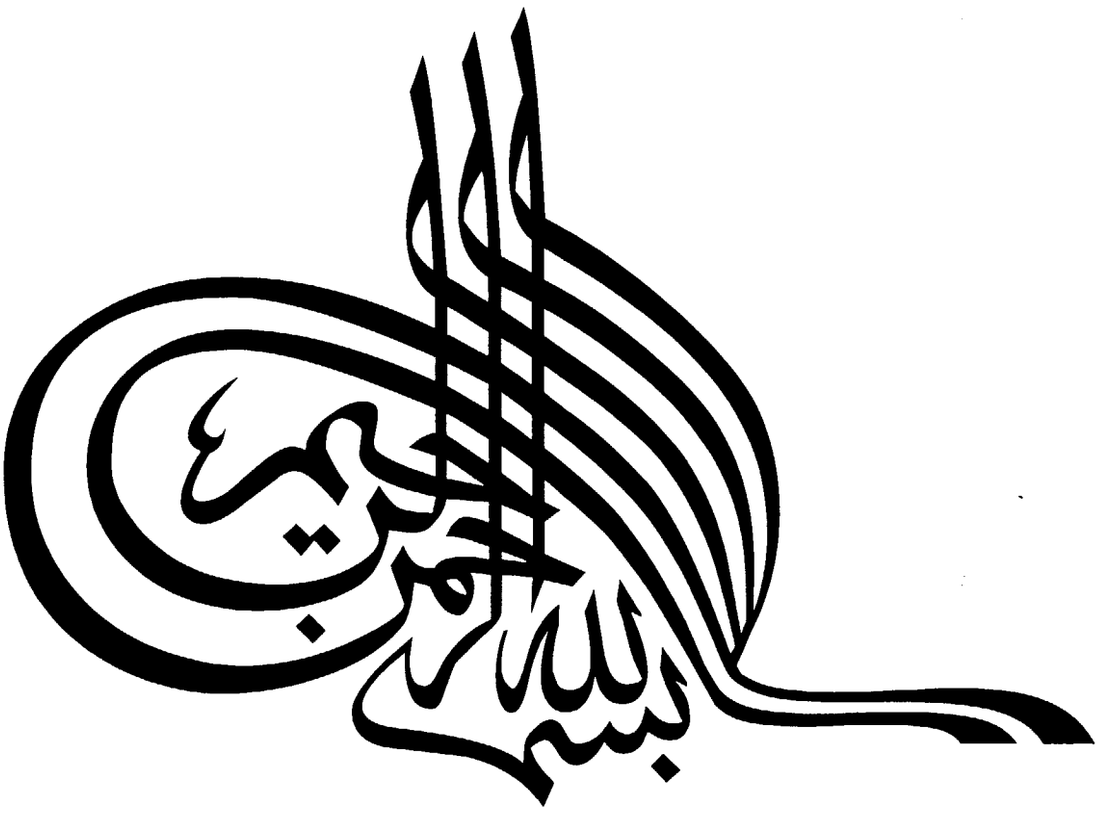


٣٥٠٨٢

۱۳۸۰ /۲/ ۱۰

013158

دانشگاه تهران

دانشکده علوم

سینتیک تولید L – سوربوز توسط

A. Suboxydans TU101 & TU201 & TU301

به طریق Fed- batch

نگارش: عبدالله الله‌وردی

اساتید راهنما: دکتر ناصر قائمی دکتر اشرف‌السادات نوحی

استاد مشاور: دکتر فریدون ملک‌زاده

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته میکروبیولوژی

۳۸۰۸۲

« بسمه تعالی »

اداره تحصیلات تکمیلی دانشگاه

احتراماً باطلاع می رساند که جلسه دفاع از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد خانم آقای عبدالله وری

تحت عنوان : سینتیک رشد و تولید سا- سوپراکسید توسط A. suboxydans T.U 101

و T.U 201 و T.U 301 - طریقه fed-batch.

