

جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم مولد لواستاتین، تعیین شرایط بهینه تولید و ارزیابی بازده محصول با دو روش کشت غوطه‌ور و تخمیر در بستر جامد

معصومه انوری: دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت
 غلام خیاطی: دانشکده فنی دانشگاه گیلان

چکیده

از میان ۲۸ سویه اسپرژیلوس جداسازی شده از خاک ۶ سویه با تولید مساوی یا بیشتر از سویه استاندارد (*Aspergillus terreus* ATCC 20542) شناسایی شدند. آزمایش‌ها بهینه‌سازی با بهترین سویه جداسازی شده به نام Gil-4 نشان داد که لاکتوز، آرد سویا و نیترات پتاسیم به ترتیب بهترین منابع کربن، نیتروژن آلی و معدنی در تولید بودند. در روش کشت بسته (غوطه‌ور) حاوی محیط با فرمولاسیون بهینه ۴ درصد لاکتوز (وزنی به حجمی)، ۴۰۰ میکروگرم لواستاتین در هر میلی‌لیتر تولید شد. در اینحال بازده ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر گرم لاکتوز بود. در مقایسه با روش کشت بسته، استفاده از روش تخمیر در بستر جامد حاوی عصاره سورگوم و آب پنیر میزان لواستاتین تولیدی ۱۵۰۰ میکروگرم به ازای هر گرم وزن خشک و بازدهی ۳۷/۵ میلی‌گرم به ازای هر گرم لاکتوز بود که نشانه برتری این روش بر کشت بسته است.

مقدمه

لواستاتین دارویی قوی برای کاهش کلسترول خون است و این عمل را از طریق مهار رقابتی آنزیم ۳- هیدروکسی-۳- میتل گلوکوتاریل کوآنزیم A ردوکتاز (HMG – Co A) که بیوسنتز کلسترول را کاتالیز می‌کند، انجام می‌دهد [۱]، [۲]. لواستاتین همچنین با مهار سنتز ایزوپرنوئید از رشد تومورها ممانعت می‌کند [۳]، [۴]. به علاوه لواستاتین حاصل از فرایند تخمیر پیش ساز سنتز سیمواستاتین است که خود یکی از انواع مهم استاتین‌های نیمه سنتتیک محسوب می‌شود [۵]. لواستاتین یکی از متابولیت ثانویه انواعی از قارچ‌های کپکی مانند گونه‌های (پنی‌سیلیوم spp، اسپرژیلوس ترئوس، مونسکوس روبر) است [۶]. تولید تجارتي این ماده براساس تخمیر با تکنیک کشت بسته قارچ اسپرژیلوس ترئوس است و غالب تحقیقات زمینه تولید این ماده به این گونه خاص قارچ اختصاص دارد [۷].

واژه‌های کلیدی: لواستاتین، کشت غوطه‌ور، تخمیر در بستر جامد و اسپرژیلوس ترئوس

۱- Solid State Fermentation (SSF)

۲- *Penicillium* spp., *Monascus ruber*, *Aspergillus terreus*

فرایند تخمیری قارچ اسپرژلوس ترئوس مشخصاً در دمای ۲۸ درجه و pH بین ۵/۸ تا ۶/۳ انجام می‌شود و میزان اکسیژن محلول معمولاً برابر ۴۰ درصد اکسیژن موجود در هوا یا بیش از آن در نظر گرفته می‌شود [۸].

یک مرحله فرایند تخمیری برای تولید محصول غالباً کمتر از ۱۰ روز به طول می‌انجامد و در برخی موارد محصولی که طی رشد توده‌ای قارچ تولید می‌شود به مراتب بیش از رشد رشته‌ای است [۹]. در صورتی که ماده اولیه به سرعت به مصرف قارچ برسد رشد قارچ به حالت کنترل شده‌ای درمی‌آید و در نتیجه رشد زیاد رشته‌های قارچ، ویسکوزیته محیط افزایش یافته و در این حال تیتراژ تولید محصول کاهش می‌یابد [۱۰].

