

بهینه‌سازی تولید لواستاتین در تخمیر غوطه‌ور به‌وسیله قارچ موناسکوس پورپورئوس

شفیعه منصوری¹، سید جمال اشرفی²، فاطمه یزدیان^{3*}، مجید عزیزی⁴

1- کارشناس ارشد، بیوتکنولوژی میکروبی، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران

2- دانشجوی دکترا، نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران

3- استادیار، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران

4- استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد

* تهران، کدپستی 1374-14395

yazdian@ut.ac.ir

(دریافت مقاله: 93/10/30 پذیرش مقاله: 94/1/22)

چکیده - لواستاتین، یک داروی قوی برای کاهش کلسترول خون به حساب می‌آید. از آنجا که علل اصلی مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه، بیماری‌های قلبی-عروقی است که در نتیجه رسوب چربی‌ها و به‌ویژه کلسترول در شریان‌های بزرگ بوجود می‌آید، بنابراین، رژیم غذایی حاوی لواستاتین می‌تواند سبب پیشگیری از ابتلا به این بیماری شود. در این پژوهش، لواستاتین، موناکولین K یا مهارکننده رقابتی آنزیم HMG-COA ردوکتاز (آنزیم مؤثر در سنتز کلسترول)، توسط موناسکوس پورپورئوس *PTCC5303* در تخمیر غوطه‌ور تولید شد. هفت عامل تغذیه‌ای و شیمیایی مؤثر در تولید لواستاتین شامل مالتوز، پپتون، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، KH_2PO_4 ، $MnSO_4 \cdot H_2O$ ، تیامین و pH به روش پلاکت برمن غربال‌گری شدند. از میان عوامل مختلف، مالتوز و $MgSO_4$ به عنوان عوامل مهم در تولید توده زیستی و لواستاتین شناخته شدند. بهینه‌سازی غلظت این عوامل به کمک روش آماری سطح پاسخ، در فلاسک‌های چرخان انجام شد. ده روز پس از رشد موناسکوس پورپورئوس تحت شرایط بهینه حاوی 26 g/L مالتوز، 0/1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، 5 g/L پپتون، 0/5 g/L $MnSO_4$ ، 4 g/L KH_2PO_4 ، 0/1 g/L Vitamin B₁ و در pH 7، 130rpm، دمای 30 درجه سانتی‌گراد بیشترین غلظت لواستاتین 63 mg/l به دست آمد.

کلیدواژگان: موناسکوس پورپورئوس، تخمیر غوطه‌ور، لواستاتین، بهینه‌سازی، روش سطح پاسخ.

1- مقدمه

مطالعات ابتدا در ژاپن، کره و چین، و سپس در آمریکا توسعه پیدا نمود. همچنین گزارش‌های علمی مربوطه، در مجله‌های معتبر پزشکی و علمی به چاپ رسیده است. لذا

مطالعات علمی در مورد قارچ‌های دارویی، در دو دهه گذشته به طور فزاینده‌ای گسترش پیدا کرده است. این

نشان دادند که کاهش LDL کلسترول (LDL-C) در کاهش خطر ابتلا به CHD مؤثر است [13]. بنابراین برای جلوگیری از ابتلا به آترواسکلروز، باید سطح کلسترول خون کنترل شود. استاتین‌ها یا مهارکننده‌های آنزیم 3 هیدروکسی متیل گلوکاتریل کوآنزیم A ردوکتاز (HMG-CoA)، مهارکننده‌های قوی بیوستز کلسترول می‌باشند. آنها دسته‌ای از عوامل کاهش دهنده چربی خون بوده و باعث پیشگیری‌های اولیه و ثانویه در ابتلا به بیماری‌های عروق کرونر می‌شوند [14]. لواستاتین یک داروی استاتینی طبیعی است که اغلب در محصولات تخمیر شده موناسکوس (MFP⁸) وجود دارد. امروزه از بسیاری از داروهای تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود. درحالی که این داروها بازده تولید کمی دارند و تلاش قابل توجهی برای توسعه فرایندهای مقرون به صرفه می‌شود. بخشی از این تلاش‌ها، مربوط به مطالعه عوامل تغذیه‌ای است [15]. تولید موناکولین در شرایط کنترل شده باید صورت گیرد زیرا عوامل تخمیر در تولید محصولات موناسکوس مؤثر است [16]. معمولاً منابع نیتروژن آلی مانند پیتون، عصاره مخمر و آب خیس‌انده ذرت برای تولید لواستاتین توسط گونه‌های مختلف قارچی ترجیح داده می‌شوند. مطالعاتی در مورد تولید موناکولین K توسط قارچ موناسکوس پورپورئوس، یافت شده است که تولید این محصول بطور مستقیم یا غیر مستقیم، تحت تأثیر شرایط محیط کشت مانند pH، دما و غیره است [17، 10]. بنابراین، قبل از ایزوله لواستاتین، بهینه‌سازی عوامل تغذیه‌ای و شیمیایی مختلف برای رسیدن به حداکثر رشد قارچ و تولید بهینه لواستاتین بسیار مهم است. روش‌های مختلفی برای بهینه‌سازی محیط کشت وجود دارد. روش آماری نسبت به روش متعارف دارای مزایای بیشتری از جمله قابل اعتماد بودن روش، سریع بودن روش، تعداد کم عوامل مهم، کاهش تعداد کل

