تهیه زیست پلیمر پولولان و سینتیک تولید آن

Preparation of Pullulan Biopolymer and Kinetics of Its Production

ایران عالم زاده ،منوچهر وثوقی ،فرشته نعیم پور

دانشگاه صنعتی شریف ،مرکز مهندسی بیوشیمی و کنترل محیط زیست

دریافت: ۷۲/۱۲/۱ ،پذیرش: ۷۳/۴/۲۵

چکیده

تولید زیست پلیمر پولولان توسط کپک ایروبازیدیم پولولاریا پولولان در محیطهای کشت تخمیری حاوی منابع قندی مانند گلوکز ،ساکارز و ملاس چغندر قند بررسی و مشاهده شد که سرعت اولیه تولید زیست پلیمر در محیط دارای گلوکز بیشتر از محیطهای کشت حاوی ساکارز و ملاس است ،ولی در نهایت میزان تولید در کلیه موارد تقریبا یکسان و به میزان ۲۰ گرم در لیتر می‌رسد. همچنین معلوم شد که تولید زیست پلیمر در طول زمان از مدل وابسته و غیر وابسته به رشد سلولی پیروی می‌کند. در ضمن مقادیر پارامترهای سینتیکی در کلیه نمونه‌ها تعیین شد.

واژه‌های کلیدی: زیست پلیمر ،پولولاریا پولولان ،پارامترهای سینتیکی ،مدل وابسته و غیر وابسته به رشد

Key Words: biopolymer, pullularia pullulans, kinetic parameters, growth and nongrowth associated model