مواد تشکیل دهنده محیط تخمیر در بیوراکتور تأثیر چشم‌گیری در نحوه تامین مواد غذایی توسط میسلیم‌های قارچ و متابولیسم آن‌ها و به طور مستقیم در توان تولیدی تخمیر دارند. در میان مواد غذایی موجود در محیط کشت، منابع کربن و ازت نقش تعیین‌کننده در این فرایند دارند؛ زیرا مستقیماً بر تشکیل بیومس و متابولیت‌های قارچ، تأثیر می‌گذارند. به علاوه نوع و غلظت منبع کربن از طریق فرایندی موسوم به مهار کاتابولیکی متابولیسم ثانویه قارچ را نیز تنظیم می‌کند. لذا تحقیقات مختلف دال بر آن است که بیوسنتز لو استاتین به منابع کربن و نیتروژن بستگی مستقیم دارد [۱۱]، [۱۲].

لذا تحقیق حاضر با هدف شناسایی بهترین میکروارگانیسم مولد و تعیین فرمولاسیون بهینه محیط برای تولید و نیز مقایسه بازده تولید بین دو روش کشت غوطه‌ور و SSF صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی میکروارگانیسم

میکروارگانیسم سویه‌های *A. terreus* از خاک، کمپوست و مواد گیاهی در حال فساد طی انکوباسیون در ۳۰ درجه سانتی‌گراد پس از کشت در محیط PDA حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم اکسی تتراسیکلین در هر میلی‌لیتر جداسازی شدند و شناسایی بر اساس خصوصیات ظاهری انجام شد [۱۳].

۲۸ سویه قارچ از ۴۵ نمونه خاک جداسازی شدند. نمونه استاندارد نیز با مشخصه *A. terreus* ATCC 20542 برای تأیید شناسایی و مقایسه میزان محصول تولیدی با سویه جداسازی شده مورد استفاده قرار گرفت.

تخمیر به روش کشت بسته (غوطه‌ور)

تخمیر با روش کشت بسته با استفاده از shaker با مشخصات ۲۲۰ rpm در ۳۰ درجه و با استفاده از فلاسک‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت انجام شد. سوسپانسیون تلقیحی حاوی ۱۰^۶ اسپور در هر میلی‌لیتر بود.

تخمیر به روش SSF

در این روش از ظروف پلاستیکی مخصوص کشت به روش SSF به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر، هر یک حاوی ۷۰ گرم ماده اولیه (۲۵ درصد وزن خشک محیط) استفاده شد. غلظت سوسپانسیون تلقیحی 10^7 اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر استریل بود. انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه و در رطوبت ۹۸ درصد انجام شد.

محیط کشت بسته

برای غربالگری بهترین سویه‌های مولد از سه محیط کشت در سیستم کشت بسته با فرمولاسیون‌های ذکر شده در جدول ۱ استفاده شد ($pH = 6/5$).

جدول ۱- اجزا محیط‌های مورد استفاده در روش کشت بسته

| F3 | F2 | F1 | نام محیط اجزا محیط (g/L) |
|-----|-----|-----|-----------------------------|
| - | - | ۲۰ | لاکتوز |
| ۵۰ | - | - | سوکروز |
| ۱۰ | ۱/۵ | ۲/۵ | عصاره ذرت * |
| - | ۳۰ | - | آرد ذرت |
| - | - | ۲ | آرد سویا |
| ۱ | ۱ | ۱ | KH_2PO_4 |
| ۱ | ۱ | ۱ | NaCl |
| ۰/۵ | ۱ | ۱ | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ |

* corn steep liquor

به دلیل آن که سویه Gil-4 از بیش‌ترین توان تولیدی برخوردار بود، به عنوان سویه انتخابی برای آزمایش‌ها بعدی مورد استفاده قرار گرفت و اثر سه منبع کربن، سه منبع ازت آلی و سه منبع ازت معدنی و غلظت‌های متفاوت KH_2PO_4 بر تولید این سویه مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳). تمامی آزمایش‌ها بر مبنای مدل «Latin Square» طراحی شد [۱۵].