در آینده، صنایع دارویی، توجه ویژه‌ای به این منابع خواهند داشت. اهمیت موضوع تا حدی است که در سال 1994، از سوی اتحادیه غذا و داروی آمریکا (FDA)، قارچ‌های خوراکی-دارویی به عنوان غذای تندرستی معرفی شدند [1]. بیش از هزاران سال است کشورهای آسیایی از قارچ موناسکوس به عنوان ماده غذایی و دارو استفاده می‌کنند. اولین اسناد ثبت شده که ارزش غذایی و دارویی قارچ موناسکوس را مطرح میکند به سال 800 میلادی برمی‌گردد [2]. بسیاری از مطالعات نشان می‌دهند که قارچ موناسکوس، متابولیت‌های اقتصادی مقرون به صرفه‌ای با ساختار پلی کتیدی از جمله رنگ‌های غذایی (قرمز، نارنجی و زرد)، داروهای پایین‌آورنده کلسترول خون¹ مانند لواستاتین² و ترکیبات وابسته (موناکولین‌ها)، سم قارچی به نام سیتیرینین³، متابولیت کشف شده جدید، با نام آنکالاکتون⁴ و آنتی بیوتیک‌ها را تولید می‌کند [3-8]. در میان این متابولیت‌ها، لواستاتین اهمیت بیشتری دارد [9، 2]. در سال 1979، عامل ضد کلسترول (موناکولین k) توسط Endo در برات‌های موناسکوس رابر⁵ کشف شد [11]. در آگوست 1987، موناکولین K (مونولین، لواستاتین (نام تجاری)، مواکور) اولین استاتینی بود که از ایالات متحده آمریکا تأییدیه FDA⁶ را دریافت کرد [9، 10، 12].

بیماری‌های قلبی-عروقی، به‌ویژه بیماری‌های عروق کرونر قلب (CHD)، یکی از علت‌های عمده مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه است [6]. همچنین شیوع بیماری‌های چاقی، دیابت و فشار خون در میان جوانان سبب شده تا احتمال ابتلا به آترواسکلروزیس⁷ نیز، در این جمعیت رو به افزایش باشد. آزمایش‌های بالینی بسیاری،

1. Antihypercholesterolemic
2. Lovastatin
3. Citrinin
4. Ankalacton
5. *Monascus ruber*
6. Food and Drug Administration
7. Atherosclerosis

8. *Monascus* Fermented Production

اسلنت کشت تازه روی محیط⁴ PDA، از مرکز مجموعه فارچ سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (IROST) خریداری شد. میسیلیوم این فارچ روی اسلنت PDA کشت داده شد و در 4°C نگهداری شد. هر 30 روز یک بار، روی محیط کشت تازه PDA، مجدداً کشت داده شد و در انکوباتور با دمای 30°C به مدت 7 روز انکوبه شدند. پس از 7 روز، در یخچال 4°C نگهداری شدند.

تمام مواد بکار برده شده برای تهیه محیط‌های کشت، از شرکت مرک تهیه شده بود. استاندارد لواستاتین توسط شرکت داروسازی پور سینا اهدا شده بود.

2-2- شرایط کشت

همه آزمایش‌ها در فلاسک 100 میلی‌لیتری ارلن مایر حاوی 30 میلی‌لیتر محیط کشت انجام شده بود. یک پانچ میسیلیومی (شعاع = 4/5 میلی‌متر) از کلنی 7 روزه فارچ مونسکوس پورپورئوس به هر فلاسک منتقل شد. تمام میسیلیوم‌های پانچ شده هم سن بودند. سپس در 30 درجه سانتی‌گراد برای 7 روز بر روی یک شیکر انکوباتور با 130 rpm انکوبه شدند. در شکل 1 تصویر میکروسکوپی و ماکروسکوپی این فارچ نشان داده شده است. مرحله بهینه‌سازی، همه آزمایش‌ها با همین شرایط برای 10 روز انکوبه شدند. در انتهای هر دوره تخمیر، تولید زیست توده و لواستاتین اندازه‌گیری شد.

2-3- روش‌های تحلیلی

2-3-1- اندازه‌گیری زیست توده

در انتهای زمان تخمیر، زیست توده در شرایط سترون، توسط کاغذ واتمن شماره 41 از محیط کشت جدا شد. زیست توده باقی‌مانده روی کاغذ واتمن به مدت سه روز توسط دستگاه فریز درایر خشک شدند (تا زمانی که وزن زیست توده ثابت شود). در نهایت وزن خشک آن اندازه‌گیری شد.

