکی از مهم‌ترین و باارزش‌ترین گونه‌های *استرپتومایسس* که توجه پژوهشگران بسیاری را به خود معطوف کرده، *استرپتومایسس کلاولی‌جروس*[1] است (۱). ترکیبات یادشده به‌شکل متابولیت ثانویهٔ ریزموجودات به‌طور معمول در زمان بیشینهٔ رشد میکروب تولید می‌شوند؛ بنابراین، چون بیشترین غلظت آنتی‌بیوتیک در زمان مرگ ریزموجود به دست می‌آید، تولید آن مستلزم زمان نسبتا طولانی (۵ تا ۷ روز) است. ساختار شیمیایی آنتی‌بیوتیک‌ها باهم متفاوت است و این ساختار شیمیایی ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی، میکروبی، دارویی و بالینی آنتی‌بیوتیک را مشخص می‌کند (۲). آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام که در درمان بیماری‌های باکتریایی به کار می‌روند، بیش از ۵۰ درصد آنتی‌بیوتیک‌ها و بخش عمده‌ای از داروهای شیمیایی را تشکیل می‌دهند. آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام با مهار پروتئین‌های متصل‌شونده به پنی‌سیلین، در سنتز دیوارهٔ سلولی باکتریایی اختلال ایجاد می‌کنند (۳). دسترسی آسان به ساختار این ترکیب، سمیت ناچیز، کارآمدی و اثر زیاد سبب کاربرد گستردهٔ آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در پزشکی شده است. این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها دو خانوادهٔ پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها را شامل می‌شود. شاخصهٔ اصلی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، وجود حلقهٔ چهار عضوی بتالاکتام است (۴).

از دههٔ ۱۹۷۰ به بعد که بحث مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به‌طور جدی مطرح شد، غربال‌گری‌های گسترده‌ای برای یافتن بتالاکتام‌های مقاوم به بتالاکتاماز انجام و به کشف برخی از بتالاکتام‌ها مانند کارباپنم‌ها منجر شدند که در برابر بتالاکتامازها مقاوم‌ترند.

میکروب‌شناسان واژهٔ تخمیر را در دو مفهوم متفاوت به کار می‌برند: در مبحث متابولیسم، تخمیر به فرایند تولید انرژی گفته می‌شود که در آن، ترکیبات آلی به‌شکل دهنده و دریافت‌کنندهٔ الکترون عمل می‌کنند؛ در میکروبیولوژی صنعتی، این واژه برای تعداد زیادی از سلول‌ها به کار می‌رود که در شرایط هوازی و بی‌هوازی و درون ظرفی به نام فرمانتور یا بیورآکتور رشد کرده‌اند (۵).

به‌طور کلی، فرایند تولید آنتی‌بیوتیک‌ها شامل پنج مرحلهٔ اصلی است که عبارتند از: مرحلهٔ اول- حفظ و نگهداری کشت فعال؛ مرحله دوم- تهیهٔ سوسپانسیون اسپوری یا درحقیقت، مایهٔ تلقیح و توسعهٔ آن؛ مرحلهٔ سوم- مرحلهٔ پیش‌کشت که به آن، مرحلهٔ بذردهی یا Seeding نیز گفته می‌شود؛ مرحله چهارم- مرحلهٔ تخمیر یا fermentation که اساسی‌ترین مرحلهٔ تولید آنتی‌بیوتیک است؛ مرحلهٔ پنجم- استخراج و برداشت محصول و خالص‌سازی آن (این مراحل برای تولید کلاولانیک‌اسید نیز صدق می‌کنند) (۵). کلاولانیک‌اسید مهم‌ترین بازدارندهٔ آنزیم بتالاکتاماز است که سبب مهار عملکرد بتالاکتامازهای کروموزومی و پلازمیدی تولیدشده به‌وسیلهٔ باکتری‌های گرم مثبت و منفی می‌شود (۶). فرمولاسیون کلاولانیک‌اسید نزدیک به ۲۰ سال در درمان طیف گسترده‌ای از عفونت‌های بالینی مؤثر بوده است. آگمنتین که نام تجاری کلاولانیک‌اسید است، حاوی ترکیبی از آموکسی‌سیلین و کلاولانات‌پتاسیم است و یکی از کاربردی‌ترین

آنتی‌بیوتیک‌ها به شمار می‌آید. باتوجه‌به کاربرد کلاولانیک‌اسید در صنعت داروسازی، تولید ارزان این ماده می‌تواند کمک بزرگی به اقتصاد و داروسازی ما باشد (۷). تأثیر منابع کربن در تولید کلاولانیک‌اسید توسط *استرپتومایسس کلاولی‌جروس*، برخلاف سفامایسین C که آن نیز یکی از محصولات تولیدی این ریزموجود است، به‌طور درخور توجهی بررسی نشده و اطلاعات چندانی دربارهٔ تولید کلاولانیک‌اسید به‌وسیلهٔ این باکتری منتشر نشده است؛ این امر نشان‌دهندهٔ پژوهش‌های کمتر در زمینهٔ تولید کلاولانیک‌اسید یا اهمیت کمتر این آنتی‌بیوتیک نیست، بلکه به احتمال زیاد، پژوهش‌های انجام‌شده در این زمینه به‌علت اهمیت صنعتی و تجاری این ترکیب منتشر نشده‌اند.

هدف اصلی پژوهش حاضر، تولید کلاولانیک‌اسید با استفاده از منابع کربنی مختلف و کاهش چشمگیر هزینهٔ تولید با استفاده از مقادیر مناسب منابع کربن در فرمولاسیون محیط‌کشت تخمیر است. در حال حاضر، باوجود تمهیداتی که علیه مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در دنیا انجام شده‌اند، هنوز انواع آنتی‌بیوتیک‌ها به‌طور چشمگیر در ایران استفاده می‌شوند و سالانه هزینهٔ زیادی برای تولید و خرید این محصولات پرداخت می‌شود؛ این امر ضرورت بومی‌سازی تولید آنتی‌بیوتیک‌ها با هزینهٔ کمتر را در کشور نشان می‌دهد و از سوی دیگر، انتخاب کلاولانیک‌اسید در پژوهش حاضر به‌علت مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایجادشده از طریق این ماده و خطر بزرگی که جامعهٔ بشریت را تهدید می‌کند، اهمیت دارد.