در مرحله بعدی مجدداً با استفاده از مدل «Latin Square» غلظت بهینه ۴ بخش اساسی تشکیل دهنده محیط یعنی لاکتوز، آرد سویا، نیترات پتاسیم و KH_2PO_4 تعیین شد (جدول ۴).

محیط مورد استفاده در روش SSF حاوی ترکیبات زیر بود:

الف) بر حسب گرم بر لیتر

پودر آب پنییر ۲۰، آرد سویا ۴، KH_2PO_4 ۴، KNO_3 ۲، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۵، NaCl ۰/۵

ب) بر حسب میلی‌گرم بر لیتر

$MnSO_4$ ۱/۶، $ZnSO_4$ ۳/۴، $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ ۲ و $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ۵

برخلاف روش کشت بسته رطوبت در این روش ۷۵ درصد و $pH=6/2$ بود. بستر جامد فوق به ترتیب یکبار عصاره سورگوم و بار دیگر گاه گندم خرد شده به قطعات یک سانتی متری بود. محیطها در ۱۲۱ درجه به مدت ۳۰ دقیقه استریل شدند.

روش آنالیز محصول

ارزیابی تولید لوآستاتین با استفاده از روش HPLC و ستون Novapak (۴ میکرومتر، $3/9 * 150$ میلی متر) با استفاده از حلال استونیتریل ۰/۱ درصد و اسید فسفریک (به نسبت ۵۰ به ۵۰ حجمی/حجمی) انجام شد. سرعت جریان در ستون ۱/۵ میلی لیتر در دقیقه بود. ظهور کروماتوگرامها در ۲۳۵ نانومتر، با استفاده از پرتو UV انجام شد. بدین منظور ۲ میلی لیتر آبگوشت تخمیر با ۲ میلی لیتر استونیتریل و ۱۰۰ میکرو لیتر اسید فسفریک مخلوط و ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی (سوپرناتنت) به ستون کروماتوگرافی تزریق شد. در مورد نمونه های تهیه شده از روش SSF ۵ گرم از هر محیط با ۱۵۰ میلی لیتر استونیتریل مخلوط و به مدت ۶۰ دقیقه روی روتاری با سرعت ۲۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. ۲ میلی لیتر از مایع رویی با ۲ میلی لیتر آب و ۵۰ میکرو لیتر اسید فسفریک غلیظ مخلوط و به ستون تزریق شد. محلول های استاندارد نیز در استونیتریل تهیه شدند. شناسایی لوآستاتین بر اساس زمان ماندگاری و طیف UV و تعیین غلظت آن بر اساس روش استاندارد انجام شد [۴].

نتایج و بحث

از ۲۸ سویه اسپرژیلوس ترئوس جداسازی شده از خاک های مناطق چهارگانه استان گیلان با روش کشت بسته ۶ سویه دارای توان تولید بیش از یک میکروگرم لوآستاتین در هر میلی لیتر بودند (جدول ۲).

جدول ۲- تولید لوآستاتین توسط سویه های مختلف قارچ اسپرژیلوس ترئوس در محیط کشت بسته در مقایسه با سویه استاندارد (بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر)

| نام سویه | منبع جداسازی | محیط F1 | محیط F2 | محیط F3 |
|------------|--------------|---------|---------|---------|
| Gil - 1 | خاک | ۳ | ۰ | ۱ |
| Gil - 2 | خاک | ۳ | ۱ | ۱ |
| Gil - 3 | خاک | ۱۱ | ۱۰ | ۲ |
| Gil - 4 | کمپوست | ۱۴۷ | ۶۱ | ۶۵ |
| Gil - 5 | کمپوست | ۱۰ | ۶ | ۶ |
| Gil - 6 | کمپوست | ۷۱ | ۵۲ | ۶۷ |
| ATCC 20542 | - | ۹۱ | ۶۵ | ۴۱ |