آزمایش‌ها، درک میانگنش‌های بین غلظت‌های مختلف مواد مغذی و یافتن مناسب‌ترین شرایط و پیش‌بینی پاسخ است [18، 12]. روش سطح پاسخ (RSM)¹، یک مجموعه آماری و روش ریاضی مفید است که برای توسعه، بهبود و بهینه‌سازی فرایندها بکار می‌رود. اگرچه RSM به طور گسترده‌ای برای فرایندها بکار می‌رود اما برای تولید لواستاتین توسط مونسکوس پورپورئوس، در تاریخچه آن، تنها چند نمونه وجود دارد [12].

بطور کلی، تولید موناکولین از طریق دو فرایند می‌تواند انجام شود: 1. کشت حالت جامد² 2. کشت غوطه‌ور³ [19]. تولید موناکولین عمدتاً در محیط جامد صورت می‌گیرد که بازده تولید رنگدانه بسیار پایین دارند و در مقیاس صنعتی مقرون به صرفه نیست. بنابراین بیشتر محققان به منظور افزایش راندمان تولید، بر محیط مایع در بیوراکتورها متمرکز شده اند [20]. در محیط غوطه‌ور، می‌توان هوادهی یکنواخت‌تری نسبت به محیط جامد داشت، در حالی که تخمیر در محیط جامد به علت آلوده شدن آسان محیط، مشکل افزایش مقیاس و عدم کنترل متغیرهای عملیاتی، دشوارتر است [21، 19].

در این تحقیق برای اولین بار از فارچ مونسکوس پورپورئوس به منظور بیوسنتز لواستاتین در کشت تخمیری با استفاده از روش آماری استفاده شده است. به این منظور عوامل مؤثر بر اساس مقالات انتخاب گردید و سطح اهمیت آن‌ها به روش پلاکت برمن مشخص شد. دو عامل مهم شده، به روش سطح پاسخ بررسی گردید و نهایتاً با نتایج آزمایشگاهی صحت‌یابی شد.

2- مواد و روش‌ها

2-1- ریز سازواره، مواد و محیط‌های کشت

کشت مونسکوس پورپورئوس PTCC5303 به صورت

1. Response Surface Methodology
2. Solid State
3. Submerge Culture

4. Potato Dextrose Agar



(الف)

(ب)

شکل 1 الف) تصویر کلنی 7 روزه موناسکوس پورپورئوس کشت داده شده بر روی PDA، ب) تصویر میکروسکوپی از قارچ همراه با میسیلیوم و کنیدیوم آن

2-3-2- اندازه‌گیری لواستاتین

مراحل استخراج طبق روش Su et al. با مختصری تغییر انجام شد [22]. پس از جداسازی بیومس از محیط کشت به کمک کاغذ واتمن 41، مقدار مشخصی از سوپرناتانت برداشته شد و به کمک H_3PO_4 (2N) در pH 3 تنظیم شد. استخراج با افزودن اتیل استات به سوپرناتانت با نسبت 1:1 در دمای $30^\circ C$ برای 2h روی یک شیکر انجام شد. مخلوط به مدت 10 دقیقه در $3000 \times g$ سانتریفیوژ شد. فاز آلی جدا شد و به کمک تری فلورواستیک اسید 1% (TFA) لاکتونیزه و خشک شد. در نهایت، برای اندازه‌گیری موناکولین به روش اسپکتوفتومتری در 238 nm، به هر نمونه متانول 95% اضافه شد و با فیلتر $0.22 \mu m$ فیلتر شدند.

2-4- غربال‌گری

در فرایندهای زیستی که عوامل زیادی بر روی فرایند تأثیرگذار است، قبل از بهینه‌سازی، غربال‌گری برای شناسایی عوامل مهم و تأثیرگذار انجام می‌شود [23]. در

این پژوهش، طراحی پلاکت برمن برای غربال‌گری عوامل مؤثر بر تولید موناکولین و زیست توده توسط موناسکوس پورپورئوس در تخمیر غوطه‌ور انجام شد. شش ترکیب غذایی و عامل pH، هر کدام در سه سطح غلظت بالا (+)، وسط (0) و کم (-1) انتخاب شدند. غلظت هر عامل در سه سطح با توجه به مقالات مختلف استخراج شد و در جدول 1 خلاصه شده است. عوامل آزمایش شده شامل مالتوز، پپتون، KH_2PO_4 ، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، $MnSO_4 \cdot H_2O$ ، Vitamin B₁ و pH می‌باشند. 12 آزمایش با 4 نقطه مرکزی طراحی شده توسط پلاکت برمن در جدول 2 آورده شده است.