مقدمه

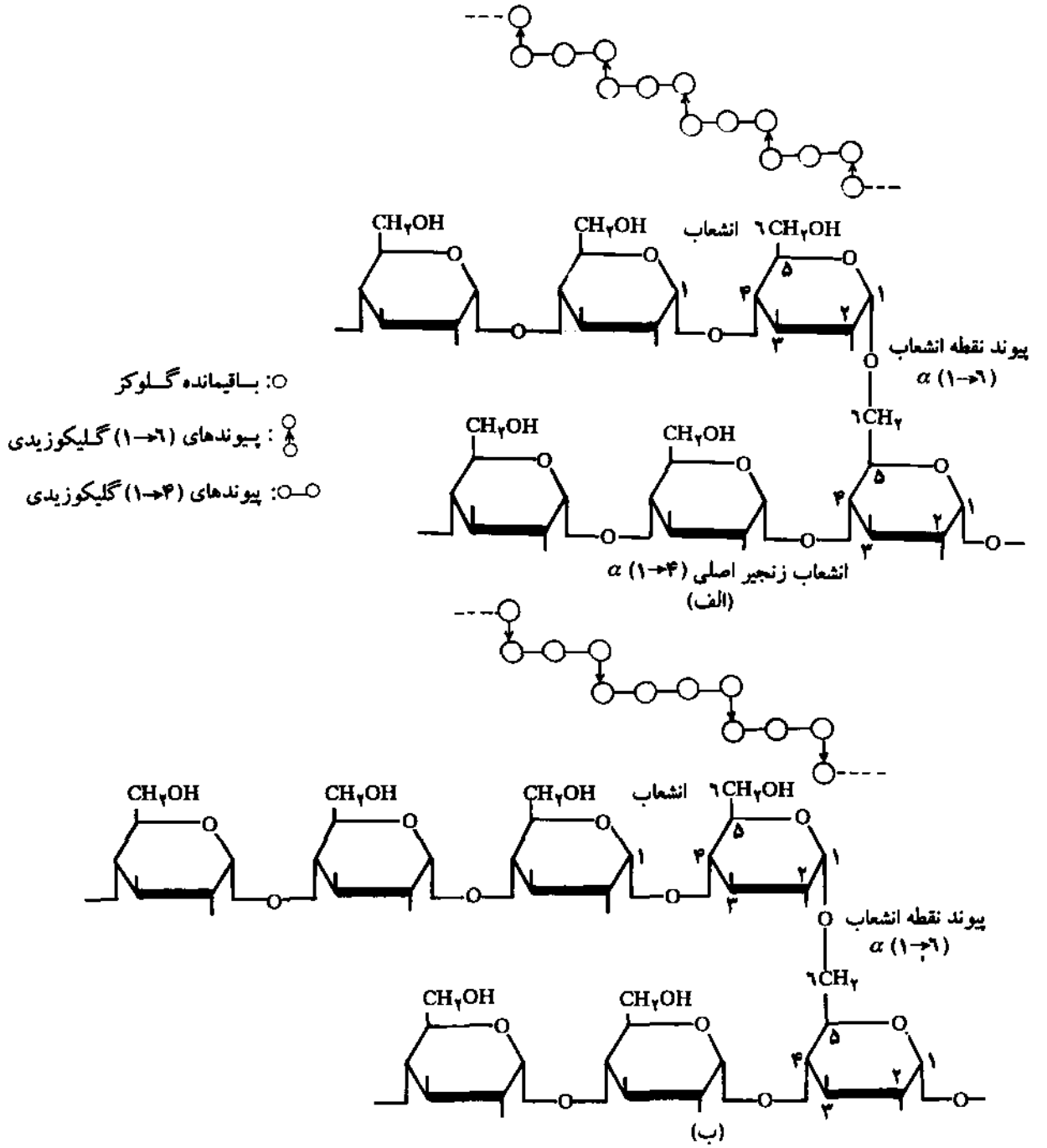
پولولاریا پولولان کپک سیاه رنگی است که از نظر شکل شباهتی به مخمرها دارد. این میکروارگانیسم با داشتن سیستمهای آنزیمی از جمله انورتاز ،گلوکوآمیلاز ،گلوکزاکسیداز و پروتئاز قادر است بسیاری از مواد آلی مانند قندها را تجزیه کرده یا توسط دسته‌ای از آنها زیست پلیمر تولید کند. مثلا ،پولولان یک نوع گلوکان خارج سلولی با وزن مولکولی ۱۰,۰۰۰-۴۰۰,۰۰۰ دالتون است که در محیط کشت حاوی مواد نشاسته‌ای و بسیاری از مواد قندی توسط این میکروارگانیسم قابل تهیه است [۱-۶] . از لحاظ ساختار ،پولولان شامل واحدهای مالتوتریوز است که توسط پیوندهای $\alpha(1\to6)$ به یک دیگر متصل و پلیمر شده‌اند. در برخی از نمونه‌های پولولان ،مالتوتروز نیز مشاهده شده است. شکل ۱ (الف و ب) ساختار این زیست پلیمر را نشان می‌دهد.

از این زیست پلیمر می‌توان در تهیه شربتهای غلیظ ،مواد غذایی کم کالری و مواد بهداشتی نظیر خمیر دندان استفاده کرد. همچنین در تولید چسب به عنوان ماده استحکام دهنده خاک کاربرد دارد. برخی از خواص فیزیکی این زیست پلیمر نظیر استحکام و شفافیت مشابه مواد استیرنی است و به دلیل قدرت کشسانی نسبتا زیاد و شدت بالای نفوذ اکسیژن در لایه‌های آن قابل توجه است. مثلاً در لایه‌ای با ضخامت ۰/۰۱ میلی متر تقریبا ۰/۶ تا ۲/۵ میلی لیتر در متر مربع اکسیژن نفوذ می‌کند. همچنین با توجه به زیست تخریب پذیری این ماده ،از آن به عنوان لایه‌های محافظ مواد غذایی از جمله میوه ،سبزی و مواد پخته استفاده می‌شود.

قابل توجه است که طی فرایند زیست شناختی تولید این زیست پلیمر ،زیست توده نیز به عنوان یک محصول جانبی به دست می‌آید. پروتئین یاد شده می‌تواند به عنوان یک منبع غذایی مورد استفاده قرار گیرد و دارای خصوصیات ویژه‌ای به شرح زیر است:

۱- ۴۰ درصد پروتئین دارد.

