Archive of SID

مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
بهار ۱۳۸۹، دوره دوم، شماره چهارم، صفحه ۶-۱

بررسی اثر غلظت فسفات بر روی تولید لوواستاتین توسط *آسپرژیلوس ترئوس* در محیط کشت ناپیوسته

آناهیتا زادمهر [۱] ، حسین عطار [۱]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات ،گروه مهندسی شیمی ، تهران، ایران

نویسنده مسؤول: دکتر حسین عطار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات ،گروه مهندسی شیمی ، تهران، ایران. attar.h@srbiau.ac.ir

دریافت: ۸۸/۸/۱۱ پذیرش: ۸۸/۱۰/۲

چکیده

زمینه وهدف : لوواستاتین یکی از داروهای خانواده استاتین هااست که در کاهش کلسترول خون نقش بسزایی دارد و توسط قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* طی فرآیند تخمیر تولید می شود. هدف این پژوهش بررسی اثر غلظت فسفات بر روی تولید لوواستاتین در یک محیط کشت ناپیوسته است.

روش بررسی: دراین پروژه به صورت آزمایشگاهی درغلظتهای مختلف فسفات(۰/۲-۳ گرم بر لیتر) با ثابت نگه داشتن بقیه پارامترهای محیط کشت، لوواستاتین تولید شده و غلظت های لوواستاتین و بیومس تولیدی اندازه گیری شده است.

یافته ها: بیشترین میزان تولید بیومس ۱/۳۲ گرم بر لیترمی باشد که در غلظت فسفات۰/۳ گرم بر لیتر بدست آمده است .در غلظت ۰/۳ گرم بر لیتر فسفات مقدار۱۱/۲۵ میلی گرم لوواستاتین تولید شد. استخراج لواستاتین توسط حلال اتیل استات در شرایط بهینه انجام شد.

نتیجه گیری: بهترین غلظت منبع فسفات برای استفاده در محیط کشت برای تولید لوواستاتین از آسپرژیلوس ترئوس ، ۰/۳ گرم بر لیتر می باشد. با افزایش غلظت لوواستاتین در محیط کشت منبع فسفات به عنوان بازدارنده در محیط عمل می کند.

واژه های کلیدی: لوواستاتین، فسفات، آسپرژیلوس ترئوس

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

لوواستاتین با فرمول عمومی ($C_{24}H_{36}O_5$) از داروهای خانواده استاتین است که همانند سیمواستاتین در کاهش کلسترول خون نقش بسزایی دارد و توسط قارچ آسپرژیلوس ترئوس (*Aspergillus terreus*) طی فرآیند تخمیر تولید می شود. به جز آسپرژیلوس ترئوس ۹ گونه دیگر هم قابلیت تولید لوواستاتین را دارند که از میان آنها آسپرژیلوس ترئوس بهترین گزینه بوده است(۱).

تولید لوواستاتین و رشد قارچ آسپرژیلوس ترئوس تحت تأثیر انواع منابع کربنی از جمله لاکتوز(۲)، گلیسرول(۳)، فروکتوز(۳) و منابع نیتروژنی عصاره مخمر(۳)، کنجاله سویا(۲) و شربت ذرت خیسانده(۳) قرار می گیرد. با استفاده از یک متابولیسم کند که در آن منبع کربنی (لاکتوز) تحت شرایط محدود نیتروژنی با کنجاله سویا ترکیب می شود، می توان بالاترین قابلیت تولید لوواستاتین را داشت .