2-5- طراحی آزمایش CCD¹

غلظت عواملی که به صورت مشترک در تولید موناکولین و زیست توده مهم و مؤثر بودند و در طراحی پلاکت برمن تعیین شده بودند، مطابق روش CCD در RSM با استفاده از نرم‌افزار DESIGN EXPERT 7.0 (Statease, USA) از نرم‌افزار

1. Central Composite Design

جدول 1 سطوح عوامل تغذیه‌ای و فیزیکی بکار برده شده در آزمایش

| متغیرها (g/l) | سطوح | | |
|--------------------------------------|------|------|-----|
| | -1 | 0 | +1 |
| مالتوز | 2 | 10 | 18 |
| پیتون | 1 | 3 | 5 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0/2 | 1/1 | 2 |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 0/1 | 0/3 | 0/5 |
| KH ₂ PO ₄ | 1 | 2.5 | 4 |
| Vit B ₁ | 0/02 | 0/06 | 0/1 |
| pH | 3 | 5 | 7 |

بهینه شدند (جدول 3). اثر متقابل دو متغیر روی پاسخ، به کمک منحنی برجسته مشخص شد (شکل 2). یک مقدار بهینه از عوامل برای حداکثر تولید لواستاتین، به کمک نرم‌افزار پیش‌بینی، تعیین شد.

3- یافته‌ها

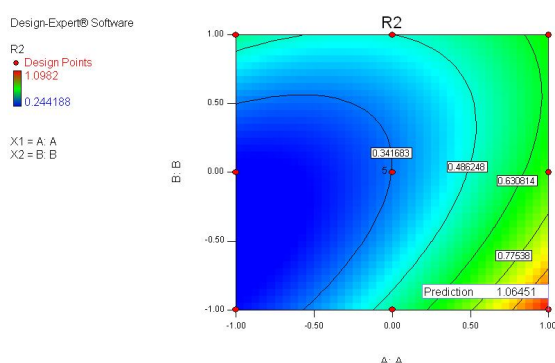
3-1- تحلیل داده‌های غربال‌گری به روش طراحی

پلاکت برمن

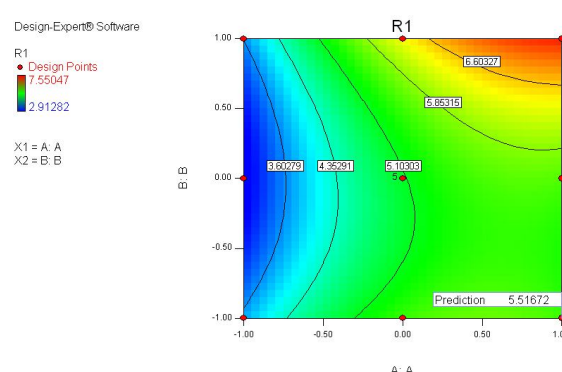
ترکیبات محیط کشت تأثیر زیادی بر تولید زیست توده و لواستاتین توسط موناسکوس پورپورئوس دارند. مقدار P میزان اهمیت متغیرها را نشان می‌دهد.

جدول 2 چیدمان طراحی آزمایش پلاکت برمن و پاسخ‌های به دست آمده

| پاسخ‌های آزمایشگاهی | | عوامل تغذیه‌ای و شیمیایی | | | | | | | |
|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------|---------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|----|-----------|
| جذب موناکولین 238 nm(abs) کل | میزان زیست توده (g/L) | مالتوز | پیتون | KH ₂ PO ₄ | MgSO ₄ .7H ₂ O | MnSO ₄ .H ₂ O | Vitamin B ₁ | pH | آزمایش |
| 1.104 | 1.86 | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 | 1 |
| 0.624 | 6.23 | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 | -1 | 2 |
| 0.278 | 1.72 | -1 | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 | 3 |
| 0.237 | 3.18 | +1 | -1 | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | 4 |
| 0.481 | 4.72 | +1 | +1 | -1 | +1 | +1 | -1 | +1 | 5 |
| 1.014 | 3.94 | +1 | +1 | +1 | -1 | +1 | +1 | -1 | 6 |
| 0.275 | 3.32 | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 | +1 | +1 | 7 |
| 0.191 | 1.43 | -1 | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 | +1 | 8 |
| 0.193 | 0.95 | -1 | -1 | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 | 9 |
| 0.774 | 4.18 | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 | +1 | +1 | 10 |
| 0.234 | 0.85 | -1 | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 | +1 | 11 |
| 0.0259 | 0.86 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 12 |
| 0.284 | 2.44 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 |
| 0.449 | 2.77 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 |
| 0.545 | 2.71 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 |
| 0.184 | 2.08 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 |



شکل 2- ب نمایش دو بعدی تاثیر غلظت‌های مالتوز (A) و $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (B) بر میزان تولید لواستاتین



شکل 2- الف نمایش دو بعدی تاثیر غلظت‌های مالتوز (A) و $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (B) بر میزان تولید توده زیستی