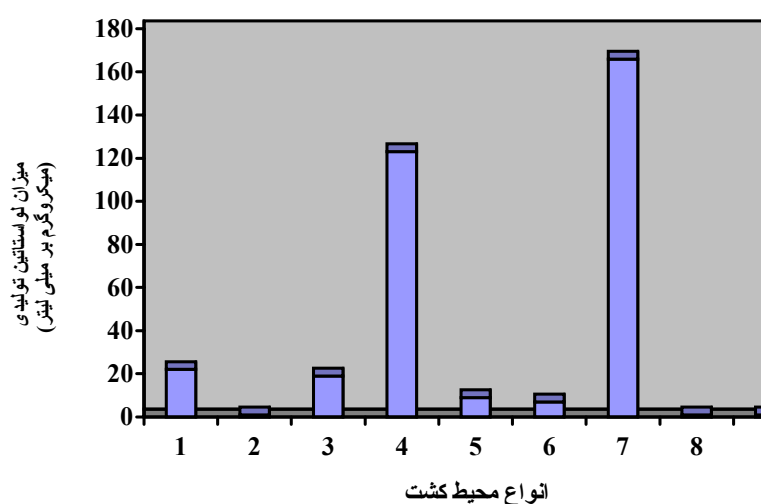
نتایج مربوط به تعیین بهترین منابع کربن، نیتروژن آلی و معدنی نشان داد که در میان اجزا محیط لاکتوز، آرد ذرت و نترات پتاسیم به ترتیب بهترین منابع کربن، نیتروژن آلی و نیتروژن معدنی بودند. افزایش غلظت KH_2PO_4 نیز سبب افزایش تولید لو استاتین شد (جدول ۳ و نمودار ۱). بر اساس نتایج حاصل از جدول ۳ محیط کشت شماره ۷ بهترین محیط برای تولید لو استاتین محسوب می‌شود.

جدول ۳- بهینه‌سازی منابع کربن، نیتروژن و غلظت فسفات برای *Aspergillus terreus* Gil-4

| نوع اجزا (W/V) % | محیط ۱ | محیط ۲ | محیط ۳ | محیط ۴ | محیط ۵ | محیط ۶ | محیط ۷ | محیط ۸ | محیط ۹ |
|---------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| لاکتوز | % ۲ | - | - | % ۲ | - | - | % ۲ | - | - |
| سوکروز | - | % ۲ | - | - | % ۲ | - | - | % ۲ | - |
| نشاسته | - | - | % ۲ | - | - | % ۲ | - | - | % ۲ |
| آرد سویا | % ۰/۳ | % ۰/۳ | % ۰/۳ | - | - | - | - | - | - |
| CSL | - | - | - | % ۰/۳ | % ۰/۳ | % ۰/۳ | - | - | - |
| آرد ذرت | - | - | - | - | - | - | % ۰/۳ | % ۰/۳ | % ۰/۳ |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | % ۰/۱ | - | - | - | - | % ۰/۱ | - | % ۰/۱ | - |
| $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ | - | % ۰/۱ | - | % ۰/۱ | - | - | - | - | % ۰/۱ |
| KNO_3 | - | - | % ۰/۱ | - | % ۰/۱ | - | % ۰/۱ | - | - |
| KH_2PO_4 (0.0) | % ۰ | - | - | - | % ۰ | - | - | - | % ۰ |
| KH_2PO_4 (0.1) | - | - | % ۰/۱ | % ۰/۱ | - | % ۰/۱ | - | % ۰/۱ | - |
| KH_2PO_4 (0.2) | - | - | - | - | - | % ۰/۲ | % ۰/۲ | - | - |
| لو استاتین ($\mu\text{g/ml}$) | ۲۲ | ۱ | ۱۹ | ۱۳۳ | ۹ | ۷ | ۱۶۶ | ۱ | ۱ |

هر محیط حاوی: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ۰/۰۵ درصد، NaCl ۰/۰۵ درصد، محلول عناصر کمیاب شامل:

(MnSO_4 1.6 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.4 g/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/L) ۰/۰۵ درصد.



