Modares Journal of Biotechnology
Volume 9, Issue 4, Fall 2018
Pages: 571-578
Type: Original Research

Effect of Spore Age and Inducers on Lovastatin Production in *Aspergillus terreus*

Jaberi Ansari F.[1] *PhD*, Jalili H.[*2] *PhD*

[1]Medical Nanotechnology Department, Advanced Technologies in Medicine Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]Life Science Engineering Department, New Sciences & Technologies Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran

Abstract

Aims: One of the ways to reduce cholesterol is to use statins that prevent cholesterol synthesis. The statins are similar to mevalonate and act as a competitive inhibitor of HMG-CoA reductase enzyme. Lovastatin is the eminent derivate of the statins group, which is produced by many microorganisms. At commercial scale lovastatin is produced in submerged culture by *Aspergillus terreus*. The industrial production of this metabolite is carried out by *Aspergillus turosus* in liquid culture. The main aim of this research was to investigate the effect of spore age on lovastatin production at the inoculation stage; also, the impact of adding olive oil and tetracycline as inducers for lovastatin production were examined.

Materials & Methods: In the present experimental research, different suspensions from varying ages of spore were prepared and added to the medium of *Aspergillus terreus* ATCC 20542; lovastatin concentration also was measured by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Findings: The utmost lovastatin was observed in inoculum with 85 days spore age and equal to 60 mg/l, which was approximately twice higher compared to when inoculated with 10 days spore age. The best concentration of spore inoculation was 0.5×10^7 spores/ml. Lovastatin production significantly increased when tetracycline and olive oil were used as inducers.

Conclusion: As the inoculated spore age increases, lovastatin and biomass production is increased. The lovastatin production is increases by more than 1.5 times while adding tetracycline and olive oil compared to date syrup alone.

Keywords
Cholesterol [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68002784];
Lovastatin [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68008148];
Aspergillus terreus [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/67545176];
Spore [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68013170];
Inducers [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68065701]

[*]Corresponding Author
Tel: +98 (21) 86093268
Fax: -
Post Address: New Sciences & Technologies Faculty, University of Tehran, Kargar Shomali Street, Tehran, Iran
hjalili@ut.ac.ir
Received: April 23, 2017 Accepted: February 18, 2018 ePublished: December 21, 2018

Archive of SID
www.SID.ir

تاثیر سن اسپور و القاگرها روی تولید لواستاتین در قارچ *آسپرژیلوس ترئوس*

فرشید جابری‌انصاری PhD
گروه نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
حسن جلیلی* PhD
گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده
اهداف: امروزه یکی از راه حل‌های کاهش کلسترول خون استفاده از داروهایی به نام استاتین است که از سنتز کلسترول جلوگیری می‌کنند. این مواد به‌دلیل شباهت به موالونات موجب مهار رقابتی آنزیم HMG-CoA ردوکتاز می‌شوند. لواستاتین یکی از اولین داروهای استاتینی کشف‌شده است که توسط میکروارگانیزم‌های زیادی تولید می‌شود. تولید صنعتی این متابولیت توسط قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* (*Aspergillus terreus*) در کشت مایع انجام می‌شود. هدف اصلی این تحقیق بررسی اثر سن اسپور در هنگام تلقیح بر تولید لواستاتین بود. همچنین تاثیر افزودن روغن زیتون و تتراسایکلین به‌عنوان القاگرهای تولید لواستاتین بررسی شدند.
مواد و روش‌ها: در تحقیق تجربی حاضر سوسپانسیون‌های متفاوتی از سن‌های مختلف اسپور تهیه و به محیط کشت قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* ATCC 20542 اضافه شدند، غلظت لواستاتین نیز با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد.
یافته‌ها: بیشترین میزان لواستاتین با تلقیح اسپورهایی با سن ۸۵ روز و برابر با ۶۰میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد که حدود دوبرابر بیشتر از تلقیح با اسپورهایی با سن ۱۰ روز بود. بهترین میزان تلقیح اسپور ^{۷}۱۰×۰/۵ اسپور بر میلی‌لیتر به دست آمد. تولید لواستاتین هنگامی که از تتراسایکلین و روغن زیتون به‌عنوان القاگرها استفاده شد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت.
نتیجه‌گیری: با افزایش سن اسپور تلقیحی تولید لواستاتین و زیست‌توده بیشتر می‌شود. تولید لواستاتین هنگام افزودن تتراسایکلین و روغن زیتون بیش از ۱/۵برابر نسبت به شیره خرمای تنها افزایش می‌یابد.
کلیدواژه‌ها: کلسترول، لواستاتین، *آسپرژیلوس ترئوس*، اسپور، القاگرها

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۹
*نویسنده مسئول: hjalili@ut.ac.ir

مقدمه

از عوامل کاهنده کلسترول خون می‌توان استاتین‌هایی مانند لواستاتین را نام برد. به‌دلیل شباهت ساختاری این متابولیت به موالونات ماده‌ای که محصول آنزیم ۳-هیدروکسی، ۳-متیل‌گلوتاریل‌کوآنزیم A ردوکتاز (HMG-CoA ردوکتاز) است، این ماده می‌تواند موجب مهار رقابتی این آنزیم و کاهش بیوسنتز کلسترول شده که در نتیجه منجر به جلوگیری از گرفتگی عروق می‌شود[1]. لواستاتین یک متابولیت ثانویه است که معمولاً در فاز سکون رشد در شرایط محدودیت نیتروژن ترشح می‌شود[2]. قارچ‌های *آسپرژیلوس ترئوس*، *موناسکوس روبر* و پنی‌سیلیوم مهم‌ترین سویه‌های تولید کننده لواستاتین هستند[3-7]، اما در مقیاس بزرگ فقط *آسپرژیلوس ترئوس* برای تولید در کشت مایع توسعه یافته است[7-13]. برای تولید صنعتی لواستاتین در کشت مایع از اسپورهای قارچ برای تلقیح در فرمانتورهای بزرگ استفاده می‌شود، بنابراین عوامل موثر بر اسپورزایی، شرایط و میزان تلقیح در تولید متابولیت‌های ثانویه مانند لواستاتین اثرگذار خواهند بود. در سال ۲۰۱۵ *پراسانا لاتا* و همکاران اثر سن اسپور بر تولید لواستاتین را در یک دوره هفت‌روزه بررسی کردند و نشان دادند که سن اسپور در تولید لواستاتین موثر است[14]. *پورسل* و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند دو فاکتور غلظت اسپور تلقیحی و شدت نور در دسترس روی اسپورزایی موثر هستند. هر افزایشی در شدت نور و غلظت اسپور موجب کاهش زمان اسپورزایی می‌شود. اسپورزایی در تاریکی و تلقیح رقیق‌شده، به‌کندی صورت می‌گیرد. تاثیر غلظت اسپور به این خاطر است که مصرف سریع مواد مغذی در غلظت بالای اسپور موجب اسپورزایی سریع‌تر می‌شود[15]. *هگارتنر* و همکاران گزارش کردند که کیفیت تلقیح اسپور در فرآیندهای زیستی به غلظت اسپور و رویش آن بستگی دارد که این عوامل روی ریخت‌زایی قارچ تاثیر گذاشته و موجب ایجاد ریخت‌زایی خاصی به نام پلت می‌شود، در نتیجه این ریخت‌زایی روی تولید متابولیت‌های ثانویه تاثیر می‌گذارد. این داده‌ها نشان می‌دهند که تعداد واحدهای کلنی تشکیل‌شده با غلظت اسپور تلقیحی رابطه مستقیم دارد اما اسپورزایی با سن اسپور متغیر است[16]. *بیژوکوج* و همکاران عنوان کردند که پلت‌های کوچک بهتر از پلت‌های بزرگ اکسیژن جذب می‌کنند و از این رو موجب تولید بیشتر لواستاتین در محیط کشت می‌شوند[17]. *ونگ* و همکاران روش جدیدی را برای افزایش تولید اسیدسیتریک توسط قارچ آسپرژیلوس معرفی کردند آنها به‌جای کشت اسپورهای قارچ از ریخت‌زایی پلت به‌عنوان تلقیح استفاده کردند این ایده می‌تواند به‌عنوان یک روش نویدبخش برای افزایش تولید دیگر متابولیت‌های ثانویه در تخمیر قارچ‌های رشته‌ای موثر باشد[18].