مواد و روش‌ها

الف) ریزموجودات: در پژوهش حاضر از سویهٔ *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* PTCC 1705 استفاده شد و این سویهٔ مولد کلاولانیک‌اسید از مرکز کلکسیون ریزموجودات صنعتی ایران تهیه شد. این مرکز بیش از دو هزار نمونهٔ میکروبی شامل باکتری، قارچ، مخمر و مشتقات آنها را طبق استانداردهای بین‌المللی نگهداری می‌کند؛ از سوی دیگر، مرکز کلکسیون پیوسته با جداسازی و جمع‌آوری نمونه‌های میکروبی ایران غنی‌تر می‌شود و سرمایه‌ای را برای پژوهش‌های علمی کشور فراهم می‌کند.

ب) محیط کشت اسپورزایی: این محیط با ترکیبات ۱۰ گرم‌برلیتر عصارهٔ مالت (Merck)، ۴ گرم‌برلیتر عصارهٔ مخمر (Quelab)، ۴ گرم‌برلیتر گلوکز (Merck)، ۲ گرم‌برلیتر کربنات‌کلسیم (Merck) و ۱۲ گرم‌برلیتر آگار (Merck) تهیه شد. این محیط‌کشت سبب رشد اسپورها می‌شود و رشد میسلیومی کمتری در این مرحله دیده می‌شود (۸). پس‌از ساخت محیط‌کشت و استریل‌کردن آن، سویهٔ ریزموجود در شرایط استریل از آمپول لیوفیلیزه به محیط‌کشت منتقل و به‌منظور تولید اسپور، ۱۴ روز در دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شد.

ج) مرحلهٔ بذردهی: هدف از تهیهٔ این محیط، وادارکردن اسپورهای باکتری به آغاز رویش میسلیوم است (۸). ترکیبات به‌کاررفته در محیط‌کشت بذردهی شامل ۱۰ گرم‌برلیتر باکتوپپتون (Himedia)، ۲۰ گرم‌برلیتر گلیسرول (Merck) و ۱۰ گرم‌برلیتر عصارهٔ مالت (Merck) بود و با تهیهٔ سوسپانسیون اسپوری از مرحلهٔ اسپورزایی، به میزان ۱ درصد حجم محیط‌کشت بذردهی به آن تلقیح شد و به‌مدت ۴۸ ساعت در هم‌زن‌انکوباتور با دور ۲۰۰ دوردردقیقه و دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. پس‌از گذشت مدت زمان یادشده و با سنجش عدم‌آلودگی میکروبی،

زیست‌تودهٔ تشکیل‌شده، ریخت‌شناسی باکتری و اسیدیته، بهترین فلاسک بذردهی به‌عنوان مایهٔ تلقیح اصلی برای مرحلهٔ تخمیر استفاده شد. مناسب‌ترین فلاسک بذردهی انتخاب‌شده زیر میکروسکوپ نوری، بدون آلودگی، دارای میسلیوم‌های مشخص، ۲۳ تا ۲۶ درصد زیست‌توده و اسیدیتهٔ ۵/۹ تا ۶/۱ بود.

د) مرحلهٔ تخمیر: ترکیبات محیط‌کشت این مرحله بیشترین اثر را در تولید آنتی‌بیوتیک دارند. ترکیبات استفاده‌شده در محیط‌کشت تخمیر شامل ۲۰ گرم‌برلیتر کنجالهٔ سویا، ۱۰ گرم‌برلیتر نشاسته (Merck)، ۲۳ گرم‌برلیتر روغن ذرت، ۱/۲ گرم‌برلیتر $Ca_3(po_4)_2$ (Merck)، ۰/۰۰۱ گرم‌برلیتر $ZnSO_4.H_2O$ (Merck)، ۰/۰۰۱ گرم‌برلیتر $FeSO_4.\ 7H_2O$ (Merck) و ۰/۰۰۱ گرم‌برلیتر $Mncl_2.4H_2O$ (Merck) بود (۹). ازآنجاکه تولید کلاولانیک‌اسید در پژوهش حاضر با استفاده از منابع کربنی مختلف انجام شد، علاوه‌بر مواد یادشده، گلیسرول به مقدار ۱۵ گرم‌درلیتر، گلوکز به مقدار ۱/۱۸ گرم‌درلیتر و سبوس گندم به مقدار ۱۷ گرم‌درلیتر در محیط تخمیر استفاده شد و ۲۳ گرم‌درلیتر روغن ذرت برای شاهد در نظر گرفته شد. پس‌از تنظیم اسیدیته و استریل‌کردن محیط، از مایهٔ تلقیح که درحقیقت محیط‌کشت بذردهی ساخته‌شده در بخش (ج) بود، به میزان ۵ تا ۱۰ درصد حجمی به محیط‌کشت تخمیر افزوده شد (۱۰) و به‌مدت ۱۲ روز در هم‌زن‌انکوباتور با دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد و سرعت ۲۰۰ دوردردقیقه قرار داده شد و طی این مدت، کلاولانیک‌اسید تولید شد. در روزهای ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ و در شرایط استریل، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر نمونه از هریک از فلاسک‌ها گرفته شد و ریخت‌شناسی، درصد زیست‌توده، اسیدیته و میزان کلاولانیک‌اسید تولیدشده در هر نمونه بررسی شد. تمام آزمایش‌ها پنج بار تکرار شدند.