نمودار ۱- اثر بهینه‌سازی منابع کربن، نیتروژن و فسفات در تولید لو استاتین (بر اساس جدول ۳)

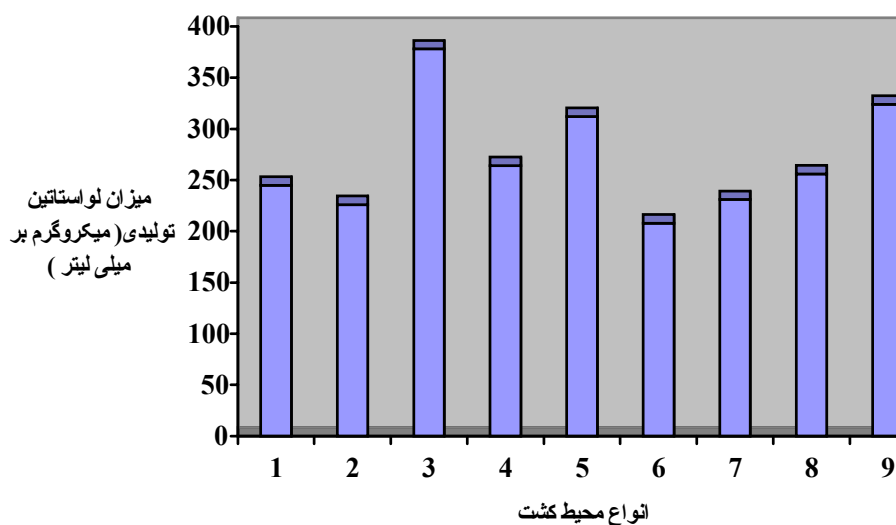
بررسی نتایج مربوط به بهینه‌سازی فرمولاسیون محیط کشت (جدول ۴) نشان داد که افزایش غلظت لاکتوز از ۲۰ گرم به ۴۰ گرم در لیتر سبب افزایش بازده می‌شود در حالی که افزایش آرد سویا بر افزایش بازده تأثیری ندارد. افزایش غلظت‌های KNO_3 و KH_2PO_4 به میزان ۰/۲ و ۰/۳ درصد نیز منجر به تولید بهینه محصول می‌شوند (جدول ۴ و نمودار ۲).

جدول ۴ - بهینه‌سازی اجزا محیط کشت انتخابی *Aspergillus terreus* Gil-4

| نوع اجزا % (W/V) | محیط ۱ | محیط ۲ | محیط ۳ | محیط ۴ | محیط ۵ | محیط ۶ | محیط ۷ | محیط ۸ | محیط ۹ |
|-----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| لاکتوز | ۲% | - | - | ۲% | - | - | ۲% | - | - |
| لاکتوز | - | ۳% | - | - | ۳% | - | - | ۳% | - |
| لاکتوز | - | - | ۴% | - | - | ۴% | - | - | ۴% |
| آرد سویا | ۰/۳ | ۰/۳% | ۰/۳% | - | - | - | - | - | - |
| آرد سویا | % | - | - | ۰/۴% | ۰/۴% | ۰/۴% | - | - | - |
| آرد سویا | - | - | - | - | - | - | ۰/۵% | ۰/۵% | ۰/۵% |
| KNO_3 | ۰/۱% | - | - | - | - | ۰/۱% | - | ۰/۱% | - |
| KNO_3 | - | ۰/۱۵ | - | ۰/۱۵ | - | - | - | - | ۰/۱۵ |
| KNO_3 | - | % | ۰/۲% | % | ۰/۲% | - | ۰/۲% | - | % |
| KH_2PO_4 | ۰/۲% | - | - | - | ۰/۲% | - | - | - | ۰/۲% |
| KH_2PO_4 | - | ۰/۳% | - | - | - | ۰/۳% | - | ۰/۳% | - |
| KH_2PO_4 | - | - | ۰/۴% | - | - | ۰/۴% | ۰/۴% | - | - |
| لواستاتین ($\mu\text{g/ml}$) | ۲۴۵ | ۲۲۶ | ۳۷۸ | ۲۶۴ | ۳۱۲ | ۲۰۸ | ۲۳۱ | ۲۵۶ | ۳۲۴ |

هر محیط حاوی: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ۰/۰۵ درصد، NaCl ۰/۰۵ درصد، محلول عناصر کمیاب شامل:

(MnSO_4 1.6 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.4 g/L, $\text{CoCl}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/L) ۰/۰۵ درصد.