۲- پروتئین کپک در مقایسه با پروتئینهای حاصل از مخمر و باکتریها از درصد نوکلئیک اسید کمتری برخوردار است و آسانتر از محیط کشت جدا می‌شود.



شکل ۱ - ساختار زیست پلیمر پولولان: (الف) دارای واحدهای مالتوتریوز و (ب) شامل واحدهای مالتوتریوز و مالتوتتروز.

۳ - محصولات غذایی تهیه شده از کپکها در تمام دنیا متداولتر ازمواد حاصل از منابع میکروبی دیگرند.

مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که طی رشد کپک ،زیست پلیمر پولولان توسط آنزیم پولولان سنتتاز تولید می‌شود که یک نوع آنزیم القایی (inductive) است و این ماده در فاز لگاریتمی رشد تولید می‌شود [۴]آنزیم القایی آنزیمی است که به طور دایم در سلول تولید نمی‌شود ،بلکه در شرایط مناسب ،سلول ملزم به تولید آن است. تولید زیست پلیمرهای مختلف در حال حاضر یکی از مهمترین زمینه‌های قابل بررسی برای پژوهشگران در رشته مهندسی زیست شیمی است. در این مورد مسایل حل نشده یا قابل اصلاح وجود دارد که یکی از آنها مربوط به استفاده از منابع قندی مختلف در محیط کشت است ،به طوری که بتوان زیست پلیمر را توسط مواد اولیه ارزانتری نظیر ملاس تهیه کرد. در

این پژوهش ،تولید زیست پلیمر پولولان توسط منابع قندی مختلف مانند گلوکز ،ساکارز و ملاس چغندر قند مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفته است.

تجربی

در این بخش مشخصات مواد ،محیطهای کشت مورد استفاده و روشهای تجزیه بحث می‌شود.

مواد

میکروارگانیسم مورد مطالعه در این بررسی کپک ایروبازیدیم پولولاریا پولولان (Aureobasidium Pullularia Pullulans) با شماره ATCC/ ۹۳۴۸ است. این میکروارگانیسم در محیط کشت آگار شیبدار سابورو دکستروز در ۴°C نگهداری می‌شود. محیط پیش کشت با انتقال کلنیهای کپک از محیط کشت آگار ۴۸ ساعته به محیط کشت اولیه آماده می‌شود. محیط کشت اولیه شامل مواد زیر است: ساکارز ۲۵g/l ،عصاره مخمر ۴g/l ؛ K_2HPO_4 ۳g/l ؛ NaCl ۱g/l ؛ $(NH)_2SO_4$ ۰/۶g/l ؛ $FeSO_4.7H_2O$ ۰/۱g/l ،آب به میزان کافی تا حجم یک لیتر و pH محلول ۶/۵. واکنش تخمیر در ۳۰°C در ارلنهای ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت اولیه انجام می‌شود. دور تکان دهنده (shaker) ۲۵۰ دور در دقیقه و زمان تخمیر ۴۸ ساعت است.

ترکیب محیطهای کشت تخمیری مشابه محیط کشت اولیه است، با اختلاف منبع قند در هر مورد که شامل گلوکز ،ساکارز و ملاس با غلظتهای به ترتیب ۵۰ ،۵۰ و ۱۰۰g/l است. غلظت بقیه مواد محیط کشت تخمیری مانند کشت اولیه است و pH در هر مورد برابر ۶/۵ تنظیم می‌شود. تخمیر در ظرفهای تخمیر ۲ لیتری حاوی ۸۰۰ میلی لیتر محیط کشت با ۲ درصد حجمی پیش کشت انجام می‌گیرد.

