استخلاص مركب اللوفاستاتين من الفطر *Penicillium chrysogenum* واختبار فعاليته المثبطة للفطر *Aspergillus fumigatus*

د. هاجر ناصر*

د. نوال علي**

د. ريم سلامة***

أمجد ديب****

(تاريخ الإيداع 21 / 4 / 2021. قُبِل للنشر في 23 / 8 /2021)

□ ملخّص □

أُجريت الدراسة لتحري قدرة الفطر *Penicillium chrysogenum* Thom على إنتاج مركب اللوفاستاتين باستخدام التخمير بالطريقة الصلبة (SSF)، بوجود مزيج مكون من ثلاث ركائز عضوية (نخالة القمح، نخالة الشوفان، فول الصويا)، ومصادر كربونية ونتروجينية (مسحوق قشور البطاطا، مستخلص الخميرة، والحليب البودرة).

أُختبرت فعالية مركب اللوفاستاتين الناتج بتركيز (0.5، 1، 2، 4) ملغ/مل في تثبيط نمو الفطر الممرض *Aspergillus fumigatus* Fresenius .

أظهر التحليل الطيفي لعينة من المستخلص الناتج باستخدام جهاز مطيافية الأشعة تحت الحمراء (FTIR) وجود مجموعة من الزمر الوظيفية والتي تعود لمركب اللوفاستاتين منها: (الهيدروكسيل، الميتيل، الميتلين، اللاكتون، الاستر).

بلغ متوسط تركيز مركب اللوفاستاتين في تجارب التخمير (21.5، 27.1، 41.83، 25.03) ملغ/غ ركازة جافة وذلك في الأيام (4، 7، 10، 13) على التتالي.

أظهر مركب اللوفاستاتين المستحصل عليه، تثبيطاً لنمو الفطر *A.fumigatus* بنسب تثبيط بلغت (72.12، 73.93، 78.78، 89.09)% وذلك عند التراكيز (0.5، 1، 2، 4) ملغ/مل على التتالي.

الكلمات المفتاحية: لوفاستاتين، *P.chrysogenum*، *A.fumigatus*، تخمير، فعالية مضادة للفطريات.

*أستاذ– قسم الكيمياء – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.

**أستاذ – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.

***مدرس– قسم العقاقير – كلية الصيدلة – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.

****طالب دراسات عليا (دكتوراة)– قسم الكيمياء البيئية– المعهد العالي لبحوث البيئة– كلية العلوم– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.

البريد الإلكتروني: amjaddeeb7@gmail.com

Extracting Lovastatin Compound From The Fungus (*Penicillium chrysogenum*) And Testing Its Inhibitory Efficacy Against The Fungus (*Aspergillus fumigatus)*

Dr. Hajar Nasser[*]
Dr. Nawal Ali[**]
Dr. Reem Salamah[***]
Amjad Deeb[****]

(Received 21 / 4 / 2021. Accepted 23 / 8 /2021)

□ ABSTRACT □

This study was carried out to investigate a possibility of the fungus (*Penicillium chrysogenum* Thom) to produce lovastatin compound by using solid substrate fermentation method (ssf) in the presence of a mixture of three organic substrates (wheat bran, oat bran, soybeans), carbon and nitrogen sources (potato peels powder, yeast extract, milk powder).
The effectiveness of the obtained lovastatin compound was tested with concentrations of (0.5, 1, 2, 4) mg/ml in inhibiting the growth of pathogenic fungus (*Aspergillus fumigatus* Fresenius).
The analysis of sample of obtained extract by using an infrared spectroscopy device (FTIR) showed presence of several of functional groups belong to lovastatin compound such as (hydroxil, methyl, lactone, and ester).
The average of concentration of lovastatin compound in fermentation experments reached (21.5, 27.1, 41.83, 25.03) mg/g dry substrate in the days (4, 7, 10, 13) respectlively.
The obtained lovastatin compound showed inhibiting the growth of the fungus (*A.fumigatus*) with inhibitory ratios reached (72.12, 73.93, 78.78, 89.09)% at concentrations (0.5, 1, 2, 4) mg/ml respectively.

Keywords: Lovastatin; *P.chrysogenum*; *A.fumigatus*; fermentation; antifungal activity .

*** Professor, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
**** Professor , Department of Botany, Faculty of Sciences, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
***** Assistant Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
****** PhD Student, Department of Environmental Chemistry at Higher Institute for Environmental Researches, Faculty of Sciences, Tishreen University, Lattakia, Syria. -E-mail: amjaddeeb7@gmail.com.**

مقدمة:

تعد الستاتينات (Statins) مجموعة من الأدوية المستخدمة بشكل أساس في خفض كوليسترول الدم بنسبة (20-60) % عن طريق تثبيط اصطناع أنزيم 3-Hydroxy-3- Methyl Glutaryl COA reductase الذي يعد الأنزيم الرئيس في الاصطناع الحيوي للكوليسترول (Seraman *et al*., 2010).

يتم الاصطناع الكيميائي للستاتينات من وحدات من الخلات ترتبط مع بعضها البعض لتشكل سلاسل تعرف بعديد الكيتيد polyketide (Marcin and Stanislaw, 2009; Sreenivasan *et al*., 2008).

بالمقابل، تنتج الفطريات مجموعة واسعة من المركبات الفعالة حيوياً، متنوعة البنى الكيميائية، يمتلك العديد منها فعاليات حيوية مثل الصادات الحيوية، ومن بين المستقلبات الفطرية المهمة أيضاً (الستاتينات)، مثل Lovastatin والذي يعد حيوي المصدر، بينما ينتج البعض الآخر من تعديلات كيميائية عليه مثل Pravastatin، Rosuvastatin، Atorvastatin، Simvastatin، Fluvastatin… (Casas Lopez *et al*., 2004; Bedford *et al*., 1995).

