توسعه محیط کشت برای تولید لوواستاتین بوسیله آسپرژیلوس ترئوس

علی صمدی افشار، حسین عطار*

تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات، مجتمع آزمایشگاهی، گروه بیوتکنولوژی

پیام‌نگار: **attar.h@srbiau.ac.ir**

چکیده

در این پژوهش، تولید لوواستاتین و توده زیستی میکروبی توسط آسپرژیلوس ترئوس تحت تاثیر منابع مختلف کربنی و منابع نیتروژنی بررسی شده است. یکی از این منابع مهم نیتروژنی، کنجاله سویا است که به دلیل بومی بودن و ارزانی آن در ایران در این مقاله مورد توجه قرار گرفته است. برای طراحی آزمایش‌ها از روش تاگوچی در بررسی تاثیر چهار عامل غلظت کربن، غلظت نیتروژن، غلظت اکسیژن و مدت تخمیر بر روی غلظت بیومس (زیست‌توده) و لوواستاتین تولید شده در یک کشت غیر مداوم توسط آسپرژیلوس ترئوس ارزیابی شد. کربن، نیتروژن، اکسیژن و مدت تخمیر در این آزمایش در گسترهٔ معین به ترتیب زیر ارزیابی شدند: ۴۸-۲۴ گرم بر لیتر، ۰/۴۶-۰/۲۳ گرم بر لیتر، ۸۰-۴۰ ٪ و ۱۱ تا ۱۴ روز. در شرایط بهینه ۴۸ گرم بر لیتر لاکتوز به عنوان منبع کربن، ۰/۲۳ گرم بر لیتر کنجاله سویا به عنوان منبع نیتروژنی با ۶۰٪ حجمی اکسیژن و در مدت ۱۱ روز، ۵±۳۰ میلی گرم بر لیتر لوواستاتین تولید شد. بر اساس نمودار، تولید لوواستاتین بر حسب مدت تخمیر بیش از ۸۰ درصد غلظت تولیدی لوواستاتین از روز هفتم به بعد بود.

کلمات کلیدی: لوواستاتین، آسپرژیلوس ترئوس، بهینه سازی فرایند تخمیر، تاگوچی

۱- مقدمه

لوواستاتین که با فرمول و با $(C_{24}H_{36}O_5)$ نام‌های تجاری موی نالین، موناکلین K [1] و مواکور [2] مشخص می‌گردد، جزء یکی از داروهای خانواده استاتین است که همانند سیمواستاتین [3] در کاهش کلسترول خون نقش بسزایی دارد. این دارو در واقع با ایجاد یک محدودکنندگی رقابتی در مقابل آنزیم اچ ام جی کوآنزیم (که سنتز کلسترول را کاتالیز می‌کند) مانع از سنتز کلسترول می‌شود[۱ و ۲]. لوواستاتین که از محصولات متابولیسم ثانویه به شمار می‌رود، می‌تواند توسط آسپرژیلوس ترئوس، موناکس رابر [4] و پنی سلیوم [5] تولید گردد، که در این تحقیق از آسپرژیلوس ترئوس (نوعی قارچ میله ای) استفاده شده است. تولید لوواستاتین با استفاده از ریزسازواره آسپرژیلوس ترئوس در دمای حدود ۲۸°C و در یک محیط اسیدی، در کمتر از ۱۱ روز طی یک فرایند ناپیوسته انجام گرفته است[۱].

از آنجا که تولید این دارو طی فرایند تخمیر صورت می‌گیرد، و در طول این فرایند از منابع کربن و نیتروژن به وفور استفاده می‌شود، لذا در این تحقیق سعی بر آن شد تا با جایگزینی منابع ارزان و بومی به جای منابع گران و غیر بومی (وارداتی)، گامی در جهت بهینه سازی محیط کشت لازم در تولید این داروی حیاتی برداشته شود و

1. Monacolin K
2. Mevacor®
3. Simvastatin
4. Monascus Ruber
5. Penicillium sp

موانع و مشکلات موجود بر سر راه تولید آن در کشور به حداقل ممکن برسد.