نمودار ۲ - اثر بهینه‌سازی اجزا محیط کشت در تولید لواستاتین (بر اساس جدول ۴)

در روش کشت SSF (تخمیر در بستر جامد) نیز از سویه Gil-4 استفاده شد. این سویه در محیط F2, F1 به ترتیب ۹۲۰ و ۱۵۴ میکروگرم بر لیتر به ازای هر گرم وزن خشک سوبسترا لواستاتین تولید کرد. که این میزان تولید در مقایسه با روش کشت غوطه‌ور به مراتب از بازدهی بیشتری برخوردار بود. بازدهی این روش ۳۷/۵ میکروگرم محصول به ازای هر گرم لاکتوز در برابر میلی‌گرم محصول به ازای هر گرم لاکتوز در روش کشت غوطه‌ور است.

منابع

1. A.W. Alberts, Lovastatin and simvastatin- inhibitors of HMG CoA reductase and cholesterol-biosynthesis. *Cardiology* 77 (1990)14-21.
2. A.W. Alberts, J. Chen, G. Kuron, V. Hunt, J. Huff, C. Hoffman, J. Rothrock, Lopez M, H. Joshua, E. Harris, A. Patchett, R. Monaghan, S. Currie, E. Stapley, Albers-Schonberg G., O. Hensens, J. Hirshfield, K. Hoogsteen, J. Liesch and J. Springer, Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 77(1980)3957–3961.
3. K.D. Jones, W.T. Couldwell, D.R. Hinton, Y.H. Su, D.K. He, L. Anker and R.E. Law, Lovastatin induces growth inhibition and apoptosis in human malignant glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 205 (1994)1681–1687.
4. A. Newman, R.D. Clutterbuck, R.L. Powles and J.L. Millar, Selective inhibition of primary acute myeloid leukemia cell growth by lovastatin. *Leukemia* 8 (1994) 2022–2029.
5. R.A. Daborah, J. Lein, M.J. Conder and G.L. Tewalt, Enzymatic deacylation of simvastatin. *British Patent GB2255974* (1992).
6. P. Juzlova, L. Martinkova and V. Kren, Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. *J Ind Microbiol* 16 (1996)163–170.
7. N. Novak, S. Gerdin and M. Berovic, Increased lovastatin formation by *Aspergillus terreus* using repeated fed-batch process. *Biotechnol Lett* 19 (1997) 947–948.
8. M. Manzoni, M. Rollini, S. Bergomi and V. Cavazzoni, Production and purification of statins from *Aspergillus terreus* strains. *Biotechnol Techniques* 12 (1998) 529–532.
9. M. Manzoni, S. Bergomi, M. Rollini and V. Cavazzoni, Production of statins by filamentous fungi. *Biotechnol Lett* 21(1999) 253–257.

10. G. Szakács, G. Morovj'an and R.P. Tengerdy, Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*. *Biotechnol Lett* 20 (1998) 411–415.
11. M.S. Kumar, S.K. Jana, V. Senthil, V. Shashanka, S.V. Kumar and A.K. Sadhukhan, Repeated fed-batch process for improving lovastatin production. *Process Biochem* 36 (2000) 363–368.
12. H. Hajjaj, P. Niederberger and P. Duboc, Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. *Appl Environ Microbiol* 67 (2001) 2596–2602.
13. E. Evans and M.D. Richardson, *Basic Mycology a practical approach*. IRL Press at Oxford University Press (2000).
14. J. Friedrich, M. Zuzek, M. Bencina, A. Cimerman, A. Strancar and I. Radez, High-performance liquid chromatographic analysis of mevinolin as mevinolinic acid in fermentation broths. *J Chromatogr A* 704 (1995) 363–367.
15. D. Weuster-Botz, Experimental design for fermentation media development: statistical design or global random search? *J Biosci Bioeng* 90 (2000) 473–483.