يمكن الحصول على مركب اللوفاستاتين من أجناس وأنواع مختلفة من الفطريات مثل *Aspergillus, Monascus, Paecilomyces, Trichoderma, Agaricus* وغيرها (Pushpa *et al*., 2016; Srinu *et al*., 2010; Chakravarti and Sahai, 2004; Casas Lopez *et al*., 2004; Bedford *et al*., 1995).

يتم إنتاج مركب اللوفاستاتين من الفطريات باستخدام إحدى طرائق التخمير: التخمير المغمور Sub-Merged Fermentation (SMF)، والتخمير بالطريقة الصلبة Solid Substrate Fermentation (SSF)، ويمتلك التخمير بالطريقة الصلبة ميزات تتفوق على التخمير المغمور منها (سهولة التحكم بالعمليات، الاستفادة القصوى من الركازة، توفير بيئة جيدة لنمو الفطريات، وزيادة إنتاج الستاتينات) (Immanuel and Anusha, 2019; Javed *et al*., 2017; Mouafi *et al*., 2016).

من الركائز المستخدمة في SSF لإنتاج اللوفاستاتين: نخالة القمح، نخالة الرز، قشور البرتقال وقشور الحبوب، وتعد نخالة القمح الأفضل مع إنتاجية تصل إلى 3273.4 ميكروغرام/غرام (Jaivel and Marimuthu, 2010, Panasuriya and Singhal, 2010; Chanakya *et al*., 2011; Reddy *et al*., 2011).

يستخدم مركب اللوفاستاتين في علاج أمراض الأوعية الدموية، الوقاية من السكتات الدماغية، الوقاية من تشكل الخثرات عدا عن تأثيره الخافض للكوليسترول، كما يخفض من معدل حدوث الزهايمر، يعالج هشاشة العظام والتهاب المفاصل الروماتيزمي، ويعمل أيضاً كمثبط لنمو بعض الأحياء الدقيقة (جراثيم، فطريات) (Pushpa *et al*., 2016; Dhar *et al*., 2015; Mendoza-Oliva *et al*., 2015; Barrios Gonzalez and Miranda, 2010; Tandon *et al*., 2005).

يعد جنس *Aspergillus* من الأجناس الفطرية الواسعة الانتشار في الطبيعة إذ يضم أكثر من 200 نوعاً إلا أن أشد الأنواع إمراضية للإنسان هي *A.fumigatus,A.niger,A.flavus* (Lamoth, 2016).

تشكل بعض أنواع الجنس *Aspergillus* عامل خطورة مهم على الصحة العامة للإنسان والحيوان، إذ توصف بعض أنواعه بكونها عوامل ممرضة للبشر، ومفرزة لسموم ضارة (Reverberi *et al*., 2010).

يُوصف الفطر *A.fumigatus* بكونه مسبب لأمراض الرئة عند الإنسان إذ يسبب في أغلب الأحيان مجموعة من المتلازمات الرئوية مثل الحساسية الرئوية، داء الرشاشيات الرئوي المزمن، وداء الرشاشيات المنتشر، ونادراً ما يحدث

عدوى في الكبد (خراج الكبد المتقيح Pyogenic liver abscess، والذي يمكن أن يُلاحظ عند 80 % من المرضى المصابين) (Yu *et al*., 2016).

أهمية البحث وأهدافه:

تحظى البدائل الطبيعية في الآونة الأخيرة بالاهتمام الكبير كونها أكثر أماناً مقارنةً بالمركبات المصنعة كيميائياً ونظراً لسهولة الحصول عليها من مصادرها المتنوعة، وباعتبار الفطريات مصدراً طبيعياً مهماً للعديد من المستقلبات الثانوية ومنها مركب اللوفاستاتين، والذي يحتفظ بالعديد من التطبيقات الطبية والصيدلانية، فقد هدف هذا البحث إلى:

1. عزل الفطرين (*Pencillium chrysogenum*، *Aspergillus fumigatus*).
2. استخلاص مركب اللوفاستاتين من الفطر *P.chrysogenum* .
3. دراسة تحليلية لتحديد تركيز مركب اللوفاستاتين وأهم الزمر الوظيفية التي يحتويها.
4. اختبار فعالية مركب اللوفاستاتين في تثبيط نمو الفطر *A.fumigatus*.

طرائق البحث ومواده:

1. تحضير المستنبتات الغذائية:

a. مستنبت Potato Dextrose Agar (PDA):

حُضر وفقاً للتعليمات الموجودة على العبوة العائدة لشركة TM Media، وذلك بإذابة 39 غ من المسحوق في 1000 مل ماء مقطر، ثم عُقم بجهاز التعقيم بالحرارة الرطبة (الأوتوغلاف) عند درجة حرارة 121^0C لمدة 20 دقيقة.

b. مستنبت Sabouraud Dextrose Agar (SDA):

حُضر وفقاً للتعليمات الموجودة على العبوة العائدة لشركة Abtek، وذلك بإذابة 62 غ من المسحوق في 1000 مل ماء مقطر، ثم عُقم بجهاز الأوتوغلاف عند درجة حرارة 121^0C لمدة 20 دقيقة.

