مقاله مروری

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره نوزدهم، شماره ۹، شهریور ۱۳۹۶، صفحه ۶۱-۵۴

فاکتورهای مؤثر در ریخت زایی قارچ آسپرژیلوس ترئوس به منظور افزایش تولید لواستاتین

فرشید جابری انصاری (MSc)[۱]، حسن جلیلی (PhD)[۲*]، مجید عزیزی (PhD)[۳]

۱-گروه نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲-گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران
۳-گروه باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشارزی، دانشگاه فردوسی مشهد

دریافت: ۹۶/۱/۱۵، اصلاح: ۹۶/۴/۴، پذیرش: ۹۶/۴/۲۵

خلاصه

سابقه و هدف: لواستاتین یکی از داروهای مهم استاتینی می‌باشد که بطور معمول توسط قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* در کشت مایع تولید می‌شود. مصرف لواستاتین موجب کاهش کلسترول خون و جلوگیری از بروز سکته قلبی و سختی عروق می‌شود. از آنجا که لواستاتین به عنوان یک متابولیت ثانویه گرانبها مطرح است، لذا این مطالعه بمنظور بررسی عوامل تأثیرگذار بر ریخت‌زایی قارچ برای افزایش تولید صنعتی این دارو بسیار مهم انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مروری برای جمع آوری اطلاعات، مقالاتی که دارای یکی از کلمات کلسترول، سختی عروق، ریخت زایی، لواستاتین، *آسپرژیلوس ترئوس* و القاءگر در فاصله سال‌های ۱۹۶۰ تا ۲۰۱۷ در پایگاه‌های Pubmed، Scopus، Science Direct و پایگاه استنادی علوم جهان اسلام(ISC) بودند، جستجو و بررسی شدند.

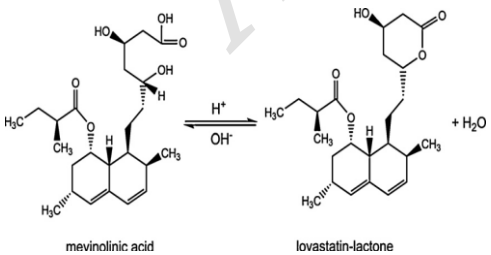
یافته‌ها: تعداد کل مقالات یافت شده ۱۴۵ مورد بود که از این تعداد، ۵۸ مقاله برای این مطالعه مناسب تشخیص داده شد. مطابق با نتایج مطالعات، منابع کربنی دیر مصرف شونده و محیط کشت مرکب، دور همزن بالا ۶۰۰ rpm، هوادهی برابر ۷۰٪ حالت اشباع، میزان تلقیح برابر 10^7 اسپور و استفاده از القاءگرهایی مانند هیدرات منیزیم‌سیلیکات، متیونین، بوتیرولاکتون و لینولئیک اسید موجب ریخت‌زایی ویژه‌ای به نام پلت می‌شوند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد نوع منبع کربنی بیشترین تأثیر را در تشکیل پلت می‌گذارند. شکل گیری پلت های کوچک موجب کاهش ویسکوزیته محیط و بالاتر رفتن نرخ انتقال اکسیژن به میکروارگانیسم شده و در نهایت موجب تولید بیشتر لواستاتین می‌شود.

واژه‌های کلیدی: لواستاتین، *آسپرژیلوس ترئوس*، کلسترول

مقدمه

لواستاتین (Mevacor) یک داروی کاهش دهنده کلسترول خون است که به دو شکل اسیدی و لاکتونی در محیط کشت وجود دارد (شکل ۱) و موجب مهار آنزیم ۳-هیدروکسی۳-متیل گلوتاریل-CoA ردوکتاز (HMG-CoA ردوکتاز) می‌شود، در نتیجه از تولید کلسترول و ایجاد بیماری‌های قلبی عروقی جلوگیری می‌کند (۱). Fadaeipuor و همکاران نشان دادند که کلسترول یکی از ریسک فاکتورها در بروز سرطان می‌باشد (۲). Setorki و همکاران نیز نشان دادند که مصرف مواد دارای آنتی اکسیدان اثر مفیدی بر کاهش ریسک فاکتورهای آترواسکلروز مانند کلسترول دارد (۳). Asadi و همکاران نشان دادند که عصاره هیدروالکلی گیاه زوفایی در کاهش سطح چربی خون اثرات لواستاتین را تقلید می‌کند (۴). Mansoori و همکاران مطالعه‌ای در زمینه بهینه سازی تولید موناکولین (یک پیش ساز در تولید لواستاتین) انجام دادند و نشان دادند مالتوز در غلظت ۱۰g/l و $MgSO_4$ در غلظت ۰/۷۸g/l بر روی تولید لواستاتین و زیست توده مؤثر هستند (۵). Nezami و همکاران نشان دادند که مصرف استاتین‌هایی مانند لواستاتین موجب کاهش خطر سختی و کلسیفیکاسیون عروقی می‌شود (۶). به طور کلی انواع روش‌های کشت برای تولید لواستاتین به دو دسته کشت جامد و مایع تقسیم بندی می‌شوند. کشت جامد روش ارزان قیمتی برای تولید لواستاتین می‌باشد (۷). در این نوع کشت از مواد زائد کشاورزی به عنوان منبع تغذیه استفاده می‌شود و مراحل پایین دستی یا استخراج ساده‌ای دارد (۸)، اما این نوع کشت دارای معایبی نیز می‌باشد. اصلی‌ترین مشکلی که در تولید صنعتی کشت جامد وجود دارد کنترل پارامترهای فرآیند (مانند اکسیژن، دما، رطوبت) و تغییر مقیاس از سطح آزمایشگاهی به سطح صنعتی است (۹و۷).