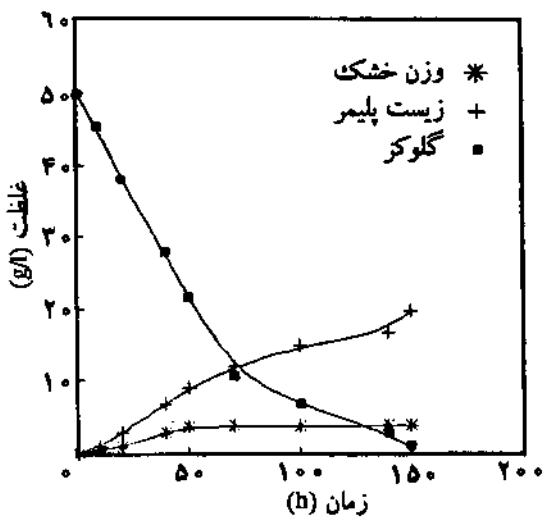
دما ۳۰°C و سرعت همزن مکانیکی ۴۰۰ دور در دقیقه است و میزان هوادهی ورودی ۰/۸ حجم محیط کشت در هر دقیقه (vvm) تنظیم می‌شود.

روشهای تجزیه

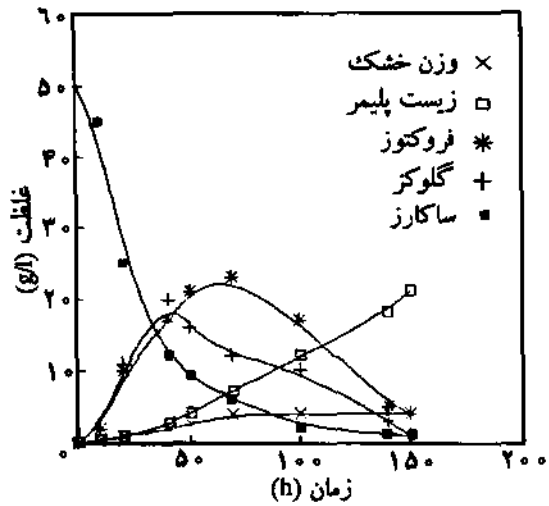
مقدار زیست توده خشک به روش صاف کردن با استفاده از صافی غشایی ۰/۴۵ میکرون تعیین می‌شود. میزان قندهای گلوکز ،فروکتوز و ساکارز توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع کارآمد HPLC ،باستون Spheri-5-Amino 5 micron در دمای ۲۶°C و فاز متحرک استونیتریل و آب به میزان ۲۰:۸۰ اندازه گیری می‌شود [۷]. برای تعیین میزان پلی ساکارید در محلول تخمیری ،محلول فاقد سلول میکروبی با یک حجم مخلوط سرد اتانول - استون در حال به هم خوردن مخلوط می‌شود و سپس نمونه برای مدت ۶-۴ ساعت در حمام یخ صفر درجه نگهداری می‌شود. رسوب پلی ساکارید پولولان ،توسط سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۰ ثانیه جداسازی می‌شود ،آن گاه تبلور مجدد توسط انحلال پلیمر در آب گرم و افزودن همان حجم اتانول و استون و رسوبگیری در شرایط مرحله اول انجام می‌گیرد. پلی ساکارید حاصل در ۴۰°C خشک و سپس توزین می‌شود.

نتایج و بحث

شکل ۲ تغییرات غلظت کپک پولولاریا ،زیست پلیمر پولولان و قند باقیمانده در محیط کشت با ۵ درصد گلوکز را نشان می‌دهد. سرعت مصرف قند در ۶۰ ساعت اول تخمیر بسیار سریع است. تولید زیست پلیمر از شروع تخمیر مشاهده می‌شود ،ولی سرعت تولید بعد از گذشت ۵۰ ساعت از تخمیر قابل ملاحظه است. این پدیده می‌تواند به دلیل وابستگی سرعت تولید به رشد کپک باشد. زیرا ،همان طور که دیده می‌شود ،بعد از این مدت است که غلظت میکروارگانیسم به حداکثر خود می‌رسد و تا خاتمه فرایند نیز تقریبا ثابت باقی می‌ماند. بدین ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که طی این مدت قند باقیمانده تنها به مصرف تولید زیست پلیمر می‌رسد و تولید زیست پلیمر در این حالت وابسته به رشد سلولی نیست. پیدایش چنین حالتی در منحنی رشد و تولید زیست پلیمر ،در عین حال می‌تواند نمایانگر این باشد که در چنین فرایندی هم حالت وابستگی تولید به رشد و هم حالت غیر وابسته موجود است [۸]. البته ،قابل توجه است که تولید اصلی زیست پلیمر در مرحله اول صورت می‌گیرد.