2. عزل الفطريات:

a. عزل الفطر *Pencillium chrysogenum* Thom:

عُزل الفطر *P.chrysogenum* من ثمار أحد أنواع الحمضيات (*Citrus* sp.)، وذلك بأخذ أجزاء صغيرة من قشر الثمار (تظهر عليها الإصابة بالفطر المذكور) بوساطة إبرة معقمة، ثم زُرعت على مستنبت (PDA)، وحُضنت عند درجة حرارة 25^0C لمدة اسبوع، تم بعدها تنقية الفطر المراد دراسته، حُدد وفق المفاتيح التصنيفية الآتية (Abastabar *et al*., 2016; Refai, 2015; Cho *et al*., 2007)، ثم حُفظ في أنابيب مائلة تحتوي على مستنبت (PDA) في البراد عند درجة حرارة 4^0C لحين إجراء الدراسات اللاحقة عليه.

b. عزلة الفطر *Aspergillus fumigatus* Fresenius:

تم الحصول على عزلة واحدة من الفطر *A.fumigatus* من مستشفى تشرين الجامعي في اللاذقية، حيث أُخذت العينة الممرضة وزُرعت على مستنبت (SDA)، حُضنت عند درجة حرارة 30^0C لمدة اسبوع، دُرست صفاتها المزرعية والمجهرية وحُددت وفـق المفاتيح التصنيفيـة الآتية: (Diba *et al*., 2007; McClenny, 2005) ، ثمّ حُفظت في أنابيب مائلة تحتوي على مستنبت (SDA) في البراد عند درجة حرارة 4^0C، لحين إجراء الدراسات اللاحقة عليه.

3. استخلاص مركب اللوفاستاتين من الفطر *P.chrysogenum*:

أُجريت بالبدء عملية تخمير بالطريقة الصلبة وفقاً ل (Mouafi *et al*., 2016; Raghunath *et al*., 2012; Gupta *et al*., 2007) مع بعض التعديلات، وذلك باستخدام مزيج متجانس مكون من مساحيق ثلاث ركائز عضوية جافة (نخالة القمح، نخالة الشوفان، فول الصويا) مطحونة ومغربلة جيداً، أُضيف 10 غ منها إلى حوجلة زجاجية سعة 250 مل، ثم أُضيف إليها حوالي 50 مل ماء مقطر ومعقم يحتوي على المصادر الكربونية والنتروجينية وفق التراكيز الآتية: 40.05 غ/ل مسحوق قشر البطاطا، 5.5 غ/ل مستخلص خميرة، 15 غ/ل حليب بودرة، وهذا المقدار المضاف يحافظ على رطوبة تعادل 70 % نسبةً لوزن المواد الجافة، ثم عُقمت الحوجلة بجهاز الأوتوغلاف عند درجة حرارة 121^0C لمدة 20 دقيقة، ثم تُركت لتبرد بدرجة حرارة المختبر، ولُقحت بحجم 2 مل من معلق أبواغ الفطر المدروس بتركيز ($1 X 10^6$ بوغة/مل)، ضُبطت درجة الحموضة عند pH = 5 بوساطة محلول من حمض كلور الماء (1M HCL) وباستخدام وقاء السيترات كمحلول دارىء وذلك للحفاظ على درجة الحموضة من التغيرات خلال عملية التخمير، حُضنت الحوجلة بدرجة حرارة 25^0C لمدة 4 أيام، أُعيدت الخطوات السابقة مع تغيير مدة الحضن إلى (7، 10، 13) يوماً، أُجريت التجارب بواقع ثلاثة مكررات لكل مدة حضن.

أُستخلص مركب اللوفاستاتين بعد انتهاء مدد التخمير السابقة، وذلك بتجفيف كل حوجلة تخمير على حده عند درجة حرارة 60^0C حتى ثبات الوزن، نُقع مسحوق التخمير الجاف بمذيب الإيتانول 95 % بنسبة (8:4) غ/مل، وُضع المزيج في حمام مائي هزاز عند درجة حرارة 28^0C، نُقل بسرعة 1500 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة، أُخذت الطبقة العلوية ومُزجت مع حمض الخل بتركيز 1 % بنسبة مل/مل، بُخرت بجهاز المبخر الدوار عند درجة حرارة 40^0C للحصول على خلاصة مركزة، ثم جُففت في فرن بدرجة حرارة 40^0C للحصول على مسحوق ناعم، حُفظ في البراد عند درجة حرارة 4^0C ضمن عبوات زجاجية عاتمة لحين الاستخدام.

4. الدراسة التحليلية لمركب اللوفاستاتين باستخدام جهاز مطيافية الأشعة تحت الحمراء Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR):

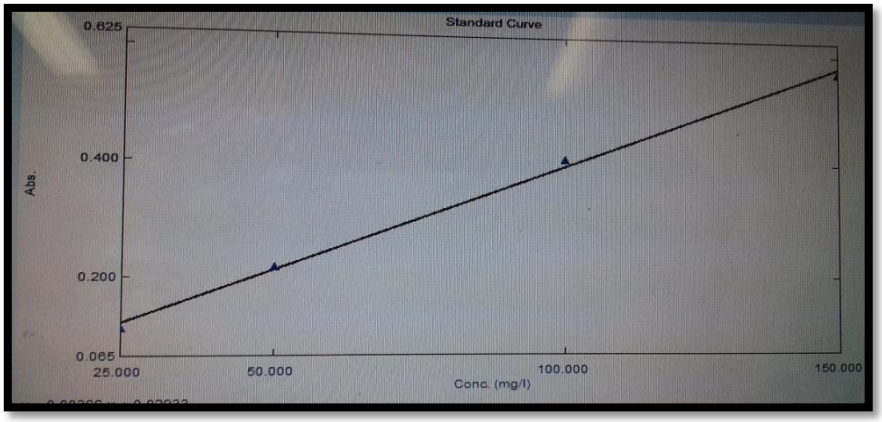
أُخذت عينة من الخلاصة الجافة للتعرف على أهم الزمر الوظيفية التي يحتويها مركب اللوفاستاتين، ثم وضعت مباشرةً على قرص بروميد البوتاسيوم الموجود ضمن الجهاز، ثم فُحصت الامتصاصية عند رقم موجة مجاله من 4000 سم$^{-1}$ إلى 400 سم$^{-1}$، وللمقارنة دُرست عينة من مركب لوفاستاتين قياسي بنفس المبدأ السابق .(Nazzal *et al*., 2002)

5. الدراسة التحليلية لمركب اللوفاستاتين باستخدام جهاز المطيافية الضوئية (Spectrophotometer):

مُددت الخلاصة بالإيتانول 95 %، قيست الامتصاصية عند طول موجة 238 نانومتر باستخدام جهاز السبيكتروفوتومتر، ثم حُسب تركيز مركب اللوفاستاتين وفق العلاقة الآتية (Mielcarek *et al*., 2009):

$$\text{تركيز اللوفاستاتين (ملغ/غ)} = \frac{\text{تركيز اللوفاستاتين(ملغ/مل)}}{\text{وزن الركازة (غ)}} \times \text{عامل التمديد}$$

- تم الحصول على تركيز مركب اللوفاستاتين بواحدة ملغ/مل من المنحني العياري لمركب لوفاستاتين قياسي (الشكل1).