سنجش اسیدیته: در پایان مرحلهٔ تخمیر، میزان ۵ میلی‌لیتر از هریک از محیط‌های کشت برداشته و اسیدیته بررسی شد. به‌منظور سنجش اسیدیته از دستگاه pHمتر رومیزی (مدل GLP 22 PH ISE CRISON) استفاده شد. مناسب‌ترین اسیدیته در این مرحله، ۵/۹ تا ۶/۱ بود.

سنجش وزن تر زیست‌توده (بیومس): به‌منظور اندازه‌گیری وزن تر زیست‌توده از رابطهٔ زیر استفاده شد (۸):

$$\text{درصد وزن تر زیست توده} = \frac{\text{وزن رسوب}}{\text{وزن محیط کشت داخل میکروتیوب}} \times 100$$

ه) سنجش میزان کلاولانیک‌اسید تولیدشده: به‌منظور استخراج کلاولانیک‌اسید از محیط‌کشت، میزان ۸ میلی‌لیتر از هر نمونه درون لولهٔ فالکن ۱۰ ریخته شد و نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس محلول رویی به ویال دیگر منتقل شد. به‌منظور حذف پروتئین‌های مداخله‌کننده، اسیدیتهٔ مایع تخمیر با استفاده از هیدروکلریک‌اسید ۰/۱ نرمال معادل ۳/۲ تنظیم شد و سپس محلول حاصل به‌مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی از طریق غشای میلی‌پور (فیلتر ۰/۴۵ درصد) فیلتر شد. مایع رویی برای اندازه‌گیری کلاولانیک‌اسید استفاده شد (۶).

پس‌از فیلترشدن، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رویی درون ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس ۸۰۰ میکرولیتر از محلول ایمیدازول به آن افزوده شد (۱۱)؛ سپس چهار ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی کلاولانیک‌اسید و ایمیدازول به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد روی شیکر قرار داده شدند؛ پس‌از

۱۵ دقیقه، کمپلکس زردرنگ کلاولانیک‌اسید و ایمیدازول مشاهده شد. میزان جذب کمپلکس رنگی کلاولانیک‌اسید- ایمیدازول برای هریک از نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۱۱ نانومتر خوانده شد (۱۱). مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول ایمیدازول (بلانک) برای تنظیم صفر دستگاه استفاده شد. غلظت‌های کلاولانیک‌اسید در نمونه‌های تخمیری با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمدند.

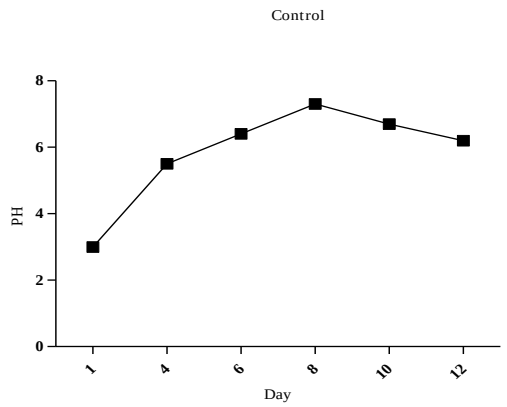
تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها: محاسبهٔ آماری مطالعهٔ حاضر با نرم‌افزار Graph pad prisme 5 انجام شد و نتایج با تحلیل واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) بررسی شدند و $P<۰/۰۵$ معنادار در نظر گرفته شد؛ سپس میزان تغییرات هریک از نمونه‌ها با نرم‌افزار Graph pad prisme 5 و با استفاده از روش One way ANOVA و Tukey's HSD post-hoc test محاسبه شد.

نتایج

نتایج پژوهش حاضر نشان دادند میزان اسیدیته، درصد زیست‌تودهٔ تولیدشده و غلظت کلاولانیک‌اسید تولیدشده طی فرایند تخمیر با تغییراتی همراه است؛ به‌طوری که در روزهای چهارم، ششم و هشتم، روند صعودی و پس‌از آن، سیر نزولی نشان می‌دهد.

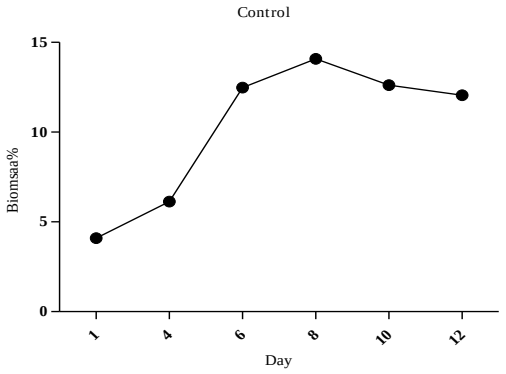
الف- ابتدا به بررسی درصد وزن تر، تغییرات ریخت‌شناسی سویهٔ مدنظر و میزان کلاولانیک‌اسید تولیدی هنگام استفاده از ۲۳ گرم‌درلیتر روغن ذرت برای شاهد در محیط‌کشت تخمیر پرداخته می‌شود.

۱- بررسی تغییرات اسیدیتهٔ محیط‌کشت تخمیر دارای روغن ذرت (گروه شاهد): در شکل ۱، تغییرات مقدار اسیدیته در محیط شاهد دارای ۲۳ گرم‌درلیتر روغن ذرت طی دورهٔ تخمیر دوازده‌روزه مشاهده می‌شود؛ به‌این‌ترتیب که مقدار اسیدیته در روز چهارم برابر ۵/۵۸ می‌شود و تا روز هشتم روند افزایشی دارد و در روز هشتم به بیشترین مقدار خود (۷/۳) می‌رسد؛ با ادامهٔ فرایند، مقدار اسیدیته سیر نزولی می‌یابد تا اینکه در روز دوازدهم تخمیر به ۶/۲ می‌رسد.