شکل ۲ - منحنی رشد میکروارگانیسم پولولاریاپولولان در محیط کشت دارای ۵ درصد گلوکز.



شکل ۳- منحنی رشد میکروارگانیسم پولولاریاپولولان در محیط کشت دارای ۵ درصد ساکارز.

شکل ۳ تغییرات غلظت کپک را در محیط کشت با ۵ درصد ساکارز نشان می‌دهد. در این فرایند پس از گذشت حدود ۱۰ ساعت هر سه قند گلوکز ،فروکتوز و ساکارز در محیط مشاهده می‌شوند. با مقایسه شکلهای ۲ و ۳ دیده می‌شود که سرعت مصرف ساکارز در این حالت بسیار سریعتر از گلوکز در حالت قبل است و این نشان می‌دهد که سیستم آنزیمی کپک به خوبی عمل می‌کند [۱۰ ، ۹]. غلظت زیست پلیمر تا جایی که سیستم آنزیمی فعالیت بالایی دارد چشمگیر نیست و اصولا میزان تولید زیست پلیمر از زمانی قابل توجه است که مصرف گلوکز و فروکتوز آغاز شود. از این رو ،مرحله تولید زیست پلیمر در این فرایند در حقیقت پس از پایان یافتن واکنشهای آنزیمی است.

نتایج کشت این میکروارگانیسم در ملاس چغندر با غلظت ۱۰ درصد در شکل ۴ نشان داده شده است. با توجه به اینکه قند اصلی ملاس ،ساکارز است (۵۰ درصد در این بررسی) ،نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که به دلیل ناخالص بودن این منبع قندی نسبت به ساکارز خالص، سرعت مصرف قند ملاس نسبت به ساکارز کمی پایین تر است. ولی ، زمان تولید زیست پلیمر دقیقا منطبق با حالت ساکارز است و سرعت تولید و مقدار محصول تقریبا با آن برابر می‌باشد. این پدیده موید این است که سیستم آنزیمی در این حالت نیز به سرعت عمل می‌کند.

نتایج کشت تخمیری با استفاده از منابع کربن مختلف نشان دهنده آن است که پس از گذشت ۱۰۰ ساعت از رشد ،محیط کشت به تدریج تیره رنگ می‌شود که می‌تواند به دلیل تولید رنگ ملانین (melanin) باشد [۱۱].

مدل سینتیکی

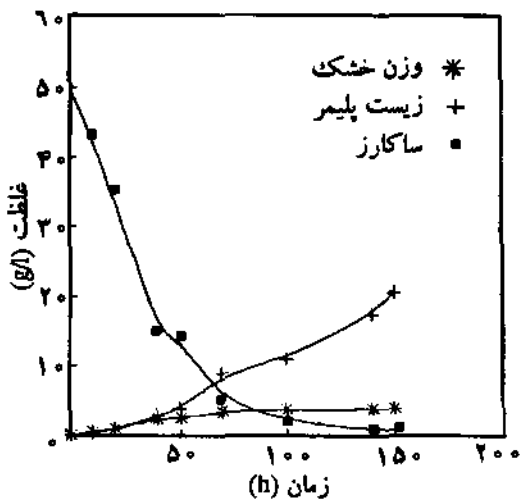
مطالعه تولید زیست پلیمر پولولان توسط کپک پولولاریا نشان می‌دهد که تولید در کلیه موارد از فاز رشد لگاریتمی شروع می‌شود و بعد از آن در فاز ثابت به حداکثر می‌رسد. بنابراین رفتار آن مطابق مدل وابسته و غیر وابسته به رشد (growth and nongrowth associated model) است [۲]. در شرایط رشد حداکثر و در صورتی که غلظت ماده اولیه و محصول روی رشد ویژه میکروارگانیسم هیچ گونه اثر منفی نداشته باشد (که در این حالت صادق است) رشد زیست توده از نظریه جمعیت برطبق رابطه ۱ پیروی می‌کند [۱۲]:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left[1 - \left(\frac{X}{X_m}\right)^n\right] \qquad (1)$$