جدول 3 چیدمان طراحی مرکب مرکزی و پاسخ‌های بدست آمده در شیکرفلاسک

| لواستاتین (OD _{238 nm}) | | توده زیستی (g/L) | | متغیرهای مهم | | |
|--------------------------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------------------------|--------|--------|
| مقدار پیش‌بینی شده توسط مدل | داده آزمایشگاهی | مقدار پیش‌بینی شده توسط مدل | داده آزمایشگاهی | MgSO ₄ ·7H ₂ O | مالتوز | آزمایش |
| 0/24 | 0/221 | 3/38 | 3/40 | -1 | -1 | 1 |
| 1/06 | 1/334 | 5/92 | 5/93 | -1 | +1 | 2 |
| 0/37 | 0/445 | 4/26 | 4/46 | +1 | -1 | 3 |
| 0/67 | 0/880 | 6/80 | 6/95 | +1 | +1 | 4 |
| 0/27 | 0/353 | 3/52 | 3/33 | 0 | -1 | 5 |
| 0/70 | 0/231 | 6/06 | 5/94 | 0 | +1 | 6 |
| 0/53 | 0/294 | 5/35 | 5/36 | -1 | 0 | 7 |
| 0/48 | 0/377 | 6/23 | 5/90 | +1 | 0 | 8 |
| 0/34 | 0/411 | 5/49 | 5/56 | 0 | 0 | 9 |
| 0/34 | 0/411 | 5/49 | 5/56 | 0 | 0 | 10 |
| 0/34 | 0/411 | 5/49 | 5/56 | 0 | 0 | 11 |
| 0/34 | 0/411 | 5/49 | 5/56 | 0 | 0 | 12 |
| 0/34 | 0/411 | 5/49 | 5/56 | 0 | 0 | 13 |

2-3- تحلیل داده‌های حاصل از بهبودسازی محیط

کشت به روش RSM

از میان عوامل مهم در تولید توده زیستی و موناکولین، فاکتورهای مشترک برای بهبودسازی غلظت آنها انتخاب شدند. یک طراحی آزمایش مطابق روش CCD سطح پاسخ برای دو عامل مهم مالتوز و $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ در قالب 13 آزمایش با 5 نقطه مرکزی طراحی شد (جدول

مقدار 0/1 - 0/05 $P <$ به عنوان سطح اطمینان از مؤثر بودن ضریب در نظر گرفته شده است. در این آزمایش، تولید زیست توده (R_1) و لواستاتین (R_2) به عنوان دو پاسخ در نظر گرفته شدند. بنابراین طبق نتایج به دست آمده، مالتوز، پپتون و $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ در تولید زیست توده و مالتوز و $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ در تولید لواستاتین مؤثر بودند.

ترمها در مدل درجه دوم ارائه شده دارای اهمیت هستند. در نتیجه تولید بهینه توده زیستی، تابعی از این عبارتها است. ترم AB با مقدار بالاتر از 0/05 توسط نرم‌افزار حذف می‌شود. برای تحلیل بهتر مدل ارائه شده توسط نرم‌افزار، متغیر R-Squared (R^2) نیز ارائه می‌شود. بطور معمول R^2 بالای 0/7، بیانگر ضریب همبستگی نسبتاً خوبی بوده و هرچه مقدار این ضریب به یک نزدیک‌تر باشد، انطباق داده‌های تجربی و مدل حاصل از رگرسیون بیشتر بوده و مدل دقت بالاتری دارد.

مقدار $R_1^2 = 0/9802$ برای معادله به‌دست آمده، همپوشانی مناسب داده‌های آزمایشگاهی و مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل ارائه شده را برای تولید بهینه توده زیستی نشان می‌دهد. مدل نهایی ارائه شده برای تولید بهینه موناکولین K با عبارتهای واقعی، به صورت زیر است:

$$R_2 \text{ (abs)} = 0.333 + 0.2412A - 0.0234B - 0.172AB + 0.124 A^2 + 0.175 B^2$$

در این معادله R_2 میزان تولید بهینه موناکولین A k غلظت مالتوز و B غلظت $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ است.

در این معادله نیز، مقدار p-Value برای ترمهای غلظت مالتوز (A)، توان دوم غلظت مالتوز (A^2) و تأثیر همزمان غلظت مالتوز و $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (AB) کمتر از 0/05 است، این ترمها در مدل درجه دوم ارائه شده دارای اهمیت هستند. ترم B با $p\text{-Value} < 0/1 - 0/05$ با احتمال، دارای اهمیت است. بنابراین ترم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (B) نیز در مدل ارائه شده است. نتایج حاصل از آنالیز توسط نرم‌افزار برای تولید زیست توده و لواستاتین، به ترتیب در جدول 4- الف و ب آورده شده است. در نتیجه تولید بهینه موناکولین، تابعی از این عبارتها است. مقدار $R_2^2 = 0/9891$ برای معادله به‌دست آمده، همپوشانی مناسب داده‌های آزمایشگاهی و مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل ارائه شده را برای تولید بهینه موناکولین k نشان می‌دهد.