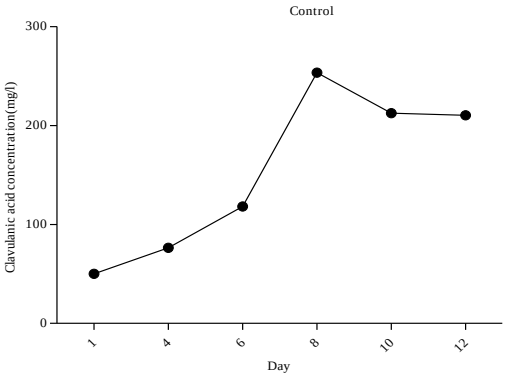


شکل ۱- نمودار تغییرات اسیدیته در طول دورهٔ دوازده‌روزهٔ کشت تخمیری در گروه شاهد

۲- بررسی درصد زیست‌توده در محیط‌کشت تخمیر دارای روغن ذرت (گروه شاهد): در شکل ۲، درصد تغییرات زیست‌توده در محیط‌کشت دارای ۲۳ گرم‌درلیتر روغن ذرت از روز اول تا دوازدهم کشت مشاهده می‌شود. نتایج نشان می‌دهند درصد زیست‌توده در محیط‌کشت از روز اول تا روز هشتم به‌ترتیب روز اول ۴/۱، روز چهارم ۶/۱۳، روز ششم ۱۲/۴۸ و روز هشتم ۱۴/۰۸ بوده و روند افزایشی داشته است؛ سپس از روز دهم تا روز دوازدهم به‌ترتیب روز دهم ۱۲/۶۲ و روز دوازدهم ۱۲/۶۰ بوده و روند کاهشی داشته است.



شکل ۲- نمودار درصد تغییرات زیست‌توده در طول دورهٔ دوازده‌روزهٔ کشت تخمیری در گروه شاهد



شکل ۳- نمودار مقدار تولید کلاولانیک‌اسید در طول دورهٔ دوازده‌روزهٔ کشت تخمیری در گروه شاهد

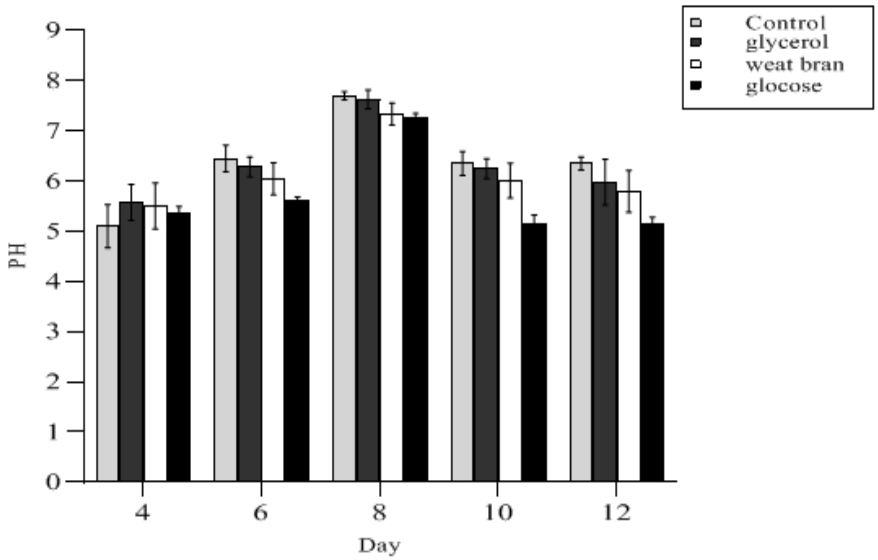
۳- بررسی مقدار کلاولانیک‌اسید تولیدشده در محیط کشت دارای روغن ذرت (گروه شاهد): شکل ۳، مقدار کلاولانیک‌اسید تولیدشده در بازهٔ زمانی دوازده روز را در محیط کشت دارای ۲۳ گرم‌درلیتر روغن ذرت (نمونهٔ شاهد) نشان می‌دهد. مقدار کلاولانیک‌اسید تولیدی از روز اول تا روز هشتم روند افزایشی داشته و به ترتیب در روز اول ۵۰، روز چهارم ۷۶/۴۱، روز ششم ۱۱۸/۲۰ و روز هشتم ۲۳۰/۴۰ میلی‌گرم‌درلیتر بوده و از روز هشتم به بعد، روند کاهشی داشته و در روز دهم و دوازدهم سنجش به‌ترتیب در روز دهم ۲۱۲/۵۰ و روز دوازدهم ۲۱۰/۲۰ میلی‌گرم‌درلیتر بوده است.

٤- بررسی تأثیر روغن ذرت روی ریخت‌شناسی باکتری *استرپتومایسس کلاولی‌جروس*: همان‌طور که در شکل ۴، الف دیده می‌شود، رشد میسلیومی باکتری در روز چهارم فرایند تخمیر آغاز می‌شود و هیف‌های کوتاه و درحال انشعاب تولید می‌شوند و تا روز ششم فرایند تخمیر، میسلیوم‌ها به‌طور کامل رشد می‌کنند و دارای طول بلند و انشعابات فراوان می‌شوند (شکل ۴، ب). در روز هشتم، رشد میسلیوم‌ها کامل می‌شود و تمام میسلیوم‌ها منشعب و دارای طول بلند می‌شوند (شکل ۴، ج). روز دهم فرایند تخمیر، میسلیوم‌ها طول کمتری دارند و در برخی قسمت‌ها قطعه‌قطعه می‌شوند و طول و انشعابات آنها کاهش می‌یابد (شکل ۴، د) و تا روز دوازدهم، تمام میسلیوم‌ها تجزیه می‌شوند و تنها قطعه‌های مجزا و پراکندهٔ میسلیومی که طول کوتاهی دارند، دیده می‌شوند (شکل ۴، ه).