در تاریخ ۷۹/۱۱/۲۴ در محل دانشکده علوم دانشگاه تبریز برگزار گردید.

هیأت داوران براساس کیفیت پایان‌نامه، استماع دفاعیه و نحوهٔ پاسخ به سؤالات، پایان‌نامه ایشان را برای دریافت

درجه کارشناسی ارشد در رشته میکروبیولوژی معادل با ۱۸ واحد با نمرهٔ ۱۹/۸

با درجهٔ عالی مورد تأیید قرار دارد.

هیأت داوران

سمت	نام و نام خانوادگی	مرتبهٔ دانشگاهی - دانشگاه	امضاء
۱- استاد راهنما	آقای دکتر ناصر مامقانی خانم دکتر اشرف بیات دوزی	استادیار	
۲- استاد مشاور	آقای دکتر عزیز مرادی کفراده	استاد	
۳- استاد مدعو	آقای دکتر پرویز فوروزی	استادیار	
۴- استاد مدعو	آقای دکتر هرمز داستانی	استادیار	

۵- نماینده تحصیلات تکمیلی گروه:

سرپرست تحصیلات تکمیلی گروه | مدیر گروه | سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده

۷۹/۱۱/۲۵

تقدیم به پدر و مادرم و برادرم

که در سایه لطف الهي، هرچه

دارم از پرتو وجود آنها است

در آغاز این دفتر شایسته است تقدیر و تشکر خود را نسبت به اساتید و دوستانی که در به پایان رسانیدن این پایان نامه مرا یاری نمودند ابراز دارم از:

استاد گرامی و عزیزم ، **سرکار خانم دکتر نوحی** که در طول مدت تحصیلات دانشگاهی همواره از راهنمایی و مساعدت ایشان برخوردار بودم

استاد ارجمند ، دکتر قایمی که در پیشرفت این تحقیق مرحله به مرحله مرا همراهی کردند

اساتید گرامی آقایان دکتر ملک زاده ، دکتر نژاد ستاری و دکتر نوروزی که زحمت مشاوره وداوری این پایان نامه را تقبل فرمودند

آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی " آقایان دکتر ابراهیم زاده و میر معصومی " که با اختیارگذاشتن امکانات و وسایل از هیچ کوششی دریغ نکردند

آقای سید محمد علی مفیدیان که در تجزیه و تحلیل آماری و آقای ایوب صادق آزاد که در برنامه نرم افزاری مرا همراهی نمودند.

فهرست

خلاصه ..... هـ

تاریخچه ۱

۱-۱ ویتامین C ۲

۱-۱-۱ خصوصیات فیزیکو شیمیایی ۲

۱-۱-۲ جذب نوری ۳

۱-۱-۳ یونیزاسیون ٤

۱-۱-٤ خصوصیات بیولوژیکی ٥

۱-۱-٥ بیوسنتز و متابولیسم ٦

۱-۲ D – سوربیتول ۹

۱-۲-۱ خصوصیات فیزیکوشیمیایی ۹

۱-۲-۲ موارد مصرف سوربیتول ۱۰

۱-۲-۳ روش اندازه‌گیری ۱۰

۱-۳ L – سوربوز ۱۱

۱-۳-۱ خصوصیات فیزیکوشیمیایی ۱۱

۱-۳-۲ موارد مصرف L – سوربوز ۱۲

۱-۳-۳ روش اندازه‌گیری ۱۲

۱-٤ روشهای اندازه‌گیری قندها ۱۳

۱-٥-۱ تبدیل D-سوربیتول به L-سوربوز به منظور تولید L-اسکوربیک اسید ۱٤

۱-٥-۲ تخمیر سوربوز ۱٦

۱-٥-۳ مسأله مهار سوبستراء و مهار محصول ۲۰

۱-٤-٥ فرمانتورهای مورد استفاده در تولید L – سوربوز ٢٤
۱-٥-٥ محاسبهٔ پارامترهای سینتیکی رشد ٣٣
۱-٦ خالص‌سازی D – سوربیتول دهیدروژناز از ارگانیسم‌های مختلف ٣٥
۱-٦-۱ خالص‌سازی از *A. Suboxydans* ٣٥
۱-٦-۲ خالص‌سازی از B. Subtilis ٣٧
۱-٦-۳ خالص‌سازی از کبد ٣٨
۱-۷ اهمیت پتانسیل و دوکس در سیستم‌های کشت میکروبی ٤٠