در این بررسی از غلظت‌های مختلف منابع کربنی و نیتروژنی و زمان‌های متفاوت تخمیر در طی آزمایش استفاده شده است تا تاثیر آن‌ها بر تولید لوواستاتین مشخص شود، که مقادیر بهینه آن‌ها با استفاده از روش تاگوچی مشخص گردید[۳]. در این روش ۴ فاکتور اصلی در دو سطح، در گسترهٔ غلظتی که در چکیده مقاله به آنها اشاره شده است، مورد بررسی قرار گرفت.که در نهایت با وارد کردن سطوح غلظت هر کمیت و سپس نتایج حاصل از هر یک از آزمایش ها، مقدار بهینه مواد و منابع مورد استفاده در تولید لوواستاتین مشخص گردید که در قسمت نتایج مقاله ارائه شده است.

۲- مواد و روش ها

۲-۱ ریزسازواره، محیط کشت و تلقیح

ریزسازواره مورد استفاده در این تحقیق، آسپرژیلوس ترئوس با شماره سویه[1]، ۵۲۶۷ است که از سازمان پژوهش‌های علمی وصنعتی ایران(مجتمع پژوهشی عصر انقلاب) تهیه شد. با توجه به رفتار متفاوت این قارچ در مراحل مختلف رشد و تولید، برای هر مرحله از محیط کشت خاصی استفاده شده است تا هدف مورد نیاز در هر مرحله تامین شود. برای مراحل نگهداری و اسپورزایی قارچ مورد نظر، از محیط کشت پی دی ای(آگار گلوکوز سیب زمینی)[2] استفاده شد. پتری‌های حاوی پی دی ای از اسلنت اصلی مورد تلقیح قرار گرفتند و به مدت ۵ روز در دمای ۲۸°C در گرمخانه گذاشته شدند، سپس پتری‌ها بوسیله محلول آبی استریل شسته شدند و محلول موردنظر به مدت ۵ دقیقه و با RCF=۶۰۹/۱۶۸g سانتریفوژ شد تا اینکه مواد جامد موجود در آن جدا گردد. همچنین غلظت اسپورها توسط اسپکتروفوتومتر (طیف‌نورسنج)[3] (TS-55) در ۳۶۰ نانومتر تعیین شد.

۲-۲ شرایط کشت

تخمیر در دمای ۲۸°C و در ارلن‌مایرهای به حجم‌های ۲۰۰ و ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۱۵۰ میلی لیتر مایه تخمیر صورت گرفت که به مدت ۱۱ تا ۱۴ روز بر روی لرزاننده با RCF =۲/۴۹۷۵g قرار داده شد. از لاکتوز به عنوان منبع کربنی و کنجاله سویا به عنوان منبع نیتروژنی استفاده شد. همچنین ارلن‌مایرها با ۹۰۰ میلی متر مکعب محلول اسپوری تلقیح شدند. محیط کشت استفاده شده در جدول (۱) ارائه شده است.

جدول ۱- اجزای محیط کشت تخمیر [۴و۲]

ماده	مقدار
لاکتوز	۲۴و۴۸ گرم
کنجاله سویا	۰/۴۶ و ۰/۲۳ گرم
فسفات پتاسیم	۰/۷۹ گرم
سولفات منیزیم	۰/۵۲ گرم
کلرید سدیم	۰/۴ گرم
نیترات آهن	۰/۰۰۲ گرم
سولفات روی	۱ میلی گرم
بیوتین	۰/۰۴ میلی گرم

۲-۳ روش‌های تحلیلی

۲-۳-۱ تعیین وزن زیست‌توده

وزن خشک زیست‌توده از صاف کردن حجم مشخصی از محلول با استفاده از کاغذ صافی میلیپور و سپس خشک کردن و وزن کردن مواد جامد حاصل از صاف کردن به دست می‌آید. با معلوم بودن وزن کاغذ صافی، وزن خشک زیست‌توده به دست می‌آید[۶ و ۵].

۲-۳-۲ تهیه سوسپانسیون اسپوری

برای تهیه سوسپانسیون اسپوری، سطح محیط کشت اسپورزا را بوسیله آب مقطر سترون شستشو می‌دهند تا سوسپانسیونی از اسپور تهیه شود[۵]. برای جدا کردن توده‌های متراکم، می‌توان به سوسپانسیون اسپوری، ۳ الی ۴ قطره محلول ۲۰ درصد گلیسرول و یک قطره توئین ۴۰ اضافه کرد(از گلیسرول به منظور نگهداری سوسپانسیون در فریزر و از توئین ۴۰ برای جداکردن توده‌های متراکم سلول استفاده شده است)[۷].

