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 آسپرژیلوس جداسازی شده از خاک ٦ 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 ٤ درصد لاکتوز(وزنی به حجمی)، ٤۰۰ 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[1] 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- هیدروکسی۳- میتل گلوتاریل کوآنزیم A ردوکتاز (HMG – Co A) که بیوسنتز کلسترول را کاتالیز می‌کند، انجام می‌دهد[۱]،[۲]. لواستاتین همچنین با مهار سنتز ایزوپرنوییید از رشد تومورها ممانعت می‌کند[۳]، [٤]. به علاوه لواستاتین حاصل از فرایند تخمیر پیش ساز سنتز سیمواستاتین است که خود یکی از انواع مهم استاتین‌های نیمه سنتتیک محسوب می‌شود[٥]. لواستاتین یکی از متابولیت ثانویه انواعی از قارچ‌های کپکی مانند گونه‌های (پنی‌سیلیوم spp، آسپرژلوس ترئوس، مونسکوس روبر)[2] است[٦]. تولید تجارتی این ماده براساس تخمیر با تکنیک کشت بسته قارچ آسپرژلوس 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 آسپرژیلوس ترئوس

۱-Solid State Fermentation (SSF)

۲- Penicillium spp., Monscus ruber , Aspergillus terreus

Archive of SID
www.SID.ir

فرایند تخمیری قارچ آسپرژلوس 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]. درصورتی 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 تیتر تولید محصول کاهش می‌یابد[۱۰].

مواد تشکیل دهنده محیط تخمیر در بیورآکتور تأثیر چشمگیری در نحوه تامین مواد غذایی توسط میسلیوم‌های 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 لواستاتین 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 درحال فساد طی انکوباسیون در ۳۰ درجه سانتی‌گراد پس از کشت در محیط PDA حاوی ۱۰۰میلی‌گرم 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 ۲۲۰rpm در۳۰ درجه و با استفاده از فلاسک‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت انجام شد. سوسپانسیون تلقیحی حاوی 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر بود.

Archive of SID

www.SID.ir

تخمیربه 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 $۱۰^۷$ 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 = ٦/٥).

جدول ۱- اجزا محیط‌های مورد استفاده در روش کشت بسته

نام محیط / اجزا محیط (g/L)	F1	F2	F3
لاکتوز	۲۰	-	-
سوکروز	-	-	٥۰
عصاره ذرت *	۲/٥	۱/٥	۱۰
آرد ذرت	-	۳۰	-
آرد سویا	۲	-	-
KH_2PO_4	۱	۱	۱
NaCl	۱	۱	۱
$MgSO_4,7H_2O$	۱	۱	۰/٥

* 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(جدول۳). تمامی آزمایش‌ها بر مبنای مدل «Latin Square» طراحی شد[۱٥].

در مرحله بعدی مجدداً با استفاده از مدل«Latin Square » غلظت بهینه ٤ بخش اساسی تشکیل دهنده محیط یعنی لاکتوز، آرد سویا، نیترات پتاسیم و KH_2PO_4 تعیین شد(جدول ٤).

محیط مورد استفاده در روش SSF حاوی ترکیبات زیر بود:

الف) بر حسب گرم بر لیتر

پودر آب پنیر ۲۰، آرد سویا ٤، KH_2PO_4 ٤، KNO_3 ۲، $MgSO_4.7H_2O$ ۰/٥، NaCl ۰/٥

ب) بر حسب میلی‌گرم بر لیتر

$MnSO_4$ ۱/٦، $ZnSO_4$ ۳/٤، $CaCl_2.6H_2O$ ۲ و $FeSO_4.7H_2O$ ٥

Archive of SID

www.SID.ir

برخلاف روش کشت بسته رطوبت دراین روش ۷۵ درصد و pH=٦/٢ بود. بستر جامد فوق به ترتیب یک‌بار عصاره سورگوم و بار دیگر کاه گندم خرد شده به قطعات یک سانتی‌متری بود. محیط‌ها در ۱۲۱ درجه به مدت ۳۰ دقیقه استریل شدند.