μسرعت رشد ویژه میکروارگانیسم ،X_m حداکثر غلظت زیست توده و n ضریب بدون بعدی است که بستگی به شرایط محیط کشت از جمله pH و دما دارد. چنانچه $X = X_m$ شود ،میزان رشد صفر خواهد شد. از این رابطه می‌توان در تخمیر قندها و زیست پلیمرها استفاده کرد [۱۳،۱۴]. از سوی دیگر ،رابطه لودکینگ و پیرت [۱۵] را می‌توان در مورد رفتار این فرایند نوشت:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \qquad (2)$$

dP/dt سرعت تولید زیست پلیمر ، $\alpha \frac{dX}{dt}$ مقطع وابسته به رشد و βX تابع غیر وابسته به رشد است. مقادیر α و βاعداد بدون بعدی هستند که α ثابت استوکیومتری واکنش و βفعالیت زیست توده را مشخص می‌کند.



شکل ۴- منحنی رشد میکروارگانیسم پولولاریاپولولان در محیط کشت دارای ۵ درصد ملاس.

اگر Y_x و Y_p به ترتیب بازده تولید زیست توده و تولید زیست پلیمر و m ضریب نگهداری (maintenance coefficient) سلول در فرایند تخمیری زیست سنتز پلی ساکاریدها در نظر گرفته شود ،رابطه ۳ را می‌توان در مورد سرعت مصرف ماده اولیه نوشت.

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_x}\frac{dX}{dt} + \frac{1}{Y_p}\frac{dP}{dt} + mX \qquad (۳)$$

در حقیقت رابطه ۳ نشان می‌دهد که مصرف ماده اولیه به رشد سلول ،تولید محصول و سوخت و ساز سلولی (mX) بستگی دارد. mX در واقع مقداری از ماده اولیه است که عامل زنده ماندن سلولها حتی در موارد عدم رشد می‌شود.

با جایگزینی (۲) در (۳) ،رابطه ۴ حاصل می‌شود:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_x}\frac{dX}{dt} + \frac{1}{Y_p}\left(\alpha\frac{dX}{dt} + \beta X\right) + mX \qquad (۴)$$

با مرتب کردن رابطه ۴ ،روابط ۵ و ۶ به دست می‌آید.

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{dX}{dt}\left(\frac{1}{Y_x} + \frac{\alpha}{Y_p}\right) + X(m + \beta/Y_p) \qquad (۵)$$

$$-\frac{dS}{dt} = \gamma\frac{dX}{dt} + \delta X \qquad (۶)$$

γ و δ ثابتهای تعریف شده در رابطه ۶ می‌باشند. پارامترهای سینتیکی α ،β ،γ و δ که در مورد تخمیر منابع قندی گلوکز ،ساکارز و ملاس در این مطالعه به دست آمده در جدول ۱ خلاصه شده‌اند.

جدول ۱ - مقادیر پارامترهای سینتیکی در محیط تخمیری پولولاریا پولولان.