شكل (1): المنحني العياري لتغيرات الامتصاصية Abs بدلالة التركيز ملغ/ل لمركب لوفاستاتين قياسي

6. اختبار فعالية مركب اللوفاستاتين في تثبيط نمو الفطر *Aspergillus fumigatus* :

أُختبرت فعالية مركب اللوفاستاتين في تثبيط نمو الفطر *A.fumigatus* بطريقة الغذاء المسموم The Poison Food method (Nene and Thapilyal, 2002) مع بعض التعديلات المناسبة للبحث، حُضرت الخلاصة بتراكيز (5، 10، 20، 40) ملغ/مل، ثم أُضيف (1) مل من كل تركيز من التراكيز المذكورة إلى 10 مل من مستنبت (SDA) وحُرّك جيداً، لتصبح التراكيز النهائية (0.5، 1، 2، 4) ملغ/مل، ثمّ صُب المزيج في أطباق بتري بلاستيكية قطرها 9 سم، تُركت لتتصلب في درجة حرارة المختبر، أُخذ بعد ذلك قرص بقطر(5) مم من أطراف مستعمرة الفطر المدروس بعمر أسبوع، وُضعت في منتصف كل طبق، أما الأطباق الشاهدة فتمت باستنبات الفطر على أطباق (SDA) خالية من اللوفاستاتين، حُضنت الأطباق عند درجة حرارة 28 ± 2^0C لمدة (7) أيام .(Dhar *et al*., 2015)

تضمنت التجربة ثلاثة مكررات لكل تركيز إضافةً إلى الشاهد، ثم قُيسَ قطر المستعمرة النامية في منتصف كل طبق، حُسب متوسط أقطار نمو المستعمرات الفطرية للمكررات الثلاثة، ومن ثمّ النسبة المئوية للتثبيط في كل معاملة وفق المعادلة الآتية (Yigit and Korukluoglu, 2007):

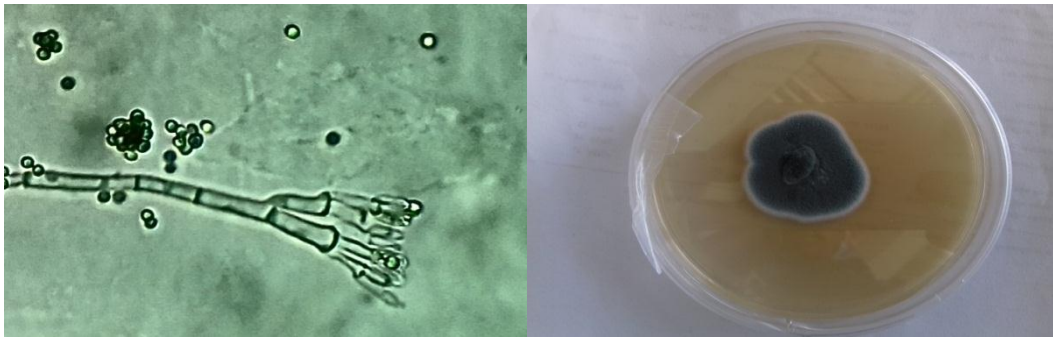
$$\textbf{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{متوسط قطر مستعمرة الشاهد} - \text{متوسط قطر المستعمرة المعاملة}}{\text{متوسط قطر مستعمرة الشاهد}} \times 100$$

النتائج والمناقشة:

1. تشخيص الفطريات:

a. تشخيص الفطر *P.chrysogenum*:

يبين (الشكل2) مستعمرة فطر *P.chrysogenum* نامية على مستنبت (PDA) بعد 7 أيام من التحضين عند درجة حرارة 25^0C، حيث ظهرت بلون أزرق من الناحية العلوية وبلون أصفر باهت من الناحية السفلية، أما مجهرياً (الشكل3) فقد ظهر الحامل الكونيدي متفرع إلى تفرعات ثنائية وثلاثية، تتوضع في نهايته خلايا اسطوانية الشكل تسمى بالخلايا المولدة للأبواغ (phialides) يتراوح طولها بين (6–7) ميكرون، وظهرت الخلايا الحاملة للفياليد (metulae) بشكل خلايا اسطوانية بأطوال (8-10) ميكرون، بينما ظهرت الأبواغ بشكل كروي أملس أبعادها بين (2-3) ميكرون.