شکل ۱ فرم های لواستاتین

بنابراین امروزه در مقیاس بزرگ تنها از *آسپرژیلوس ترئوس* برای تولید لواستاتین در کشت مایع استفاده می کنند (۱۵-۱۰و۱). Minooeian

* مسئول مقاله: دکتر حسن جلیلی
آدرس: تهران، میدان انقلاب، خیابان کارگر شمالی، دانشکده علوم و فنون نوین. تلفن: ۸۶۰۹۳۲۶۸-۰۲۱
E-mail: hjalili@ut.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

Haghighi و همکاران تأثیر اسانس های زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه را بر روی سلول های *آسپرژیلوس* بررسی کردند و نشان دادند این مواد بر روی رشد *آسپرژیلوس* تأثیر منفی می‌گذارند(۱۶). Asadi و همکاران تأثیرات هیستوشیمیایی ناشی از مصرف غذاهای آلوده با *آسپرژیلوس* را بررسی کردند و نشان دادند این قارچ پاتوژن است و میکوتوکسین تولید می‌کند (۱۷). امروزه چندین روش کشت مایع برای تولید بیشتر لواستاتین به کار گرفته می‌شود که عبارت از کشت بسته، کشت تغذیه‌ای (۱۸و۱۵و۱۲) و کشت دو مرحله‌ای (۲۰و۱۹) می باشد. منابع کربنی برای تولید لواستاتین از قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* معمولا شامل گلوکز، لاکتوز، گلیسرول و منابع کربنی پیچیده می‌باشند. Jaberi Ansari و همکاران به بررسی عوامل مؤثر در تولید لواستاتین توسط قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* ATCC 20542 در کشت مایع پرداختند و نشان دادند که منابع کربنی، منابع نیتروژنی، نسبت C/N، pH و عناصر معدنی در تولید لواستاتین نقش بسزایی دارند (۲۱). یکی از عوامل مؤثر در تولید متابولیت‌های ثانویه در قارچ های رشته‌ای ریخت‌زایی قارچ می‌باشد. Gao و همکاران به بررسی ارتباط بین ریخت‌زایی و تولید ایتاکونیک اسید در قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* پرداختند و نشان دادند افزایش فسفر و دما موجب افزایش قطر پلت می‌شود و از این رو موجب کاهش تولید ایتاکونیک اسید می‌شود (۲۲). Lu و همکاران نشان دادند که کنترل ریخت‌زایی موجب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه مانند ایتاکونیک اسید در کشت مایع می‌شود (۲۳). Anuradha. و همکاران نشان دادند که pH برابر ۵/۵، دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و دور همزن برابر rpm ۲۰۰ موجب بهبود بخشیدن تشکیل ریخت‌زایی پلت و تولید آنزیم‌ها از این قارچ می‌شود (۲۴).

Wang و همکاران در سال ۲۰۱۷ روش جدیدی را برای افزایش تولید اسید سیتریک توسط قارچ *آسپرژیلوس* معرفی کردند آنها به جای کشت اسپورهای قارچ از ریخت‌زایی پلت به عنوان تلقیح استفاده کردند، این ایده می‌تواند به عنوان یک روش نوید بخش برای افزایش تولید دیگر متابولیت‌های ثانویه در تخمیر قارچ‌های رشته ای نیز مؤثر باشد (۲۵).

تولید صنعتی لواستاتین تنها در حالت مایع می‌تواند در مقیاس‌های بسیار عظیم مانند فرمانتورهای ۱۵۰۰۰۰ مترمکعبی انجام شود. اما مشکلی که صنعت در کشت مایع برای تولید لواستاتین در فرمانتورهای بزرگ با آن مواجه است، اکسیژن رسانی مطلوب به قارچ می‌باشد. تاکنون از روش های گوناگونی مانند استفاده از کریرهای اکسیژن، استفاده از ستون حباب و کاهش ویسکوزیته محیط برای غلبه بر این مشکل استفاده شده است. به نظر می‌رسد از بین این عوامل کاهش ویسکوزیته محیط بیشترین سهم را در انتقال مؤثر اکسیژن در مقیاس بزرگ به همراه داشته باشد. به همین دلیل در این مقاله به بررسی عوامل تأثیرگذار بر ریخت‌زایی قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* که در ویسکوزیته محیط نقش دارند پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مروری برای جمع آوری اطلاعات، مقالاتی که دارای یکی از کلمات کلسترول، سختی عروق، ریخت زایی، لواستاتین، *آسپرژیلوس ترئوس* و القاءگر در فاصله سال‌های ۱۹۶۰ تا ۲۰۱۷ در پایگاه های Pubmed، Scopus، Science Direct و پایگاه استنادی علوم جهان اسلام (ISC) بودند جستجو و بررسی شدند. از مجموع مقالات یافت شده در پایگاه های مختلف اطلاعاتی ۵۷ مقاله که مربوط به نقش و ارتباط تأثیر منابع کربنی، دور همزن، گرانرویی، هوادهی، میزان تلقیح و القاءگرها بر ریخت زایی قارچ *آسپرژیلوس*، تولید لواستاتین و متابولیت های ثانویه بود انتخاب گردیده و سایر مقالات که ارتباطی با موضوع این پژوهش نداشتند از مطالعه حذف شدند.