مواد و روشها

۲-۱ جمع‌آوری نمونه ٤١
۲-۳ محیطهای کشت ٤٢
۲-۲-۱ محیطهای جداسازی و نگهداری ٤٢
۲-۲-۲ محیط تولید ٤٤
۲-۲-۳ محیط شناسایی ٤٤
۲-۳ جداسازی باکتری ٤٥
۲-٤ معرفی ٤٦
۲-٥ شناسایی باکتری ٤٧
۲-٦ آنتی بیوگرام ٤٩
۲-۷ روشهای اندازه‌گیری سوربوز ٥١
۲-۷-۱ روش Resorcinol ٥١
۲-۷-۲ روش الکترود آنزیمی ٥١
۲-۷-۳ روش DNS ٥٢

٤-٧-٢ روش سبستئین کربازول یا روش Dische ٥٢
٥-٧-٢ روش Indole ٥٤
٦-٧-٢ روش Dreywood یا واکنش Anthrone ٥٤
٧-٧-٢ روش آرسنومولیبدات یا روش Nelson ٥٥
٨-٧-٢ روش فروسیانید یا روش Johnson & Park ٥٦
٨-٢ تخمیر ٥٧
١-٨-٢ روش تعیین منحنی استاندارد L – سوربوز با استفاده از روش DNS ٥٧
٢-٨-٢ روش تعیین حد آستانه مهار سوبسترا برای ٦ سویه جدا شده ٥٩
٣-٨-٢ روش تعیین سینتیک رشد و تولید L – سوربوز توسط سویه‌های جدا شده به طریقه بسته (Batch) ٦٠
٤-٨-٢ تولید L – سوربوز به طریقه کشت نیمه بسته (Fed- Batch) ٦١
٩-٢ محاسبه پتانسیل ردوکس و ارتباط آن با تولید L – سوربوز ٦٣
١-٩-٢ روشهای اندازه‌گیری پتانسیل رودکس ٦٤
٢-٩-٢ الکترود رفرانس ٦٥
٣-٩-٢ روش کار ٦٥
١-٣-٩-٢ تهیه منحنی استاندارد ٦٦
٢-٣-٩-٢ طراحی رآکتور مناسب ٦٧

نتایج

جداسازی و شناسایی باکتریهای جدا شده ٦٩

منحنی استاندارد سوربوز ۷۵

آستانهٔ مهار سوربیتول برای ٦ سویه جدا شده ۸۸

خصوصیات سینتیکی رشد وتولید L-سوربوز توسط سویه‌های جدا شده ۹۲

تولید L-سوربوز به طریقهٔ کشت نیمه بسته ۹۸

محاسبه ثابت رشد و تولید ویژه (μ) ۱۰۸

تجزیه و تحلیل آماری تولید سوربوز در سویه‌های جدا شده ۱۱٤

اندازه‌گیری پتانسیل ردوکس ۱۲۳

بحث

منابع مورد استفاده ۱۳۲

چکیده

سوربوز یکی از متابولیت‌های کلیدی در سنتز ویتامین C می‌باشد. این ماده بر اثر بیوترانسفورماسیون باکتریایی در حضور اکسیژن تولید می‌شود، ولی مهار سوبسترا و مهار محصول باعث کاهش بازدهی تولید می‌گردد. برای حذف یا تقلیل مهار سوبسترا از روش کشت نیمه بسته(Fed-Batch) استفاده می‌شود. از بین ٦ سویهٔ جداسازی و شناسایی‌شده، تولید ۳ سویه قابل مقایسه با سویهٔ استاندارد بود که برای سایر آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت. آستانهٔ تحمل سوبسترا برای سویهٔ T.U101 و T.U301 در ۸٪ سوربیتول و برای سویهٔ T.U201 ٤٪ سوربیتول برآورد گردیده است ولیکن تولید سوربوز در سویهٔ T.U101 و T.U301 در ۸٪ سوربیتول بیشتر از سویهٔ استاندارد PTCC112033 می‌باشد.