شکل ۴- ریخت‌شناسی باکتری *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* در محیط کشت شاهد در طول تخمیر؛ الف. روز چهارم، ب. روز ششم، ج. روز هشتم، د. روز دهم، ه. روز دوازدهم

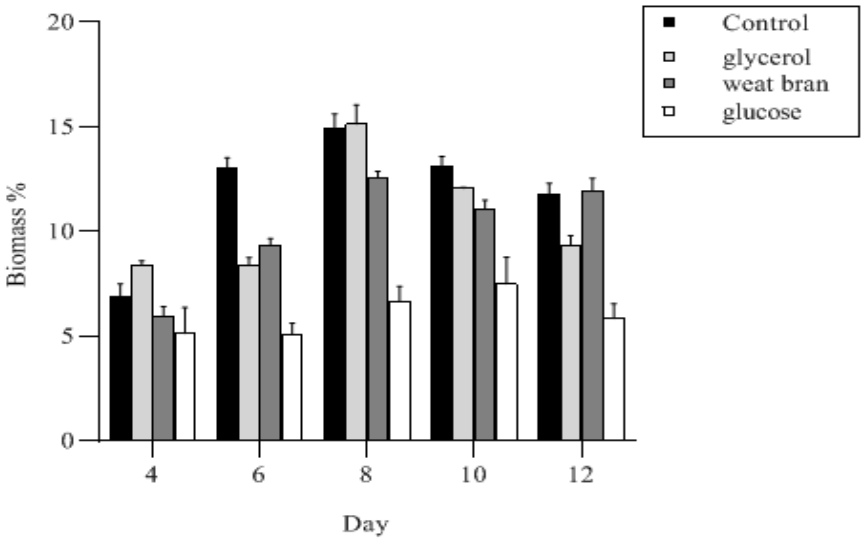
ب) بررسی و مقایسهٔ هم‌زمان اثر تمام غلظت‌ها روی شاخص‌های تخمیر

۱- بررسی تأثیر تمام غلظت‌ها روی اسیدیتهٔ محیط‌کشت تخمیر: شکل ۵ نشان می‌دهد در تمام غلظت‌ها، اسیدیته در ابتدای فرایند (از روز چهارم تا روز هشتم) روند افزایشی دارد و پس‌ازآن، کاهش می‌یابد. در پژوهش حاضر، بیشترین مقدار اسیدیته به روغن ذرت (۲۳ گرم‌درلیتر) و پس‌ازآن، سبوس گندم (۱۷ گرم‌درلیتر)، گلیسرول (۱۵ گرم‌درلیتر) و درنهایت، گلوکز (۱/۱۸ گرم‌درلیتر) تعلق داشت. گروه‌های آزمون با گروه شاهد بر اساس آزمون آماری two way ANOVA مقایسه شدند. معناداربودن داده‌ها با نرم‌افزار Graph pad prisme 5 و آزمون Tukey و One way ANOVA بررسی شد و اختلاف معنادار نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد ($P<0.122$).



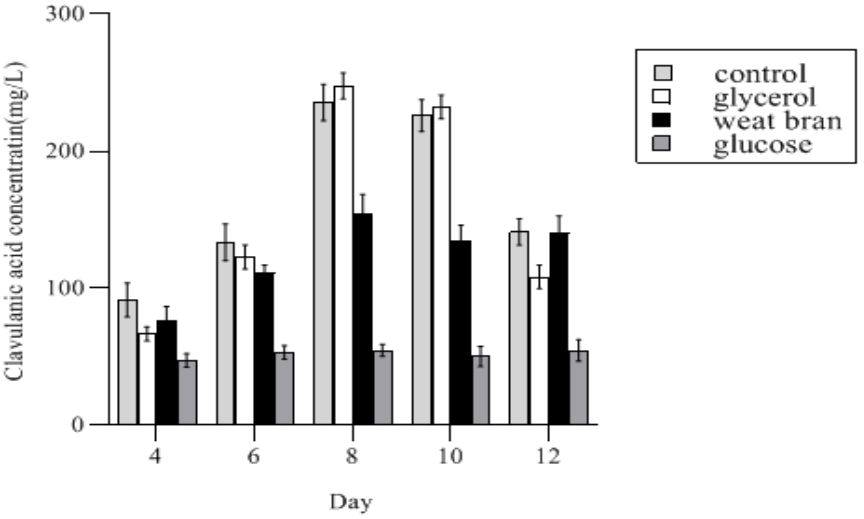
شکل ۵- نمودار تغییرات اسیدیته در تمام گروه‌ها طی مدت ۱۲ روز

۲- بررسی اثر تمام غلظت‌ها روی درصد وزن تر زیست‌تودهٔ تولیدی محیط‌کشت تخمیر: شکل ۶، تغییرات وزن تر زیست‌توده نسبت به تمام غلظت‌ها را نشان می‌دهد. بیشترین میزان وزن تر زیست‌توده در روز هشتم به‌ترتیب به روغن ذرت (۲۳ گرم‌درلیتر) به مقدار ۱۴/۰۸ و سپس سبوس گندم (۱۷ گرم‌درلیتر) به مقدار ۱۲/۵۴، گلیسرول (۱۵ گرم‌درلیتر) به مقدار ۱۲/۱۶ و گلوکز (۱/۱۸ گرم‌درلیتر) به مقدار ۶/۰۳ مربوط بود. گروه‌های آزمون با گروه شاهد بر اساس آزمون آماری two way ANOVA مقایسه شدند. معناداربودن داده‌ها با نرم‌افزار Graph pad prisme 5 و آزمون Tukey و One way ANOVA بررسی و اختلاف معنادار نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ($P<0.006$).