1. Persian Type Culture Collection
2. Potato Dextrose Agar
3. Spectrophotometer

۲-۳-۳ سنجش غلظت لوواستاتین در نمونه‌های تخمیری

برای سنجش غلظت لوواستاتین تولید شده می‌توان از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا[1]، طیف‌نورسنج[2] و کروماتوگرافی لایه نازک استفاده کرد که در این تحقیق ابتدا از کروماتوگرافی لایه نازک استفاده شد و سپس توسط کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مورد تایید قرار گرفت.

۲-۳-۲-۱ محلول استاندارد لوواستاتین

برای تهیه محلول‌های استاندارد لوواستاتین، از پودر لوواستاتین استفاده شد که مادهٔ اولیه آن از شرکت داروسازی عبیدی تهیه گردید.

۲-۳-۲-۲ استخراج لوواستاتین موجود در مایه تخمیری

برای استخراج لوواستاتین، مقداری از محلول هر کدام از ارلن‌مایرها به همراه همان مقدار بوتیل استات به مدت ۱۵ دقیقه با RCF = ۲۴/۹g سانتریفوژ شد و فازهای آلی بالای لوله‌ها جدا شدند تا برای استفاده در مرحله شناسایی، در یخچال نگهداری شوند.

۲-۴ طراحی آزمایش ها

در این بررسی به دلیل استفاده از غلظت‌های مختلف منابع کربنی و نیتروژنی و زمان‌های تخمیر متفاوت در طی آزمایش‌ها و همچنین برای دستیابی به بهترین زمان تخمیر و مقادیر بهینه غلظت‌های منابع کربنی و نیتروژنی، از روش تاگوچی استفاده شد تا تاثیر بهتر این متغیرها بر تولید لوواستاتین مشخص شود.

۳- نتایج

۳-۱ اثر مایه تلقیح بر ریخت ارگانیسم رشته ای

در تخمیرهای قارچی، در برخی موارد، رشد قارچ به شکل رشته ای و در بعضی موارد به شکل گویچه ای است. ارتباط ریخت ریزسازواره با روش توسعه مایه تلقیح این است که غلظت اسپورها و نوع محیط کشت توسعه تلقیح تا حدود زیادی بر ریخت موثر است[۶]. معمولا مایه تلقیح با اسپور زیاد به رشد پراکنده منجر می‌شود. در حالیکه مایه تلقیح با اسپور کم (حدود 10^7) تشکیل گویچه را تسریع می‌کند. اصولا رشد پراکنده در محیط کشت‌های پیچیده و غنی روی می‌دهد، در صورتیکه در محیط‌هایی که ترکیب آنها از نظر شیمیایی مشخص است، معمولا رشد گویچه ای مشاهده می‌شود. بنابراین محیط کشت مورد استفاده در مرحله تکثیر اسپور باید بر اساس ریخت مایه تلقیح بهینه شود[۶]. همچنین در تولید صنعتی محصولات قارچی، رشد ارگانیسم در ریخت مطلوب اهمیت زیادی دارد که این امر نیز نیازمند استفاده از مایه تلقیح مناسب است. اگر مرحله تولید با سوسپانسیون اسپوری تلقیح شود، غلظت اسپور باید چنان باشد که کشت تولید منجر به ریخت مطلوب شود[۹ و ۸]. در این مقاله با توجه به مایه تلقیح حاوی 10^7 اسپور و محیط کشت از نوع مشخص، رشد قارچ به شکل گویچه ای بود (شکل (۱)).