با توجه به اینکه لوواستاتین داروی کاهش دهنده کلسترول خون می باشد و مصرف زیادی در ایران دارد، از آنجایی که تولید این دارو بیولوژیک میباشد و علم تولید آن درکشور وجود ندارد، به همین دلیل جهت واردات این دارو ارز قابل توجهی از کشور خارج می شود لذا هدف این پژوهش، تولید این دارو وبهینه کردن شرایط تولید می باشد تا گامی درجهت بهینه سازی محیط کشت لازم در تولید این داروی حیاتی برداشته و موانع و مشکلات موجود بر سر راه تولید آن در کشور به حداقل رسانده شود. در فرایند های تخمیری انتخاب محیط کشت مناسب اهمیت بسزایی دارد(۴). غلظت های بهینه چهار فاکتور موثردر تولیدلوواستاتین کربن، نیتروژن ، اکسیژن و زمان تخمیر(بدون در نظر گرفتن اثر فسفات) با استفاده از روش تاگوچی (۵ و۶) طراحی شده که بر روی غلظت بیومس و لوواستاتین تولید شده در یک کشت غیر مداوم توسط قارچ آسپرژیلوس ترئوس بعنوان محیط کشت بهینه استفاده شده است(۳). همچنین در پژوهشی دیگر توسط روش RSM (Response Surface Methodology) اثر پنج فاکتور کربن، نیتروژن، فسفات ، اکسیژن، زمان بر روی تولید لوواستاتین و غلظت بیومس تولید شده بررسی شده است(۷). همچنین در پژوهش هایی دیگر، اثر سرعت همزدن(۲)، انتقال اکسیژن(۸) و مورفولوژی(۹) مورد بررسی واقع شده است. پژوهش های انجام شده بر روی بهینه سازی محیط کشت برای تولید لوواستاتین عمدتاً بر روی منبع کربن و نیتروژن انجام گرفته و منبع فسفات کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. در این تحقیق با استفاده از نتایج حاصل از این دو بررسی، ابتدا محیط کشت بهینه را بدست آورده و سپس با ستفاده از داده های حاصل از روش RSM که درغلظت های gr/lit ۲/۵ – ۰/۵ فسفات انجام شده بطور تجربی به بررسی اثرغلظت فسفات بر تولید لوواستاتین پرداخته شده است(۵).در این پروژه بصورت تجربی و آزمایشگاهی درغلظت های gr/lit ۳-۰/۲ فسفات را به محیط کشت با شرایط یکسان اضافه کرده و غلظت لوواستاتین و غلظت بیومس اندازه گیری شده است.دراین پروژه هدف، بررسی اثر فسفات درغلظت لوواستاتین و غلظت بیومس در تولیدداروی لوواستاتین است.

روش بررسی

کشت میکروارگانیسم: میکروارگانیسم مورد استفاده در این آزمایشات، قارچ آسپرژیلوس ترئوس ۵۲۶۷ می باشد که از سازمان پژوهش های علمی وصنعتی ایران(مجتمع پژوهشی عصر انقلاب) تهیه شده است. برای محیط اسپورزایی از محیط کشت آماده PDA استفاده شد. محیط تخمیر برای تولید لوواستاتین شامل ترکیبات زیر بود: لاکتوز ۴۸ گرم، کنجاله سویا ۰/۲۳ گرم، سولفات منیزیم ۷ آبه ۰/۵۲ گرم، نمک طعام ۰/۴ گرم، نیترات آهن ۹ آبه ۰/۰۲۲ گرم، سولفات روی ۱ آبه ۰/۰۰۱ گرم، بیوتین ۰/۰۴ گرم،پتاسیم دی هیدروژن فسفات در غلظت های ۰/۲، ۰/۳، ۰/۵، ۱/۵، ۲/۵ ،۳ گرم و محلول میکروالمنت که حاوی ترکیبات زیر بود: $Na_2B_4O_7.10H_2O$ ۱۰۰ میلی گرم، $Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$ ۵۰ میلی گرم، $MnCl_2{\cdot}4H_2O$ ۵۰ میلی گرم، $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ ۲۵۰ میلی گرم. pH محیط تخمیر بر روی ۶/۵ تنظیم شد. از آنجایی که در این پروژه از شش غلظت مختلف برای منبع فسفات استفاده شده، لذا تعداد ۸ ارلن به حجم ۵۰۰ میلی لیتر برای محیط کشت آزمایشگاهی و ۲ ارلن به عنوان شاهد (حاوی آب مقطر) در نظر گرفته شد که در مجموع ۱۰ ارلن تهیه شد. سپس در هر ارلن به مقدار ۱۵۰ میلی لیتر از محیط کشت آزمایشگاهی ریخته و مقدار مشخصی از مایه تلقیح اسپوری اضافه می شود. سپس ارلن ها را داخل شیکر با دمای آزمایشگاهی (۲۶ درجه سانتی گراد) و سرعت ۱۵۰دور بر دقیقه قرار داده و در روز یازدهم از ارلن ها در شرایط استریل مقدار ۲۰ سی سی نمونه برداشته و برروی آن اندازه گیری وزن خشک بیومس، تهیه