افزون بر سن اسپور و ریخت‌زایی قارچ، القاگرها نیز به‌عنوان یک فاکتور مهم در تولید لواستاتین محسوب می‌شوند. القاگرها موادی هستند که افزودن آنها به‌واسطه تاثیر بر آنزیم‌ها موجب افزایش محصول مورد نظر می‌شود. افزودن القاگر در هر یک از مراحل رشد و همچنین میزان افزودن آن در تولید متابولیت‌های ثانویه موثر است[19]. موادی که موجب تحریک و پاسخ مرتبط با تراکم‌های جمعیت هستند نیز نوعی القاگرها به شمار می‌آیند. این مواد در باکتری‌ها به‌صورت وسیعی مطالعه شده‌اند و به‌خوبی به اثبات رسیده‌اند در حالی که در قارچ‌ها تنها در چند گونه شامل *کاندید آلبیکنز* (*Candida albicans*)، *آسپرژیلوس فلاووس* (*Aspergillus felavous*) و *آسپرژیلوس ترئوس* (*Aspergillus terreus*) کشف شده‌اند[20-22]. لینولئیک‌اسید به‌عنوان مولکول پیام‌رسان در ارتباطات سلول به سلول عمل می‌کند و موجب افزایش تولید لواستاتین در قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* می‌شود[23]. مشتقات اسیدچرب مانند اگزیلیپین نیز پتانسیل پاسخ به تراکم سلولی در قارچ‌ها را دارد[24-27]. مشتقات لینولئیک‌اسید در قارچ *آسپرژیلوس نیدولانس* (*Aspergillus nidulans*) در تولید جنسی و غیرجنسی اسپور وابسته به تراکم برای تولید متابولیت‌های ثانویه از قبیل پنی‌سیلین دخیل هستند و در قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* در تبدیل کنیدیوم به اسکلتریوم نقش دارند[26, 27]. *سورنتینو* و همکاران افزودن لینولئیک‌اسید به‌عنوان القاگر برای افزایش تولید لواستاتین را بررسی کردند[23]، *دارتورا* و همکاران نیز عنوان کردند که استفاده از پکتین خالص موجب افزایش تولید آنزیم اندوپلی‌گالاکتوروناز به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه در قارچ‌های رشته‌ای مانند *آسپرژیلوس ترئوس* می‌شود[28]. *جابری‌انصاری* و همکاران عوامل موثر در تولید لواستاتین شامل منابع کربنی، نیتروژنی، نسبت کربن به نیتروژن، pH، عناصر معدنی و القاگرها در قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* را بررسی کرده و نشان دادند منبع کربنی بیشترین تاثیر را در تولید لواستاتین دارد[29]. *جیا* و همکاران گزارش کردند که بین منبع کربن، تولید لواستاتین و تغییرات ریخت‌زایی ارتباط وجود دارد[30]. انتخاب

Archive of SID
www.SID.ir

منبع کربن و نیتروژن مناسب بیش از اینکه روی بازده زیست‌توده تاثیر بگذارد روی بازده لواستاتین تاثیرگذار است[7]. کربوهیدرات مهم‌ترین ماده موثر در رشد میکروارگانیزم و تولید لواستاتین است. پرمصرف‌ترین منبع کربوهیدراتی برای تولید لواستاتین گلوکز است، بیشترین تولید لواستاتین و زیست‌توده در غلظت مشخصی از گلوکز رخ می‌دهد و غلظت بیشتر و کمتر از این مقدار منجر به افزایش تولید لواستاتین نمی‌شود[1, 31, 32]. شیره خرما نیز منبع غنی از کربوهیدرات‌ها برای رشد قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* و تولید لواستاتین محسوب می‌شود. *جابری‌انصاری* و همکاران برای اولین بار از شیره خرما برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در میکروارگانیزم‌ها استفاده کردند و نشان دادند که تولید متابولیت‌های ثانویه در محیط کشت شیره خرما افزایش می‌یابد[33]. طبق مطالعه *کماس* و همکاران محیط تغذیه‌ای پایه مانند گلوکز، لاکتوز، گلیسرول و غیره می‌توانند به‌عنوان یک القاگر عمل کنند و تولید لواستاتین را افزایش دهند[34]. همان‌گونه که بیان شد بهینه‌سازی و افزایش تولید یکی از چالش‌های پیش‌روی صنعتگران است، شرکت‌های تولیدی عظیم همواره به‌دنبال افزایش تولید محصولات خود با کمترین هزینه هستند. در مطالعه حاضر پیداکردن راه حل‌هایی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه مانند لواستاتین مدنظر بود، به‌گونه‌ای که کمترین هزینه را برای صنعتگران به همراه داشته باشد، برای این منظور ابتدا به تاثیر سن و میزان اسپور برای افزایش غلظت تولید لواستاتین در محیط سنتزی پرداخته شد و سپس براساس آزمایشات صورت‌گرفته روی غلظت کربوهیدرات‌ها و عناصر معدنی شیره خرما این ماده محیط مناسبی برای تولید لواستاتین تشخیص داده شد و بنابراین اثر تتراسایکلین و روغن زیتون به‌عنوان القاگر در این محیط بررسی شدند.

مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر سن اسپور و القاگرها بر تولید لواستاتین در قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* انجام شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک پژوهش تجربی است.