منبع کربن	α	β	γ	δ
گلوکز	۱/۹۲۵	۰/۰۴	۱/۴	۰/۰۸
ساکارز	۰/۳۸۳	۰/۰۴	۹/۴	۰/۲
ملاس	۰/۲۶۵	۰/۰۴	۱۲/۸۸	۰/۲۷

نتیجه‌گیری

کپک پولولاریا پولولان در محیطهای کشت حاوی منابع قندی گلوکز ، ساکارز و ملاس علاوه بر زیست توده ،قابلیت تولید زیست پلیمر پولولان را نیز دارد. منابع قندی ساکارز و گلوکز در طبیعت به وفور موجودند و تهیه آنها راحت تر از سایر منابع خالص قندی است. به علاوه ،ملاس چغندر،که از ضایعات کارخانه‌های صنعت قند است ، منبعی ارزان قیمت می‌باشد. تولید زیست پلیمر پولولان از فاز رشد شروع می‌شود و میزان آن به طور مرتب افزایش می‌یابد. از این رو ، تولید آن از مدل وابسته و غیر وابسته به رشد سلولی پیروی می‌کند. مقدار زیست پلیمر در ۵۰ ساعت اولیه در مورد گلوکز بیشتر از ساکارز و ملاس است و دلیل آن ساده بودن قند گلوکز نسبت به ساکارز و قند ملاس می‌باشد. در نتیجه ،تجزیه گلوکز راحت تر از قندهای دوتایی مانند ساکارز انجام می‌گیرد. بدین ترتیب ،تولید محصول در مورد قند گلوکز در ابتدا سریعتر انجام می‌شود. در مورد ساکارز ابتدا این دی ساکارید به قندهای ساده گلوکز و فروکتوز تبدیل می‌شود و سپس پلیمر شدن مونوساکارید گلوکز انجام می‌گیرد. میزان تولید پولولان در محیطهای حاوی گلوکز ،ساکارز و ملاس با غلظتهای به کار گرفته شده تقریبا یکسان و در حدود ۲۰g/l است. نتایج این بررسی همچنین حاکی از آن است که علاوه بر منابع قندی گلوکز و ساکارز خالص ،از ضایعات کشاورزی نظیر ملاس نیز برای تولید پولولان می‌توان استفاده کرد.

مراجع

1 Shipman R.H. and Fan L.T., *Process Biochem*, **13**, 21, 1979.

2 Catley B.J., *Appl.Microbiol.*, **22**, 641-648, 1971.

3 Catley B.J., *J.Gen.Microbiol.*, **120**, 265, 1980.

4 Catley B.J. and Whelhan W.J., Observation on the Structure of Pullulan, *Arch.Biochem.Biophys.*, 143, 138 1971.

5 Catley B.J. and McDowell W., Liquid-Linked Saccharides Formed During Pullulans Bio-Synthesis in Aureobasidium Pullulans, *Carbohydrate Res.*, **103**, 65, 1982.

6 Fan, L.T., Process For Producing Fructose, US Patent 4, 774 ,183, 1988.

7 Alemzadeh I., Vossoughi M. and Fan L.T., Fructose Production From Sucrose Using Aureobasidium (Pullularia) Pullulans, Chisa Proceeding, Chec., September, 1993.

8 Blakebrough N., *Biochemical and Biological Engineering Science*, **1**,Chapter 6, Academic Press, Inc., NewYork, 1967.

9 Alemzadeh I. and Vossoughi M., Sucrose Inversion by

Saccharomyces Yeast Cells Immobilized Onto Corn Grits, *J.Eng.IRI*, **2**, 84, 1989.

10 Monsan P., Combes D. and Alemzadeh I., *Biotechol. Bioeng.*, **26**, 658, 1984.

11 Durell L.W., Studies of Aureobasidium Pullulans (De Barry), *Arnaud.Mycopatol.Mycol.Appl.*, **35**, 113, 1968.

12 Bailey J.E. and Ollis D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill Book Company, New York, 359, 1977.

13 Mulchandani A., and Luong J.H.T., Batch Kinetics of Microbial Polysaccharide Biosynthesis, *Biotechnol.Bioeng.*, **32**, 639, 1988.

14 Klimek J. and Ollis D.F., Extracellular Microbial Polysaccharids: Kinetics of Preudomonas SP., Azotobacter Vinelandic and Aureobasiduim Pullulans Batch Fermentation, *Biotechnol.Bioeng.*, **22**, 2321, 1980.