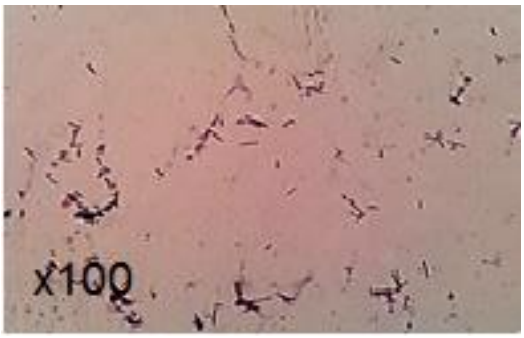
شکل ۶- نمودار تغییرات زیست‌توده در تمام روزها

۳- بررسی اثر تمام غلظت‌ها بر میزان کلاولانیک‌اسید تولیدی محیط کشت تخمیر: با توجه به شکل ۷، غلظت‌های مختلف روغن ذرت با غلظت ۲۳ گرم‌درلیتر به میزان ۲۲۰/۴۳ میلی گرم‌درلیتر، گلیسرول با غلظت ۱۵ گرم‌درلیتر به مقدار ۲۱۸/۳میلی گرم‌درلیتر، سبوس گندم با غلظت ۱۷ گرم‌درلیتر به مقدار ۱۳۸/۲۶ میلی گرم‌درلیتر و گلوکز با غلظت ۱/۱۸ گرم‌درلیتر به مقدار ۴۷/۱۱ میلی گرم‌درلیتر رسیده است. گروه‌های آزمون با گروه شاهد بر اساس آزمون آماری two way ANOVA مقایسه شدند. معناداربودن داده‌ها با نرم‌افزار Graph pad prisme 5 و آزمون Tukey و One way ANOVA بررسی و اختلاف معنادار نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ($P<0.001$).



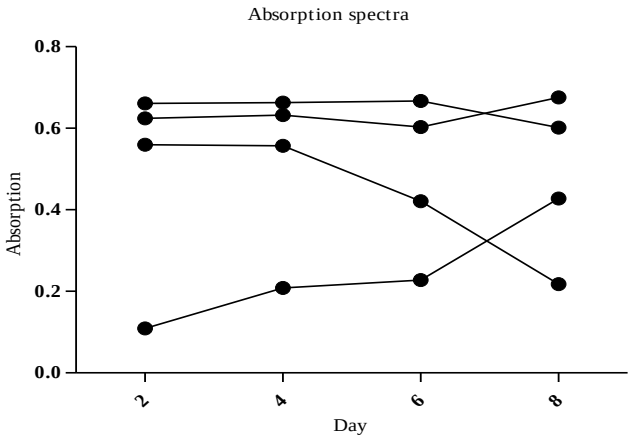
شکل ۷- تأثیر تمام غلظت‌ها بر تولید کلاولانیک‌اسید

ج) غلظت بهینه برای تولید کلاولانیک‌اسید: بر اساس نتایج، علاوه‌بر روغن ذرت در غلظت ۲۳ گرم‌درلیتر که به‌شکل شاهد در محیط‌کشت تخمیر استفاده شد و میزان کلاولانیک‌اسید تولیدی آن برابر ۲۲۰/۴۳ میلی‌گرم‌برلیتر بود، گلیسرول با غلظت ۱۵ گرم‌درلیتر که میزان تولید کلاولانیک‌اسید آن در روز هشتم برابر ۲۳۸/۳ میلی‌گرم‌برلیتر بود، می‌تواند غلظت بهینه برای تولید کلاولانیک‌اسید باشد؛ همچنین سبوس گندم که در پژوهش‌های گذشته روی غلظت‌های مختلف آن برای تولید کلاولانیک‌اسید کار شده است، در غلظت ۱۷ گرم‌درلیتر به میزان ۱۳۸/۲۶ میلی‌گرم‌درلیتر کلاولانیک‌اسید تولید کرد. میزان تولید کلاولانیک‌اسید در گلوکز با غلظت ۱/۱۸ برابر ۵۰/۶ میلی‌گرم‌برلیتر و بسیار کمتر از روغن ذرت، گلیسرول و سبوس گندم بود. مطالعهٔ ریخت‌شناسی نشان داد تولید میسلیوم در غلظت ۱/۱۸ میلی‌گرم‌درلیتر گلوکز بسیار ناچیز است و باکتری گلوکز را به میزان بسیار کم جذب کرده است (شکل ۸).



شکل ۸- تصویر تغییرات ریخت‌شناسی باکتری *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* در روز هشتم فرایند تخمیر با غلظت ۱/۱۸ میلی‌گرم‌درلیتر گلوکز

د) طیف جذبی محیط‌کشت در روزهای مختلف: شکل ۹ طیف جذبی محیط‌کشت در روزهای دوم، چهارم، ششم و هشتم را نشان می‌دهد که با دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شده است.



شکل ۹- نمودار طیف جذبی گلیسرول، گلوکز، سبوس گندم و شاهد

بحث و نتیجه‌گیری

باتوجه‌به نتایج پژوهش حاضر، استفاده از مقادیر ۱۵ گرم‌برلیتر گلیسرول و ۱۷ گرم‌برلیتر سبوس سبب تولید مقادیر مختلف کلاولانیک‌اسید می‌شود و گلوکز با میزان ۱/۱۸ گرم‌برلیتر میزان بسیار ناچیزی کلاولانیک‌اسید می‌کند. مونیر[۲] و همکاران در سال

۲۰۱۰، بهبود و افزایش تولید کلاولانیک‌اسید در *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* را با استفاده از روغن گیاهی بررسی کردند و نتیجه گرفتند استفاده از روغن زیتون به‌شکل تنها منبع کربن و انرژی برای کشت *استرپتومایسس کلاولی‌جروس*، راهبرد امیدوارکننده‌ای برای تولید کلاولانیک‌اسید است و استفاده از روغن ذرت به‌شکل تنها منبع کربن مناسب است. نتایج مطالعهٔ حاضر با انتخاب روغن ذرت برای منبع کربن در محیط تخمیر مطابقت دارند (۱۲).

پژوهشگران بیان کرده‌اند گلیسرول در غلظت‌های ۱۰ تا ۱۵ میلی‌گرم‌درلیتر سبب افزایش تولید کلاولانیک‌اسید در کشت‌های فلاسک لرزشی می‌شود و غلظت گلیسرول بیش از ۱۵ میلی‌گرم‌درلیتر را برای مهار بروز کلاولانیک‌اسید گزارش کرده‌اند (۶ و ۱۳). در پژوهش حاضر، گلیسرول با مقدار ۱۵ میلی‌گرم‌درلیتر بیشترین میزان کلاولانیک‌اسید را تولید کرد.