تأثیر دو عامل غلظت مالتوز و $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ بر میزان

(3). اثر هر متغیر و اثرات متقابل متغیرها بر روی پاسخها، از طریق انجام آزمایش‌های تخمیر که در سطوح مختلف و به صورت تصادفی برای هر دو متغیر انجام شد مورد مطالعه قرار گرفتند. وزن خشک زیست توده و غلظت موناکولین تولید شده به عنوان پاسخ در هر آزمایش به کمک نرم‌افزار DESIGN EXPERT 7.0 آنالیز شد (جدول 4).

جدول 4- الف آنالیز انحراف معیار تولید توده زیستی

| عبارت | مجموع مربعات | مربع میانگین | F-Value | P-Value Prob>F |
|-------|--------------|--------------|---------|----------------|
| A | 9/70 | 9/70 | 276/59 | 0/0001 |
| B | 1/14 | 1/14 | 32/61 | 0/0012 |
| A^2 | 1/08 | 1/08 | 37/84 | 0/0001 |
| B^2 | 0/25 | 0/25 | 7/17 | 0/032 |
| AB | 0/0004 | 0/0004 | 0/01 | 0/918 |

جدول 4- ب آنالیز انحراف معیار تولید موناکولین

| عبارت | مجموع مربعات | مربع میانگین | F-Value | P-Value Prob>F |
|-------|--------------|--------------|---------|----------------|
| A | 0/34 | 0/34 | 332/07 | 0/0001 |
| B | 3/601E0/003 | 3/601E0/003 | 3/53 | 0/1024 |
| AB | 0/11 | 0/11 | 112/60 | 0/0001 |
| A^2 | 0/042 | 0/042 | 40/96 | 0/0004 |
| B^2 | 0/077 | 0/077 | 75/05 | 0/0001 |

نرم‌افزار یک مدل رگرسیون غیرخطی را به صورت یک

معادله (با فاکتورهای واقعی) برای هر پاسخ پیشنهاد کرد:

$$R_1 \text{ (g/l)} = 5.4912 + 1.282A + 0.433B - 0.712 A^2 + 0.321 B^2$$

که در این معادله R_1 میزان تولید بهینه توده زیستی، A غلظت مالتوز و B غلظت $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ است.

با توجه به اینکه p-Value برای ترمهای غلظت مالتوز (A)، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (B) و توان دوم غلظت مالتوز (A^2) و توان دوم غلظت مالتوز (B^2) کمتر از 0/05 است، این

تولید لواستاتین توسط قارچ مورد نظر است [9] و به عنوان محیط کشت پایه در این مطالعه انتخاب شدند؛ اما به منظور افزایش بازده تولید لواستاتین، افزودن منابع معدنی مورد نیاز نیز ضروری است.

در این پژوهش 7 متغیر مؤثر بر تولید لواستاتین با توجه به منابع بکاربرده شده در مقاله‌های مختلف برای قارچ موناسکوس پورپورئوس، انتخاب شدند که با توجه به نتایج غربال‌گری، مالتوز و منیزیم سولفات به عنوان متغیرهای مهم شاخه شدند. مالتوز ممکن است در تنظیم بیان ژن‌ها و فعالیت آنزیم‌های پلی کتید سنتتاز تأثیر داشته باشد [27]. رشد توده زیستی بیانگر این بود که این قارچ توانایی جذب کامل مالتوز را دارد. با توجه به اثر مستقیم منیزیم بر روی رشد قارچ و تولید زیست توده، حضور آن به عنوان نیازی اصلی در رشد طبیعی قارچ مشخص است و از آنجا که متابولیت‌های ثانویه اغلب در شرایط استرس‌زا برای میکرو ارگانیسم تولید می‌شوند، در این تحقیق ماده معدنی منیزیم در شرایط رشدی که مالتوز با سطح مذکور به عنوان منبع کربنی نقش ایفا می‌کرد به صورت عامل استرس‌زا ظاهر شد. به این ترتیب سطح بالای منیزیم، رشد قارچ و تولید زیست توده را به همراه داشت و به مرور با رشد بیشتر توده میسلیومی و کاهش منیزیم فقدان این ماده برای قارچ استرس آور شده و باعث تولید لواستاتین به عنوان یک متابولیت ثانویه گردید. این موضوع با پژوهش انجام شده توسط Sadik و همکاران نیز همخوانی دارد [18]. تا جایی که با وجود کاهش زیست توده، افزایش لواستاتین مشاهده شد.

چنانچه مسیرهای متابولیکی بیوستتزی این قارچ به درستی شناخته شوند، می‌توان به صورت دقیق‌تر از منابع مورد نیاز آن برای جهت‌دار کردن مسیر متابولیکی به سمت تولید متابولیت مطلوب (لواستاتین) استفاده کرد. علاوه بر این، غلظت منابع تغذیه‌ای نیز در بیوستتزی لواستاتین مؤثرند، بنابراین برای به‌دست آوردن

تولید توده زیستی و تولید موناکولین_k، به ترتیب به صورت دو بعدی در شکل 2- الف و ب نشان داده شده است. میزان تولید موناکولین در شرایط بهینه با نرم‌افزار، 1/06451 abs و میزان زیست توده 5/51672g/L پیش‌بینی شده است.