با بررسی سینتیک رشد و تولید محصول نتیجه گرفته شد که ۳ سویه جدا شده پس از ٦ ساعت وارد فاز لگاریتمی و پس از ١٤ ساعت وارد فاز رکود می‌شود و تولید سوربوز هم در فاز لگاریتمی و هم در فاز سکون رشد انجام می‌گیرد.

میزان افزایش تولید سوربوز در کشت نیمه بسته نسبت به کشت بسته در مورد سویهٔ T.U101 ۲/٥ برابر، در مورد سویهٔ T.U201 حدود ۳/۲ برابر و در مورد سویهٔ T.U301، ۱/۹٦ برابر است و نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان می‌دهد که تولید سوربوز در حالت نیمه بسته نسبت به حالت بسته با سطح اطمینان ۹۹٪ معنی‌دار است و روش نیمه بسته روش کارای‌تری برای تولید سوبوز نسبت به حالت بسته است. نکته جالب توجه دیگر آنکه افزایش سوربیتول در کشت نیمه بسته سبب افزایش بیومس نمی‌گردد و سوربیتول اضافه شده به طرف تولید سوربوز هدایت می‌شود.

یکی از مدلهای موجود برای توجیه مسأله مهار سوربیتول، کاهش پتانسیل ردوکس می‌باشد درحالیکه سویه‌های گلوکونوباکتراکسیدانس هوازی شدید و در پتانسیل بالای ۲۰۰ mv + رشد و متابولیسم دارد. در آزمایش انجام شده همراه با افزایش سوربیتول، غلظت عوامل OH-(الکلی) افزایش می‌یابد و پتانسیل ردوکس به پائین‌تر از ۱۵۰mv می‌رسد که ابتدا بیوترانسفورماسیون سوبسترا و سپس رشد متوقف می‌گردد و آزمایش انجام شده با مدل فوق مطابقت دارد.

تاریخچه

در سال ۱۹۳۲ chars. J. king و Viliam. F توانستند ویتامین C را از عصاره لیمو بطور خالص بدست آورند و در پیشگیری و درمان اسکوربوت بکار برند [۸].

در سال ۱۹۳۲ تا ۱۹٦٦ خصوصیات این ویتامین تعیین گردید. در سال ۱۹٦٦ Muler. J در آلمان پی برد L-سوربوز در اثر دهیدژوناسیون می‌تواند به L- اسکوربیک اسید تبدیل شود. به دنبال آن دانشمندانی نظیر Kolblin. R. و Troger. R. در ۱۹۷۷ و Beschkov. V. و Mitov- S. در ۱۹۸۵ تولید L- سوبوز از D- سوربیتول را در تخمیر بسته و مداوم(Continuous و Batch) بررسی نمودند[٥].

نظر به اینکه L-سوربوز از لحاظ اقتصادی مادهٔ باارزشی است و پیش ماده اصلی ویتامین C می‌باشد، رقابت شدیدی برای بهینه‌سازی شرایط تخمیر و بدست آوردن سویه‌های برتر باکتری انجام گرفت تا بهره‌وری اقتصادی افزایش یابد، بطوری که در ۱۹۹۸، ۷۵۰۰۰ تن ویتامین C از این راه بدست آمد[۱٤].