www.SID.ir

Archive of SID

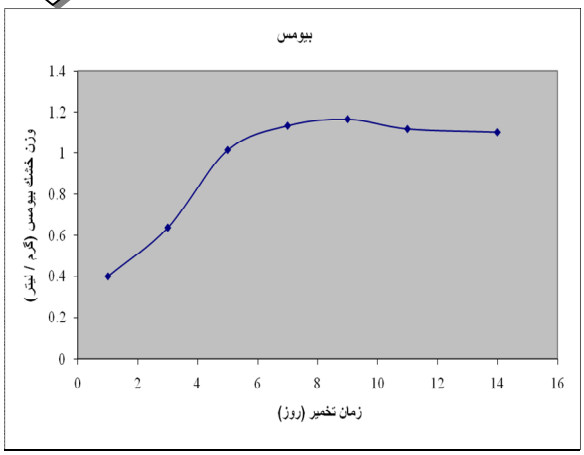
نمونه برای سنجش غلظت لوواستاتین تولیدی، pH و تهیه اسلاید برای تعیین مورفولوژی انجام می گیرد.

تعیین وزن خشک بیومس : برای به دست آوردن وزن خشک بیومس از کاغذ صافی ۰/۴۵ میکرو متر و از سیستم مخصوص فیلتراسیون بیومس قارچی استفاده شد. بعد از توزین کاغذ صافی ها، یک کاغذ صافی داخل محفظه مخصوص فیلتراسیون قرار داده و مقدار ۱۲/۵ سی سی از مایع تخمیری را روی آن ریخته و پمپ خلا را روشن کرده تا فیلتر شود. سپس کاغذ صافی همراه بیومس دوباره به مدت ۲ ساعت در آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد قرار داده و توزین می شود. با معلوم بودن وزن کاغذ صافی، وزن خشک بیومس به دست می آید.

استخراج و تعیین غلظت لوواستاتین: برای استخراج لوواستاتین از هر کدام از فلاسک ها، روزانه مقدار ۸ سی سی درون لوله آزمایش ریخته و ۸ سی سی هم حلال اتیل استات به آن اضافه شد مخلوط به مدت۲ساعت روی شیکرباسرعت۱۸۰دوربردقیقه قرارداده شد وسپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰دور بر دقیقه سانتریفوژ کرده و فاز آلی بالای لوله ها جدا شد و pH آن با اسیدکلریدریک روی عدد ۳ تنظیم شده و برای استفاده در مرحله شناسایی، در یخچال نگهداری شد. برای تعیین غلظت لوواستاتین استخراج شده از محیط کشت از دستگاه HPLC استفاده شد. مشخصات دستگاه HPLC به این صورت می باشد: شناساگر ۲۳۸ نانومتر، ستون C8 (25cm×4.6mm×5µm)، سرعت جریان۱/۵ میلی لیتر بر دقیقه و مقدار تزریق ۲۰ میکرولیتر. جهت سنجش غلظت لوواستاتین ازروش ذکرشده درکتاب USP 30(American pharmacopia) استفاده شده است.

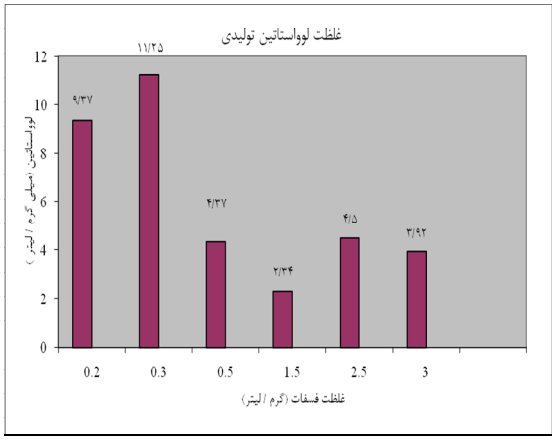
یافته ها

طبق شکل ۱ رشد لگاریتمی میکروارگانیسم طی چهارده روز درمرحله تخمیر مشاهده شده است. تغییرات بیومس محیط کشت آسپرژیلوس ترئوس در طی تخمیر، طبق نمودار نشان داد، مقدار بیومس در روز اول ۰/۴گرم بوده که این میزان تا روز نهم افزایش یافته (البته سرعت افزایش بیومس از روز پنجم کم شده است) و رشد بیومس تاروزیازدهم اندکی کاهش یافته و همچنین تا روز چهاردهم این مقدار ثابت مانده است.