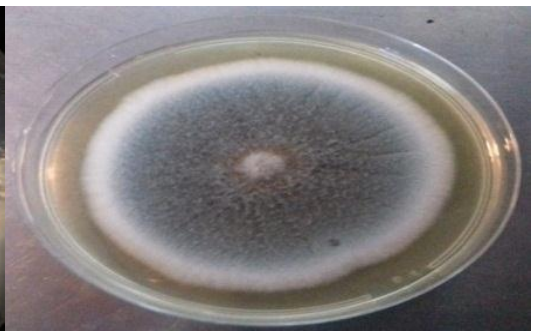


شكل (2): مستعمرة فطر *P.chrysogenum* نامية على مستنبت (PDA) بعمر 7 أيام

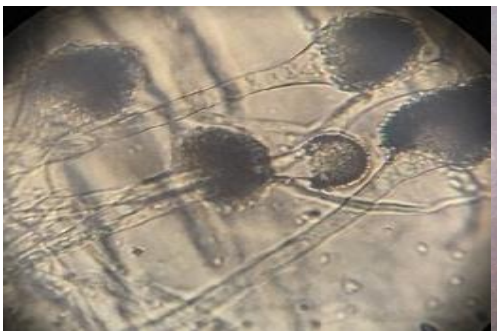
شكل (3): الحامل الكونيدي لفطر *P.chrysogenum* تكبير (40X10)

.b

يبين (الشكل4) مستعمرة فطر *A.fumigatus* نامية على مستنبت (SDA) بعد 7 ايام من التحضين عند درجة حرارة 30^0C، حيث ظهرت بلون أخضر مزرق من الناحية العلوية للطبق وبلون أصفر داكن من الناحية السفلية، أما مجهرياً (الشكل5) فقد ظهر الحامل الكونيدي وفي نهايته انتفاخ، يتوضع عليه صف أو صفين من الخلايا والتي تحمل خلايا قارورية الشكل تسمى بالخلايا المولدة للأبواغ (phialides)، وقد بلغت ثخانة الحامل الكونيدي (4.5-7) ميكرون، بينما ظهرت الأبواغ بشكل دائري وحيدة الخلية رمادية اللون تراوحت أبعادها بين (1.85-2) ميكرون.



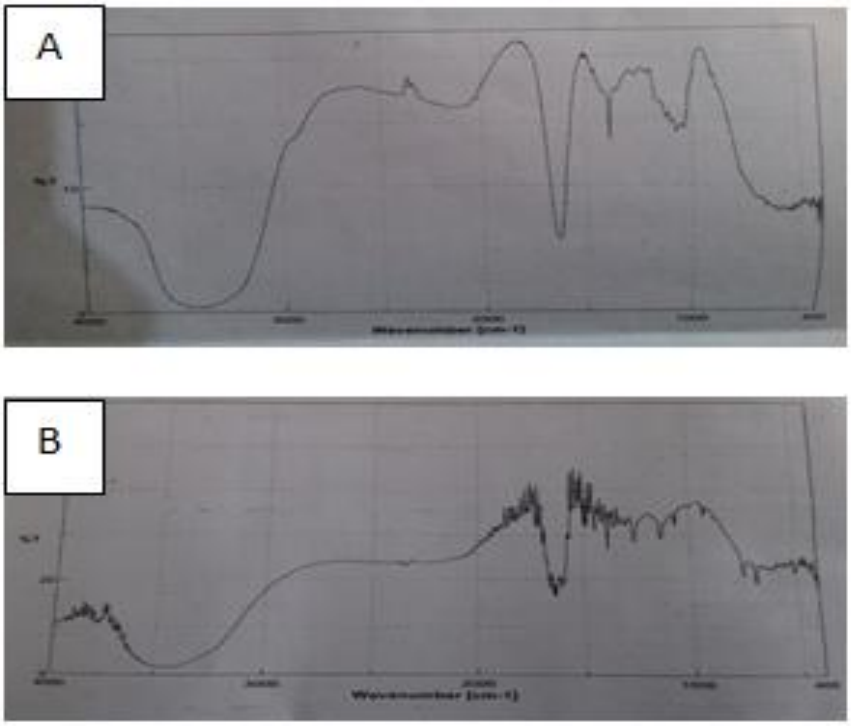
شكل (4): مستعمرة فطر *A.fumigatus* نامية على مستنبت (SDA) بعمر 7 أيام



شكل (5): الحوامل الكونيدية لفطر *A.fumigatus* تكبير (40X10)

2. نتائج الدراسة التحليلية لمركب اللوفاستاتين باستخدام جهاز مطيافية الاشعة تحت الحمراء FTIR:

يبين (الشكل6) طيف IR لمركب لوفاستاتين عياري ولعينة من مركب اللوفاستاتين المستحصل عليه من الفطر *P.chrysogenum*، وأهم الزمر الوظيفية التي يحتويها: (OH stretching) والتي ظهرت عند رقم موجة 3514.63 سم$^{-1}$، (olefinic C-H stretching) عند الرقم 2950 سم$^{-1}$، (C-H asymmetric stretching) عند 2360.44 سم$^{-1}$، (lactone and ester carbonyl stretch) عند 1585.2 سم$^{-1}$، (methyl and methylene bending) عند (1375- 1440.87) سم$^{-1}$، (C-O-H bending) عند 1342.55 سم$^{-1}$، (ester C-O-C symmetric) عند 1050.88 سم$^{-1}$، و (meta disturbed benzene-strong) عند 750.33 سم$^{-1}$، ويؤكد وجود الزمر الوظيفية السابقة في كلا الطيفين تواجد مركب اللوفاستاتين في العينة المستخلصة (Upendra *et al*., 2013).



شكل(6): A) طيف IR لمركب لوفاستاتين عياري، B) طيف IR لمركب لوفاستاتين مستحصل عليه من الفطر *P.chrysogenum*

3. نتائج الدراسة التحليلية لمركب اللوفاستاتين باستخدام جهاز المطيافية الضوئية (السبيكتروفوتومتر):

يُبين الجدول (1) تركيز مركب اللوفاستاتين في العينات المستخلصة خلال أيام تخمير مختلفة، إذ لُوحظ ازدياد تركيز مركب اللوفاستاتين بازدياد المدة الزمنية للتخمير حتى اليوم العاشر، وبلغ متوسط تركيز مركب اللوفاستاتين (21.5±0.75 ، 27.1±0.85، 41.83±1.60) ملغ/غ ركازة جافة وذلك في الأيام (4، 7، 10) على التتالي، بينما لُوحظ انخفاض متوسط تركيز مركب اللوفاستاتين في اليوم الثالث عشر للتخمير، حيث بلغ (25.03±0.55) ملغ/غ ركازة جافة.