در برخی پژوهش‌ها، اثر آرد بادام‌زمینی و اجزای مختلف آن بر رشد *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* و تولید کلاولانیک‌اسید در محیط کمپلکس دارای آرد سویا، آرد مالت و نمک‌های معدنی بررسی شده است و نتایج نشان داده‌اند بهترین غلظت آرد دانهٔ بادام‌زمینی برای رشد *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* و تولید کلاولانیک‌اسید به‌ترتیب برابر ۵ و ۱ گرم‌برلیتر است که به‌ترتیب سبب ۳۵ و ۴۰ درصد افزایش زیست‌توده و تولید کلاولانیک‌اسید می‌شوند (۶ و ۱۴)؛ در این راستا، استفاده از سبوس گندم به‌جای روغن ذرت، منبع مناسب کربن و انرژی در فرمولاسیون فرایند تخمیر است و تولید کلاولانیک‌اسید در محیط‌کشت حاوی سبوس گندم با غلظت ۲۰/۴ گرم‌برلیتر افزایش می‌یابد. در پژوهش حاضر، سبوس گندم با غلظت ۱۷ گرم‌برلیتر استفاده شد و نتیجه با یافته‌های مطالعه‌های پیشین مطابقت داشت و سبب افزایش تولید کلاولانیک‌اسید شد (۶).

باتوجه‌به نتایج، هم‌زمان‌بودن یا نبودن رشد باکتری و تولید کلاولانیک‌اسید به شرایط تخمیر و به‌ویژه ترکیبات محیط‌کشت و مقدار آنها بستگی دارد؛ در صورتی که طبق الگوی کلاسیک، بیشترین میزان آنتی‌بیوتیک در مرحلهٔ ایدیوفاز (مرحلهٔ سکون) تولید می‌شود (۸). مطابق با این نتایج، پژوهش‌ها نشان می‌دهند تولید کلاولانیک‌اسید سبب رشد جزئی ریزموجود می‌شود (۱۰)

محیط‌کشت حاوی روغن گل زیتون (olive pomace oil) سبب افزایش رشد *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* و درنتیجه، افزایش تولید کلاولانیک‌اسید می‌شود (۳). کاهش دما در محدودهٔ ۲۰ تا ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد سبب افزایش تولید کلاونیک‌اسید در کشت‌های تخمیری *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* دارای گلسیرول در فرمانتور با سرعت ۲۵۰ دوردردقیقه و اسیدیتهٔ ۶/۸ می‌شود (۷). آمینواسیدها به‌عنوان عاملی برای افزایش بازدهی رشد در شرایطی با اسیدیته و اکسیژن کنترل‌شده مطالعه شده‌اند. ترکیب هم‌زمان آرژنین و گلیسرول در محیط‌کشت سبب تولید ۱۳۰ میلی‌گرم‌برلیتر کلاولانیک‌اسید و حضور هم‌زمان اورنیتین و گلیسرول سبب تولید ۲۰۰ میلی‌گرم‌برلیتر کلاولانیک‌اسید می‌شود (۱۵). به‌طور کلی، افزودن موادی مانند گلیسرول یا روغن‌های گیاهی مانند روغن ذرت و روغن زیتون در مقایسه با نشاسته (۱۶) و ثابت نگه‌داشتن مقدار اکسیژن و اسیدیته، بازده تولید کلاونیک‌اسید را افزایش می‌دهد. همچنین روش‌های مختلف تخمیری مانند fed-batch در افزایش تولید موثر هستند (۱۷).

در زمینهٔ رشد باکتری *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* و تغییرات وزن تر زیست‌توده طی فرایند تخمیر دیده شد میسلیوم‌های باکتری به‌شکل قطعه‌های کوتاه هستند؛ زیرا باکتری مدنظر در فاز تأخیری است و سلول‌ها درحال سازگاری با شرایط محیط کشت جدید هستند. پس‌از اتمام فاز تأخیری، فاز جدید نمایی آغاز شد و میسلیوم‌ها با انشعابات بلند مشاهده شدند که این تغییر در فاز رشد باکتری سبب افزایش ناگهانی و شدید مقدار زیست‌توده شد (۸).

در بررسی ارتباط تغییرات ریخت‌شناسی باکتری *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* و تولید کلاولانیک اسید، ریخت‌شناسی تعداد زیادی از اکتینومیست‌ها با غلظت‌های اسپوری زنده در مایهٔ تلقیح تحت‌تأثیر قرار گرفت؛ به‌طوری‌که در غلظت‌های زیاد به ایجاد شکل میسلیوم‌ها و در غلظت‌های کم مایهٔ تلقیح به شکل پلت منجر شد. هم‌زدن محیط تخمیر، عامل مؤثر دیگری بود که بر تغییرات ریخت‌شناسی باکتری تأثیر داشت؛ در این محیط کشت، هم‌زدن نه‌تنها برای انتقال حرارت، انتقال جرم و مخلوط‌کردن محیط به‌منظور انتقال اکسیژن در فلاسک ضروری بود، تأثیراتی روی ریزموجودات داشت که ازجملهٔ آنها عبارتند از: تغییر ریخت‌شناسی ریزموجودات رشته‌ای، تغییر بازده رشد و تغییر سرعت تشکیل محصول. ازآنجاکه هیف‌ها طول بلندی داشتند، نسبت به سلول‌های منفرد در معرض نیروهای برشی بزرگ‌تری قرار داشتند. برخی از اکتینومیست‌ها، دیوارهٔ سخت و محکمی داشتند و نیروهای برشی شدید را تحمل کردند؛ درحالی‌که برخی دیگر به نیروهای برشی حساس‌تر بودند. شکسته‌شدن هیف‌ها می‌تواند آثار مفید و زیان‌آوری را در پی داشته باشد. رشد هیف تنها در سلول‌های نوک هیف رخ می‌دهد. اگر هیف از ناحیه‌ای که در رشد مؤثر است، بریده شود، سیتوپلاسم بیشتری از دست می‌دهد و مرگ اتفاق می‌افتد؛ ولی اگر هیف از ناحیه‌ای که تأثیری در رشد ندارد، بریده شود، بدون اینکه سرعت رشد خود را از دست دهد، به دو قسمت تبدیل می‌شود. بریده‌شدن هیف‌ها سبب کاهش ویسکوزیتهٔ مایع تخمیر می‌شود. هیف‌های بسیار منشعب حساسیت کمتری نسبت به شکنندگی دارند و در سرعت‌های زیاد هم‌زن، شدت شکنندگی قطعه‌های هیف بزرگ‌تر کم تر از قطعه‌های کوچک‌تر است (۸).