روش آنالیز محصول

ارزیابی تولید لواستاتین با استفاده از روش HPLC و ستون Novapak (٤ میکرومتر، ۳/۹ * ۱۵۰ میلی‌متر) با استفاده از حلال استونیتریل ۰/۱ درصد و اسید فسفریک(به نسبست۵۰ به ۵۰ حجمی/ حجمی) انجام شد. سرعت جریان در ستون ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه بود. ظهور کروماتوگرام‌ها در۲۳۵ نانومتر، با استفاده از پرتوUVانجام شد. بدین منظور۲میلی‌لیترآبگوشت تخمیر با ۲میلی‌لیتر استونیتریل و۱۰۰میکرولیتر اسیدفسفریک مخلوط و۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی(سوپرناتنت) به ستون کروماتوگرافی تزریق شد. در مورد نمونه‌های تهیه شده از روش SSF ۵ گرم از هر محیط با ۱۵۰ میلی‌لیتر استونیتریل مخلوط و به مدت ٦۰ دقیقه روی روتاری با سرعت ۲۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. ۲ میلی‌لیتر از مایع رویی با ۲ میلی‌لیتر آب و۵۰ میکرولیتر اسیدفسفریک غلیظ مخلوط و به ستون تزریق شد. محلول‌های استاندارد نیز در استونیتریل تهیه شدند. شناسایی لواستاتین بر اساس زمان ماندگاری و طیفUV و تعیین غلظت آن بر اساس روش استاندارد انجام شد[١٤].

نتایج و بحث

از ۲۸ سویه آسپرژیلوس ترئوس جداسازی شده از خاک‌های مناطق چهارگانه استان گیلان با روش کشت بسته ۶ سویه دارای توان تولید بیش از یک میکروگرم لواستاتین در هر میلی‌لیتر بودند(جدول ۲).

جدول۲- تولید لواستاتین توسط سویه‌های مختلف قارچ آسپرژیلوس ترئوس در محیط‌کشت بسته در مقایسه با سویه استاندارد (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

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	۱٤۷	٦۱	٦۵
Gil - 5	کمپوست	۱۰	٦	٦
Gil - 6	کمپوست	۷۱	۵۲	٦۷
ATCC 20542	-	۹۱	٦۵	٤۱

Archive of SID

www.SID.ir

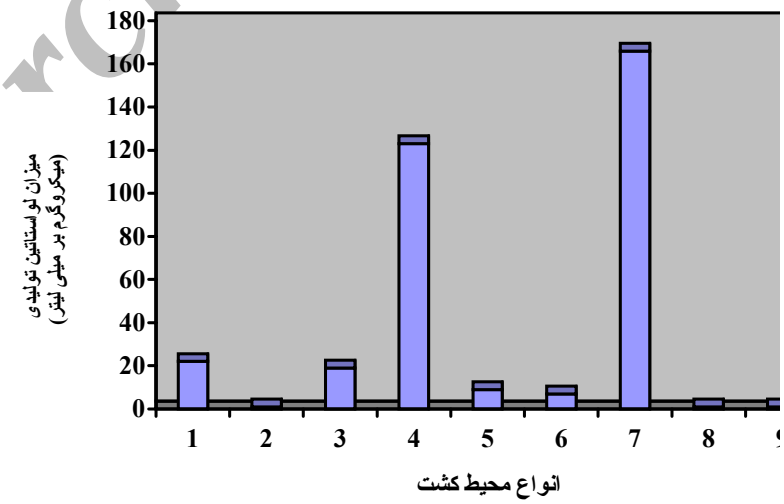
نتایج مربوط به تعیین بهترین منابع کربن، نیتروژن آلی و معدنی نشان داد که در میان اجزا محیط لاکتوز، آرد ذرت و نیترات پتاسیم به ترتیب بهترین منابع کربن، نیتروژن آلی و نیتروژن معدنی بودند. افزایش غلظت KH_2PO_4 نیز سبب افزایش تولید لواستاتین شد(جدول۳ و نمودار ۱). بر اساس نتایج حاصل ازجدول۳ محیط کشت شماره ۷ بهترین محیط برای تولید لوستاتین محسوب می‌شود.

جدول۳- بهینه‌سازی منابع کربن، نیتروژن و غلظت فسفات برای Aspergillus terreus Gil-4

نوع اجزا % (W/V)	محیط ۱	محیط ۲	محیط ۳	محیط ٤	محیط ٥	محیط ٦	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 %
$(NH_4)_2SO_4$	۰/۱ %	-	-	-	-	۰/۱ %	-	۰/۱ %	-
$(NH_4)_2HPO_4$	-	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 %	-
KH_2PO_4 (0.2)	-	۰/۲ %	-	-	-	۰/۲ %	۰/۲ %	-	-
لواستاتین(µg/ml)	۲۲	۱	۱۹	۱۳۳	۹	۷	۱٦٦	۱	۱

هر محیط حاوی : $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۰۵ درصد، NaCl ۰/۰۵ درصد، محلول عناصر کمیاب شامل:

($MnSO_4$ 1.6 g/L , $ZnSO_4.7H_2O$ 3.4 g/L , $CoCl_6.H_2O$ 2 g/L , $FeSO_4.7H_2O$ 5 g/L) ۰/۰۵ درصد.