یافته‌ها

ریخت‌زایی رشد قارچ آسپرژیلوس ترئوس: ریخت‌زایی رشد به فاکتورهای وابسته به میکروب شناسی شامل سویه قارچ، تکنیک شروع کشت، طبیعت محیط کشت و همچنین فاکتورهای فیزیکوشیمیایی مثل نیروی شکستن یا برش، درجه‌ها، pH، دما، قدرت یونی، هوادهی و غیره بستگی دارد (۲۸-۲۶). ریخت‌زایی‌های رشد گوناگون مخصوص قارچها و اکتینومیست‌ها در محیط کشت مایع می‌باشند (۲۹). در کشت مایع قارچها می‌توانند بصورت میسلیوم‌های آزاد یا ریخت‌زایی خاصی به نام پلت رشد کنند (۳۰و۲۹).

تجمع میسلیوم‌ها بصورت توده‌ای کلاف مانند ریخت‌زایی خاصی به نام پلت را بوجود می‌آورد. Razeghi yadek و همکاران گزارش کردند که ترکیب محیط کشت، pH و دما بر روی سرعت رشد قارچ شی‌تاکه مؤثر بوده و pH پایین برابر ۵/۴ و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد موجب بیشترین میزان رشد قارچ می شود (۳۱). تأثیر تنوع ریخت‌زایی ارگانیسم‌ها بر فرآیند تخمیر بطور گسترده‌ای بررسی شده است(۳۳و۳۲و۲۶)، König و همکاران عملکرد مقایسه ای میسلیوم‌های میله‌ای و پلت را در تولید پنی‌سیلین در ستون هوا ارتقاء دادند (۳۴). Takahashi و همکاران تفاوت معنی‌دار گرانرویی بین میسلیوم میله‌ای و پلت را در پنی‌سیلیوم کرایزوژنوم گزارش کردند (۳۵). Kumar و همکاران گزارش کردند رشد پلت‌های فشرده در آسپرژیلوس ترئوس موجب تولید بیشتر لواستاتین نسبت به حالت رشد رشته‌ای و میسلیومی می‌شود (۱۲).

غلظت اسپور: Gbewonyo و همکاران گزارش کردند غلظت شروع اسپور و میزان هوادهی تشکیل شدن پلت را تعیین می‌کنند (۲۹). به خاطر اینکه تعداد اسپور بر روی زیست توده مؤثر است تعداد اسپورها باید به دقت در حد خاصی نگه داری شود تا نتایج آزمایشات تکرار شدنی باشد، به طور میانگین باید حدود ۱۰۷ اسپور در میلی لیتر به محیط کشت تلقیح شود (۳۶). در غلظت کم اسپور میسلیوم‌های کمی تجمع کرده و پلت با قطر کوچک بدست می‌آید در غلظت بالای اسپور میسلیوم‌های زیادی تجمع کرده و قطر پلت‌ها بزرگ می‌باشد در غلظت خیلی بالا نیز سایز میسلیوم‌ها کوچک و تجمع شکل نمی‌گیرد (۳۷).

منابع کربنی: بین منبع کربن تولید لواستاتین و تغییرات ریخت‌زایی ارتباط وجود دارد (۳۸). محیطهای کشت مورد نظر برای تولید لواستاتین به دو دسته‌ی محیطهای سنتزی و محیطهای پیچیده تقسیم بندی می‌شوند. منابع کربنی خود به دو دسته‌ی منابع کربنی سریع متابولیزه شونده و منابع کربنی دیرمصرف شونده تقسیم بندی می‌شوند.

استفاده از منابع کربنی سریع متابولیزه شونده قارچ را به سمت رشد کنترل نشده میسلیومی سوق می‌دهد (۴۰و۳۹و۱۲). همچنین این نوع منابع کربنی موجب سرکوب کاتابولیتی متابولیت‌های ثانویه می‌شوند و به این دلیل موجب کاهش تولید لواستاتین می‌شوند (۳۸). در هنگام استفاده از منابع کربنی دیر مصرف شونده ریخت‌زایی رشد بصورت ساختاری فشرده، منظم و کوچکتری است، این

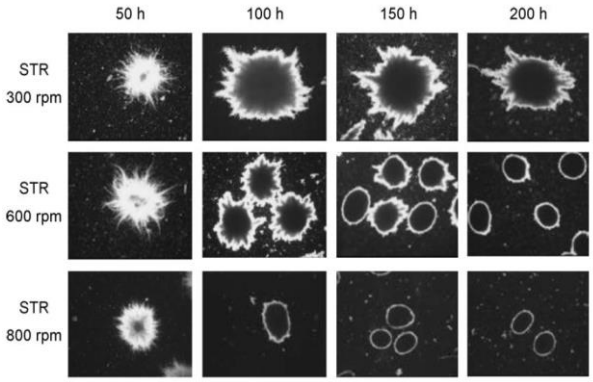
Archive of SID
www.SID.ir

ریخت‌زایی برای تولید متابولیت های ثانویه سودمند است و موجب تولید بیشتر لواستاتین با منابع کربنی دیرمصرف شونده می‌شود (۳۸). دسته دوم محیط‌های کشت برای تولید لواستاتین محیط‌های کشت مرکب می‌باشند. Jaberi Ansari و همکاران نشان دادند تولید لواستاتین در محیط کشت مرکب بیش از سه برابر نسبت به محیط کشت سنتزی حاوی گلوکز افزایش یافته است، همچنین پلت‌های تشکیل شده در این محیط کوچکتر از پلت‌های تشکیل شده در محیط کشت سنتزی می‌باشند (۴۱).