15 Luedeking R. and Piret E.L., A Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation, Batch Process at Controlled pH, *J. Biochem. Microbiol.Technol. Eng.*, 1-393, 1959.

آمینهای آروماتیک

آمینهای آروماتیک (آریل آمینها) طبقه‌ای از مواد شیمیایی مشتق از هیدروکربنهای آروماتیک مانند بنزن ،نفتالین ،دی فنیل و غیره‌اند که با جابه جایی دست کم یک اتم هیدروژن توسط یک گروه آمینو (NH_2) ساخته می‌شوند. در این مقاله ترکیبات وابسته به آمینهای آروماتیک مانند آمیدهای آروماتیک ،نیتروزآمینها ،کاربامات‌ها ،اوره ،هیدرازینها یا آزوبنزنها (به جز آمینوزوبنزن) به طور مفصل مرور نمی‌شوند ،ولی به این ترکیبات در جای مناسب اشاره شده است. به همین ترتیب ،آثار داروها و محصولات طبیعی بر سلامتی انسان به طور ویژه بررسی نشده است.

مواد شیمیایی مورد نظر براساس ساختار شیمیایی به پنج گروه طبقه بندی می‌شوند: (الف) آنیلینها (که در این گزارش به صورت آمینهای آروماتیک تک حلقه‌ای با یک گروه آمینو تعریف می‌شوند) و فنیلن دی آمینها ؛(ب) بنزیدینها ،شامل بنزیدین و رنگهای بر پایه بنزیدین و مواد مشابه آن (در متن هرجا به رنگهای بر پایه بنزیدین یا رنگدانه‌ها اشاره شد ،منظور موادی است که پایه آنها را ترکیب مادر بنزیدین تشکیل می‌دهد، ترکیبات بر پایه بنزیدین استخلاف شده به طور خاص یا به صورت ترکیبات بر پایه بنزیدین و مواد مشابه آن مورد اشاره قرار می‌گیرند) ؛ (ج) ترکیبات ۴ و ۴ دی آمینو دی فنیل متان ؛(د) نفتیل آمینها و (ه) آمینو آزوبنزنها.

در هر گروه ترکیبات ویژه‌ای برای بحث بیشتر در مورد خواص و آثار آنها انتخاب شده‌اند. ترکیبات مورد بررسی براساس اهمیت فنی یا تجارتی ،گذشته یا حال آنها و مقدار اطلاعات موجود ،انتخاب شده‌اند. این امکان وجود دارد که در بعضی کشورها کاهش یا توقف ساخت یا مصرف برخی از این مواد صورت گرفته باشد.

مواجهه

حجم تولید آمینهای آروماتیک برای تنها چند کشور گزارش شده است. تولید سالیانه آنیلین دست کم چند هزار تن است. تولید سالیانه هزاران تن اورتو تولوئیدین ۲ و ۴ - زایلیدین ،اورتوآنیزیدین و پاراآنیزیدین ،۲ و ۴ - دی آمینو تولوئن ، ۳ و ۳ - دی کلروبنزیدین و ۴ و ۴ متیلن دی آنیلین نیز گزارش شده است. در سالیان اخیر چندین تن ۴ و ۴ - متیلن - بیس (۲ - کلروآنیلین) در ایالات متحده تولید شده است.

بسیاری از آمینهای آروماتیک مورد بحث این مقاله به طور طبیعی یافت نمی‌شوند. این مواد در هوا و آب نسبتا سریع اکسید می‌شوند ، ولی برخی ترکیبات یا محصولات تجزیه وجود دارند که زمان اقامت آنها در خاک طولانی است. به ویژه آمینوآزوبنزنها به دلیل چربی دوستی نسبتا بالایی که دارند تمایل بیشتری به تجمع زیستی دارند. گزارش شده است که آمینهای آروماتیک بسیاری وارد زنجیر غذایی می‌شوند.

بقیه در پاورقی صفحه ۲۰۲