تهیه قارچ *آسپرژیلوس ترئوس*: قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* سویه ATCC 20542 از کلکسیون هماهنگ میکروارگانیزم‌ها (BCCM؛ بلژیک) خریداری و برای کشت و برای تولید لواستاتین استفاده شد.

کشت اسپور برای تهیه استوک در لوله آزمایش: به‌منظور تکثیر و تهیه استوک از قارچ *آسپرژیلوس ترئوس*، ۱۰میلی‌لیتر از محیط کشت اتوکلاوشده سیب‌زمینی‌دکستروزآگار (PDA؛ ایبرسکو؛ ایران) درون لوله آزمایش ریخته و به‌صورت شیب‌دار قرار گرفت تا جامد شود. سپس اسپورهای سویه خریداری‌شده با لوپ درون لوله آزمایش حاوی محیط کشت PDA به‌صورت چمنی کشت و در مدت‌های معین (۱۰، ۲۵، ۸۵، ۱۳۵، ۱۷۵ و ۲۲۵ روز) در دمای ۳۰°C درون انکوباتور (شیماز؛ ایران) گرماگذاری شدند. پس از مدت‌های ذکرشده اسپورهای رشدکرده درون دمای یخچال (۵°C) نگهداری شدند[7].

کشت اسپور به‌منظور تلقیح در ارلن بصورت شیب‌دار: به‌منظور آماده‌سازی اسپورهای مرحله قبل برای تلقیح، ۵میلی‌لیتر محلول ۲% توئین ۲۰ (سیگما؛ ایالات متحده) به لوله‌های آزمایش اضافه و لوله‌ها به‌مدت دودقیقه ورتکس شدند تا تمامی اسپورها از سطح کنده شوند. به‌منظور یکنواخت‌سازی میزان تلقیح سوسپانسیون حاصله پس از هم‌زدن درون فالکن‌های ۵۰میلی‌لیتر ریخته شد و به‌مدت ۵ دقیقه در دور ۲۸۰۰×g در دستگاه سانتریفیوژ مدل MF20-R (awel؛ فرانسه) سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی (سوپرناتانت) هر فالکن جدا و به رسوب که همان اسپورهای جدا شده بدون توئین هستند، محلول نرمال‌سالین اضافه و برای مراحل بعدی نگهداری شدند[7]. لازم به توضیح است که پس از افزودن محلول سالین میزان ۱۰میکرولیتر از محلول حاوی اسپور به‌عنوان نمونه برداشته شده و در زیر میکروسکوپ نوری مدل CX_{22} (المپیوس؛ ژاپن) با لام هماسیتومتر شمارش شدند، سپس جذب با دستگاه اسپکتروفوتومتر نوری مدل NanoDrop 2000c (ترموساینتیفیک؛ ایالات متحده) خوانده شده و با نمودار استاندارد به‌منظور تعیین مقدار اسپورها مقایسه شد.

کشت قارچ در محیط کشت: ۵۰میلی‌لیتر محیط کشت سنتزی یا شیره خرما در ارلن‌های ۲۵۰میلی‌لیتری با ۱۵گرم بر لیتر عصاره مخمر (ایبرسکو؛ ایران) ترکیب و سپس اتوکلاو شدند. میزان pH به‌وسیله اسیدکریدریک و سود یک‌مولار (مرک؛ آلمان) روی حدوداً ۶.۵ تنظیم شد. یک‌میلی‌لیتر از محلول تلقیح حاوی میزان معینی اسپور اضافه و در دمای ۲۸°C به‌مدت ۱۲ روز در شیکر انکوباتور (IKA؛ آلمان) با دور همزن مشخص قرار داده شد. بعد از ۱۲ روز مقدار زیست‌توده و لواستاتین تولیدشده مطابق روش‌های زیر اندازه‌گیری شدند:

کشت در ارلن در محیط کشت سنتزی (برای بررسی تاثیر سن اسپور بر تولید لواستاتین)

ترکیبات این محیط کشت از نظر نوع و میزان عناصر مورد نیاز رشد میکروارگانیزم به دو دسته عناصر اصلی و عناصر کمیاب تقسیم‌بندی می‌شوند:

تهیه استوک عناصر کمیاب برای محیط کشت سنتزی: عناصر کمیاب عناصری هستند که برای رشد و تولید متابولیت‌های میکروارگانیزم به میزان کمی لازم هستند، برای رشد قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* و همچنین تولید لواستاتین مطابق مقالات استوک عناصر کمیاب به میزان‌های ۰/۱گرم بر لیتر بوریک‌اسید، ۰/۲۵گرم بر لیتر مس سولفات ۵آبه، ۰/۰۵گرم بر لیتر منیزیم‌کلراید ۴آبه، ۰/۰۵گرم بر لیتر سدیم‌مولیبدات ۲آبه در یک‌لیتر آب مقطر تهیه شدند و سپس به میزان یک‌میلی‌لیتر در لیتر به محیط کشت اصلی اضافه شدند[15].

تهیه محیط کشت عناصر اصلی محیط کشت سنتزی: محیط کشت سنتزی متشکل از ۶۰گرم بر لیتر گلوکز، ۱۵گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۰/۸گرم بر لیتر پتاسیم‌دی‌هیدروژن‌فسفات، ۰/۴۱گرم بر لیتر سدیم‌کلراید، ۰/۵۲گرم بر لیتر منیزیم‌سولفات ۷آبه، ۰/۰۰۱گرم بر لیتر روی‌سولفات یک‌آبه و ۰/۰۰۲گرم بر لیتر آهن‌سولفات تهیه شد (تمامی عناصر و نمک‌ها از شرکت مرک تهیه شدند). پس از ترکیب‌کردن این مواد ۲میلی‌لیتر از محلول عناصر کمیاب به ازای هر لیتر به محیط کشت سنتزی اضافه شد.

کشت در ارلن در محیط کشت شیره خرما

شیره خرمای استفاده‌شده در مطالعه حاضر از شیره خرمای موجود در بازار واریته کبکاب تهیه شد. تهیه محیط کشت شیره خرما به‌صورت حجمی انجام شد. بدین‌منظور پنج‌حجم آب دوبار تقطیر با یک‌حجم از شیره خرما مخلوط و سپس اسپورهای حاصله از لوله‌های کشت شیب‌دار مانند مرحله قبل در کشت سنتزی برای تلقیح استفاده شدند.

اندازه‌گیری عناصر معدنی شیره خرما به‌وسیله جذب اتمی

برای اندازه‌گیری عناصر معدنی در شیره خرما از طیف‌سنجی جذب

Archive of SID
www.SID.ir

اتمی استفاده شد. این بخش از آزمایش توسط پژوهشگاه مرکزی دانشگاه تهران صورت پذیرفت.