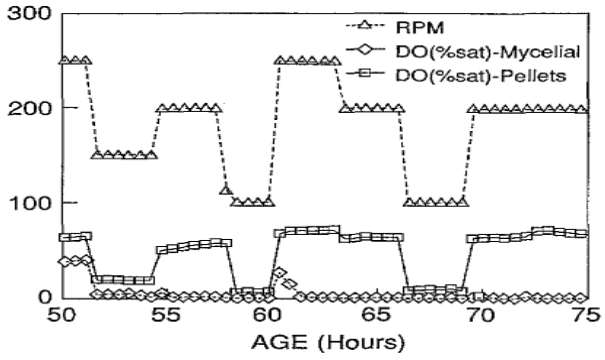
Ansari Jaberi و همکاران در سال ۲۰۱۵ برای اولین بار از شیره خرما به عنوان یک منبع کربنی مرکب برای تولید پروتئین نوترکیب β-NGF استفاده کردند و نشان دادند که رشد میکرورگانیسم و تولید پروتئین نوترکیب β-NGF در زمان استفاده از شیره خرما افزایش می‌یابند (۴۲). Tavana و همکاران قند مالتوز موجب بیشترین تولید زیست توده و پلی‌ساکاریدهای برون سلولی توسط قارچ گنودرما لوسیدیوم می‌شود (۴۳). Azizi و همکاران نیز نشان دادند که بیشترین میزان بازده هاگ زایی در هنگام استفاده از سبوس های ممرز بدست می‌آید (۴۴).

دور همزن: دور همزن یکی از عوامل مؤثر در قطر پلت می‌باشد، دور همزن بعنوان فراهم کننده اکسیژن برای رشد قارچ محسوب می‌گردد و موجب تولید بالاتر لواستاتین می‌شود، یکی از دلایل کاهش تولید لواستاتین در سرعت‌های بالا نسبت به سرعت های پایین‌تر، طبق گزارش Flickinger و همکاران به هم‌ریختن ساختار پلت‌های تشکیل شده می‌باشد (۴۵). در بیوراکتور همزن‌دار در شدت هوادهی ۳۰۰ rpm پلت‌هایی با قطر بیشتر از ۲۳۰۰ میکرومتر پایدار هستند ولی در قدرت هوادهی ۶۰۰ rpm پلت‌هایی با قطر کوچک تر از ۹۰۰ میکرومتر پایدارند. نیروی برشی زیاد در بیوراکتور همزن‌دار (معمولا بیشتر از ۶۰۰ rpm) موجب کاهش طول پلت ها به کمتر از ۹۰۰ میکرومتر می‌شود، با افزایش سرعت از ۳۰۰ rpm به ۸۰۰ rpm قطر پلت کاهش می‌یابد (۱۸) (شکل ۲).

هوادهی: اکسیژن برای تشکیل متابولیت‌هایی که وابسته به اکسیدو ردوکتازها هستند مهم می‌باشد. در تولید لواستاتین یک مرحله اکسیداسیون وجود دارد که توسط سیتوکروم p۴۵۰ انجام می‌شود (۴۷و۴۶). بیشترین میزان تولید لواستاتین بوسیله تلقیح پلت‌های کروی و میزان اکسیژن محلول ۷۰٪ در بیوراکتور رخ می‌دهد. هنگامی که میزان اکسیژن محلول به حدود ۸۰٪ حالت اشباع در بیوراکتور برسد زمینه برای برش زیاد و تخریب میسلیوم‌ها بوسیله سرعت هوادهی بالا مهیا می‌شود و هنگامی که میزان اکسیژن محلول کمتر از ۳۵-۲۰٪ حالت اشباع برسد، اکسیژن برای بیوسنتز لواستاتین محدود کننده می‌شود (۱۵). همچنین قطر پلت‌ها و غلظت پلت‌ها هر دو تحت تأثیر میزان هوادهی قرار دارند (۳۷). استفاده از اکسیژن خالص موجب تغییر ریخت‌زایی پلت می‌شود. نرمی، فشردگی و قطر پلت ها نیز بوسیله‌ی هوادهی و دورهمزن تحت تأثیر قرار می‌گیرد (۱۸). پلت‌ها در ابتدا کوچک هستند ولی وقتی اکسیژن خالص دریافت کنند ضخیم و قطور می‌شوند (۴۸). نتایج نشان داده‌اند نرخ جذب اکسیژن در تخمیر پلت غیر حساس به دور همزن است و برابر ۲۰ mM/l.h می‌باشد. ولی در تخمیر میسلیوم‌ها نرخ جذب اکسیژن حساس به دور همزن می‌باشد. میزان غلظت اکسیژن حل شده در تخمیر پلت به میزان تغییرات دور همزن حساس است ولی در مقابل غلظت اکسیژن حل شده در تخمیر میسلیومی حدودا صفر درصد می‌باشد(۲۹) (شکل ۳).



شکل۲. نشان دهنده ریخت‌زایی مختلف پلت در بیوراکتور همزن‌دار در دورها و ساعت‌های مختلف



شکل ۳. پاسخ غلظت اکسیژن حل شده در برابر rpm

القاءگرها: القاءگرها موادی هستند که افزودن آنها بواسطه تأثیر بر آنزیم‌ها موجب افزایش محصول مورد نظر می‌شود (۴۹). Gonciarz و همکاران گزارش کردند که افزودن تاک به محیط کشت آسپرژیلوس ترئوس موجب ایجاد پلت های فشرده‌تر و همچنین تولید بیشتر لواستاتین می‌شود (۵۰). مواد کروم سنسینگ نیز نوعی از القاءگرها به شمار می‌روند که مرتبط با جمعیت میکروارگانیسم‌ها می‌باشند. مولکول‌های کروم سنسینگ شامل آسیل هموسرین لاکتون، گامابوتیرولاکتون و پپتیدهای کوچک در باکتری‌ها و اگزیلیپین‌ها و فارنزول و بوتیرولاکتون I در قارچ‌ها است (۵۳-۵۱). آسپرژیلوس ترئوس توانایی ساختن بوتیرولاکتون I را دارد (۵۴). بوتیرولاکتون I به عنوان القاء کننده تغییرات ریخت‌زایی و در نتیجه افزایش تشکیل اسپور و لواستاتین عمل می‌کند. استفاده از منابع کربنی دیرمصرف شونده موجب ترشح بیشتر این ماده می‌شود (۵۶و۵۵). افزودن ۱۰۰ نانو مولار بوتیرولاکتون I موجب دو برابر شدن تولید محصول در زمانی که تراکم سلول‌ها بالا است (فاز سکون) می‌شود (۵۴). لینولئیک اسید نیز به عنوان مولکول سیگنال‌رسان در ارتباطات سلول به سلول عمل می‌کند و موجب افزایش تولید لواستاتین در قارچ آسپرژیلوس ترئوس می‌شود(۵۷).