انشعابات بیشتر و طویل‌تر هیف‌ها در محیط کشت تخمیر (بهینه) نسبت به محیط کشت شاهد نشان‌دهندهٔ تأثیر ترکیبات محیط کشت بر ریخت‌شناسی سویهٔ *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* بود. این یافته‌ها با نتایج مطالعهٔ سایر پژوهشگران مطابقت دارند (۸ و ۱۸).

یکی از راه‌های کاهش هزینه، جایگزینی مواد خام محیط کشت با مواد ارزان و دردسترس است. ریزموجودات در وضعیت خاص قادر به تولید متابولیت‌های ثانویه هستند؛ بنابراین، نکتهٔ اصلی در تولید متابولیت‌های ثانویه، برنامه‌ریزی و طراحی محیط کشت مناسب است. محدودیت منبع مغذی در محیط کشت سبب محدودیت رشد ریزموجودات و تولید محصول می‌شود. در پژوهش حاضر، گلیسرول در غلظت ۱۵ گرم‌برلیتر به‌شکل منبع کربن توانست رشد باکتری و تولید کلاولانیک‌اسید را تقویت کند. در پژوهش حاضر، گلیسرول و سبوس گندم بیشترین میزان تولید کلاولانیک‌اسید را داشتند و گلوکز بازدهی بسیار کمی نسبت به این دو ماده داشت.

سپاسگزاری

از نویسندگان این مقاله و همچنین کارکنان آزمایشگاه میکروب‌شناسی رازی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات برای همکاری صمیمانه در اجرای این پروژه سپاسگزاری می‌کنم.

References

(1) Aharonowitz Y., Demain AL. Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in streptomyces clavuligeru. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*® (AAC) 1987; 14: 159-164.

(2) Béahdy J. Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. In: Perlman D., editor. *Advances in applied microbiology*. Research Institute for Pharmaceutical Chemistry, Budapest, Hungary: Elsevier; 1974: 309-406.

(3) Young T., Li Y., Efthimiou G. Olive pomace oil can be used as an alternative carbon source for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. Waste and Biomass Valorization 2019 3: 1-6.

(4) Elson SW., Oliver RS. Studies on the biosynthesis of clavulanic acid. I. The Journal of Antibiotics 1978; 31(6): 586-592.

(5) Liras P., RodriguezGarcia A. Clavulanic acid, a B-lactamase inhibitor: biosynthesis and molecular genetics. Applied Microbiology and Biotechnology 2011; 54: 467-475.

(6) Hosseini Khayat S., Akbarzadeh S. Production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* in batch cultures with using wheat bran as the source of carbon. Journal of Pharmaceutical and Health Sciences 2017 1; 5(1): 51-60.

(7) Costa CL., Badino AC. Production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* in batch cultures without and with glycerol pulses under different temperature conditions. Biochemical Engineering Journal 2012; 69: 1-7.

(8) Firozbakht M., Akbarzadeh kolahi S., Labeiki GH., Attar S. Optimization of suitable nitrogen sources for the production of erythromycin by Saccharopolyspora erythraea. Journal of Microbial World 2015; 221-230 (in Persian).

(9) Mayer AF., Deckwer WD. Simultaneous production and decomposition of clavulanic acid during *Streptomyces clavuligerus*. Applied Microbiology and Biotechnology 2009; 45: 41-46.

(10) Neto AB., Hirata DB., Cassiano Filho LC., Bellão C., Badino Júnior AC., Hokka CO. A study on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in batch, fed-batch and continuous processes. Brazilian Journal of Chemical Engineering 2005; 22(4): 557-563.

(11) Kızıldoğan AK. The effect of different vegetable oils on clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi 2017;32(2): 223-228.

(12) Salem-Bekhit MM., Alanazi FK., Alsarra IA. Improvement and enhancement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* using vegetable oils. *African Journal of Biotechnology* 2010; 9(40): 6806-6812.

(13) Chen KC., Lin YH., Tsai CM., Hsieh CH., Houng JY. Optimization of glycerol feeding for clavulanic acid production by Streptomyces clavuligerus with glycerol feeding. Biotechnology Letters 2002; 24(6): 455-458.

(14) Hamedi J., Imanparast F., Tirandaz H., Laamerad B., Sadrai S. Improvement of clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* with peanut derivatives. Annals of Microbiology 2012; 62(3): 1227-1234.

(15) Teodoro JC., Baptista-Neto A., Araujo ML., Hokka CO., Badino AC. Influence of glycerol and ornithine feeding on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. Brazilian Journal of Chemical Engineering 2010; 27(4): 499-506.

(16) Bellão C., Antonio T., Araujo ML., Badino AC. Production of clavulanic acid and cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* under different fed-batch conditions. Brazilian Journal of Chemical Engineering 2013; 30(2): 257-266.

(17) Ser HL., Law JW., Chaiyakunapruk N., Jacob SA., Palanisamy UD., Chan KG., et al. Fermentation conditions that affect clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: a systematic review. Frontiers in Microbiology. 2016; 7: 1-20.

(18) Hamedi J., Malekzadeh F., Saghafi-Nia AE. Enhancing of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* with common and uncommon oils. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2004; 31(10): 447-456.

[1]- *Streptomyces clavuligerus*
[2]- Mounir