نمودار ۱- اثر بهینه‌سازی منابع کربن، نیتروژن و فسفات در تولید لواستاتین (براساس جدول ۳)

Archive of SID
www.SID.ir

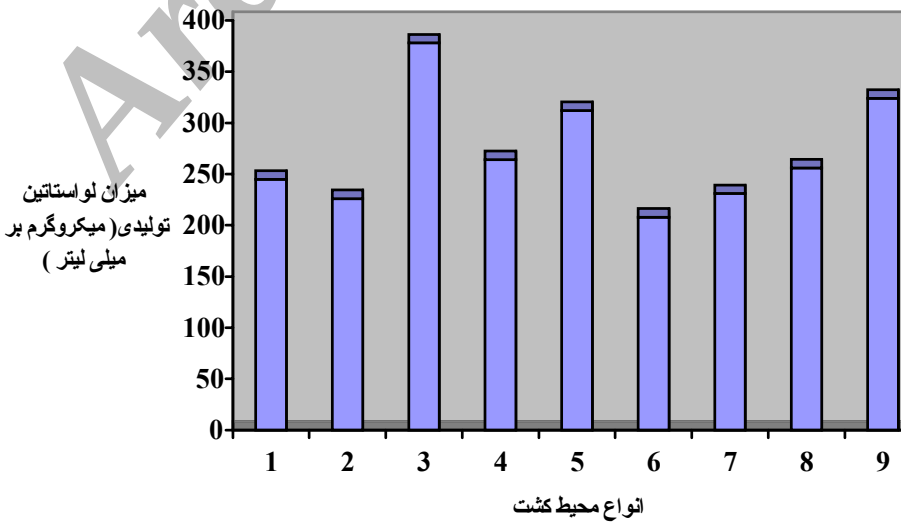
بررسی نتایج مربوط به بهینه‌سازی فرمولاسیون محیط کشت(جدول ٤) نشان داد که افزایش غلظت لاکتوز از ۲۰ گرم به ٤۰ گرم در لیتر سبب افزایش بازده می‌شود در حالی که افزایش آرد سویا بر افزایش بازده تأثیری ندارد. افزایش غلظت‌های KNO_3 و KH_2PO_4 به میزان ۰/۲ و ۰/۳ درصد نیز منجربه تولید بهینه محصول می‌شوند (جدول٤ و نمودار۲).

جدول ٤ - بهینه‌سازی اجزا محیط کشت انتخابی Aspergillus terreus Gil-4

نوع اجزا % (W/V)	محیط ۱	محیط ۲	محیط ۳	محیط ٤	محیط ٥	محیط ٦	محیط ۷	محیط ۸	محیط ۹
لاکتوز	۲ %	-	-	۲ %	-	-	۲ %	-	-
لاکتوز	-	۳ %	-	-	۳ %	-	-	۳ %	-
لاکتوز	-	-	٤ %	-	-	٤ %	-	-	٤ %
آرد سویا	۰/۳	۰/۳ %	۰/۳ %	-	-	-	-	-	-
آرد سویا	%	-	-	۰/٤ %	۰/٤ %	۰/٤ %	-	-	-
آرد سویا	-	-	-	-	-	-	۰/٥ %	۰/٥ %	۰/٥ %
	-								
KNO_3	۰/۱ %	-	-	-	-	۰/۱ %	-	۰/۱ %	-
KNO_3	-	۰/۱٥ %	-	۰/۱٥ %	-	-	-	-	۰/۱٥ %
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	-	۰/٤ %	-	-	-	۰/٤ %	۰/٤ %	-	-
لواستاتین (µg/ml)	۲٤٥	۲۲٦	۳۷۸	۲٦٤	۳۱۲	۲۰۸	۲۳۱	۲٥٦	۳۲٤

هر محیط حاوی : $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۰٥ درصد، NaCl ۰/۰٥ درصد، محلول عناصر کمیاب شامل:

($MnSO_4$ 1.6 g/L , $ZnSO_4.7H_2O$ 3.4 g/L , $CoCl6.H_2O$ 2 g/L , $FeSO_4.7H_2O$ 5 g/L) ۰/۰٥ درصد.



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

Archive of SID
www.SID.ir

در روش کشت SSF(تخمیر در بستر جامد) نیز از سویه Gil-4 استفاده شد. این سویه در محیط F1 , F2 به ترتیب ۹۲۰ ۱۵٤ 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 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, LopezM, 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, Selec-tive 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:areview.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, Produc-tion and purification of statins from Aspergillus terreus strains. Biotechnol Techniques 12 (1998) 529–532.
9. M. Manzoni, S. Bergomi, M. Rollini and V. Cavazzoni, Pro-duction of statins by filamentous fungi. Biotechnol Lett 21(1999) 253–257.

Archive of SID

www.SID.ir

10. G. Szak´acs, 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.

Archive of SID

www.SID.ir