بحث و نتیجه گیری

مسأله مهم در صنعت داروسازی این است که چگونه می توان در بیوراکتورهای غول‌آسا غلظت تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله لواستاتین را در

Archive of SID
www.SID.ir

همان میزانی که در مقیاس آزمایشگاهی تولید می‌شود نگه داشت، چرا که در مقیاس آزمایشگاهی معمولا آزمایشات در سطح ارلن‌های کوچک و بیوراکتورهای ۲۰-۳ لیتری انجام می‌شوند و به همین سبب اکسیژن رسانی به میکروارگانیسم به راحتی صورت می‌پذیرد و غلظت تولید در میزان بالایی قرار دارد اما هنگامی که مقیاس افزایش می‌یابد و به فرمانتورهای بزرگتر در اندازه های ۱۵۰۰۰۰-۱۰۰۰مترمکعبی می‌رسد غلظت تولید به تناسب افزایش مقیاس کاهش می‌یابد چرا که در درون محفظه بیوراکتور رفته رفته غلظت اکسیژن در دسترس کاهش می‌یابد و تأمین اکسیژن برای میکروارگانیسم را مشکل ساز می‌کند.

در این مطالعه مروری عوامل مؤثر بر کاهش ویسکوزیته محیط که مهمترین نقش را در رساندن اکسیژن به میکروارگانیسم دارند بررسی شده‌اند، اساسی ترین عامل در ویسکوزیته محیط، ریخت‌زایی رشد میکروارگانیسم می‌باشد همانگونه که ذکر شد قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* جزو قارچ های رشته‌ای می‌باشد و به همین دلیل ریخت زایی‌های گوناگونی در محیط مایع به خود می گیرد. طبق مطالعات Jaberi Ansari و همکاران ویسکوزیته محیط هنگام تشکیل ریخت زایی پلت در مقایسه با ریخت‌زایی میسلیومی بسیار کاهش می‌یابد (۴۱)، این موضوع کاملا موافق با دیگر پژوهش‌های انجام شده مانند نتایج König و همکاران (۳۴) و یا Kumar و همکاران (۱۲) بر روی ریخت زایی‌های متفاوت در قارچهای رشته‌ای به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد.

همانگونه که ذکر شد غلظت اسپور از عوامل مؤثر در تشکیل ریخت‌زایی پلت می‌باشد Jaberi Ansari و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که استفاده از استفاده از اسپورهای قدیمی‌تر بین ۲۵ تا ۱۷۵ روز موجب تولید حدودا ۲ برابر لواستاتین بیشتری نسبت به اسپورهای تلقیحی ۱۰ روزه می‌شود (۵۸) اما امروزه به جای اسپورهای قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* از پلت‌های تازه تشکیل شده آن برای تلقیح استفاده می‌کنند، با این کار هم موجب کاهش طول مدت زمان فرآیند تخمیر می‌شوند چرا که زایش اسپورها و تبدیل شدن به فرم رویشی خود چندین روز زمان نیاز دارد و همچنین از ایجاد فرم رویشی به صورت ریخت زایی پلت اطمینان حاصل می‌شود زیرا تنها پلت های تلقیح شده رشد می‌کنند اما در هنگام تلقیح اسپور طیفی از ریخت‌زایی از میسلیوم‌ها گرفته تا پلت‌های فشرده حاصل می‌شوند (۲۵). مطالعات Jia و همکاران نشان داد نوع منبع کربنی تأثیر بسزایی در ریخت‌زایی میسلیوم و پلت بازی می‌کند (۳۸). افزون براین نتایج تحقیقات Jaberi Ansari و همکاران نیز نشان داد که نوع منبع کربنی مانند شیره خرما علاوه بر تشکیل شدن پلت می‌تواند بر اندازه آن نیز اثر گذار باشد. در محیط کشت شیره خرما پلت‌های بسیار ریزی رشد می‌کنند در حالی که در محیط کشت سنتزی حاوی گلوکز پلت‌هایی با اندازه‌های درشت‌تر ایجاد می‌شوند. ریخت‌زایی پلت‌های کوچک موجب کاهش گرانرویی فاز مایع و انتقال بهتر اکسیژن می‌شود برعکس ساختارهای شبکه‌ای میسلیومی موجب ایجاد محلول‌های غیر نیوتونی با گرانرویی بالا شده که از انتقال جرم اکسیژن جلوگیری می‌کند. بنابراین این پژوهش نشان می دهد که علاوه بر تشکیل پلت سایز پلت نیز در تولید لواستاتین نقش بسزایی دارد و موجب تولید سه برابری این دارو در حالت پلت‌های ریز به نسبت پلت‌های درشت‌تر می‌شود (۴۱).