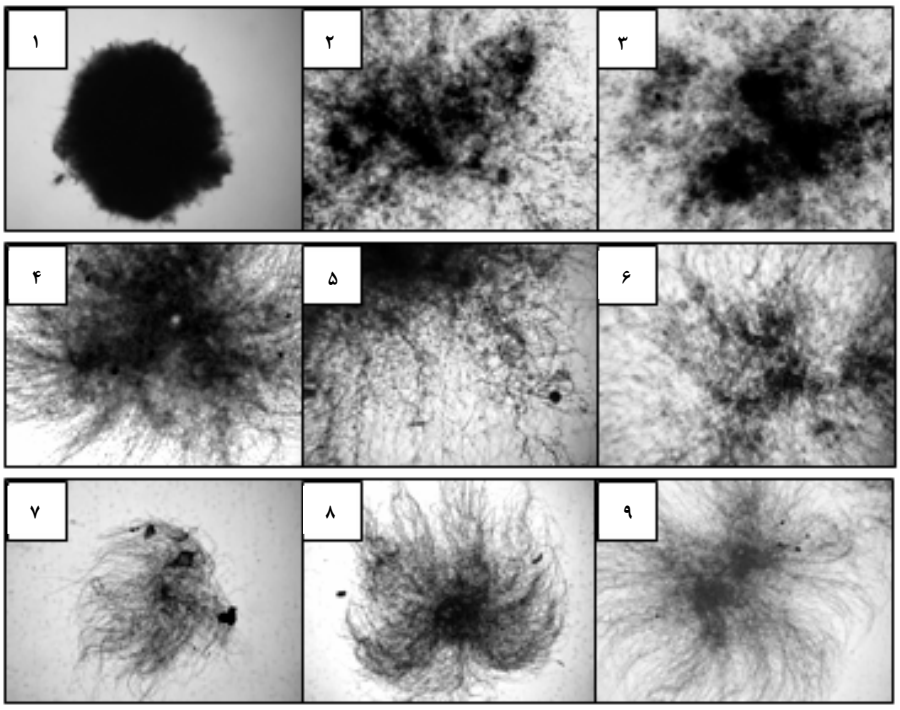
۳-۲ رشد آسپرژیلوس ترئوس و تغییرات غلظت زیست‌توده در تخمیر

در شکل (۲) منحنی رشد آسپرژیلوس ترئوس در طی تخمیر نشان داده شده است. در این منحنی، سه فاز: فاز رشد، فاز سکون و فاز مرگ مشاهده می‌شود. با توجه به نمودار، غلظت زیست‌توده در روز اول ۰/۰۰۸ گرم بوده که با سرعت زیادی تا روز پنجم به ۰/۰۱۸۲ گرم رسید. حداکثر مقدار ۰/۰۲ گرم در روز نهم به دست آمد. از روز نهم به بعد منحنی رشد وارد فاز مرگ شد و در نهایت در روز چهاردهم غلظت زیست‌توده به مقدار ۰/۰۱۸۶ گرم به ازای هر لیتر مایه تخمیر رسید.

۳-۳ تغییرات چگالی در طی تخمیر

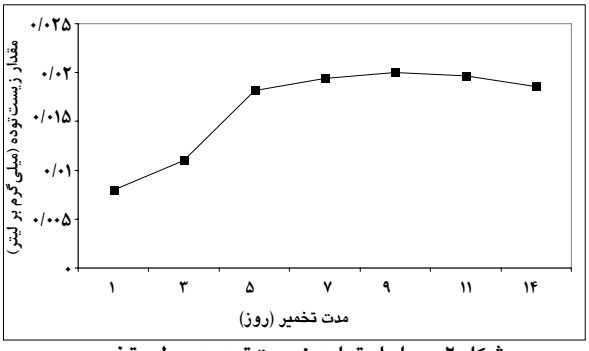
در این تحقیق به طور مستقیم از چگالی سنج برای محاسبه چگالی استفاده شد. در شکل (۳) تغییرات چگالی مایه تخمیری طی مدت تخمیر و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، نشان داده شده است. با گذشت مدت تخمیر و رشد ریزسازواره، زیست‌توده‌ها نیز بزرگتر شدند و نسبت وزن به حجم (چگالی) بیشتر می‌شود.

1. High Performance Liquid Chromatography
2. Thin Layer Chromatography

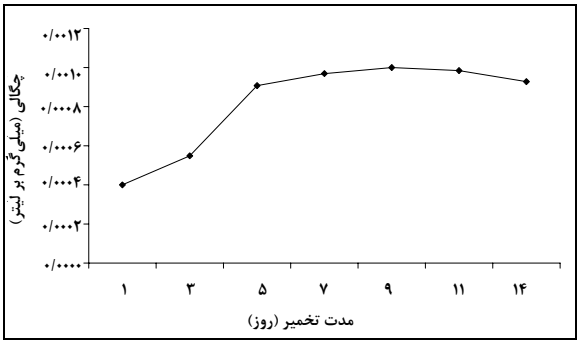


شکل ۱– ریخت رشد قارچ در داخل محیط کشت ،طی تخمیر

۱– روز سوم ۲– روز چهارم ۳– روز پنجم ۴– روز ششم ۵– روز هفتم ۶– روز هشتم ۷– روز نهم ۸– روز دهم ۹– روز یازدهم