4- بحث

به منظور افزایش بازده تولید لواستاتین توسط جنس موناسکوس در تخمیر غوطه‌ور، مطالعات اندکی در دسترس است [24]. بطوری که تنها چند نمونه در تاریخچه آن ذکر شده است که با روش‌های آماری معتبر مثل پلاکت برمن و پاسخ سطح نیز انجام گرفته است. از آنجا که در یک فرایند زیستی عوامل زیادی دخیل است و هر عامل با هم میانکنش دارند، بهینه‌سازی فرایند تولید بسیار پرهزینه است. بنابراین در این پژوهش برای کاهش هزینه‌ها از روش‌های آماری مثل پلاکت برمن و سپس روش سطح پاسخ استفاده شده است.

اخیراً، محققان مقادیر سوبسترا و شرایط کلی محیط کشت برای تولید لواستاتین را بررسی کردند و مطالعات بسیاری در زمینه شرایط قابل کنترل مختلف مانند دما، منابع کربن و نیتروژن و ترکیب محیط کشت انجام شده است [25].

در تخمیر متابولیت‌های ثانویه، منابع کربن و نیتروژن در تنظیم رشد و تولید، نقش محوری دارند و می‌توانند به عنوان پیش‌ساز و عامل به همراه عمل کنند [26، 27]. معمولاً منابع نیتروژن آلی مانند پپتون، عصاره مخمر و آب خیسانده ذرت برای تولید لواستاتین توسط گونه‌های مختلف قارچی ترجیح داده می‌شوند. منابع نیتروژن مانند پپتون، سدیم نترات و عصاره مخمر، به طرز چشمگیری به تولید لواستاتین به‌وسیله موناسکوس پورپورئوس کمک می‌کند [12]. بنابراین برای افزایش بازده تولید لواستاتین در این مطالعه از پپتون استفاده شد. منابع کربنی و نیتروژنی شامل مالتوز و پپتون ترکیب مناسبی برای رشد و

- purpureus*). *Biotech.* 2: 37-49.
- [3] Azizi, M., Malekzade, KH., Saberi Najafi, M. (2011) Effect of sodium nitrate, saccharose and zinc sulfate concentration on pigment production by *Monascus purpureus*. *Color Sci. and Tech.* 5: 199-206. (Persian).
- [4] Wang, T.H. and Lin, T.F. (2007) monascus rice products. *Advances in Food and Nutrition Research.* 53: 123-159
- [5] Lin, Y. L., Wang, T. H., Lee, M. H., Su, N. W. (2008) Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice: a review. *App. Microbiol. and Biotech.* 77: 965-973.
- [6] Ajdari, Z., Ebrahimpour, A., Abdul manna, M., Hamid, M., Mohamad, R. and Ariff, B. (2011) Assessment of Monacolin in the Fermented Products Using *Monascus purpureus* FTC5391. *Biomedicine and Biotechnology.* 1-9.
- [7] Juzlova, P., Martinkova, L., Kren, V., (1996) Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review, *Industrial Microbiol.* 16: 163-170.
- [8] Young, E. M. (1930) Physiological studies in relation to the taxonomy of *Monascus spp.* In: Juday C (ed) Transactions of the Wisconsin Academy of Sciences, Arts and Letters. Wisconsin Academy of Sciences, Madison, WI, p. 227 (plate 224ff). Vol. (25).
- [9] Kumari, M., Mohan, A. D., Vijayalakshmi, G. (2012) Optimization of Monacolin K Production by *Monascus purpureus* MTTC410 in Submerged Fermentation. *International Journal of Food Engineering.* 8: 1556-3758.
- [10] Radha, K., Lakshmanan, D., (2013) A review: lovastatin production and applications, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* 6: 21-26.
- [11] Chayawat, J., Jareonkitmongkol, S., Songsasen, A., Yongsmith, B. (2009) Pigments and Anti-Cholesterol Agent Production by *Monascus kaoliang* KB9 and Its Color Mutants in Rice Solid Cultures. *Kasersart Journal.* 43: 696-702.
- [12] Seraman, S., Rajendran, A., Thangavelu, V. (2010) Statistical optimization of anticholesterolemic drug lovastatin production by the red mold *Monascus purpureus*. *Food & Bioproducts Processing.* 88: 266-276.
- [13] Nijjar, P. S., Burke, F.M., Bloesch, A. and Rader, D. J. (2010) Role of dietary supplements in lowering low-density lipoprotein cholesterol: A review. *Clinical Lipidology.* 4: 248-258.
- [14] Zhou, Q. and Liao, J. (2009) Statins and Cardiovascular Diseases: From Cholesterol Lowering to Pleiotropy. *PMC2896785.* 15:

فرمولاسیون بهینه محیط کشت برای تولید بیشینه لواستاتین آزمایش‌هایی مطابق با آزمایش‌های طراحی شده با نرم‌افزار DESIGN EXPERT انجام شد. شرایط بهینه سه بار تکرار شد و میانگین این نتایج نشان داد که پس از ده روز، حداکثر تولید لواستاتین 63 mg/l تحت شرایط بهینه شامل 26 g/L مالتوز، 0/1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، 5 g/L پیتون، 0/1 g/L KH_2PO_4 ، 4 g/L $MnSO_4$ 0/5 g/L و Vitamin B₁ در pH 7، 130 rpm، دمای 30 درجه سانتی‌گراد به دست می‌آید.

نرم‌افزار دو معادله (R_1 و R_2) برای پیش‌بینی غلظت زیست توده و لواستاتین را ارائه داده است که به کمک آن می‌توان هر غلظتی از مالتوز و منیزیم سولفات را به آن داد تا میزان توده زیستی و لواستاتین نهایی را پیش‌بینی کند. با توجه به شکل 1 مشاهده می‌شود که افزایش غلظت مالتوز و منیزیم سولفات سبب افزایش رشد زیست توده خواهد شد، در حالی که افزایش مالتوز و کاهش منیزیم سولفات تولید لواستاتین را افزایش می‌دهد. به این ترتیب، با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، بسته به هدف از کشت قارچ موناسکوس در محیط مایع، می‌توان به سمت افزایش تولید توده زیستی و یا افزایش تولید لواستاتین خارج سلولی رفت. چنانچه هدف، رسیدن به بالاترین میزان تولید توده زیستی باشد، می‌توان از آن محیط کشت، به عنوان محیط پیش‌کشت و یا برای به دست آوردن بیشترین بازده لواستاتین داخل سلولی استفاده کرد. این مطالعه نشان داد که تولید لواستاتین در شرایط بهینه نسبت به محیط کشت پایه 22/5% افزایش داشته است.

5- منابع

- [1] اسمیت، روان و سولیوان (2011). قارچ‌های دارویی، خواص درمانی و کاربرد آنها در پزشکی با تأکید در درمان سرطان. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.
- [2] Erdogru, O. and Azirak, S. (2004) Review of the studies on the red yeast (*Monascus*

- [21] Hu, Z., Zhang, X., Wu, Z., Qi, H. and Wang, Z. (2012) Perstraction of intracellular pigments by submerged cultivation of *Monascus* in nonionic surfactant micelle aqueous solution. *Applied Microbiology Biotechnology*. 94: 81–89.
- [22] Su, Y. C., Wang, J. J., Lin T. T., Pan, T. M., (2003) Production of the secondary metabolites γ -aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*. *Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30: 41-46.
- [23] Montgomery, D.C. (2008) Design and analysis of experiments, John Wiley & Sons.
- [24] Srianta, I., Ristiarini, S., Nugerhani, I., Sen, S. K., Zhang, B. B., Xu, G. R. and Blanc, P. J. (2014) Recent research and development of *Monascus* fermentation products. *International Food Research Journal*. 21: 1-12.
- [25] Sun, J. L., Zou, X., Ai-Ying Liu, A.Y., Tang-Fu Xiao, T. F. (2011) Elevated yield of Monacolin K in *Monascus purpureus* by fungal elicitor and mutagenesis of UV and Li Cl. *Biological Research*. 44: 377-382.
- [26] Kumar, M.S., Jana, S. K., Senthil, V., Kumar, S. V., Sadhukhan, A. K. (2000) Repeated fed-batch process for improving lovastatin production. *Process Biochemistry*. 36: 363-368.
- [27] Hajjaj, H., Niederberger, P., Duboc, P. (2001) Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium, *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2596-2602.
- 467–478.
- [15] Masurekar P. S. (2008) Nutritional and engineering aspects of microbial process development. *Progress in Drug Research*. Birkhäuser Verlag, Basel (Switzerland), 65: 293-328.
- [16] Manzoni, M., Rollini, M. (2002) Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbial Biotechnology*. 58: 555-564.
- [17] Japakaset, J., Wongkhalaung, C., Leelawatcharamas, V. (2009) Utilization of soybean residue to produce monacolin K-cholesterol lowering agent. *Science and Technology*. 31: 35-39.
- [18] Sayyad, S. A., Panda, B.P., Javed, S. and Ali, M. (2006) Optimization of nutrient parameters for lovastatin production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under submerged fermentation using response surface methodology. *Applied Microbial Biotechnology*. 73: 1054-1058.
- [19] Maniyom, S. and Markx, G.H. (2012) Biomass and Pigment Production by *Monascus* during Miniaturized Submerged Culture on Adlay. *Engineering and Technology*. 68: 1786- 1791.
- [20] Mukherjee, G., Singh, S. (2011) Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Process Biochemistry*. 46: 188-192.