اندازه‌گیری منابع کربوهیدراتی شیره خرما به‌وسیله کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)

به‌منظور بررسی منابع کربوهیدراتی شیره خرما این ماده توسط کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا برای تعیین غلظت گلوکز، فروکتوز و ساکارز بررسی شد. در این راستا اسیدسولفوریک ۰/۱ نرمال به‌عنوان فاز متحرک و با نرخ جریان ۵/۰میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. دستگاه HPLC مدل Goebel-Knauer (KNAUER؛ آلمان) با دتکتور K-2600 RI و ستون Eurokat 30GX340EKN با ضخامت ۸×۳۰۰میلی‌متر استفاده شد[35].

اندازه‌گیری زیست‌توده

به‌منظور اندازه‌گیری زیست‌توده و لواستاتین تولیدی ۵۰میلی‌لیتر محیط کشت حاصل از ۱۲ روز تخمیر درون فالکون ۵۰میلی‌لیتری ریخته و به‌مدت ۵دقیقه در دور ۲۵۰۰g سانتریفوژ شد. فاز رویی به کمک قیف بوخنر پس از عبور از کاغذ صافی برای اندازه‌گیری لواستاتین ذخیره شد، فاز ته‌نشین‌شده که حاوی توده سلولی بود، روی کاغذ صافی واتمن شماره یک دیگری (که قبلاً وزن شده بود) قرار گرفت و به‌منظور شستن مواد قندی، صمغ و دیگر مواد محلول دوبار با آب مقطر شسته شد. سپس کاغذهای صافی به‌مدت یک روز درون آون ۷۰°C قرار داده شدند. با توزین مجدد وزن اضافه‌شده به کاغذ صافی معادل وزن توده سلولی لحاظ شد[36].

استخراج لواستاتین

به‌منظور استخراج لواستاتین پس از جداکردن زیست‌توده از محلول تخمیر قارچ مطابق مرحله قبل، pH محلول حاصل به کمک اسیدکلریدریک و سود یک‌مولار به ۳ رسانده شد، سپس ۵میلی‌لیتر از این محلول برداشته و به آن ۱۰میلی‌لیتر اتیل‌استات (سیگما؛ ایالات متحده) اضافه شد. محلول حاصل به‌مدت ۱۸ساعت در دمای ۳۰°C در شیکر انکوباتور با دور ۲۰۰دور در دقیقه گرماگذاری شد. طی این مدت لواستاتین درون اتیل‌استات نفوذ کرد، یک‌میلی‌لیتر از آن برداشته شده و به آن یک‌میلی‌لیتر محلول تری‌فلئوروستیک‌اسید (TFA ۱%؛ سیگما؛ ایالات متحده) به‌منظور لاکتونیزه‌کردن و پایداری لواستاتین اضافه شد. به‌منظور تبخیر اتیل‌استات و تری‌فلئوروستیک‌اسید محلول جدید به‌مدت دو روز درون شیکر انکوباتور با شرایط ذکرشده در قبل قرار داده شد[37].

اندازه‌گیری غلظت لواستاتین

غلظت لواستاتین تولیدشده توسط دستگاه HPLC با دتکتور مریی-فرابنفش و ستون‌های C_{18} با اندازه ذرات ۵میکرومتر و سرعت ۱/۵میلی‌لیتر در دقیقه در طول موج ۲۳۸نانومتر اندازه‌گیری شد. در این آنالیز از آب و ارتوفسفریک‌اسید (سیگما؛ ایالات متحده) به‌صورت ۳۵:۶۵ حجمی/حجمی به‌عنوان فاز متحرک استفاده شد. مقدار لواستاتین تولیدشده از منحنی رسم‌شده به کمک استاندارد قابل محاسبه است[37]. میزان غلظت لواستاتین هر آزمایش به‌وسیله **Error! Reference source not found.** با محلول استاندارد (اسوه؛ ایران) محاسبه شد[38]:

$$\text{غلظت لواستاتین} = \frac{\text{مساحت ناحیه به‌دست آمده از نمونه}}{\text{مساحت ناحیه به‌دست آمده از استاندارد}} \times \text{غلظت استاندارد}$$

یافته‌ها

با افزایش سن اسپور تلقیحی تولید لواستاتین بیشتر شد. تقریباً طی روزهای ۲۵ تا ۱۷۵ تولید لواستاتین ثابت و در بیشترین میزان خود قرار داشت و پس از ۱۷۵ روز از سن اسپورهای تلقیحی تولید لواستاتین کاهش یافت. تولید لواستاتین در روز ۸۵ به بیشترین میزان خود برابر ۶۰میلی‌گرم بر لیتر در محیط کشت سنتزی رسید که در حدود دوبرابر غلظت لوستاتین هنگام استفاده از اسپورهای ۱۰روزه برای تلقیح بود (نمودار ۱).

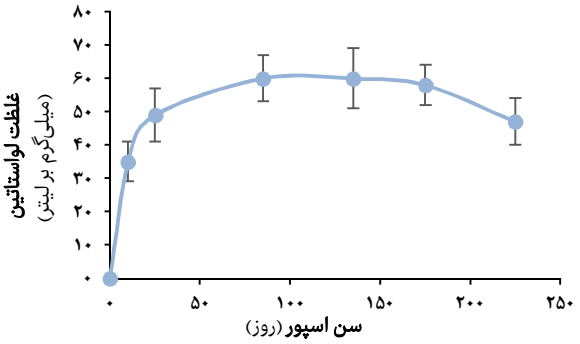
با افزایش سن اسپور تلقیحی تقریباً تولید زیست‌توده بیشتر شد و از ۱.۶گرم در روز دهم به ۳.۴۶گرم در روز ۲۲۵ رسید، البته در مورد روند تولید زیست‌توده در سن‌های مختلف اسپور تغییرات کمی وجود داشت اما روند کلی افزایش تولید زیست‌توده با افزایش سن اسپور بود (نمودار ۲).

میزان تولید لواستاتین با مقدار کربوهیدرات یکسان (۶۰گرم بر لیتر) و میزان 8×10^{7} اسپور مطابق آزمایش شماره یک برابر ۳۰میلی‌گرم بر لیتر لواستاتین و در میزان 2×10^{7} اسپور مطابق آزمایش شماره ۲ برابر ۳۵میلی‌گرم بر لیتر لواستاتین بود، این میزان هنگام استفاده از $0/5\times10^{7}$ اسپور آزمایش شماره چهار به ۴۵میلی‌گرم بر لیتر لواستاتین افزایش یافت (جدول ۱).

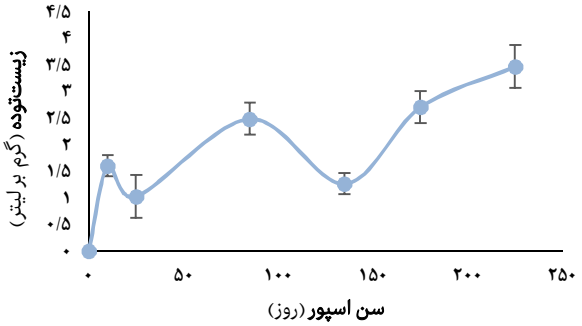
مشاهده شد که شیره خرما منبعی سرشار از انواع عناصر معدنی است (جدول ۲).