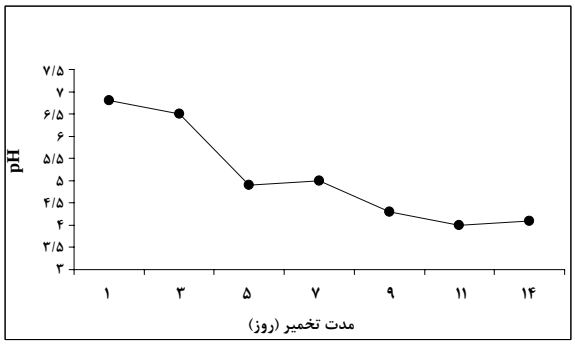
شکل ۲– مراحل تولید زیست‌توده در طی تخمیر



شکل ۳– تغییرات چگالی مایه تخمیر در طی تخمیر

۳-۴ تغییرات قدرت اسیدی مایه تخمیری

در طی فرایند تخمیر با گذشت زمان تخمیر، لوواستاتین در محلول به صورت بتا هیدروکسی اسید ظاهر می‌شود، لذا محلول اسیدی می‌شود که این مورد در شکل (۴) به خوبی نمایان است.

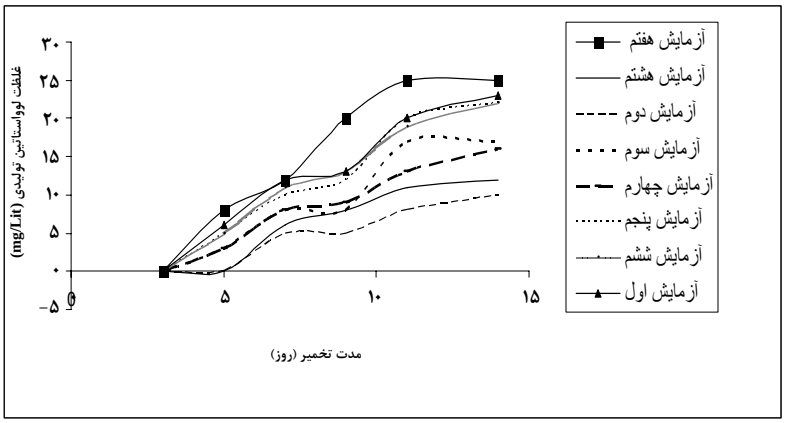


شکل ۴– تغییرات قدرت اسیدی مایه تخمیر در طی تخمیر

۳-۵ تولید لوواستاتین در طی تخمیر

در شکل (۵) و جدول (۲) که از نتایج آزمایشگاهی و روش تاگوچی

به دست آمده است، میزان تولید لوواستاتین در غلظت معین مایه تلقیح اسپوری در زمان‌های مختلف کشت با توجه به غلظت‌های مختلف منابع کربنی و نیتروژنی و میزان اکسیژن مصرفی در هر آزمایش نشان داده شده است. از آنجا که برای بهینه کردن شرایط و غلظت منابع از روش تاگوچی استفاده شد، حداکثر لوواستاتین نیز در شرایط بهینه تاگوچی تولید شد. همانطوری که در شکل (۵) مشخص است، تا روز سوم هیچ تولیدی مشاهده نشد و همچنین با کروماتوگرافی لایه نازک قابل شناسایی نبود ولی بعد از روز سوم به تدریج لوواستاتین تولید شد و این تولید با یک روند افزایشی تا روز یازدهم ادامه یافت. پس از روز یازدهم میزان تولید لوواستاتین تقریباً ثابت شد و به میزان۵± ۳۰ میلی گرم بر لیتر رسید(این مقدار توسط کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا حدود ۲۳ میلی گرم بر لیتر شد)، در این مرحله بهتر است تخمیر متوقف شود و نوبت بعدی تولید آغاز گردد که به بهره وری بیشتری منجر خواهد شد.