علاوه بر موارد ذکر شده دور همزن و هوادهی نیز در تولید لواستاتین تأثیر بسزایی دارند. بیشترین تولید لواستاتین مطابق پژوهش های Jaberi Ansari و همکاران در محیط کشت شیره خرما در ۱۵۰ rpm بدست آمد که دور نسبتا پایینی می‌باشد (۴۱)، این مورد برخلاف اکثر نتایج پژوهش‌های انجام شده می باشد که نشان می‌دهد دور همزن یا هوادهی نسبتا بالا موجب افزایش تولید لواستاتین می‌شود (۱۸) دلیل این نتیجه این نیست که دور همزن و هوادهی در تولید لواستاتین تأثیر ندارند بلکه به این خاطر است که نوع منبع کربنی تأثیر بیشتری بر ریخت‌زایی می‌گذارد، و تأثیر ریخت‌زایی بر ویسکوزیته و انتقال اکسیژن بیشتر از اکسیژن رسانی بوسیله دورهمزن و هوادهی می‌باشد. همچنین این گروه در تحقیقات خود اثر لینولئیک اسید را به عنوان القاءگر در تولید لواستاتین و ریخت زایی قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* در محیط کشت شیره خرما بررسی کردند و مشاهده کردند که تولید لواستاتین ۱/۵ برابر افزایش می‌یابد (۵۸) که مشابه نتایج پژوهش Sorrentino و همکاران در مورد تأثیر مثبت القاءگر در تولید لواستاتین می‌باشد، اما رشد پلت‌ها تغییر خاصی پیدا نکرد که این مورد نیز خود پیشنهاد دهنده این موضوع است که منابع کربنی بیش از القاءگرها بر ریخت-زایی قارچ تأثیرگذار هستند(۵۷).

علاوه بر عوامل مؤثر بر ریخت زایی و ویسکوزیته محیط عواملی دیگر مانند منابع نیتروژنی، نسبت C/N، pH و عناصر معدنی نیز بر روی تولید لواستاتین تأثیر گذارند که توسط Jaberi Ansari و همکاران مورد بررسی قرار گرفتند (۲۱). در نهایت می‌توان گفت مهمترین عامل مؤثر برای تشکیل شدن ریخت‌زایی پلت منبع کربنی می‌باشد. پس از منبع کربنی غلظت اسپور برابر 10^7 اسپور در هر میلی‌لیتر، دورهمزن بالا در حدود ۶۰۰ rpm هوادهی برابر ۷۰٪ حالت اشباع و استفاده از القاءگرهایی مانند هیدرات منیزیم‌سیلیکات، متیونین، بوتیرولاکتون و لینولئیک اسید در تشکیل پلت مؤثر هستند، ویسکوزیته محیط را کاهش و انتقال اکسیژن را به قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* افزایش می‌دهند و از این رو موجب افزایش تولید لواستاتین می‌شوند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از بنیاد ملی نخبگان، دکتر سورنا ستاری ریاست بنیاد ملی نخبگان و گروه تحقیقاتی رویال تکنولوژی جهت حمایت از این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد.

Archive of SID
www.SID.ir

A Study of the Factors Effective in Morphogenesis of Aspergillus terreus in order to Increase the Production of Lovastatin

F. Jaberi Ansari (MSc)[1], H. Jalili (PhD)*[2], M. Azizi (PhD)[3]

1.Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran
2.Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, I.R.Iran
3.Department of Medicinal Plants Production & Processing, Horticulture College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(9); Sep 2017; PP: 54-61
Received: Apr 4th 2017, Revised: Jun 25th 2017, Accepted: Jul 16th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Lovastatin is one of the most important types of statin drugs, commonly produced by *Aspergillus terreus* in a liquid culture. Lovatatin use reduces blood cholesterol and prevents heart attacks and vascular stiffness. Since lovastatin is introduced as a valuable secondary metabolite, this study was conducted to analyze the factors effective in morphogenesis of this fungus to increase the industrial production of this drug.

METHODS: For data collection in this review article, the articles containing one of the words "cholesterol", "vascular stiffness", "morphogenesis", "lovastatin", "Aspergillus terreus", and " inducer" between the years 1960 and 2017 were searched and studied in Pubmed, Scopus, Science Direct and Islamic World Science (ISC) databases.

FINDINGS: Overall, 145 articles were found, among which 58 papers were considered appropriate for this study. According to the results of the studies, the slowly metabolized carbon source and combined culture medium, high stirrer speed at 600 rpm, an aeration equal to 70% saturation, an inoculation equal to 10^7 spores, and the use of inducers such as magnesium silicate hydrate, methionine, butyrolactone and linoleic acid cause a special morphogenesis called Pellet.

CONCLUSION: The results indicate that the type of carbon source has the greatest effect on morphogenesis of pellet. The formation of small pellets reduces the viscosity of the medium, increases the rate of oxygen transfer to microorganisms, and ultimately produces more lovastatin.

KEY WORDS: *Lovastatin, Aspergillus terreus, Cholesterol*.

Please cite this article as follows:
Jaberi Ansari F, Jalili H, Azizi M. A Study of the Factors Effective in Morphogenesis of Aspergillus terreus in order to Increase the Production of Lovastatin. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(9):54-61.

***Corresponding author: H. Jalili (PhD)**
Address: Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, I.R.Iran
Tel: +98 21 86093268
E-mail: hjalili@ut.ac.ir.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1.Casas López JL, Sánchez Pérez JA, Fernández Sevilla JM, Acién Fernández FG, Molina Grima E, Chisti Y. Production of lovastatin by aspergillus terreus: effects of the C: N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. Enzyme Microb Technol. 2003;33(2):270–7.

2.Fadaeipuor S, Babaei Z, Parsian H, et al. Comparison of the serum total bile acids and cholesterol levels in breast cancer patients with control group. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(8): 48-53. [In Persian].