شیره خرما منبع غنی از گلوکز، فروکتوز و ساکارز بود، فروکتوز بیشترین میزان شیره خرما را با ۷۲گرم بر لیتر به خود اختصاص داد و پس از آن گلوکز با ۶۱گرم بر لیتر و ساکارز با ۵گرم بر لیتر بیشترین میزان‌ها را به خود اختصاص دادند.

تولید لواستاتین در شیره خرما برابر ۱۰۵میلی‌گرم بر لیتر حدود سه برابر محیط کشت سنتزی با میزان ۳۵میلی‌گرم بر لیتر لواستاتین بود. همچنین تاثیر روغن زیتون و تتراسایکلین بر تولید لواستاتین در شیره خرما نشان داد که تولید لواستاتین هنگام افزودن تتراسایکلین و روغن زیتون بیش از ۱/۵ برابر نسبت به شیره خرمای تنها افزایش یافت و به‌ترتیب به ۱۶۲میلی‌گرم بر لیتر و ۱۸۰میلی‌گرم بر لیتر لواستاتین رسید (جدول ۳).



نمودار ۱) نمودار غلظت لواستاتین تولیدشده در سن‌های مختلف اسپورهای تلقیحی



نمودار ۲) زیست‌توده تولیدشده در سن‌های مختلف اسپورهای تلقیحی

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱) غلظت لواستاتین و زیست‌توده در میزان‌های متفاوت گلوکز و اسپور تلقیحی

شماره آزمایش	غلظت‌های گلوکز (گرم در لیتر)	غلظت لواستاتین (میلی‌گرم بر لیتر)	زیست‌توده (گرم بر لیتر)
یک	۸×۱۰^۷ اسپور، ۶۰	۳۰	۴/۱۷
دو	۲×۱۰^۷ اسپور، ۶۰	۳۵	۱/۶۴
سه	۲×۱۰^۷ اسپور، ۳۰	۴۸	۷/۱۲
چهار	۰/۵×۱۰^۷ اسپور، ۶۰	۴۵	۰/۴۵

جدول ۲) عناصر معدنی اندازه‌گیری‌شده در شیره خرما به‌وسیله تکنیک جذب اتمی

نام عنصر	میزان (بخش در میلیون)
کادمیوم (Cd)	۰/۰۰
وانادیوم (V)	۰/۰۴
کلسیم (Ca)	۱۳۶۸/۲۴
بریلیوم (Be)	۰/۰۰
باریوم (Ba)	۰/۵۲
بور (B)	۱۰/۱۴
آرسنیک (As)	۲/۷۶
زیرکونیوم (Zr)	۰/۰۸
آلومینیوم (Al)	۳/۹۱
نقره (Ag)	۰/۰۲
منگنز (Mn)	۳/۵۳
منیزیوم (Mg)	۵۴۴/۸۲
سیلیسیوم (Si)	۲۹۵/۹۳
لانتان (La)	۰/۵۱
پتاسیم (K)	۶۸۲۰/۰
جیوه (Hg)	۱/۲۱
آهن (Fe)	۲۰/۰۶
مس (Cu)	۱/۲۴
قلع (Sn)	۵۳۴/۲۹
کبالت (Co)	۰/۰۳
سلنیوم (Se)	۲/۳۸
اسکاندیوم (Sc)	۳۶/۷۴
آنتیموان (Sb)	۰/۳۲
استرانسیوم (Sr)	۲۲/۸۲
فسفر (P)	۵۸۲/۲۲
تیتانیم (Ti)	۰/۲۹
سدیم (Na)	۱۹۰۰/۸۲
روی (Zn)	۱/۴۷
ایتریم (Y)	۰/۰۲

جدول ۳) غلظتق لواستاتین و زیست‌توده هنگام افزودن القاگرهای پلی‌کتید در محیط کشت شیره خرما

القاگرهای پلی‌کتید	غلظت لواستاتین (میلی‌گرم بر لیتر)	زیست‌توده (گرم بر لیتر)
شیره خرما	۱۰۵	۳۰/۴۸
تتراسایکلین (در محیط کشت شیره خرما)	۱۶۲	۲۲/۹۷
روغن زیتون (در محیط کشت شیره خرما)	۱۸۰	۲۰/۸
محیط کشت سنتزی	۳۵	۱/۶۴

بحث

مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر سن اسپور و القاگرها بر تولید لواستاتین در قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* انجام شد.

امروزه لواستاتین به‌طور صنعتی توسط قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* در کشت مایع تولید می‌شود. یکی از راه حل‌های تولید صنعتی متابولیت‌ها افزایش تولید آنها به‌نحوی است که کمترین هزینه را در بر داشته باشند، آزمایش‌ها نشان داده‌اند که تولید لواستاتین و زیست‌توده توسط قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* به سن اسپور تلقیح‌شده بستگی دارد. سن اسپور برای تلقیح به‌منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه بسیار سودمند و ارزشمند است.

پراسانا لاتا و همکاران گزارش کردند که در یک دوره هفت‌روزه بیشترین میزان تولید لواستاتین در روز ۴ برابر ۵/۲میلی‌گرم بر گرم است[14]. این در حالی است که *پورسل* و همکاران گزارش کردند که بیشترین میزان لواستاتین از اسپورهای تلقیح‌شده در روز ۱۶ به دست می‌آید، *پورسل* بیان کرد افزایش سن اسپور موجب کاهش زیست‌توده و افزایش تولید لواستاتین می‌شود، این اثر دوگانه به علت این است که اصولاً لواستاتین طی فاز سکون تولید می‌شود، همچنین هنگامی که سن تلقیح اسپورها از ۹ روز به ۱۶ روز افزایش یابد میزان لواستاتین نیز ۵۲% افزایش پیدا می‌کند[15].