اقتصادی‌ترین راه تولید ویتامین C به روشی است که در ۱۹۷۵ توسط Reichstein ابداع شد و بعدها شرایط تولید بهینه‌سازی گردید. اساسی این روش تبدیل گلوکز به L-اسکوربیک اسد است که ترکیبی از مراحل متعدد واکنش‌های شیمیایی و فیزیکوشیمیایی است و یک مرحلهٔ بیوشیمیایی آن اکسیداسیون میکروبی D-سوربیتول به L-سوربوز است که توسط سویه‌های باکتریایی گلوکونوباکتراکسیدانس انجام می‌گیرد[٦۲].

۱-۱- ویتامین C

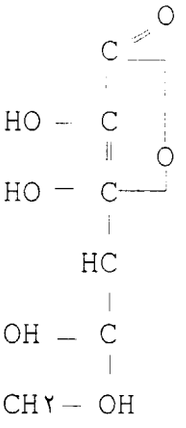
۱-۱-۱- خصوصیات فیزیکوشیمیایی:

ویتامین C به اسامی مختلف نامیده می‌شود که عبارتند از:

۱-L- Ascorbic acid　　۲-Cevitamic acid

۳-Hexoronic acid　　٤-Anti Scorbutic Vitamin

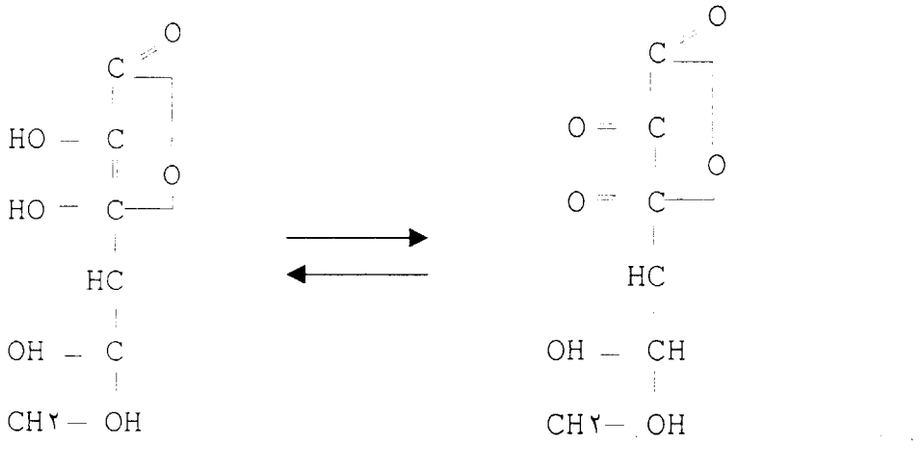
از نظر شیمیایی اسید آسکوربیک ترکیب سادهٔ ٦ کربنی است و در ارتباط نزدیک با منوساکاریدهاست در مقابل اسیدها مقاوم ولی به سهولت در نتیجهٔ اکسیداسیون، نور، حرارت تغییر ماهیت می‌دهد فرمول بستهٔ $C_6H_8O_6$ و فرمول ساختمانی آن به شکل زیر است. معمولاً بلورهای سفید و مزه‌ایی ترشی داشته و نقطهٔ ذوب ۱۹۲ °C ۱۹۰-۱۹۲ دارد.



اسید اسکوربیک قابل اکسید شدن می‌باشد، نخستین محصول اکسیداسیون این ماده ترکیب فعال بیولوژیکی L- دهیدرواسکوربیک اسید با فرمول $C_6H_6O_6$ می‌باشد که نسبت به حالت احیای آن دو اتم هیدروژن کمتر دارد[١٦].

در ساختمان شیمیایی ویتامین C بین کربن دوم و سوم یک رابطهٔ مضاعف یافت می‌شود و معنی آن اینست که ساختمان زنجیرهٔ ویتامین C چندان استحکام نداشته و اتمهای هیدروژن در این نقطه ترجیح می‌دهند با هر اکسیژن که در مجاورت

آنها باشد پیوند ایجاد کنند. هرگاه این دو هیدروژن ساختمان مولکولی ویتـــامین C را تحریک کنند، ماده حاصل از آن به بعد L- دی هیدرواسکوربیک اسید خوانده‌می‌شود.