3.S. Fadaeipuor , Babaei Z, Parsian H, Motevalizadeh Ardekani A, Nikbakhsh N. Effect of rhus coriaria consumption with high cholesterol food on some atherosclerosis risk factors in rabbit. J Babol Uni Med Sci. 2012;14(3):38-45. [In Persian].

4.Asadi m, Cheraghi j, Pilevariyan a, Mehrabi a, Ebrahimi vosta kalaee s. Effect of Alcoholic extract of thymbra spicata on blood lipid profile in compared with lovastatin in male rats. J Babol Univ Medical Sci. 2012;14(5):42-8. [In Persian].

5.Mansoori Sh, Yazdian F, Azizi M, Sheikhpour M, Amoabediny G, Hamedi J, Rasekh B. Optimization of monacolin production in a controlled system. Ap Food Biotechnol. 2015;2(4):21-6.

6.N. Nezami M. Asghari J. Safa, Bagheri M, B Salari, S Ghorashi. Effect of lovastatin on serum osteoprotegerin level in type 2 diabetic nephropathy. J Babol Univ Med Sci. 2012;14(4):61-70. [In Persian].

7.Radha KV, Lakshmanan D. A review: lovastatin production and applications. Asian J Pharma Clin Res. 2013;6(3):21-6.

8.Pandey A, Soccol CR, Rodriguez-Leon JA. Solid state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications" reference book. 2001: asiatech publishers, Inc.

9.Wei P, Xu Z, Cen P. Lovastatin production by Aspergillus terreus in solid-state fermentation. J Zhejiang Univ Sci . 2007;8(9):1521-6.

10.Goswami S, Vidyarthi AS, Bhunia B, Mandal T. A review on lovastatin and its production. J Biochem Technol. 2012;4(1):581-7.

11.Hajjaj H, Niederberger P, Duboc P. Lovastatin biosynthesis by Aspergillus terreus in a chemically defined medium. Appl Environ Microbiol. 2001;67(6):2596-602.

12.Kumar M, Jana SK, Senthil V, Shashanka V, Kumar SV, Sadhukhan AK. Repeated fed-batch process for improving lovastatin production. Pro Biochem. 2000;36(4):363-8.

13.Manzoni M, Bergomi S, Rollini M, Cavazzoni V. Production of statins by filamentous fungi. Biotechnol lett. 1999;21(3):253-7.

14.Manuela M, Rollini S, Bergomi V, Cavaz z. Production and purification of statins from aspergillus terreus strains. Biotechnol Techniq. 1998;12(7):529-32.

15.Novak N, Gerdin S, Berovic M. Increased lovastatin formation by Aspergillus terreus using repeated fed-batch process. Biotechnol Lett. 1997;19(1):947-8.

16.Minooeian Haghighi M, Khosravi AR. Inhibition and destruction effects of cuminum cyminum, ziziphora clinopodioides and nigella sativa essences on aspergillus cells. J Babol Uni Med Sci. 2013;15(6):25-35. [In Persian].

17.Asadi M, Solaeymanirad J, Kazemi A, Tabrizchi H. Histopathologic findings induced by using contaminated food with mycotoxins. J Babol Univ Med Sci. 2001;3(2):32-7. [In Persian].

18.Rodr´ıguez Porcel EM, Casas Lopez JL , Sanchez P JA, Fernandez Sevilla JM, Chisti Y. Effects of pellet morphology on broth rheology in fermentations of Aspergillus terreus. Biochem Eng J. 2005;26(2):139-44.

19.Porcel R, Lopez C, Pérez S. Lovastatin production by aspergillus terreus in a two-staged feeding operation. J Chem Technol Biotechnol. 2008;83(9):1236-43.

20.Porcel R, Lopez C, Perez S, et al. Enhanced production of lovastatin in a bubble column by Aspergillus terreus using a two-stage feeding strategy. J Chem Technol Biotechnol. 2007;82(1):58-64.