الجدول(1): متوسط تركيز مركب اللوفاستاتين (ملغ/غ) في العينات المستخلصة خلال أيام تخمير مختلفة± الانحراف المعياري

مدة التخمير (يوم)	4	7	10	13
تركيز اللوفاستاتين (ملغ/غ)	21.5bc±0.75	27.1b±0.85	41.83a±1.60	25.03b±0.55

*** الحروف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية عند مستوى دلالة 5%.**

توافقت نتائج الدراسة مع نتائج دراسات سابقة (Ouda *et al*., 2015; Dewi *et al*., 2011)، والتي بينت اختلاف تركيز مركب اللوفاستاتين باختلاف المدة الزمنية للتخمير، كما توافقت مع نتائج درسات أخرى بينت أن استخدام مزيج

من عدة ركائز عضوية في عملية التخمير يعطي تركيز مرتفع من مركب اللوفاستاتين مقارنةً باستخدام ركازة عضوية مفردة (Al-Sa'ady and Aziz, 2020; Ab Rashid *et al*., 2014).

توافقت نتائج الدراسة أيضاً مع نتائج دراسات أخرى، أظهرت ازدياد تركيز مركب اللوفاستاتين بازدياد المدة الزمنية للتخمير حتى اليوم العاشر، وانخفاضه بعدها .(Munir *et al*., 2018; Patil *et al*., 2011)، ويمكن أن يُعزى انخفاض التركيز إلى تموت الخلية الفطرية وحدوث تحلل مائي لمركب اللوفاستاتين في وسط التخمير، إضافةً لإنتاج بعض المركبات مثل حمض الإيتاكونيك، والذي يؤثر في تكوين بعض الأنزيمات المسؤولة عن اصطناع مركب اللوفاستاتين (Lai *et al*., 2007) .

يعود إنتاج مركب اللوفاستاتين لوجود مركبات مختلفة تشكل مصدراً مغذياً للفطر المدروس، تحفز نمو الفطر وبالتالي زيادة العمليات الاستفلابية، تُشكل نخالة القمح مصدر غني بالعديد من المغذيات مثل الكربوهيدرات، الحموض الأمينية والأملاح المعدنية كأملاح (الحديد، المغنيزيوم، الزنك، والنحاس)، بينما تتميز نخالة الشوفان بغناها بالكربوهيدرات، الفيتامينات وخاصةً حمض الفوليك، الحموض الدسمة المشبعة وغير المشبعة مثل الأوميغا 3 والأوميغا 6، إضافةً لأملاح المعادن (الكالسيوم، الحديد، البوتاسيوم، والفوسفور)، كما أن فول الصويا يعد مصدر جيد للعديد من المركبات الكربونية والنتروجينية يدعم تأثير المصادر الأخرى المضافة في تجربة التخمير، والتي تؤمنها قشور البطاطا، مستخلص الخميرة، والحليب البودرة، حيث تتميز مجتمعةً بغناها بالكربوهيدرات كالنشاء، الغلوكوز واللاكتوز، إضافةً لوجود العديد من الفيتامينات والحموض الأمينية والحموض الدسمة (Mouafi *et al*., 2016; Jacqueline and Marcus, 2013; Jia *et al*., 2010).

4. نتائج فعالية مركب اللوفاستاتين في تثبيط نمو الفطر *A.fumigatus* :

يبين الجدول(2) متوسط أقطار المستعمرات الفطرية (سم) والنسب المئوية لتثبيط نمو الفطر *A.fumigatus* بوجود تراكيز مختلفة من مركب اللوفاستاتين المستحصل عليه، حيث لُوحظ ازدياد الفعالية بازدياد التركيز وبلغت نسب التثبيط (72.12، 73.93، 78.78، 89.09)% وذلك عند التراكيز (0.5، 1، 2، 4) ملغ/مل على التتالي، توافق ذلك مع دراسات أخرى (Dhar *et al*., 2015; Upendra *et al*., 2013; Cabral *et al*., 2013) بينت فعالية بعض مركبات الستاتين ومنها مركب اللوفاستاتين في تثبيط نمو بعض الأحياء الدقيقة، ويعود التأثير السمي المحتمل لتلك المركبات لوجود الوظيفة الفينولية والتي تُثبط نمو الفطر من خلال الارتباط ببعض المركبات الداخلة ببنية الغشاء السيتوبلاسمي، مما يؤدي لإحداث ثقوب في الغشاء تُنقص المحتوى السيتوبلاسمي للخلية (Lucchini *et al*., 1990).

الجدول(2): متوسط أقطار المستعمرات الفطرية (سم) والنسب المئوية لتثبيط نمو الفطر *A.fumigatus* بوجود تراكيز مختلفة من مركب اللوفاستاتين في اليوم السابع من نمو الفطر

الشاهد		0.5 ملغ/مل		1 ملغ/مل		2 ملغ/مل		4 ملغ/مل	
القطر	%	القطر	%	القطر	%	القطر	%	القطر	%
8.25	0	2.3	72.12bc	2.15	73.93b	1.75	78.78b	0.9	89.09a

*** الحروف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية عند مستوى دلالة 5%.**

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

1. بينت الدراسة إمكانية استخلاص مركب اللوفاستاتين من الفطر *P.chrysogenum* وبتركيز بلغ 41.83 ملغ/غ ركازة عضوية جافة وذلك عند اليوم العاشر للتخمير.
2. أظهر مركب اللوفاستاتين المستخلص من الفطر *P.chrysogenum* تثبيطاً لنمو الفطر *A.fumigatus* بنسبة بلغت 89.09% عند التركيز 4 ملغ/مل.