نتایج این مطالعه حاکی از آن است که تنها با تغییر سن اسپورهای تلقیحی می‌توان تولید متابولیت‌های ثانویه را افزایش داد، در مطالعه حاضر نشان داده شد که با افزایش سن اسپور تلقیحی در بازه ۱۰ تا ۸۵ روز تولید لواستاتین افزایش می‌یابد. هیچ مطالعه‌ای تاکنون این رنج وسیع را برای تاثیر سن اسپور بر تولید متابولیت‌های ثانویه بررسی نکرده است، نکته جالب توجه این است که در این بین هیچ هزینه اضافه‌ای متوجه صنعتگران نخواهد بود. همچنین با تنظیم تعداد اسپورها در ۰/۵×۱۰^۷ عدد در میلی‌لیتر تولید لواستاتین در بیشترین میزان خواهد بود، زیرا در میزان‌های بالاتر تاثیر فاکتورهایی که موجب تحریک و پاسخ به تراکم جمعیتی می‌شوند موجب کاهش رشد و ایجاد ساختار میسلیومی رشته‌ای می‌شود ولی در میزان ۰/۵×۱۰^۷ اسپور ریخت‌زایی خاصی به نام پلت شکل می‌گیرد که برای تولید لواستاتین مناسب است، البته در میزان‌های کمتر از این مقدار نیز به‌علت کاهش اسپورزایی رشد و تولید لواستاتین کاهش می‌یابد، زیرا تولید لواستاتین مرتبط با ریخت‌زایی قارچ است و هنگام تشکیل ریخت‌زایی پلت تولید افزایش می‌یابد. در غلظت کم اسپور میسلیوم‌ها کمی تجمع کرده و پلت با قطر کوچک حاصل می‌شود، در غلظت بالای اسپور میسلیوم‌های زیادی تجمع کرده و قطر پلت‌ها بزرگ است، در غلظت خیلی بالا نیز سایز میسلیوم‌ها کوچک و تجمع شکل نمی‌گیرد[39]. این میزان اسپور تلقیحی به‌طور کامل با تمامی کار دیگر پژوهشگران برای تولید لواستاتین همخوانی دارد.

پس از بررسی سن و میزان اسپور و همچنین تاثیر میزان کربوهیدرات، از شیره خرما به‌عنوان منبع کربوهیدرات و منابع معدنی برای بررسی اثر القاگرها در تولید لواستاتین استفاده شد. عناصر معدنی نقش بسیار مهمی در تولید زیست‌توده و همچنین لواستاتین بازی می‌کنند. از میان این عناصر آهن، فسفر، منیزیم، سدیم، پتاسیم و روی برای رشد قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* و همچنین تولید لواستاتین مورد نیاز هستند و شیره خرما غلظت بالایی از این عناصر را دارد. دهمان‌طور که گفته شد منبع کربن یکی از اصلی‌ترین فاکتورهای موثر در تولید لواستاتین است، شیره خرما نیز منبع غنی از کربوهیدرات‌ها است. برای تعیین غلظت کربوهیدرات‌های شیره خرما از دستگاه HPLC استفاده شد.

همچنین همان‌طور که اشاره شد زیست‌توده ارتباط مستقیم با میزان اسپور تلقیح‌شده دارد و هرچه میزان اسپور تلقیحی افزایش یابد میزان زیست‌توده تولیدی نیز بیشتر خواهد شد و به خاطر اینکه تعداد اسپور روی زیست‌توده موثر است تعداد اسپورها باید به دقت در حد خاصی نگه‌داری شوند تا نتایج آزمایشات تکرارشدنی باشد[40]. در نتایج حاصل از مطالعه حاضر تغییراتی در منحنی تولید زیست‌توده در برابر سن اسپور وجود داشت دلیل این امر به

Archive
www.SID.ir

خاطر یکسان‌نبودن رشد قارچ و ایجاد طیفی از ریخت‌زایی از پلت تا میسلیوم است زیرا هنگامی که قارچ به‌صورت پلت رشد می‌کند زیست‌توده کمتری و هنگامی که به‌صورت میسلیومی رشد می‌کند زیست‌توده بیشتری تولید می‌شود. لازم به یادآوری است که طبق گزارش *رحیم* و همکاران بین تولید لواستاتین با تولید زیست‌توده ارتباطی وجود ندارد و بنابراین همان‌طور که مطالعه حاضر نشان داد تغییرات در میزان زیست‌توده تاثیری بر تولید لواستاتین نداشت[41].

جیا و همکاران گزارش دادند که وجود عنصر روی به‌تنهایی به اندازه دیگر عناصر در رشد *آسپرژیلوس ترئوس* تاثیرگذار است. همچنین حضور آهن، منگنز و روی بیشتر از عناصر دیگر روی تولید لواستاتین تاثیر دارد[42]. نتایج حاصل‌شده از جذب اتمی نیز نشان داد که شیره خرما نه‌تنها فراهم‌کننده عناصر یادشده در بالا است بلکه دیگر عناصر مورد نیاز رشد و تولید لواستاتین را نیز دارد. نکته جالب توجه اینجا است که شیره خرما حاوی عناصر پتاسیم، سدیم و منیزیم در سطح بالاتر و میزان کمتری آهن، منگنز و روی همانند محیط‌های کشت سنتزی گزارش‌شده توسط *پورسل* و همکاران است[15]. این یافته‌ها نشان می‌دهند که شیره خرما می‌تواند محیط کشت مناسبی از نظر عناصر معدنی برای رشد قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* و همچنین تولید لواستاتین باشد. نتایج تاثیر کربوهیدرات نیز نشان داد که با کاهش میزان گلوکز به ۳۰گرم بر لیتر تولید لواستاتین و زیست‌توده هر دو افزایش چشمگیری پیدا می‌کند. میزان گلوکز در بالاتر از این غلظت اثر مهار کاتابولیکی دارد و موجب سرکوب کاتابولیکی متابولیت‌های ثانویه می‌شود و به این دلیل موجب کاهش تولید لولستاتین و زیست‌توده می‌شود[30, 43]. در مرحله بعد تولید لواستاتین و رشد قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* در محیط کشت شیره خرما با محیط کشت سنتزی به‌منظور آگاهی از نحوه رشد و تولید لواستاتین مقایسه شدند، نتایج حاصل از این مرحله نشان داد تولید لواستاتین و زیست‌توده در محیط کشت بهینه شیره خرما بسیار بیشتر از محیط سنتزی بود. بیشترین میزان تولید لواستاتین پس از دوازده روز در شیره خرما حدود ۱۰۵میلی‌گرم بر لیتر حدود سه‌برابر محیط کشت سنتزی با میزان ۳۵میلی‌گرم بر لیتر لواستاتین بود، علت این افزایش در شیره خرما غنی‌بودن منابع کربوهیدراتی، میزان مناسب عناصر معدنی، وجود عناصری مشابه تاک (هیدرات‌منیزیم‌سیلیکات) که موجب ایجاد ریخت‌زایی پلت برای افزایش تولید لواستاتین می‌شود و همچنین بوتیرولاکتون به‌عنوان القاگر است[44, 45]. بیشترین میزان زیست‌توده در محیط کشت شیره خرما نیز برابر ۳۰/۴۸گرم بر لیتر است، اما در محیط کشت سنتزی این میزان پس از دوازده روز برابر ۱/۶۴گرم بر لیتر بود. این داده‌ها نشان دادند زیست‌توده تولیدشده در شیره خرما حدود ۱۹برابر بیشتر از محیط کشت سنتزی در ارلن است. دلیل رشد بسیار بیشتر میکروارگانیزم در شیره خرما نسبت به محیط کشت سنتزی منبع کربوهیدراتی فروکتوز و همچنین وفور عناصر معدنی در شیره خرما است. طبق گزارش‌ها فروکتوز موجب بیشترین میزان تولید زیست‌توده در میان تمامی منابع کربوهیدراتی دیگر می‌شود[7].