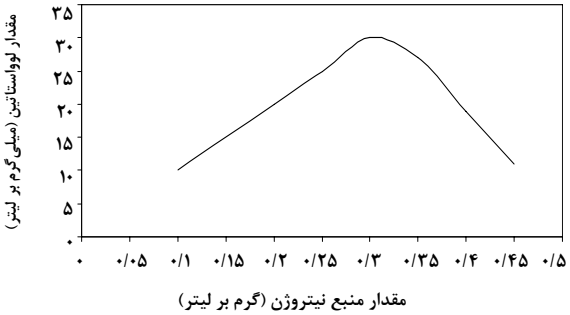
شکل ۵- میزان تولید لوواستاتین در مدت تخمیر

جدول ۲- شرایط مختلف هر آزمایش برای تولید لوواستاتین نتایج با استفاده از نرم افزار تاگوچی به دست آمده است(Q4wxpdemo)

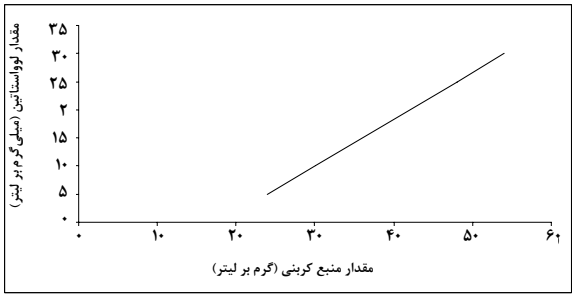
Trial Condition 1 (Randomly selected order 1)		
oxygen in the aer	200(v/v)	1
C-concentration	24 g/l	1
N-concentration	0.23 g/l	1
fermentation time	11 days	1
Trial Condition 2 (Randomly selected order 5)		
oxygen in the aer	200(v/v)	1
C-concentration	24 g/l	1
N-concentration	0.46 g/l	2
fermentation time	14 days	2
Trial Condition 3 (Randomly selected order 3)		
oxygen in the aer	200(v/v)	1
C-concentration	48 g/l	2
N-concentration	0.23 g/l	1
fermentation time	14 days	2
Trial Condition 4 (Randomly selected order 6)		
oxygen in the aer	200(v/v)	1
C-concentration	48 g/l	2
N-concentration	0.46 g/l	2
fermentation time	11 days	1
Trial Condition 5 (Randomly selected order 2)		
oxygen in the aer	500(v/v)	2
C-concentration	24 g/l	1
N-concentration	0.23 g/l	1
fermentation time	14 days	2
Trial Condition 6 (Randomly selected order 4)		
oxygen in the aer	500(v/v)	2
C-concentration	24 g/l	1
N-concentration	0.46 g/l	2
fermentation time	11 days	1
Trial Condition 7 (Randomly selected order 8)		
oxygen in the aer	500(v/v)	2
C-concentration	48 g/l	2
N-concentration	0.23 g/l	1
fermentation time	11 days	1
Trial Condition 8 (Randomly selected order 7)		
oxygen in the aer	500(v/v)	2
C-concentration	48 g/l	2
N-concentration	0.46 g/l	2
fermentation time	14 days	2