التوصيات:

1. دراسة إمكانية استخلاص مركب اللوفاستاتين من فطريات أخرى.
2. اختبار فعالية مركب اللوفاستاتين كمنتج طبيعي في تثبيط نمو فطريات ممرضة أخرى.
3. إجراء دراسات لاحقة لتقييم فعالية مركب اللوفاستاتين على الأحياء Invivo.

References:

1-ABASTABAR, M., MIRHENDI, H., MATEHKOLAEI, A.R., MOHAMMADI, R., GHOJOGHI, A., and AKHTARI, J. Genetic and Morphological Diversity of the Genus *Penicillium* From Mazandaran and Tehran Provinces, Iran. Jundishapur J Microbiol., Vol(9) No(1)2016, 1-7.

2-AB RASHID, S., IBRAHIM, D., and ARYANTHA, I.N.P. Isolation and Screening of Lovastatin Producing Fungi: *Fusarium pseudocircinatum* IBRL B3-4 as a Potential Producer, JOURNAL OF PURE AND APPLIED MICROBIOLOGY, Vol(8) No(3) 2014, 1763-1772.

3-AL-SA'ADY, A.J.R., and AZIZ, G.M. Optimization of Lovastatin Production from A Local Isolate of *Aspergillus terreus* A50 in Solid State Fermentation by Classical and Statistical Methods. Iraqi Journal of Science, Vol(61) No(10) 2020, 2525-2539.

4-BARRIOS-GONZALEZ, J., and MIRANDA, R.U. *Appl. Microbiol*. Biotechnol., Vol(85) 2010, 869 - 883.

5- BEDFORD, J.D, SCHWEIZER, E., HOPWOOD, D.A., and KHOSLA, C. Expression of a fungal polyketide synthase in the bacterium *Streptomyces coelicolor* A3(2). J Bacteriol, Vol(177) 1995, 4544-4548.

6-CABRAL, M.E., FIGUEROA, L.I.C., and FARINA, J.I. Synergistic antifungal activity of statin–azole associations as witnessedby Saccharomyces cerevisiae- and Candida utilis-bioassays and ergosterol quantification, Rev Iberoam Micol, Vol(30) No(1) 2013, 31–38.

7-CASAS LÓPEZ, J.L., SÁNCHEZ PÉREZ, J.A., FERNÁNDEZ SEVILLA, J.M., ACIÉN FERNÁNDEZ, F.G., MOLINA GRIMA, E., and CHISTI, Y. Fermentation optimization for the production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: Use of response surface methodology. J. Chem. Technol. Biotechnol, Vol(79) 2004, 1119–1126.

8-CHAKRAVARTI, R., and SAHAI, V. Compactin-a review. Appl Microbiol Biotechnol, Vol(64) 2004, 618-24.

9-CHANAKYA, P., LATHA, P.M., and Manipati srikanth, M. Solid state fermentation for the production of lovastatin by *Aspergillus fischerii*. Res J Pharm Sci Biotech, Vol(1)2011, 9-13.

10-CHO, H.Y., GINALSKA, G., BANCERZ, R., and CHO, N.S. Culture Conditions of Psychrotrophic Fungus, *Penicillium chrysogenum* and Its Lipase Characteristics. Journal-Faculty of Agriculture Kyushu University, Vol(52) No(2) 2007, 281-286.

11-DEWI, R.T., ARTANTI, N., MULYANI, H., and LOTULUNG, P.D.N. production of lovastatin and sulochrin by *Aspergillus terreus* using solid state fermentation, Makara, Teknologi, Vol(15) No(1) 2011, 1-4.
12-DHAR, R., CHOUDHURY, G.B., and NIGAM, V.K. Screening of different fungi for production of lovastatin, Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, Vol(5) No(44) 2015, 24-29.
13-DIBA, K., KORDBACHEH, P., MIRHENDI, S.H., REZAIE, S., and MAHMOUDI, M. Identification of *Aspergillus* species using morphological characteristics. Pak. J. Med. Sci, Vol(23) No(6) 2007, 867-872.
14-GUPTA, K., MISHRA, PK., and SRIVASTAVA. A Correlative Evaluation of Morphology and Rheology of *Aspergillus terreus* during Lovastatin Fermentation, Biotechnology and Bioprocess Engineering, Vol(12) 2007, 140-146.
15-IMMANUEL, SR., and ANUSHA, P. Production of Lovastatin by Soil Microfungi *Rhizopus oryzae*, ACTA SCIENTIFIC MEDICAL SCIENCES, Vol(3) No(1) 2019, 70-74.
16-JACQUELINE, B. and MARCUS, M. S. Food Science Basics: healthy cooking and baking demysti-fied: The Science behind Healthy Foods, Cooking and Baking. *The Science and Practice of Healthy Cooking*. Vol(6) 2013, 51-97.
17-JAIVEL, N., and MARIMUTHU, P. Optimization of lovastatin production in solid state fermentation by *Aspergillus terreus*. Int J Eng Sci Technol, Vol(2) 2010, 2730-2733.
18-JAVED, S., MERAJ, M., MAHMOOD, S., HAMEED, A., NAZ, F., HASSAN, S., and IRFAN, R. Biosynthesis of lovastatin using agro-industrial wastes as carrier substrates, Tropical Journal of Pharmaceutical Research February; Vol(16) No(2) 2017, 263-269.
19-JIA, Z., ZHANG, X., ZHAO, Y., and CAO, X. Enhancement of lovastatin production by supplementing polyketide antibiotics to the submerged culture of *Aspergillus terreus*. Appl. Biochem. Biotechnol, Vol(160) 2010, 2014-2025.
20-LAI, L.S.T., HUNG, C.S., and LO, C.C. Effects of Lactose and Glucose on Production of Itaconic Acid and Lovastatin by *Aspergillus terreus* ATCC 20542. Journal Of Bioscience AND Bioengineering, Vol(104) No(1) 2007, 9–13.
21-LAMOTH, F. *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. Frontiers in Microbiology, Vol(7) 2016, 1-8.
22- LUCCHINI, J.J., CORRE. J., and CREMIEUX , A. Antibacterial activity of phenolic compounds and aromatic alcohols. Res Microbiol Vol(141) 1990, 499–510.
23-MARCIN, B., and STANISLAW, L. Physiological, morphological and kinetic aspects of lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus.* Biotechnol J, Vol(4) 2009, 1-61.
24-MENDOZA-OLIVA, A., FERRERA, B., FRAGOSO-MEDINA, J., and ARIAS, C. Lovastatin Differentially Affects Neuronal Cholesterol and Amyloid-b Production in vivo and in vitro, CNS Neuroscience & Therapeutics, Vol(21) 2015, 631–641.
25-MCCLENNY, N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. J. Med. & Vet. Mycol, Vol(1) No(43) 2005, 125-128.
26- MIELCAREK, J., NASKRENI, M., and GROBELNY, P. Photochemical properties of simvastatin and lovastatin by radiation, J. Therm. Anal. Calorim. Vol(96) 2009, 301–305.
27-MOUAFI, F.E., IBRAHIM, G.S., and ABO ELSOUD, M.M. Optimization of lovastatin production from *Aspergillus fumigatus*, Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, Vol(14) 2016, 253–259.