نتایج آزمایشات *سورنتینو* و *جیا* نشان داد تولید لواستاتین با افزودن آنتی‌بیوتیک‌های پلی‌کتید و لینولئیک‌اسید در *آسپرژیلوس ترئوس* سویه ATCC 20542 در کشت مایع افزایش می‌یابد[23, 36]. این مطالعه نشان داد که افزودن تتراسایکلین و روغن زیتون موجب افزایش تولید لواستاتین می‌شود، لواستاتین از طریق مسیر پلی‌کتید سنتز می‌شود که شامل نوناکتیدسنتاز (LNKS)، دی‌کتیدسنتاز (LDKS) و آنزیم‌ها و پروتئین‌های فرعی دیگر است[46, 47]. تتراسایکلین به‌دلیل اینکه یک ماده پلی‌کتیدی است از طریق مسیر پلی‌کتید عمل کرده و تولید لواستاتین را افزایش می‌دهد و روغن زیتون نیز ترکیبی از اسیدهای چرب است که پیش‌ماده اولیه برای تولید لواستاتین به شمار می‌رود و همانند لینولئیک‌اسید به‌عنوان القاگر عمل کرده و تولید را افزایش می‌دهد. *کاساس‌لوپز* و همکاران گزارش کردند به‌دلیل آن که لواستاتین یک متابولیت ثانویه است، تولید آن هنگام توقف رشد افزایش می‌یابد[7]. طبق یافته‌های حاصل از مطالعه حاضر میزان زیست‌توده با افزودن القاگرهای تتراسایکلین و روغن زیتون کاهش یافت و به‌ترتیب از ۳۰/۴۸گرم بر لیتر در شیره خرما به ۲۲/۹۷گرم بر لیتر در تتراسایکلین و ۲۰/۸گرم بر لیتر در روغن زیتون رسید، این کاهش زیست‌توده به معنای این است که رشد قارچ کاهش یافته و میکروارگانیزم سریع‌تر وارد فاز سکون شده و موجب افزایش تولید لواستاتین می‌شود. در انتها باید یادآور شد که استفاده از اسپورهای قدیمی‌تر برای تلقیح و همچنین افزودن القاگرها موجب افزایش نه‌تنها لواستاتین بلکه دیگر متابولیت‌های ثانویه نیز خواهد شد.

در مطالعه حاضر اثر سن اسپور، روغن زیتون و تتراسایکلین به‌عنوان القاگرها برای تولید لواستاتین بررسی و مشخص شد که این عوامل می‌توانند بر تولید لواستاتین تاثیرگذار باشند. اما این موارد کافی نیستند و باید علاوه بر سن اسپور، تاثیر نور، دما و ترکیب این موارد را نیز آزمود. در آینده می‌توان اثر سایر پلی‌کتیدها و حتی دیگر موادی که موجب ایجاد شوک و متوقف‌شدن رشد قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* می‌شوند را به‌منظور افزایش تولید لواستاتین استفاده نمود و اثر آنها را بررسی کرد.

نتیجه‌گیری

با افزایش سن اسپور تلقیحی تولید لواستاتین و زیست‌توده بیشتر می‌شود. تولید لواستاتین هنگام افزودن تتراسایکلین و روغن زیتون بیش از ۱/۵برابر نسبت به شیره خرمای تنها افزایش می‌یابد.

تشکر و قدردانی: بدین‌وسیله از بنیاد ملی نخبگان، دکتر *سورنا ستاری* ریاست محترم بنیاد ملی نخبگان و گروه رویال تکنولوژی که با حمایت‌های خود ما را در انجام این پروژه یاری کردند تشکر و قدردانی می‌شود.

تاییدیه‌اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: فرشید جابری‌انصاری (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۷۰%)؛ حسن جلیلی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۳۰%)

منابع مالی: منابع مالی مطالعه حاضر توسط جناب آقای دکتر *جلیلی* تامین شده است.

منابع

1- Gunde-Cimerman N, Friedrich J, Cimerman A, Benički N. Screening fungi for the production of an inhibitor of HMG CoA reductase: Production of mevinolin by the fungi of the genus Pleurotus. FEMS Microbiol Lett. 1993;111(2-3):203-6.

2- Subazini TK, Kumar GR. Characterization of lovastatin biosynthetic cluster proteins in aspergillus terreus strain ATCC 20542. Bioinformation. 2011;6(7):250-4.