Archive of SID

www.SID.ir

21.Jaberi Ansari F, Jafari Mansoorian H, Jalili H, Azizi M. A review of the effective factors for lovastatin production by Aspergillus terreus ATCC 20542 in liquid submerged fermentation. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(12):40-8. [In Persian].
22.Gao Q, Liu J, and Liu L. Relationship between morphology and itaconic acid production by Aspergillus terreus. J Microbiol Biotechnol. 2014;24(2):168-76.
23.Lu F, Ping K, Wen L, Wen L. Enhancing gluconic acid production by controlling the morphology of Aspergillus niger in submerged fermentation. Proc Biochem. 2015;50(9):1342-8.
24.Anuradha K, Padma N, Venkateshwar S, Reddy G. Effect of physical factors on pellet morphology of Aspergillus awamori MTCC 9166 and polygalacturonase production. Biocatal Agricult Biotechnol. 2014;3(4):271-4.
25.Wang B, Chen J, Li H, Sun F, Li Y, Shi G. Pellet-dispersion strategy to simplify the seed cultivation of Aspergillus niger and optimize citric acid production. Bioproc Biosystem Engin. 2017;40(1):45-53.
26.Metz B and Kossen NWF. The growth of molds in the form of pellets–a literature review. Biotechnol Bioeng. 1977;19(6):781-99.
27.Van S, Metz B. Influence of engineering variables upon the morphology of filamentous molds. Biotechnol Bioengin. 1981;23(1):111-48.
28.Metz B, Kossen NWF ,and Van Suijdam JC. The rheology of mould suspensions. In Adv Biochem Engin Springer. 1979;11:103-56.
29.Gbewonyo K, Hunt G, and Buckland B. Interactions of cell morphology and transport processes in the lovastatin fermentation. Bioproc Engin. 1992;8(1-2):1-7.
30.Metz B, Kossen NWF. The growth of molds in the form of pellets–a literature review. Biotechnol Bioeng. 1977; 19(6):781-99.
31.Yadak R, Azizi m, Farsi m, Shah Tahmasbi sh. Evaluation effect of media formulation, ph and temperature on. J Horticult Sci. 2009,23(1):18-26.
32.Whitaker A and Long PA. Fungal pelleting. Pro Biochem. 1973;8(11):27-31.
33.Schügerl K, Wittler R, Lorenz T. The use of molds in pellet form. Trend Biotechnol. 1983;1(4):121.
34.König B, Schügerl K, Seewald C. Strategies for penicillin fermentation in tower–loop reactors. Biotechnol Bioengin. 1982;24(2):259-80.
35.Takahashi J, Yamada KJ. Part III. Effects of cultural temperature on the production of mold protease. J Agric Chem Soc Japan. 1960;34:100-3.
36.Bizukojc M Ledakowicz S. Biosynthesis of lovastatin and (+)-geodin by Aspergillus terreus in batch and fed-batch culture in the stirred tank bioreactor. Biochem Engin J. 2008;42(3):198-207.
37.Nielsen J, Johansen C, Jacobsen M, et al. Pellet formation and fragmentation in submerged cultures of Penicillium chrysogenum and its relation to penicillin production. Biotechnol Prog. 1995;11(1):93-8.
38.Jia Z, Zhang X, and Cao X. Effects of carbon sources on fungal morphology and lovastatin biosynthesis by submerged cultivation of Aspergillus terreus. Asia-Pac J Chem Engin. 2009;4(5):672-7.
39.Martín J, Casqueiro J, Kosalková K, Marcos Ana. Penicillin and cephalosporin biosynthesis: mechanism of carbon catabolite regulation of penicillin production. Ant van Leeuwenh. 1999;75(1):31-2.
40.Feng B, Friedlin E, Marzluf GA. A reporter gene analysis of penicillin biosynthesis gene expression in Penicillium chrysogenum and its regulation by nitrogen and glucose catabolite repression. App Environment Microbiol. 1994;60(12):4432-9.
41.Jaberi Ansari F, Jalili H. Optimization of complex media for increase lovastatin production by Aspergillus terreus, Department of Life Science Engineering. 2016, Tehran university: Tehran university.(MSc thesis)
42.Jaberi Ansari F ,Hajihassan Z, Jalili H. Recombinant β-NGF production in E.coli using date syrup. Tarbiat Modar. 2015;6(2):60-70. [in persian].

Archive of SID

www.SID.ir

43.Tavana m, azizi m, farsi m, Baneshi F. Optimization of medium composition for efficient production of mycelial biomass and extracellular polysaccharides in the submerged culture of ganoderma lucidum. Iran J Med Aromat Plant. 2012,28(3):423-33. [In Persian].

44.Azizi M, Tavana M, Farsi M, Oroojalian F. Yield performance of lingzhi or reishi medicinal mushroom, Ganoderma lucidum (W. Curt.: Fr.) P. Karst.(higher basidiomycetes), using different waste materials as substrates. Inter J Med Mushrooms. 2012;14(5):521-7.

45.Flickinger MC, Drew SW. Fermentation, biocatalysis and bioseparation. Encyclopedia of Bioprocess Technology, 1st ed. Hoboken, USA: John Wiley & Sons. 2002. 267-91.

46.Hutchinson R, Kennedy J, Park C, Kendrew S, Auclair K, Vederas J. Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases. Antonie Van Leeuwenhoek. 2000;78(3):287-95.

47.Sutherland A, Auclair K, and Vederas JC. Recent advances in the biosynthetic studies of lovastatin. Curr Opin Drug Dis Dev. 2001;4(2):229-36.

48.Casas L, Sánchez P, Fernández S. Fermentation optimization for the production of lovastatin by Aspergillus terreus: use of response surface methodology. J Chem Technol Biotechnol. 2004;79(10):1119-26.

49.Lai L, Hung C, Lo C. Effects of lactose and glucose on production of itaconic acid and lovastatin by Aspergillus terreus ATCC 20542. J Biosci Bioengin. 2007;104(1):9-13.

50.Gonciarz J and Bizukojc M. Adding talc microparticles to Aspergillus terreus ATCC 20542 preculture decreases fungal pellet size and improves lovastatin production. Engineer Life Sci. 2014;14(2):190-200.

51.Brown H, Zarnowski R, Sharpee WC, et al. Morphological transitions governed by density dependence and lipoxygenase activity in Aspergillus flavus. App Env Microbiol. 2008;74(18):5674-85.

52.Horinouchi S. Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus Streptomyces. Biosci Biotechnol Biochem. 2007;71(2):283-99.

53.Miller M and Bassler B. Quorum sensing in bacteria. Ann Rev Microbiol. 2001;55(1):165-99.

54.Palonen E, Neffling M, Raina S, et al. Butyrolactone I quantification from lovastatin producing Aspergillus terreus using tandem mass spectrometry—evidence of signalling functions. Microorg. 2014;2(2):111-27

55.Beppu T. Signal transduction and secondary metabolism: prospects for controlling productivity. Trend biotechnol. 1995;13(7):264-9.

56.Schimmel T, Coffman A, Parsons S. Effect of butyrolactone I on the producing fungus, Aspergillus terreus. App Environmet Microbiol. 1998;64(10): 3707-12.

57.Sorrentino F, Roy I, and Keshavarz T. Impact of linoleic acid supplementation on lovastatin production in Aspergillus terreus cultures. App Microbiol Biotechnol. 2010;88(1):65-73.

58.Jaberi Ansari F, Jalili H. The effect of spore age and inducers on lovastatin production in Aspergillus terreus. Tarbiat Modares. 2017;8(1). [in press].

Archive of SID

www.SID.ir