28-MUNIR, N., MURTAZA, M.A., ASGHAR, M., and AKHTER, N. Enhanced production of Lovastatin by filamentous fungi through solid state fermentation. Pak. J. Pharm. Sci., Vol(31) No(4) 2018, 1583-1589.
29-NAZZAL, S., SMALYUKH , I.I., LAVRENTOVICH, O.D., and KHAN , M.A. Preparation and in vitro characterization of a eutectic based semisolid self-nanoemulsified drug delivery system (SNEDDS) of ubiquinone: mechanism and progress of emulsion formation. Int J Pharm,Vol(235) 2002, 247-265.
30-NENE, Y., and THAPILYAL, L. *Poisoned food technique of fungicides in plant disease control*. (3rd eds). Oxford and IBH Publishing Company, New Delhi, 2002.
31-OUDA, S.M., GABR, S.A., YOUNIS, N.A., SAID, M.E., SABRY, A.A., and SAMAH, A.Y. Optimization of Different Parameters on Lovastatin Production by *Aspergillus niger* I4 and *Aspergillus terreus* I8 and its Hypocholesterolemic Effect, Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, Vol(6) No(5) 2015, 1439-1448.
32-PANASURIYA, C.R., and SINGHAL, R.S. Response surface methodology for optimisation of lovastatin production by solid state fermentation. Braz J Microbiol; Vol(41) 2010, 164-72.
33-PATIL, R.H., KRISHNAN, P., and MAHESHWARI, V.L. Production of Lovastatin by Wild Strains of *Aspergillus terreus*. Natural Product Communications, Vol(6) No(2) 2011, 183-186.
34-PUSHPA, H., PRIYATA, H., NOMITA DEVI, K., VIJAYALAKSHMI, A., and RAMESH, D.H. Screening of lovastatin (HMG-CoA reductase inhibitor) from edible wild mushrooms, Current Research in Environmental & Applied Mycology, Vol(6) No(3) 2016, 190-196.
35-RAGHUNATH, R., RADHAKRISHNA, A.J., and ANGAYARKANNI, M. Palaniswamy, Production and cytotoxicity studies of Lovastatin from *Aspergillus niger* PN2 an endophytic fungi isolated from Taxus baccata, IJABPT, Vol(3) No(3) 2012, 562–570.
36-REDDY, D.S.R., LATHA, P.D., and LATHA, H.K.P.J. Production of lovastatin by solid state fermentation by *Penicillium funiculosum* NCIM 1174. Drug Invention Today, Vol(3) 2011, 7-75.
37-REFAI, M. *Monograph on the genus Penicillium*. A guide for historical, classification and identification of *Penicillim*, their industrial applications and detrimental effects, 2015.
38-REVERBERI, M., RICELLI, A., ZJALIC, S., FABBRI, A., and FANELLI, C. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol(87) 2010, 899-911.
39-SERAMAN, S., RAJENDRAN, A., and THANGAVELU, V. Statistical optimization of anticholesterolemic drug lovastatin production by the red mold *Monascus purpureus*. Food and bioproducts processing, Vol(88) 2010, 266–276.
40-SREENIVASAN, A., SHUBAHGAR, S., ARVINDAN, R., and VIRUTHAGIRI, T. Microbial production and biomedical applications of lovastatin. Indian J Pharm Sci; Vol (70) 2008, 701-709.
41-SRINU, M., BHUSHAN, G.V.P., and MOGES, F. Screening of HMG CoA reductase inhibitor producing marine actinomycetes. Pharm Res Health Care, Vol(2) 2010, 66-74.
42-TANDON, V., BANO, G., KHAJURIA, V., PARIHAR, A., and GUPTA, S. Pleiotropic effects of statins. Ind J Pharmacol, Vol(37) 2005, 77-85.
43-UPENDRA, RS., KHANDELWAL, P., AMIRI, ZR., SHWETHA, L, and AUSIM, M. Screening and Molecular Characterization of Natural Fungal Isolates Producing Lovastatin, J Microb Biochem Technol, 2013, 2-5.

44-YIGIT, A., and KORUKLUOGLU, M. The effect of potassium sorbate, NaCl and PH on the growth of food spoilage fungi. Annals Microbiol., Vol(57) No(2) 2007, 209-215.
45-YU, L., SU, M., and LIU, Q. Myelodysplastic syndrome with *Aspergillus fumigatus* infection: A case report and literature review, *Radiology of Infectious Diseases xx,* 2016, 1-3.