Archive of SID

www.SID.ir

3- Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, et al. Mevinolin: A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980;77(7):3957-61.
4- Endo A, Kuroda M, Tanzawa K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. FEBS Lett. 1976;72(2):323-6.
5- Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterogensis produced by Penicillium citrinum. J Antibiot (Tokyo). 1976;29(12):1346-8.
6- Jůzlová P, Martínková L, Křen V. Secondary metabolites of the fungusMonascus: A review. J Ind Microbiol. 1996;16(3):163-70.
7- Casas López JL, Sánchez Pérez JA, Fernández Sevilla JM, Acién Fernández FG, Grima EM, 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(2-3):270-7.
8- Goswami S, Vidyarthi AS, Bhunia B, Mandal T. A review on lovastatin and its production. J Biochem Technol. 2012;4(1):581-7.
9- Hajjaj H, Niederberger P, Duboc P. Lovastatin biosynthesis by Aspergillus terreus in a chemically defined medium. Appl Enviro Microbiol. 2001;67(6):2596-602.
10- Sitaram Kumar M, Jana SK, Senthil V, Shashanka V, Vijay Kumar S, Sadhukhan AK. Repeated fed-batch process for improving lovastatin production. Process Biochem. 2000;36(4):363-8.
11- Manzoni M, Bergomi S, Rollini M, Cavazzoni V. Production of statins by filamentous fungi. Biotechnol Lett. 1999;21(3):253-7.
12- Manzoni M, Rollini M, Bergomi S, Cavazzoni V. Production and purification of statins from Aspergillus terreus strains. Biotechnol Tech. 1998;12(7):529-32.
13- Novak N, Gerdin S, Berovic M. Increased lovastatin formation by Aspergillus terreus using repeated fed-batch process. Biotechnol Lett. 1997;19(10):947-8.
14- Prasanna Latha D, Hemalatha KPJ. Production of lovastatin by Aspergillus fischeri NCIM 509 using barley bran, wheat husk, rice bran and rice husk under solid state fermentation. Eur J Exp Biol. 2015;5(8):8-17.
15- Porcel ER, López JL, Ferrón MA, Pérez JA, Sánchez JL, Chisti Y. Effects of the sporulation conditions on the lovastatin production by Aspergillus terreus. Bioprocess Biosyst Eng. 2006;29(1):1-5.
16- Ehgartner D, Fricke J, Schröder A, Herwig C. At-line determining spore germination of Penicillium chrysogenum bioprocesses in complex media. Appl Microbiol Biotechnol. 2016;100(20):8923-30.
17- Bizukojc M, Gonciarz J. Influence of oxygen on lovastatin biosynthesis by Aspergillus terreus ATCC 20542 quantitatively studied on the level of individual pellets. Bioprocess Biosyst Eng. 2015;38(7):1251-66.
18- 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. Bioprocess Biosyst Eng. 2017;40(1):45-53.
19- Lai LS, Hung CS, Lo CC. Effects of lactose and glucose on production of itaconic acid and lovastatin by Aspergillus terreus ATCC 20542. J Biosci Bioeng. 2007;104(1):9-13.
20- Atkinson S, Williams P. Quorum sensing and social networking in the microbial world. J R Soc Interface. 2009;6(40):959-78.
21- Raina S, De Vizio D, Palonen EK, Odell M, Brandt AM, Soini JT, et al. Is quorum sensing involved in lovastatin production in the filamentous fungus Aspergillus terreus?. Process Biochem. 2012;47(5):843-52.
22- Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. Annu Rev Cell Dev Biol. 2005;21:319-46.
23- Sorrentino F, Roy I, Keshavarz T. Impact of linoleic acid supplementation on lovastatin production in Aspergillus terreus cultures. Appl Microbiol Biotechnol. 2010;88(1):65-73.
24- Brown SH, Scott JB, Bhaheetharan J, Sharpee WC, Milde L, Wilson RA, et al. Oxygenase coordination is required for morphological transition and the host-fungus interaction of Aspergillus flavus. Mol Plant Microbe Interact. 2009;22(7):882-94.
25- Horowitz Brown S, Zarnowski R, Sharpee WC, Keller NP. Morphological transitions governed by density dependence and lipoxygenase activity in Aspergillus flavus. Appl Environ Microbiol. 2008;74(18):5674-85.
26- Tsitsigiannis DI, Keller NP. Oxylipins act as determinants of natural product biosynthesis and seed colonization in Aspergillus nidulans. Mol Microbiol. 2006;59(3):882-92.
27- Tsitsigiannis DI, Kowieski TM, Zarnowski R, Keller NP. Three putative oxylipin biosynthetic genes integrate sexual and asexual development in Aspergillus nidulans. Microbiology. 2005;151(Pt 6):1809-21.
28- Dartora AB, Bertolin TE, Bilibio D, Silveira MM, Costa JA. Evaluation of filamentous fungi and inducers for the production of endo-polygalacturonase by solid state fermentation. Zeitschrift für Naturforschung C. 2002;57(7-8):666-70.
29- 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.
30- Jia Z, Zhang X, Cao X. Effects of carbon sources on fungal morphology and lovastatin biosynthesis by submerged cultivation of Aspergillus terreus. Asia Pac J Chem Eng. 2009;4(5):672-7.
31- Greenspan MD, Yudkovitz JB. Mevinolinic acid biosynthesis by Aspergillus terreus and its relationship to fatty acid biosynthesis. J Bacteriol. 1985;162(2):704-7.
32- Endo A. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a Monascus species. J Antibiot (Tokyo). 1979;32(8):852-4.
33- Jaberi Ansari F, Hajihassan Z, Jalili H. Recombinant β-NGF production in E.coli using date syrup. Modares J Biotechnol. 2015;6(2):63-70. [Persian]
34- Vadakke Kamath P, Santebennur Dwarakanath B, Chaudhary A, Janakiraman S. Optimization of culture conditions for maximal lovastatin production by Aspergillus terreus (KM017963) under solid state fermentation. HAYATI J Biosci. 2015;22(4):174-80.
35- Rahman NA, Hasan M, Hussain MA, Jahim J. Determination of glucose and fructose from glucose isomerization process by high performance liquid chromatography with UV detection. Mod Appl Sci. 2008;2(4):151-4.
36- Jia Z, Zhang X, Zhao Y, Cao X. Enhancement of lovastatin production by supplementing polyketide antibiotics to the submerged culture of Aspergillus terreus. Appl Biochem Biotechnol. 2010;160(7):2014-25.

Archive of SID

www.SID.ir

37- Samiee SM, Moazami N, Haghighi S, Aziz Mohseni F, Mirdamadi S, Bakhtiari MR. Screening of lovastatin production by filamentous fungi. Iran Biomed J. 2003;7(1):29-33.
38- Karthika C, Sharmila G, Muthukumaran C, Manikandan K. Utilization of whey powder as an alternate carbon source for production of hypocholesterolemic drug by Aspergillus terreus MTCC 1281. Food Sci Biotechnol. 2013;22(5):1-7.
39- Nielsen J, Johansen CL, Jacobsen M, Krabben P, Villadsen J. Pellet formation and fragmentation in submerged cultures of Penicillium chrysogenum and its relation to penicillin production. Biotechnol Prog. 1995;11(1):93-8.
40- Bizukojc M, Ledakowicz S. Biosynthesis of lovastatin and (+)-geodin by Aspergillus terreus in batch and fed-batch culture in the stirred tank bioreactor. Biochem Eng J. 2008;42(3):198-207.
41- Abd Rahim MH. Production of lovastatin, (+)-geodin and sulochrin by Aspergillus terreus ATCC 20542 using pure and crude glycerol [Dissertation]. Sydney: The University of Sydney; 2015.
42- Jia Z, Zhang X, Zhao Y, Cao X. Effects of divalent metal cations on lovastatin biosynthesis from Aspergillus terreus in chemically defined medium. World J Microbiol Biotechnol. 2009;25(7):1235-41.
43- Radha KV, Lakshmanan D. A review: Lovastatin production and applications. Asian J Pharm Clin Res. 2013;6(3):21-6.
44- Gonciarz J, Bizukojc M. Adding talc microparticles to Aspergillus terreus ATCC 20542 preculture decreases fungal pellet size and improves lovastatin production. Eng Life Sci. 2014;14(2):190-200.
45- Palonen EK, Neffling MR, Raina S, Brandt A, Keshavarz T, Meriluoto J, et al. Butyrolactone I quantification from lovastatin producing Aspergillus terreus using tandem mass spectrometry-evidence of signalling functions. Microorganisms. 2014;2(2):111-27.
46- Kennedy J, Auclair K, Kendrew SG, Park C, Vederas JC, Hutchinson CR. Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. Science. 1999;284(5418):1368-72.
47- Witter DJ, Vederas JC. Putative diels-alder-catalyzed cyclization during the biosynthesis of lovastatin. J Org Chem. 1996;61(8):2613-23.

Archive of SID

www.SID.ir