۴- بحث و نتیجه گیری

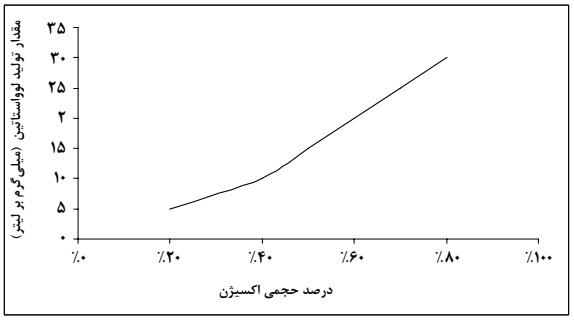
در این تحقیق سعی شد تا با تغییراتی در محیط کشت تولیدی، گامی در توسعه محیط کشت برای بومی سازی مواد اولیه آن و تولید بهینه و بیشتر این دارو برداشته شود. لذا با مطالعه کارهای مشابه انجام شده و بررسی روش‌های عملی دیگر، بازه‌های غلظتی مورد استفاده در این آزمایش تعیین شد، و این نتیجه حاصل گردید که مقدار و نوع منبع نیتروژنی می‌تواند یکی از عوامل مهم در تولید لوواستاتین باشد، به همین دلیل از سویا که یکی از محصولات کشاورزی بومی ایران است و به وفور در ایران کشت می‌شود به جای سایر منابع گران و وارداتی مثل شربت ذرت خیسانده و عصاره مخمر استفاده شد. همچنین ایده انتخاب حجم بیشتری از هوا برای فرایند تخمیر مورد بررسی قرار گرفت که تاثیر خوبی بر میزان لوواستاتین تولیدی در بر داشت. و در نتیجه اثر این عامل و سه عامل دیگر، یعنی غلظت نیتروژن، غلظت کربن، غلظت اکسیژن و مدت تخمیر در تولید لوواستاتین را به صورت شکل‌های (۶) تا (۸) می‌توان نشان داد. همانطور که مشخص است، اکسیژن نقش مؤثرتری دارد چنان که می‌توان با تغییر مقدار اکسیژن، لوواستاتین بیشتری تولید کرد. ولی با مقایسه مقادیر کربن و نیتروژن می‌توان به این نتیجه رسید که نقش کربن پر رنگ تر از نیتروژن است، زیرا غلظت نیتروژن تا حدی به بهبود تولید لوواستاتین کمک می‌کند و پس از این مقدار، نقش محدودکنندگی نیتروژن بیشتر نمایان می‌شود. همچنین با توجه به منحنی تاثیر مدت تخمیر (شکل (۵)) می‌توان گفت که این عامل بعد از یک مقدار مشخص عملاً بی تاثیر خواهد بود.



شکل ۶- غلظت لوواستاتین بر حسب منبع نیتروژنی



شکل ۷- غلظت لوواستاتین بر حسب منبع کربنی



شکل ۸- غلظت لوواستاتین بر حسب درصد اکیسژن

مراجع

[1] Lopez J.L; Perez J.A; Sevilla J.M; "Fermentation optimization for the production of lovastatin by Aspergillus terreus: use of response surface methodology" Chem Technol Biotechnol ;79:1119–1126, (2004).

[2] Lopez J.L; Sanchez Perez J.A; Fernandez Sevilla, J.M; "Production of lovastatin by Aspergillus terreus: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production"; Elsevier-Enzyme and Microbial Technology; 33: 270–277, (2003).

[۳] آرپناهی ایوب، جزوهٔ آموزشی "کارگاه آموزشی طراحی آزمایشها با استفاده از روش تاگوچی" سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده اصفهان؛ (۱۳۸۰).

[4] Hajjaj H; Niederberger; Peter; Duboc; Philippe; "Lovastatin Biosynthesis by Aspergillus terreus in a Chemically Defined Medium" American Society for Microbiology; DOI: 10.1128/AEM.67: 2596–2602; (2001).

[۵] سید عباس، شجاع الساداتی؛ محمد علی، اسداللهی" بیوتکنولوژی صنعتی" دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳-۹ و ۲۵-۲۱ و ۵۷-۴۲ و ۱۳۸-۱۳۷ و ۳۰۹-۳۰۱ و ۳۲۰-۳۲۱، (۱۳۸۱).

[۶] حسن، قجاوند "بررسی ارتباط مورفولوژی و تولید اریترومایسین با استفاده از باکتری اریتریا" پایان نامه کارشناسی ارشد،دانشگاه صنعتی امیرکبیر، (۱۳۸۲).

[۷] حسن، لامع؛ محمد رضا، احسانی " مبانی بیوتکنولوژی و میکروب شناسی صنعتی"دانشگاه آزاد اسلامی، ۱۶۰-۱۵۲ و ۱۶۶-۱۶۲ و ۱۸۵-۱۸۲، (۱۳۷۵).

[8] Rodriguez Parcel, E.M; Lopez J.L; Sanchez Perez J.A "Effects of pellet morphology on broth rheology in fermentations of Aspergillus terreus" Elsevier, Biochemical Engineering Journal 26: 139–144; (2005).

[9] Rodriguez Porcel E. M; Casas Lopez J. L; Sanchez Perez J. A; Fernandez Sevilla J. M; Garcıa Sanchez J. L; Chist Y "Aspergillus terreus Broth Rheology, Oxygen Transfer, and Lovastatin Production" Ind. Eng. Chem. Res; 45: 4837-4843; (2006).