شکل ۱. بررسی تغییرات بیومس در محیط کشت *Aspergillus terreus* **طی تخمیر**

در این پژوهش تولید لوواستاتین در شش غلظت مختلف فسفات در پنج بچ ودر هر بچ ، سه بار تکرارشد.که نتایج بدست آمده بصورت تجربی نشان داد بیشترین غلظت لوواستاتین تولید شده ۱۱/۲۵ میلی گرم برلیتر بدست آمده که این مقدار با دستگاه HPLC اندازه گیری شد، با محاسبه سطح زیر منحنی حاصل از این دستگاه مقدارغلظت لوواستاتین بدست آمده است،این مقدار در غلظت ۰/۳ گرم بر لیتر فسفات مشاهده شد و حداقل میزان تولید لوواستاتین ۲/۳۸ میلی گرم و در غلظت فسفات ۱/۵ گرم بر لیتر دیده می شود (شکل ۲).

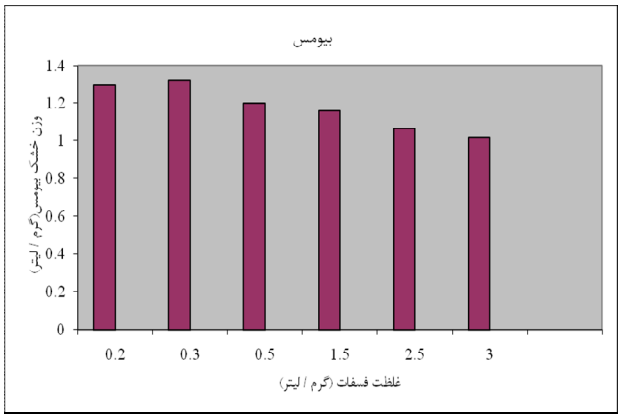


شکل ۲. میزان لوواستاتین تولیدی در محیط های حاوی غلظت های مختلف فسفات استخراج شده توسط حلال اتیل استات در روز یازدهم تخمیر

www.SID.ir

Archive of SID

حداکثر میزان بیومس تولیدی در محیط کشت *Aspergillus terreus* در محیط های حاوی غلظت های مختلف فسفات که در روز یازدهم بدست آمده بیشترین میزان تولید بیومس ۱/۳۲ گرم بر لیترمی باشد که در غلظت فسفات۰/۳ گرم بر لیتر بدست آمده است (شکل۳).



شکل ۳. حداکثر میزان بیومس تولیدی در محیط کشت *Aspergillus terreus* در محیط های حاوی غلظت های مختلف فسفات در روز یازدهم

بنابراین بهترین غلظت منبع فسفات برای استفاده در محیط کشت جهت تولید لوواستاتین ازقارچ *Aspergillus terreus* ، ۰/۳ گرم بر لیتر می باشد.

بحث

در پژوهشی که به منظور تولید لوواستاتین انجام شداثر غلظت منبع فسفات بر روی تولید این دارو بررسی شد. در ابتدا طبق منحنی تغییرات بیومس محیط کشت طی تخمیر، از همان روز اول فاز رشد مشاهده شده است که نشان داد که سویه قارچ *Aspergillus terreus* باکد ۵۲۶۷ که از سازمان پژوهش های صنعتی تهیه شد، درصد خلوص بالایی داشته است. این میزان تا روز پنجم افزایش یافت که فاز لگاریتمی رشد را نشان داد و پس از آن روز مقدار بیومس تاروز نهم اندکی افزایش داشته در این مرحله از منحنی فاز تاخیر مشاهده شده است و درانتها مقدار رشد بیومس کاهش یافته است. البته این کاهش اندک است که دراین مرحله میکروارگانیسم وارد فاز مرگ شده است (۱۰).

دراین پژوهش بیشترین غلظت لوواستاتین بدست آمده ۱۱/۲۵ میلی گرم برلیترکه در غلظت فسفات ۰/۳ گرم بر لیتر دیده می شود.همانطورکه شکل ۲ نشان داد تولید لوواستاتین تا غلظت فسفات ۰/۳ گرم بر لیتر افزایش یافته و پس از آن کاهش می یابد.به طوری که افزایش فسفات درمحیط کشت ابتدا باعث رشد قارچ آسپرژیلوس ترئوس در محیط شده است ولی از غلظت ۰/۳ میلی گرم به بعد فسفات بعنوان بازدارنده در محیط عمل کرده و مانع رشد قارچ وتولید لوواستاتین شده است، با این تفاوت که نتایج حاصل از روش RSM نشان داد که فسفات در غلظتهای ۰/۵-۲/۵ گرم بر لیتر همواره اثرافزاینده بر تولید لوواستاتین دارد(۷). بطورکلی مقدار فسفر مورد نیاز برای میکروارگانیسم های مختلف بین ۰/۳تا۳۰۰ میلی مول درلیتر متغییر است بالاترین فسفرمورد نیاز برای بیشترین تولید متابولیت های ثانویه،یک مول درلیتر،اثربازدارندگی شدیدی دارد(۱۱).