L-Ascorbic Acid L- Dehydro Ascorbic Acid

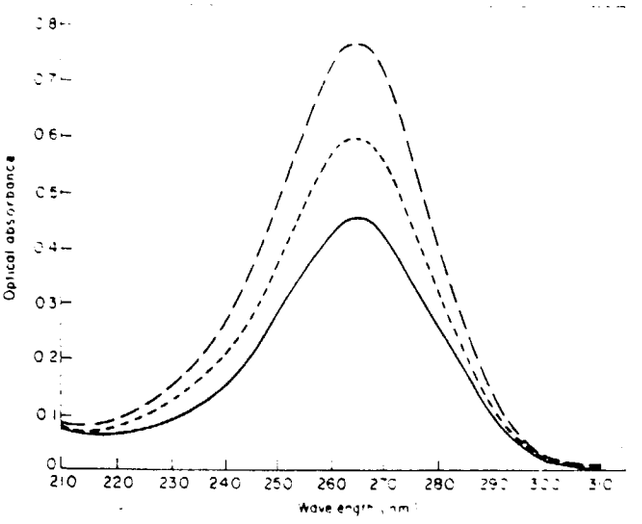
این ترکیب از لحاظ بیولوژیکی فعال است و بسهولت احیا می‌شود. اکسیداسیون فراتر L- دهیدرواکسکوبیک اسید تولید جسمی بنام اسید دی کتوگلوکونیک می‌کند که ازنظر بیولوژیکی غیرفعال است. این حالت اکسیداسیون غیرفعال برگشت می‌باشد.

L- Ascorbic asid $\underset{\text{Reduction}}{\overset{\text{Oxidation}}{\rightleftharpoons}}$ L- Dehydro Ascorbic Asid $\underset{\text{Reduction}}{\overset{\text{Oxidation}}{\rightleftharpoons}}$ Deketogluconic Acid

واحد بین‌المللی ویتامین C برابر mg ۰/۰۵ اسیداسکوربیک متبلور است[۳۲].

۲-۱-۱: جذب نوری(optic absorbance)

محدودهٔ جذب نوری اسکوربات در تحقیقات مختلف گزارش شده است. بر اساس نظریهٔ Hewitt و Dickes در ۱۹۸۱ حداکثر مقدار جذب بین ۲٦٥nm و ۲٦٦ nm است و این مقدار با زمان تهیهٔ محلول اسکوبات مقاومت می‌باشد. درشکل زیر محدودهٔ حداکثر میزان جذب محلول آسکوربات خالص و همچنین تأثیر زمان تهیهٔ محلول بر روی جذب نوری نشان داده شده‌است[٦۲].



شکل ۱-۱ حداکثر جذب نوری اسکوربیک اسید بین ۲٦٥ nm و ۲٦٦ nm و همچنین زمان تهیه محلول اسکوربات را بر روی میزان جذب نشان‌می‌دهد(منحنی خط‌چین ۹ دقیقه بعداز تهیه محلول، منحنی نقطه‌چین ۷۰ دقیقه بعداز تهیهٔ محلول و منحنی یکنواخت ۱۳۰ دقیقه بعداز تهیه محلول)

۱-۲-۱: چرخش نوری (Optical rotation)

فعالیت نوری اسکوربات توسط Herbert و همکارانش در محیط‌های آبی طبیعی $[a]_{5780}^{18^\circ} = +116^\circ$ و درمحیط اسیدکلریدریک ۱/۲۰ نرمال $[a]_{D}^{18^\circ} = 22^\circ$ تعیین گردید.

۱-۱-۳: یونیزاسیون (Inonization)

اسید اسکوربیک در دومرحله در PH های مختلف یونیزه‌می‌شود. در $37\ ^\circ C$ اولین PK برابر ٤/۱۸ و دومین PK برابر ۱۱/٦ گزارش شده است(karrer و همکارانش در ۱۹٥۹).