همانطور که از نمودار شکل ۳ مشخص است، بیشترین میزان تولید بیومس ۱/۳۲ گرم بر لیترمی باشد که در غلظت فسفات۰/۳ گرم بر لیتر بدست آمده است و حداقل میزان بیومس تولیدی ۱/۰۱۶ گرم در غلظت فسفات ۳ گرم بر لیتر بدست آمده است. با این تفاوت که نتایج حاصل از روش RSM نشان دادکه با افزایش غلظت فسفات در بازه ۰/۵-۲/۵ گرم بر لیتر باکاهش مقداربیومس همراه است(۷).دراین پژوهش بصورت تجربی نشان داده شدکه در این بازه ابتدا مقدار بیومس افزایش و سپس کاهش می یابد.

نتیجه گیری

به طور کلی منبع فسفات بعنوان یکی از پارامترهای موثر در افزایش راندمان تولید لوواستاتین می باشد که با استفاده از محیط کشت استفاده شده در این پژوهش، با مقدارفسفات با غلظت۰/۳ گرم بر لیتر بیشترین غلظت لوواستاتین(۱۱/۲۵ گرم بر لیتر) بدست آمده است.

تشکر و قدردانی

باتشکر ازمدیریت وپرسنل مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد واحد علوم تحقیقات تهران که با حمایت مالی وعلمی برای انجام و اتمام پروژه یاری رساندند.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1- Samiee S, Moazami N, Haghighi S, Aziz Mohseni S, Mirdamadi S, Bakhtiari MR . *Screening of lovastatin production by Filamentous Fungi*. Iran biomed J. 2003; 7(1): 29-33.
2- Lopez Casas JL, Sanchez Pereza JA, Ferandez Sevillaa JM,. Rodrıguez Porcela EM, ChistibY. *Pellet morphology, culture rheology an lovastatin production in cultures of Aspergillus terreus*.2005; 61-77.
3- Lopez casas JL, sanchez Perez JA,;Fernandez sevilla JM. *production of lovastatin by Aspergillus terreus : effect of the C:N ratio and principle nutrient on growth and metabolic production* . Enzyme and Microbial Technology J.2003; 270-277.
4- Dunn GM. *Nutritional requirements of microorganisms*. In: mooyung .eds, Comprehensive biotechnology,Vol 1,Pergaman Press Oxford. 1985. pp. 113-126.
5- Corran K. *Design Preparation and Sterilization of Fermentation Media*;In Moo-Young; Comprehensive Biotechnology; Vol. 1;Pergamon press Oxford
6- Stanbury PF, Whitaker A, Hall S. *Principles of fermentation technology*. 2nd ed. New Delhi, 1997.
7- Lopez casas JL, perez sanchez JA, sevilla Fernandez JM, Fernandez FG Acie n ; Grima, Molina E; chist Y. *Frementation optimization for the production of lovastatin by Aspergillus terreus : used of response surface methodology*. Chemical Technology & Biotechnology J. 2004; 79:1119-1126.
8- Rodrıguez Porcel EM, Casas Lopez JL, Sanchez Perez JA, Fernandez Sevilla JM, Garcıa Sanchez JL, Chisti Y. *Aspergillus terreus Broth Rheology, Oxygen Transfer, and Lovastatin Production in a Gas-Agitated Slurry Reactor*, Ind. Eng. Chem. Res. 2006; 45; 4837-4843.
9- Rodrıguez Porcel EM, Casas Lopez JL, Sanchez Perez JA, Fernandez Sevilla JM, Chisti Y. *Effects of pellet morphology on broth rheology in fermentations of Aspergillus terreus.* Biochemical Engineering J. 2005; 139-144.
10- Lamee H, Ehsani MR. *Fundamental biotechnology and microbiology industrial*.Islamic Azad University.1996; 85-98.
11- Shojaosadati Seied A, Asadollahi MA. *Industrial biotechnology*.2nd ed. Ttarbiat Modarres University Press.2008; 60-65.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir