Applied Research in Chemical - Polymer Engineering

Vol. 7, No.3
page 49-66 ,fall 2023

Evaluating the Metabolic Activity of Aspergillus niger for Organic Acid Production Considering the Impact of Small Molecules in Culture Media

Ali Naderi[1], Seyyed Mohammad Mousavi[1*]

1- Biotechnology Group, School of Chemical Engineering, University of Tarbiat Modares, Tehran, Iran, P.O. Box: 14115-111.

Abstract

Research Subject: Aspergillus niger stands as a versatile filamentous fungus renowned for its industrial significance in producing various organic acids, notably citric acid and oxalic acid. Low sugar concentration as substrate leads to the production of oxalic acid, therefore, this article delves into the intricate metabolic machinery orchestrating the synthesis of these acids within A. niger, shedding light on the pivotal role of culture media composition and metabolic activity.

Research Approach: Through a comprehensive review of A. niger metabolism, this study elucidates the pathways involved in the biosynthesis of citric acid and oxalic acid, unraveling the intricate interplay of enzymatic cascades and regulatory mechanisms governing their production. Furthermore, it explores the impact of small molecules on metabolic flux through regulatory media, offering insights into strategies for controlling metabolic flux in order to eliminate oxalic acid production and amplify the citric acid production considering low sugar content of 30 g/L.

Main Results: After careful review of previous researches, key reactions and genes was found and introduced for future researches in order to control the A. niger products. Examination of small molecule as a regulator in culture media not only elucidated the importance of culture media composition but also employing them helped us to redirect flux from oxalate toward citrate. NH_4, Leucine, Cysteine, NaF, Glutathione, and Metformin were all found to be effective in the elimination of oxalic acid. In this regard, employing them leads to the production of 1868, 1530, 2093, 2250, 787, and 675 mg/L oxalic acid in comparison to the control culture media in which 5560 mg/L oxalic was produced. In addition, elimination of oxalic acid in some cases leads to the production of more acids like the culture containing NH_4 , Cysteine and Metformin.

key words

Aspergillus niger

Regulatory defined medium

Metabolic activity

Organic acid

Small molecule

---

*To whom correspondence should be addressed:
mousavi_m@modares.ac.ir

پژوهش‌های کاربردی
مهندسی شیمی- پلیمر

فصلنامه علمی - پژوهشی بین رشته ای
سال هفتم، شماره ۳، نسخه ۱
پاییز ۱۴۰۲ ، صفحه ۶۶-۴۹

ارزیابی سوخت‌وساز سلولی قارچ آسپرژیلوس نایجر در تولید اسیدهای آلی با در نظر گرفتن نقش مواد تنظیمی در محیط کشت

علی نادری[1]، سیدمحمد موسوی[1*]

۱-گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵

چکیده

موضوع تحقیق: آسپرژیلوس نایجر می‌تواند به‌عنوان کارخانه سلولی تولیدکننده انواع اسیدهای آلی و آنزیم‌ها به‌کار گرفته شود. از مهم‌ترین این محصولات می‌توان به سیتریک‌اسید و اگزالیک‌اسید اشاره کرد. غلظت پایین قند در کشت این قارچ منجر به تولید اگزالیک‌اسید به‌عنوان محصول جانبی سیتریک‌اسید می‌شود. با توجه به این امر، بررسی سوخت‌وساز سلولی و ارتباط آن با اجزای محیط کشت می‌تواند روشنگر دلیل این امر و یافتن راهی برای افزایش بازدهی تولید در این قارچ باشد.

روش تحقیق: پس از مطالعه همه‌جانبه سوخت‌وساز سلولی مرکزی این قارچ، تمام مسیرهای منتهی به تولید سیتریک‌اسید و اگزالیک‌اسید و برهم‌کنش مواد درون‌سلولی و نقش تنظیمی آن‌ها بر یکدیگر مورد بررسی قرار گرفت تا بتوان مسیرهای مهم برای تنظیم درون‌سلولی برای این پژوهش و پژوهش‌های آتی را یافت. پس از آن مواد تنظیمی با روشی دقیق مبتنی بر تشابه آنزیمی از پایگاه داده برندا به‌دست آمد و در آزمایشگاه توسط محیط کشت‌های تنظیمی مورد بررسی روی کشت قارچ آسپرژیلوس نایجر قرار گرفت. این مهم با این هدف انجام شد تا بتوان در مقادیر کم قند ۳۰ گرم بر لیتر گلوکز، شار را از اگزالات به سیترات منتقل و تولید اگزالیک‌اسید را کاهش و سیتریک‌اسید را افزایش داد.

نتایج اصلی: پس از بررسی مطالعات قبلی واکنش‌ها و ژن‌های کلیدی برای تحقیقات آتی معرفی شدند. بررسی اثرگذاری کوچک‌مولکول‌ها به‌عنوان مواد تنظیمی نه‌تنها اهمیت ترکیب مواد موجود در محیط کشت را برای ما روشن کرد بلکه با این روش توانستیم شار سوخت‌وسازی را از اگزالات به سمت سیترات هدایت کنیم. آمونیوم، لوسین، سیستئین، سدیم‌آزید، گلوتاتیون و متفورمین همگی در از بین بردن اگزالیک‌اسید مؤثر بودند. در این راستا، تولید اگزالیک‌اسید به مقدار ۱۸۶۸، ۱۵۳۰، ۲۰۹۳، ۲۲۵۰، ۷۸۷ و ۶۷۵ mg/L در مقایسه با محیط کشت شاهد که در آن ۵۵۶۰ mg/L اگزالیک تولید شده بود، مشاهد شد. علاوه بر این، حذف اگزالیک‌اسید در برخی موارد منجر به تولید اسیدهای بیشتری مانند کشت حاوی آمونیوم، سیستئین و متفورمین شد.

کلمات کلیدی

آسپرژیلوس نایجر

محیط کشت تنظیمی

فعالیت سوخت‌وسازی

اسیدهای آلی

کوچک‌مولکول

***مسئول مکاتبات:**
mousavi_m@modares.ac.ir

۱ مقدمه

آسپرژیلوس نایجر به‌عنوان یکی از گونه‌های قارچی برای اولین بار توسط کوری در سال ۱۹۱۷ به‌دلیل قابلیت بالای آن در تولید سیتریک‌اسید کشف شد [۱]. علاوه بر سیتریک‌اسید این سویه قابلیت تولید اسیدهای گلوکونیک، اگزالیک و مالیک و بسیاری از آنزیم‌ها اعم از سلولاز، پکتیناز و گلوکوآمیلاز را دارد. تخمیر این سویه توسط سازمان غذا و داروی آمریکا به‌عنوان سویه عموماً ایمن شناخته شده است [۲]. سیتریک‌اسید اسیدآلی ضعیف با فرمول شیمیایی $C_6H_8O_7$ است. این اسید به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین محصولات این قارچ در صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی، دارویی و شوینده‌ها کاربرد فراوانی دارد. تولید این محصول پرکاربرد، حدود ۲ میلیون تن در سال گزارش شده که بیش از ۸۰ درصد آن توسط قارچ آسپرژیلوس نایجر و به روش تخمیری تولید می‌شود [۳]. دلیل استفاده گسترده از این سویه، بازدهی و بهره‌وری مناسب، کمتر بودن محصولات جانبی در مقایسه با سویه‌های دیگر و ترشح آنزیم‌های متنوع برای استفاده از منابع ارزان کربنی همچون ملاس عنوان شده است [۴]. اگزالیک‌اسید با فرمول شیمیایی $C_2H_2O_4$ به‌عنوان یکی از محصولات جانبی در تولید سیتریک‌اسید محسوب می‌شود. کاربرد اصلی این اسید آلی در فرآیندهای تمیزکاری، سفیدکاری و عامل از بین برنده زنگ آهن بیان شده است. همین‌طور می‌تواند به‌عنوان عامل تثبیت‌کننده در رنگ‌ها به کار رود [۵].

سویه و محیط کشت به‌عنوان دو عنصر اصلی فرایندهای تخمیری محسوب می‌شوند به‌طوری که میزان و نوع مواد محیط کشت تعیین‌کننده رفتار سویه در رشد و تولید محصول است. نوع مواد محیط کشت را می‌توان با انجام سعی و خطا برای مواد ضروری مختلف مثل منبع کربن یا مهندسی سوخت‌وساز بسته به نوع سویه تعیین کرد. همین‌طور غلظت مناسب را می‌توان با روش‌های مختلف طراحی آزمایش مثل روش سطح پاسخ (Response Surface Methodology)، پلاکت برمن (Placket Burman) و غیره به‌دست آورد. یافتن غلظت بهینه، پارامتر بسیار مهمی است از این جهت که کم یا زیاد بودن غلظت می‌تواند بر شار مسیرهای سوخت‌وسازی سویه یا در شبکه تنظیمی تأثیر گذاشته و عملکرد بهینه سویه را دچار اختلال کند. در پژوهشی که با روش پاسخ سطح طراحی آزمایش انجام شد، غلظت بهینه منبع کربن و pH اولیه برای تولید بیشتر سیترات توسط قارچ آسپرژیلوس نایجر به‌دست آمد [۶]. محیط های کشت مختلفی مانند سابورو دکستروز آگار (Sabouraud Dextrose Agar - SDA)، پوتیتو دکستروز آگار (Potato Dextrose Agar - PDA)، سیزاپک (Czapek)، مالت اکسترکت (Malt Extract Agar) آگار معمولاً برای تسهیل رشد و شناسایی قارچ های از گونه آسپرژیلوس استفاده می‌شوند. هر محیطی ترکیبات غذایی و شرایط مناسب برای کشت را در خود دارد. به‌طور خاص برای آسپرژیلوس نایجر، SDA به‌دلیل تطبیق‌پذیری آن اغلب مورد استفاده قرار می‌گیرد. سیزاپک به‌عنوان یکی از پرکاربردترین‌ها می‌تواند برای کشت‌های حالت مایع به کارگرفته شود.

بهینه‌سازی عملکرد سویه یا به بیان دیگر توسعه سویه مجموعه روش‌ها و ابزارهایی است که به‌کار گرفته می‌شود تا عملکرد سویه در جهت رشد و تولید محصول به مقدار مطلوب برسد. غربالگری سویه‌های بهتر، جهش‌زایی و اصلاحات ژنتیکی از جمله کارهایی است که به‌طور سنتی در توسعه سویه انجام می‌شود. مطالعات متعددی در راستای بهینه‌سازی تولید اسیدهای آلی توسط این سویه انجام گرفته که رویکردهای متفاوتی را دنبال کرده‌اند. بهبود سازوکار مصرف منبع کربنی و آنزیم‌های آب‌کافت‌کننده، رفع یا کاهش بازدارندگی مواد مختلف موجود در محیط کشت یا مواد درون‌سلولی روی آنزیم مسیرهای هدف، افزایش شار مسیرهای اصلی و واکنش‌های آناپلروتیک در تهیه پیش‌سازها، کاهش فعالیت واکنش‌های تجزیه‌کننده محصولات هدف، افزایش فعالیت چرخه تنفسی و چرخه تنفسی جایگزین، بهینه‌سازی مقادیر مواد محیط کشت و فلزات موجود کم مقدار، افزایش بیان پروتئین‌های انتقال‌دهنده و ترشح‌کننده محصولات هدف به محیط و کاهش بیان ژن محصولات جانبی از جمله کارهایی هستند که می‌توانند برای افزایش تولید و بهینه‌سازی به کار روند [۷]. استفاده از داده‌های امیکس، توسعه مدل‌های مقیاس ژنوم و الگوریتم‌های مختلف، ابزارهای نوین مهندسی ژنتیک همچون فناوری کریسپر همگی ابزارهایی هستند که مهندسی سوخت‌وساز را سرعت بخشیدند. در توسعه هدفمند و تنظیم سویه می‌توان تولید محصولات جانبی را کنترل کرد تا علاوه بر کاهش مصرف بیهوده منابع کربنی، فرایندهای جداسازی و خالص‌سازی را آسان‌تر و کم هزینه‌تر کرد.

روجتر و همکاران در سال ۱۹۹۹ موفق شدند با حذف ژن‌های بیان‌کننده آنزیم‌های گلوکز اکسیداز و اگزالواستات هیدرولاز در pH برابر ۵ در حضور منگنز، سیتریک‌اسید تولید کنند و تولید محصولات جانبی را از بین ببرند [۸]. سیترات به‌عنوان بازدارنده آنزیم PFK می‌تواند شار مسیر گلیکولیز را کاهش دهد. بنابراین افزایش شار مسیر گلیکولیز در زمان تولید سیتریک‌اسید امری ضروری است. کاپودر و همکاران در سال ۲۰۰۹ با اصلاحات پساترجمه روی این آنزیم موفق به تولید گونه‌ای از این آنزیم شد که کوتاه‌تر و مؤثرتر است؛ به‌طوری‌که اگر بیان آن افزایش یابد، می‌تواند منجر به افزایش تولید سیتریک‌اسید به میزان ۷۰ درصد شود [۹]. اثر بازدارندگی ATP روی PFK و کاهش بار اکسیداسیونی روی سویه با فعال‌تر شدن مسیر

اکسایشی جایگزین (AOX) می‌تواند کاهش یابد. سویه در این مسیر تعداد الکترون کمتری از همتافت‌های (Complexes) ۳ و ۴ عبور می‌دهد و بدین ترتیب شیب کمتری از الکترون ایجاد می‌شود و فعالیت ATP سنتاز کاهش می‌یابد و در نهایت ATP کمتری تولید می‌شود. هو و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان دادند با افزایش بیان ژن aox۱ تولید سیترات افزایش می‌یابد [۱۰]. یکی از اثرات فلز منگنز در محیط نقش آن در فعال‌سازی همتافت ۱ است بدین شکل که با نبود این عنصر، فعالیت همتافت ۱ کاهش یافته و فعالیت مسیر جایگزین AOX افزایش می‌یابد. فعال‌سازی عملکرد این مسیر و بهبود تولید سیتریک‌اسید با بازدارندگی سوکسینات سیتوکروم c توسط موادی همچون آنتی‌مایسین‌آ نیز بررسی شده است که نتیجه مثبت داشته است [۱۱]. نیلسن و همکاران در سال ۲۰۰۸ با مهندسی چرخه rTCA موفق شدند با افزایش بیان ژن آنزیم‌های مالات دهیدروژناز (Mdh۲)، فوماراز (FumR) و فومارات ریداکتاز(Frds۱) از اگزالواستات، مالات و سوکسینات به‌عنوان سوبسترای تولید سیترات استفاده کند و تولید سیتریک‌اسید را بهبود ببخشند [۱۲].

اصلاح فعالیت سویه و تنظیم بیان ژن‌های هدف را می‌توان از طریق اصلاحات ژنتیکی انجام داد، اما این روش دارای محدودیت‌هایی است. به‌عنوان مثال، این فرایند زمان‌بر است و برای دستیابی به محصول و بازدهی مطلوب به تجهیزات تخصصی، پرسنل با تجربه و چندین مرحله آزمون و خطا نیاز دارد. علاوه بر این، استفاده از سویه‌های اصلاح‌شده ژنتیکی شامل محدودیت‌های قانونی و شرایط کنترل‌شده هستند که کاربرد گسترده آن‌ها را محدود می‌کند. محدودیت دیگر کاهش عملکرد چنین سویه‌هایی در طول زمان یا در مقایسه با سویه دستکاری‌نشده است. به‌عنوان مثال نوترکیب‌سازی سویه با استفاده از پلاسمید علاوه بر هزینه‌بر بودن و ناپایداری آن می‌تواند سبب افزایش بار متابولیکی روی سویه شود [۱۳]. یکی از روش‌های جایگزین برای این فرایندهای دشوار، تعریف محیط کشت تنظیمی با هدف تنظیم هدفمند شار سوخت‌وسازی سویه است. در این روش مواد با نقش بازدارندگی و فعال‌کنندگی واکنش‌های هدف با مقادیر نسبتاً کمتر از مواد مغذی به محیط کشت اضافه می‌شوند تا فعالیت سوخت‌وسازی سویه را دستخوش تغییر در جهت مطلوب برای تولید محصول کنند [۱۴]. این مواد می‌توانند فعالیت آنزیم واکنش‌های پیش‌برنده را تغییر دهند و شار سوخت‌وسازی جدید و فنوتایپ جدید رقم بزنند. مطالعات متعددی با این رویکرد، تا به حال انجام شده است که نتایج مطلوبی نشان داده است. در مطالعه‌ای با یافتن تنظیم‌کننده آمونیوم‌کلراید برای سویه سینکوسیستیس (Synechocystis) تولید الکتریسیته در پیل سوختی تا ۴۰ برابر افزایش پیدا کرد [۱۵]. در تحقیقی دیگر با بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های مختلف، محیط کشتی با اجزای معین تعریف شد که نتیجه آن افزایش میزان سیانید در فروشویی زیستی بود که به‌وسیله آن استخراج طلا از زیر ۱۰ درصد به ۵۵ درصد رسید [۱۶].

در این پژوهش، در مورد موادی که در مطالعه قبلی ما به‌منظور حذف اگزالیک‌اسید و تغییر جهت شار از اگزالات به سیترات استفاده شده است، بحث خواهد شد و اثرگذاری موادی که در پژوهش قبل به آن پرداخته نشده بود همچون اسیدهای آمینه به تفصیل مورد بررسی قرار می‌گیرد [۱۷]. تولید سیتریک‌اسید با استفاده از غلظت بهینه و اقتصادی منبع کربنی برای مصارف مختلف امری ضروری است که این قارچ توانایی تولید این اسید با مقدار کم ۳۰ گرم بر لیتر گلوکز را ندارد. ضمن اینکه حذف محصولات جانبی می‌تواند هزینه‌های جداسازی در فرایندهای زیستی که تا ۸۰ درصد هزینه‌های تولید را می‌تواند شامل شود بسیار حیاتی به حساب می‌آید. بنابراین با به‌کارگیری روش تنظیمی پساترجمه، این پژوهش موفق به تولید سیتریک‌اسید با محتوای گلوکز کم ۳۰ گرم در لیتر و حذف محصول جانبی یعنی اگزالیک‌اسید شد.

۲ مواد، دستگاه‌ها و روش‌ها

۲-۱ انتخاب تنظیم‌کننده مناسب برای محیط کشت تنظیمی

برای یافتن تنظیم‌کننده‌های واکنش‌های هدف به‌دست آمده، از پایگاه داده برندا (BRENDA) استفاده شد. برای این کار، در صفحه آنزیم واکنش، مواد تنظیمی مورد جستجو قرار گرفت تا مواد بازدارنده و فعال‌کننده مناسب انتخاب شوند. این مواد قبلاً به‌صورت تجربی مورد آزمایش قرار گرفته و در این پایگاه داده گزارش شده‌اند. برای انتخاب اصولی‌تر تنظیم‌کننده مناسب، ابتدا توالی اسیدآمینه‌ای آنزیم برای سویه آسپرژیلوس نایجر از پایگاه داده UNIPROT به‌دست آمد و با انجام فرایند پروتئین BLAST برای توالی مذکور و سویه‌های دارای تنظیم‌کننده گزارش شده در برندا، تنظیم‌کننده‌ای انتخاب شد که دارای بیشترین تشابه توالی بود. این فرایند انجام شد چراکه تنظیم با استفاده از کوچک‌مولکول‌ها روی آنزیم واکنش‌های مستعد یا به بیان دیگر تنظیم در مرحله پساترجمه در حال انجام است. لذا نیاز است تا ساختار پروتئین مورد تنظیم ما و پروتئین دارای تنظیم‌کننده گزارش شده تشابه بالایی داشته تا به دنبال آن احتمال اثر کوچک مولکول مورد نظر افزایش یابد.

۲-۲ کشت قارچ آسپرژیلوس نایجر

۲-۲-۱ تهیه سویه، بانک میکروبی و آزمون آلودگی

قارچ آسپرژیلوس نایجر به‌صورت آمپول لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران با شماره شناسه PTCC ۵۰۱۰ خریداری شد. توسط هود میکروبی، در شرایط سترون، ابتدا چند پلیت به صورت کشت مرکزی برای رشد اسپور قارچی روی محیط کشت PDA تهیه شد و به مدت ۷ روز در گرم‌خانه لرزان در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفت. برای تهیه بانک میکروبی، از اسپورهای کشت داده شده روی اسلنت‌های حاوی PDA، استفاده شد و در یخچال، در دمای ۴ درجه سلسیوس ذخیره شدند. برای اطمینان از عدم آلودگی سویه خریداری شده، دو کشت در محیط PDB (Potato Dextrose Broth)، یکی در حضور کلرامفنیکل و دیگری در عدم حضور کلرامفنیکل به‌عنوان آنتی‌بیوتیک و عامل ضد رشد برای باکتری‌ها انجام شد و مورد مقایسه قرار گرفت.

۲-۲-۲ تهیه مایه تلقیح

کشت قارچ در محیط کشت معین مایع نیاز به مایه تلقیح دارد که این مایه تلقیح از تعداد مشخصی از اسپورهای کشت داده شده اولیه تشکیل شده است. برای تهیه مایه تلقیح، در شرایط سترون، زیر هود میکروبی، اسپورهای کشت‌داده‌شده با آب مقطر سترون شستشو و از کاغذ صافی عبور داده شد. سپس مایع به‌دست آمده رقیق شد و در زیر میکروسکوپ توسط لام توما (Thoma) شمارش شد تا به غلظت مناسب ۱۰۷ اسپور در میلی‌لیتر برسد.

۳-۲-۲ کشت قارچ در محیط کشت پایه و محیط کشت تنظیمی

برای کشت قارچ، محیط کشت پایه سیزاپک با ترکیبات و مقادیر گزارش شده در جدول ۱ انتخاب شد. این محیط کشت عمدتاً برای تولید اگزالیک‌اسید مورد استفاده قرار می‌گیرد و حاوی مقادیر کم قند است. برای بررسی اثر مواد تنظیمی اضافه‌شده به محیط کشت برای هرکدام کشت جداگانه‌ای انجام شد. کشت‌ها همگی در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتر با میزان ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت در شرایط هوازی با دور ۱۴۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سلسیوس در گرم‌خانه لرزان انجام شدند. ابتدا با توزین مقدار مناسب مواد محیط کشت بدون اضافه کردن قند، آب به مقدار ۴۵ سی‌سی به هر ارلن اضافه شد و سپس اتوکلاو شد. منبع کربن نیز به‌صورت جداگانه توزین و در غلظت مناسب پس از اتوکلاو به‌میزان ۵ میلی‌لیتر به محیط کشت اضافه شد. در تهیه غلظت مناسب مواد تنظیمی ابتدا از هر کدام محلول ۰/۱ مولار در شیشه پنی‌سیلین تهیه شد سپس در زیر هود میکروبی با صافی سرسرنگی به درون شیشه پنی‌سیلین سترون انتقال داده شد. پس از اتوکلاو محیط کشت، مقدار مناسبی از هر یک از مواد تنظیمی متناسب با جدول ۲ به محیط کشت اضافه شد. در نهایت، مایه تلقیح به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر یعنی ۱٪ به محیط اضافه شد. از بین مواد گزارش‌شده برای هدف مورد نظر که در جدول ۴ گزارش شده است، مواد موجود در آزمایش‌های جدول ۲ تهیه شد و ادامه کار در آزمایشگاه با این کشت‌ها مورد بررسی قرار گرفت. همین‌طور برای واکنش مالات دهیدروژناز با توجه به فراوانی مواد گزارش شده در برندا، موادی که در آزمایشگاه در دسترس بودند، بدون در نظر گرفتن شرط تشابه توالی انتخاب شدند که در جدول ۲ به همراه غلظت مورد آزمایش آن‌ها گزارش شده‌اند. جدول ۲ در ابتدا بر اساس غلظت مواد گزارش شده در برندا طراحی شد سپس در مراحل متعدد کشت و بررسی و تحلیل این مقادیر، مقدارهای مناسب تری برای آن‌ها استفاده شد که در بخش بررسی pH مورد بررسی قرار گرفته شده‌اند.

۳-۲ اندازه‌گیری پارامترهای رشد و مقدار محصولات

تولید متابولیت‌ها از جمله اسیدهای آلی می‌توانند سبب کاهش pH به میزان قابل‌توجهی در محیط کشت شود. این تولید و کاهش pH می‌تواند بیانگر فعالیت درست سویه و رشد آن به میزان مناسب نیز باشد. در این پژوهش در روزهای مختلف، از تمام ارلن‌های کشت قارچ به میزان ۱ میلی‌لیتر در میکروتیوب ۸ میلی‌لیتری نمونه گرفته شد و روند pH در آن‌ها مورد

جدول ۱ اجزای تشکیل‌دهنده محیط کشت پایه سیزاپک

Table 1 Czapek-Dox Broth culture medium composition

Composition	Concentration (g/l)
Glucose	30
K_2HPO_4	1
$NaNO_3$	3
$MgSO_4.7H_2O$	0.5
KCl	0.5
$FeSO_4.7H_2O$	0.01

جدول ۲ آزمایش‌های انجام‌شده بر اساس مواد تنظیمی در دسترس با غلظت مشخص
Table 2 Experiment based on available small molecules and their concentration

Culture No.	Regulators	mM	Culture No.	Regulators	mM
1	30 g/L Glucose - Control	-	20	Urea	0.1
2	60 g/L Glucose - Control	-	21	Urea	2
3	30 g/L Sucrose - Control	-	22	L-glutamate	5
4	60 g/L Sucrose - Control	-	23	Cd^{2+}	1
5	Hg^{2+}	2	24	Cd^{2+}	0.2
6	Ag^{+}	2	25	Glutathione	2
7	Ag^{+}	0.5	26	Glutathione	0.1
8	NH^{4+}	2	27	$CuSO_4.5H_2O$	5
9	2-oxoglutarate + Aspartic acid	0.01 + 0.01	28	EDTA	1
10	2-oxoglutarate + Aspartic acid	0.1 + 0.1	29	$ZnSO_4.7H_2O$	2
11	2-oxoglutarate + Aspartic acid	1 + 1	30	Cysteine	2
12	2-oxoglutarate	1	31	$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	2
13	Aspartic acid	2	32	Carvedilol	2
14	Leucine	2	33	Carvedilol	0.5
15	$NaNO_3$	0.1	34	Carvedilol	0.1
16	$NaNO_3$	1	35	Metformin	2
17	NaF	0.1	36	Metformin	0.5
18	NaF	1	37	Metformin	0.1
19	Urea	0.01	38	Temozolomide	2

بررسی قرار گرفت.

برای غربالگری اولیه از مواد تنظیمی مورد استفاده و بررسی اثر آن‌ها در کاهش تولید اگزالیک‌اسید، ابتدا جداسازی اگزالیک‌اسید با روش رسوب‌دهی با کلسیم‌کلرید انجام شد. سپس برای بررسی میزان اگزالیک از روش عنوان‌شده در پژوهش قبل استفاده شد [۱۷]. برای اندازه‌گیری کل اسید تولیدی در غربالگری از روش تیتراسیون رنگ‌سنجی با سدیم‌هیدروکسید و شناساگر فنل‌فتالئین استفاده شد. به این شکل که ۱ میلی‌لیتر از نمونه با سدیم‌هیدروکسید ۰/۱ مولار تیتر شد تا زمانی که رنگ شناساگر موجود در محیط از نارنجی به قرمز تغییر پیدا می‌کرد که بیانگر تکمیل واکنش اسیدهای موجود در محیط با هیدروکسید تیتر شده است. برای اندازه‌گیری دقیق مواد غربالگری شده در مراحل اول نیز از سوانگاری مایع با کارایی بالا استفاده شد.

۲-۴ واکاوی و تجهیزات

دما و اختلاط با استفاده از گرم‌خانه‌ی لرزان WIS-۲۰ WiseCube (Daihan Scientific، کره جنوبی) برای انجام کشت خالص قارچ کنترل شد. pH محیط با استفاده از مولتی‌متر دیجیتال (ISTEK-CP، ۵۰۰L، کره) پایش شد. شمارش اسپور با استفاده از لام توما (Thoma) با عمق و مساحت ۰/۱ میلی‌متر و ۰/۰۰۲۵ میلی‌متر مربع در زیر میکروسکوپ مشاهده شد (Standard ۲۵, Zeiss, Germany). غلظت اسید آلی در محیط از طریق سوانگاری مایع-طیف‌سنجی جرمی (LC-MS؛ Alliance ۲۶۹۵ Quattro micro API micro mass waters Separations) اندازه‌گیری شد.

۳ نتایج و بحث

۳-۱ سوخت‌وساز مرکزی آسپرژیلوس نایجر

آسپرژیلوس نایجر به‌عنوان ریزاندامگان کموارگانوتروف از منابع کربنی آلی به‌عنوان منبع غذایی و انرژی برای رشد و تولید محصول استفاده می‌کند. منابع کربنی، نیتروژنی و عناصر دیگر موجود در محیط کشت، مسیرهای سوخت‌وساز متعددی را در این قارچ، برای

تولید محصولات مختلف طی می‌کنند. از عمده منابع کربنی مصرفی معمول توسط این سویه می‌توان به گلوکز، ساکارز و ملاس اشاره کرد. ساکارز به‌عنوان منبع بهتری برای تولید سیتریک‌اسید به‌عنوان محصول اصلی گزارش شده است؛ چرا که در pHهای بهینه آنزیم اینورتاز فعالیت بهتری دارد و می‌تواند سبب آب‌کافت این منبع کربن شود. غلظت بالای منبع کربن به‌دلیل خاصیت بازدارندگی روی سنتز آنزیم آلفا کتوگلوتارات دهیدروژناز و عدم تجزیه سیترات ضروری است. نمک‌های آمونیومی در زمره منابع نیتروژنی، برای تولید سیتریک‌اسید در اولویت استفاده هستند، زیرا ضمن مصرف می‌توانند سبب آزاد شدن پروتون در محیط شوند و pH محیط را برای تولید این ماده، به مقدار بهینه برسانند [۱۸].

گلوکزاکسیداز به‌عنوان آنزیمی کلیدی در مراحل اولیه رشد می‌تواند به‌صورت خارج سلولی، گلوکز را به گلوکونیک‌اسید ۶ کربنه تبدیل کند. تولید اسیدهای دیگر اما به‌صورت محصول میانه سازوکار سلولی رخ می‌دهد. مسیر گلیکولیز به‌عنوان شاهراه اصلی مصرف منبع کربن، ضمن مصرف این منبع برای رساندن شار به مسیر تری‌کربوکسیلیک‌اسید، پیش‌سازهای دیگر مورد نیاز سویه برای رشد را طی مسیرهای پنتوزفسفات و سازوکارهای مختلف دیگر مثل مسیرهای تولید اسیدهای آمینه مهیا می‌کند. در این مسیر قند مصرف‌شده توسط سویه می‌تواند به پیروات تبدیل شود و به‌عنوان پیش‌ساز تولید مواد دیگر به کار رود. پیروات به‌طور مستقیم می‌تواند در سیتوزول به اگزالواستات تبدیل شود و با آب‌کافت آن توسط آنزیم اگزالواستات هیدرولاز به اگزالات و استات تبدیل شود که مسیر تولید اگزالیک‌اسید است. در مسیر دیگر پیروات می‌تواند به میتوکندری رفته و به استیل‌کوآنزیم‌آ تبدیل شود تا بتواند به‌عنوان مولکول ۲ کربنه توسط آنزیم سیترات‌سنتاز با اگزالواستات ۴ کربنه موجود در میتوکندری ترکیب شود و سبب تولید سیتریک‌اسید ۶ کربنه شود و ادامه چرخه TCA را مهیا سازد [۱۹]. از آنزیم‌های مهمی که در مسیر سنتز سیتریک‌اسید وجود دارد می‌توان به پیروات دهیدروژناز (PDH)، استیل کوآنزیم‌آ سنتاز (ACS) و ATP سیترات لیاز (ACL) اشاره کرد. گزارش شده است که ممکن است تولید استیل‌کوآنزیم‌آ به‌وسیله سیترات‌لیاز منجر به مصرف سیترات شود زیرا مشاهده شده است با حذف ژن acl۱ تولید سیترات افزایش یافته اما در تحقیقی دیگر نتیجه عکس مشاهده شده که حذف این ژن سبب کاهش تولید شده است [۲۰]. در مسیر گلیکولیز یکی از آنزیم‌های مهم و تأثیرگذار فسفوفروکتوکیناز (PFK) است. مطالعات انجام‌گرفته روی این آنزیم نشان داده است که فعالیت این آنزیم تحت تأثیر مجموعه‌ای از مواد درون‌سلولی مثل سیترات، ATP، آمونیاک و مواد کم‌مقدار است. به‌طور دقیق‌تر می‌توان گفت تولید سیترات در سیتوزول می‌تواند نقش بازدارندگی روی این آنزیم داشته باشد و به‌دنبال آن سبب کاهش شار مسیر گلیکولیز شود [۲۱]. یکی دیگر از اثرات مثبت نمک‌های آمونیومی، کاهش اثر بازدارندگی سیترات و ATP روی PFK گزارش شده است که می‌تواند سبب افزایش تولید و فعالیت مؤثرتر سویه شود [۲۲]. تجمع و انتقال سیترات به بیرون سویه از موضوعاتی است که هنوز نیاز به مطالعه بیشتر دارد، اما تا به حال تریکربوکسیلات ترنسپورتر به‌عنوان عامل انتقال سیترات به خارج میتوکندری و ژن cexA به‌عنوان مسئول پمپ سیترات به خارج سلول شناسایی شدند [۲۳و۲۴]. تجمع سیترات همواره در رقابت با تجزیه آن توسط آنزیم‌های آکونیتاز و ایزوسیترات دهیدروژناز است. در سوخت‌وساز سلولی ایزوسیترات به‌عنوان محصول جانبی در تولید سیتریک‌اسید شناخته می‌شود. آمونیوم علاوه بر کاهش بازدارندگی سیترات روی PFK می‌تواند سبب کاهش تولید آلفاکتوگلوتارات دهیدروژناز و کاهش تجزیه سیترات شود و تجمع سیتریک‌اسید را افزایش دهد [۲۵]. مالیک‌اسید به‌عنوان اسید ۴ کربنه به‌عنوان محصول دیگر این قارچ می‌تواند درون میتوکندری از فومارات و در سیتوزول توسط مسیر rTCA از اگزالواستات به‌دست آید. واکنش اول توسط آنزیم فومارات هیدراتاز و واکنش برگشت‌پذیر دوم توسط مالات دهیدروژناز درون سیتوزولی انجام می‌پذیرد. در مطالعه‌ای با حذف ژن آنزیم اگزالواستات هیدرولاز (oahA) و افزایش بیان ژن آنزیم‌های مسیر rTCA مثل پیروات کربوکسیلاز (pyc) و مالات دهیدروژناز (mdh۳) موفق به تولید ۵ برابری مالیک‌اسید شدند [۲۶]. چرخه گلی‌اکسیلات به‌عنوان مسیر میانبر در چرخه TCA می‌تواند سبب سنتز اگزالیک‌اسید از سیتریک‌اسید شود، اما مطالعات نشان داده است که ایزوسیترات لیاز که اولین آنزیم در واکنش‌های این مسیر است حین تولید سیتریک‌اسید فعال نیست. بنابراین، کل مالات و اگزالواستات باید از کربوکسیل‌دار کردن پیروات تولید شود و اگزالیک‌اسید نیز باید در سیتوزول، توسط آنزیم اگزالواستات‌هیدرولاز سنتز شود [۲۷]. افزایش بیان ایزوسیترات لیاز در چرخه گلی‌اکسیلات می‌تواند سبب افزایش فومارات و سیترات شود.

مسیری که در خارج میتوکندری و در سیتوزول می‌تواند سبب تولید استات، اگزالات، مالات، فومارات و سوکسینات از اگزالواستات شود را چرخه کوتاه شده تری‌کربوکسیلیک‌اسید یا rTCA گویند. همان‌طور که گفته شد مسیر اصلی تولید اگزالیک‌اسید در این سویه، مسیر rTCA است به‌طوری‌که در پژوهشی با حذف ژن آنزیم‌های تولیدکننده اسیدهای اگزالیک و گلوکونیک یعنی اگزالواستات هیدرولاز (oahA) و گلوکزاکسیداز (gocX) موفق شدند در pH غیربهینه ۵

برای تولید سیتریک‌اسید، تولید این اسید را ممکن سازند[۸]. به‌طور کلی در برنامه ژنتیکی این سویه برای تولید هر نوع اسید pH بهینه‌ای وجود دارد. سویه در ابتدا با دسترسی به منبع کربن در pHهای بالای ۵/۵ شروع به تولید گلوکونیک‌اسید می‌کند و سبب کاهش pH می‌شود تا شرایط برای تولید اسیدهای اگزالیک و مالیک در pHهای ۳ تا ۵ مهیا شود. سپس با تولید اسید و کاهش مداوم pH شرایط برای تولید سیتریک‌اسید مهیا می‌شود. به‌طوری که در مطالعه‌ای با استفاده از مدل مقیاس ژنوم و داده‌های ترنسکریپتوم سویه حین تولید اسید، نشان دادند سطح بهینه pH برای تولید اسیدهای تولیدی به شرح جدول ۳ است و نشان داده‌اند که در خارج از این نقاط، تولید اسید مدنظر ممکن نیست [۲۸]. به‌عنوان مثال تولید گلوکونیک‌اسید در مقادیر زیر ۳، برای سویه وحشی امکان‌پذیر نیست. علاوه بر اختصاصی شدن تولید سیتریک‌اسید در pH پایین، می‌توان خطرات آلودگی محیط کشت را کاهش داد.

جدول ۳ محدوده pH بهینه تولید اسیدهای آلی مختلف توسط قارچ آسپرژیلوس نایجر
Table 3 The ideal pH for each organic acid generated by Aspergillus niger

Organic acid	Optimum range
Gluconic	5.5
Malic	5-8
Oxalic	5-8
Citric	Less than 3

تنظیم بار اکسیداسیونی قارچ از عوامل مهم و تأثیرگذار در فرایند تولید اسیدهاست. علاوه بر مختل‌شدن فعالیت سلولی به‌دلیل خاصیت سمی این مواد، نقش تنظیمی آن‌ها می‌تواند موجب تغییر در بازدهی شود. به‌عنوان مثال در حالت ایده‌آل به ازای هر مول گلوکز که به ۱ مول سیتریک‌اسید تبدیل می‌شود، ۱ مول ATP و ۳ مول NADH تولید می‌شود. اکسید ۳ مول NADH توسط زنجیره انتقال الکترون سبب تولید بیشتر ATP شده که اثرات بازدارندگی آن روی PFK قبلاً بیان شده است [۲۹].

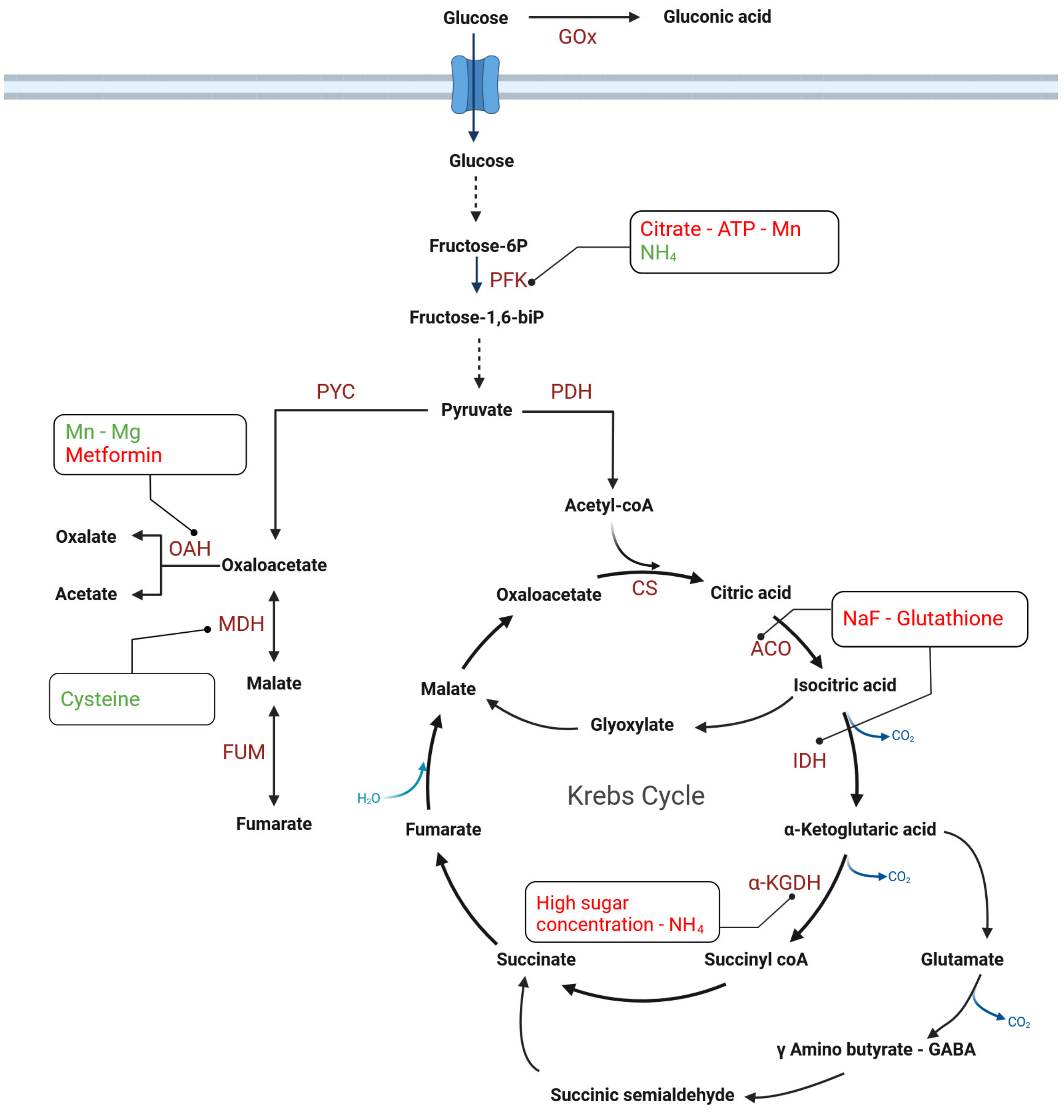
مطالعات سامانه‌ای و امیکس متعددی روی فعالیت این سویه حین تولید سیتریک‌اسید صورت گرفته است. با مطالعه‌ای که روی داده‌های ژنوم سه سویه با بازدهی متفاوت و داده‌های ترنسکریپتوم یکی از آن‌ها با بازدهی بالا در زمان‌های مختلف تولید سیتریک‌اسید انجام شد و مشاهده شد که ۴۷۹ ژن، تفاوت قابل‌توجهی در بیان داشتند. این ژن‌ها شامل متابولیسم مرکزی، مسیر آلفا-آمینوبوتیریک‌اسید (GABA) و حامل‌ها بودند. در این بین در سازوکار گلیکولیز، دو آنزیم تریوز فسفات ایزومراز افزایش بیان و پیروات کیناز کاهش بیان داشتند. جالب توجه است که در بیشتر آنزیم‌های چرخه TCA کاهش بیان مشاهده شده بود که دلیل آن کاهش شدید pH عنوان شده بود. آنزیم ATP سیترات لیاز در مرحله تجمع سیتریک‌اسید در مقایسه با مراحل اولیه رشد، افزایش بیان ۷ برابری داشت که سبب تولید مجدد اگزالیک‌اسید و ورود آن به میتوکندری و TCA به‌عنوان پیش‌ساز بود. از آنزیم‌های مهم دیگری که حین تجمع سیترات، کاهش بیان داشتند، PFK، سیترات سنتاز، آکونیتاز و ایزوسیترات دهیدروژناز عنوان شده‌اند. از مسیرهای مهمی که افزایش بیان قابل توجهی داشتند مسیر GABA عنوان شده که دلیل آن افزایش میزان گلوتامات است زیرا این اسیدآمینه با مصرف پروتون‌های درون‌سلولی سبب افزایش مقاومت سویه به شرایط اسیدی در تولید سیتریک‌اسید می‌شود. همین‌طور این مسیر سبب ترشح آمونیوم به سیتوزول می‌شود که از خاصیت بازدارندگی سیترات روی PFK می‌کاهد [۳۰]. در مطالعه دیگری که بین داده‌های ترنسکریپتوم در کشت با نشاسته و عصاره ذرت بین دو سویه صنعتی با بازدهی بالا و سویه وحشی ATCC۱۰۱۵ صورت گرفت مشاهده شد آنزیم‌های تجزیه‌کننده و دریافت‌کننده منابع کربنی و پروتئینی افزایش بیان چند برابری داشتند. به این معنی که قارچ آسپرژیلوس نایجر به‌عنوان یکی از سویه‌هایی که قابلیت استفاده از طیف وسیعی از منابع کربنی را دارد می‌تواند آنزیم‌های متنوعی برای تجزیه این منابع کربنی ترشح کند تا بتواند این منابع کربنی را راحت‌تر جذب و مصرف کند. این سویه‌های صنعتی توانایی بیان زیاد ژن این آنزیم‌ها برای استفاده بیشتر از این منابع را دارند. در بررسی داده‌های سوخت‌وساز مرکزی و سازوکار اسیدچرب مشاهده شد بسیاری از آنزیم‌های کلیدی مثل سیترات سنتاز، ATP سیترات لیاز، ایزوسیترات دهیدروژناز، آکونیتاز، مالات دهیدروژناز، سوکسینات دهیدروژناز تغییر بیان چندانی نداشتند. آنزیم‌های مسیر گلی‌اکسیلات و گلیسرآلدهید ۳ فسفات دهیدروژناز (GAPDH) که بیشتر نقش غیرمتابولیکی دارند افزایش بیان داشتند. همین‌طور استیل کوآنزیم‌آ سنتاز که در تبدیل اسیدهای چرب به استیل کوآنزیم‌آ و تهیه پیش‌ساز سیترات نقش دارد، سطح بیان بیشتری داشت. در بررسی نتایج این پژوهش فعالیت بالای زنجیره انتقال الکترون، فعالیت بالای

ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ترجمه و نسخه‌برداری و سامانه مؤثرتر مواد مقاوم به مواد اکسیدکننده (ROS) از عوامل مؤثر در تولید بیشتر و کارکرد بهینه‌تر سویه عنوان شده است [۳۱]. در مطالعه‌ای با تفسیر داده‌های متابولومیک سویه حین تولید دریافتند شار بالای مسیر امبدن میرهوف (EMP) و سطح بالای پیش‌سازهای سیتریک‌اسید می‌تواند در تولید بیشتر این محصول مؤثر باشد. مشاهده شد که در مرحله تولید این اسید، سطح پیروات و اگزالواستات درون‌سلولی به‌ترتیب ۵ و ۱۲ برابر شدند [۳۲].

۳-۲ لیگاندهای مستعد تنظیم از پایگاه داده برندا

پس از بررسی دقیق متابولیسم مرکزی آسپرژیلوس نایجر و شبیه‌سازی سامانه‌ای بر روی مدل متابولیکی مقیاس ژنوم این قارچ از تحقیق قبلی ما، تنظیم‌کننده‌های مناسبی از پایگاه داده برندا به‌منظور ارزیابی اثر این کوچک‌مولکول‌ها به کار گرفته شد [۱۷]. نام و آنزیم مسئول واکنشی که ما برای کوچک مولکول انتخاب کردیم در جدول ۴ نشان داده شده است. تنظیم‌کننده مناسب بر اساس شباهت توالی پروتئین و فرایند پروتئین BLAST بین پروتئین هدف در آسپرژیلوس نایجر و پروتئین ذکرشده در سویه‌های گزارش‌شده روی آنزیم توسط برندا انتخاب شد.

نکته قابل توجه در مورد مواد انتخاب‌شده این است که برخلاف تشابه بالا در توالی و اطمینان از اثرگذاری مواد، درصد زیادی از مواد در فرایند کشت قارچ مؤثر


Glucose
GOx
Gluconic acid
Glucose
Fructose-6P
Citrate - ATP - Mn
NH_4
PFK
Fructose-1,6-biP
PYC
Pyruvate
PDH
Mn - Mg
Metformin
Acetyl-coA
Oxalate
OAH
Oxaloacetate
Acetate
MDH
Cysteine
Malate
FUM
Fumarate
Oxaloacetate
CS
Citric acid
NaF - Glutathione
ACO
Isocitric acid
Malate
Glyoxylate
IDH
CO_2
H_2O
Krebs Cycle
Fumarate
α-Ketoglutaric acid
α-KGDH
CO_2
High sugar concentration - NH_4
Succinate
Succinyl coA
Glutamate
CO_2
γ Amino butyrate - GABA
Succinic semialdehyde

شکل ۱ سوخت‌و ساز مرکزی قارچ آسپرژیلوس نایجر به همراه نقش تنظیمی مواد درون‌سلولی
Figure 1 Aspergillus niger core metabolism and regulatory effect of intracellular metabolites

جدول ۴ تنظیم‌کننده‌های مستعد انتخابی اولیه بر اساس پایگاه داده برندا و بررسی درصد تشابه توالی اسید آمینه‌ای آنزیم‌ها
Table 4 Potential small molecules obtained from BRENDA considering amino acid sequence identity of responsible enzymes

Ligand	**Regulation**	**E.C Number**	**Enzyme Name**	**Organism**	**Seq Identity**
Hg^{2+}	Inhibition	1.1.3.4	Glucose oxidase	A. niger	100
DTT	Inhibition	1.1.3.4	Glucose oxidase	A. niger	100
DTNB	Inhibition	1.1.3.4	Glucose oxidase	A. niger	100
Ag^{+}	Inhibition	1.1.3.4	Glucose oxidase	A. niger	100
NH_4^{+}	Activation	2.7.1.11	6-phosphofructokinase	A. niger	100
Metformin	Inhibition	3.7.1.1	Oxaloacetase	A. niger	100
Carvedilol	Inhibition	3.7.1.1	Oxaloacetase	A. niger	100
Temozolomide	Inhibition	3.7.1.1	Oxaloacetase	A. niger	100
3,3-difluoroxaloacetate	Inhibition	3.7.1.1	Oxaloacetase	A. niger	100
2-oxoglutarate	Inhibition	6.4.1.1	Pyruvate carboxylase	A. nidulans	93
L-Asp	Inhibition	6.4.1.1	Pyruvate carboxylase	A. nidulans	93
L-aspartate	Inhibition	6.4.1.1	Pyruvate carboxylase	A. terreus	93
Oleoyl-CoA	Inhibition	2.3.3.8	ATP citrate synthase	A. niger	100
Palmitoyl-CoA	Inhibition	2.3.3.8	ATP citrate synthase	A. niger	100
ADP	Inhibition	2.3.3.8	ATP citrate synthase	A. nidulans	94
L-Leu	Inhibition	2.3.3.8	ATP citrate synthase	A. nidulans	94
Malonyl-CoA	Inhibition	2.3.3.8	ATP citrate synthase	A. nidulans	94
lauroyl-CoA	Inhibition	2.3.3.8	ATP citrate synthase	L. starkeyi	85
Stearoyl-CoA	Inhibition	2.3.3.8	ATP citrate synthase	L. starkeyi	85
NaF	Inhibition	4.2.1.3	Aconitate hydratase	A. niger	100
Iodoacetic acid	Inhibition	4.2.1.3	Aconitate hydratase	A. niger	100
Potassium ferricyanide	Inhibition	4.2.1.3	Aconitate hydratase	A. niger	100
Oxalomalate	Inhibition	4.2.1.3	Aconitate hydratase	S. cerevisiae	74
Sodium mersalyl	Inhibition	4.2.1.3	Aconitate hydratase	Y. lipolytica	73
PCMB	Inhibition	4.2.1.3	Aconitate hydratase	Y. lipolytica	73
Urea	Inhibition	4.2.1.3	Aconitate hydratase	Y. lipolytica	73
Glyoxylate	Inhibition	1.1.1.41	Isocitrate dehydrogenase	Y. lipolytica	68
L-glutamate	Inhibition	1.1.1.41	Isocitrate dehydrogenase	R. toruloides	65
Cd^{2+}	Inhibition	1.1.1.42	Isocitrate dehydrogenase	Mus musculus	65
Desferroxamine	Inhibition	1.1.1.42	Isocitrate dehydrogenase	R. norvegicus	68

Diphenylchloroarsine	Inhibition	1.1.1.42	Isocitrate dehydrogenase	Sus scrofa	67
Glutathione	Inhibition	1.1.1.42	Isocitrate dehydrogenase	Sus scrofa	67
$(NH_4)2SO_4$	Inhibition	1.1.1.37	Malate dehydrogenase	C. glutamicum	
AgNO3	Inhibition	1.1.1.37	Malate dehydrogenase	A. lwoffii	
$Cu^{2+}/CuCl_2$	Inhibition	1.1.1.37	Malate dehydrogenase	Some	
EDTA	Inhibition	1.1.1.37	Malate dehydrogenase	F. frigidimaris	
$HgCl_2$	Inhibition	1.1.1.37	Malate dehydrogenase	F. frigidimaris	
$Zn^{2+}/ZnCl_2$	Inhibition	1.1.1.37	Malate dehydrogenase	Some	
Cysteine	Activation	1.1.1.37	Malate dehydrogenase	M. phlei	
Glutathione	Activation	1.1.1.37	Malate dehydrogenase	M. phlei	
Sodium phosphate	Activation	1.1.1.37	Malate dehydrogenase	H. crassispina	

نبودند. دلیل این موضوع را می‌توان به این شکل توجیه کرد که مواد گزارش شده عمدتاً در شرایط invitro آزمایش شده و گزارش شده‌اند و لزومی به اثرگذاری آن‌ها در شرایط کشت اصلی یعنی invivo وجود ندارد. به بیان دیگر، اثرگذاری این مواد تنظیمی روی سامانه‌های آنزیمی موثر است؛ اما اطمینانی از اثرگذاری آن‌ها در شرایط کشت اصلی وجود ندارد. دلیل دوم این عدم اثرگذاری، را می‌توان عدم آگاهی از غلظت مناسب عنوان کرد. چراکه غلظت بیش از حد و کمتر از حد می‌تواند اثرگذاری صحیح این مواد را از بین ببرد. همین‌طور این مواد تنظیمی ممکن است علی‌رغم اثر مطلوبی که روی آنزیم هدف دارند و هدف ما را برآورده می‌کنند، بر روی آنزیم‌های غیرهدف دیگری نیز اثرگذار باشند و حتی رشد را با مشکل مواجه سازند. دسته اول لیگاندها برای آنزیم گلوکزاکسیداز و برای جلوگیری از تجزیه گلوکز در محیط کشت انتخاب شد. این مواد اگرچه برای سویه آسپرژیلوس نایجر گزارش شده‌اند اما دارای خواص سمی‌اند پس می‌توان انتظار عدم اثرگذاری را داشت. دسته دوم و مهم این مواد، بازدارنده‌های آنزیم اگزالواستات هیدرولاز هستند که مسئول تولید اگزالیک‌اسید از سوبسترای اصلی سیتریک‌اسید یعنی اگزالواستات است. مورد بعد بازدارنده‌های آنزیم پیروات‌کربوکسیلاز یعنی آنزیم تولیدکننده اگزالواستات از پیروات است. دسته مهم بعد آنزیم‌های تجزیه‌کننده سیتریک‌اسید هستند و در آخر نیز مواد تنظیمی مربوط به مالات‌دهیدروژناز برای بررسی عدم تجزیه اگزالواستات به مالات یافت شدند.

۳-۳ بررسی اثر مواد تنظیمی بر رشد و تولید محصولات

قارچ آسپرژیلوس نایجر قابلیت تولید طیف وسیعی از اسیدهای آلی را دارد که نوع و مقدار تولید این محصولات بستگی به پارامترهای مختلف درون و برون سلولی دارد. به‌عنوان مثال ژنوم برخی از سویه‌های صنعتی به‌عنوان عامل محدودیت داخلی به گونه‌ای است که این سویه‌ها توانایی تولید اسید حتی به میزان ۲۰۰ گرم بر لیتر را دارند. نوع منبع کربن و غلظت آن نیز به‌عنوان عامل خارجی بر نوع و میزان محصولات تولیدی تأثیرگذار هستند. غلظت بالای منبع کربن می‌تواند به دلیل ایجاد جریان شار بالا سبب تولید بیشتر سیتریک‌اسید شود، چرا که سویه برای جلوگیری از ایجاد بار متابولیکی و تولید زیاد پیش‌سازها، تمایل به خارج‌کردن سیترات تولیدی در ابتدای چرخه TCA را دارد [۳۳]. در مقابل، غلظت پایین قند می‌تواند شار سوخت‌وسازی را در جهت ادامه این مسیر و تولید اگزالیک‌اسید سوق دهد که این امر را می‌توان در نتایج پژوهش‌های گذشته نیز مشاهده کرد [۳۴]. از بین بردن اگزالیک‌اسید به‌عنوان محصول جانبی، نیاز به غلظت بالا و غیراقتصادی قند دارد [۶]. در این پژوهش از محیط کشت پایه سیزاپک با غلظت قند ۳۰ گرم بر لیتر استفاده شد که دلیل آن سادگی و وجود اجزای معین بود. ضمن اینکه این محیط کشت و غلظت کم منبع کربنی منجر به تولید سیتریک‌اسید به مقدار ناچیز می‌شود که می‌توان با رویکرد سوخت‌وسازی اتخاذ شده، تولید سیتریک‌اسید را در غلظت‌هایی از منبع کربن که مقرون‌به‌صرفه باشند، بهبود بخشید. این موضوع امکان تولید سیتریک‌اسید از منابع کربنی لیگنوسلولوزی و منابع کربنی کم‌مقدار را نیز می‌تواند فراهم کند.

تعداد ۲۰ ماده مختلف تنظیمی در ۳۸ کشت با غلظت‌های متفاوت مورد بررسی قرار گرفت که اطلاعات مربوط به آن‌ها در جدول ۲ آمده است. از بین این مواد ۶ ماده یافت شد که می‌توان با افزودن

جدول ۵ مواد موثر تنظیمی به همراه غلظت مناسب
Table 5 Effective rgulatory small malecules

Ligand	Concentration (mM)
NH_4	2
Leucine	2
Cysteine	2
NaF	0.1
Glutathione	0.1
Metformin	0.5

آن‌ها به محیط کشت، تولید سیتریک‌اسید را افزایش و اگزالیک‌اسید را کاهش داد. اسامی این مواد به همراه غلظت مؤثر آن‌ها در جدول ۵ گزارش شده است.

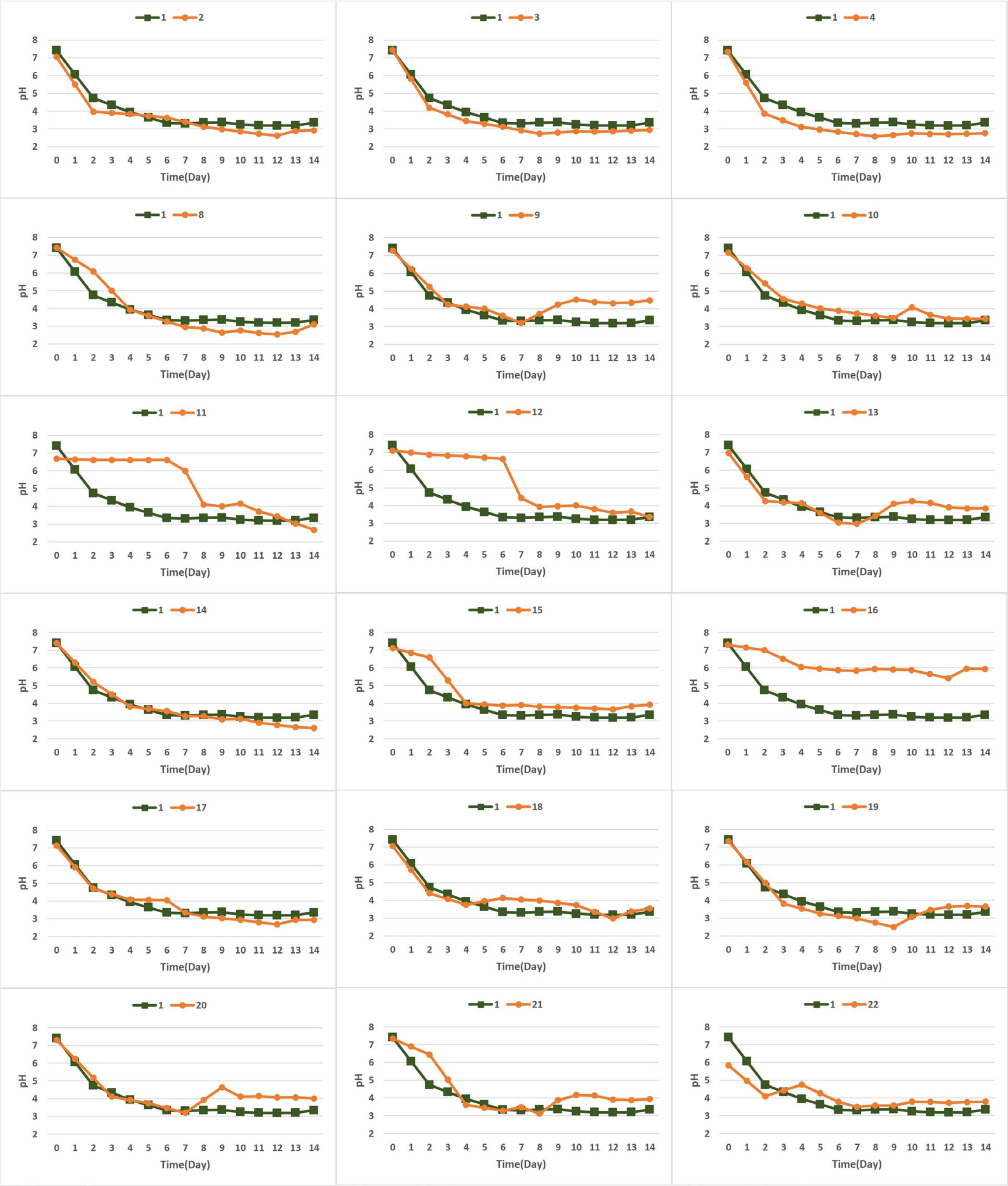
در بررسی اثر مواد مؤثر تنظیمی، ابتدا کشت به همراه غلظت مشخص از آن‌ها صورت گرفت. سپس pH برای هر کدام به‌صورت یک روز در میان اندازه‌گیری شد تا مطالعه دقیقی روی نحوه رشد و تولید محصول از قارچ‌های کشت داده شده، انجام شود. سپس در روزهای ۱۳ و ۱۴ طی دو روز متوالی، برای جلوگیری از خطا و اطمینان از اندازه‌گیری‌های انجام شده، از کشت‌ها نمونه گرفته شد تا با تیتراسیون توسط سود، میزان اسید کل تولیدی و با روش رسوب‌سنجی میزان اگزالیک‌اسید تولیدی توسط قارچ‌ها بررسی شود. ۳۸ کشت بیان‌شده طی ۴ مرحله پشت سر هم و منقطع انجام شد تا غلظت مناسب برای تنظیم‌کننده‌ها به‌دست آید.

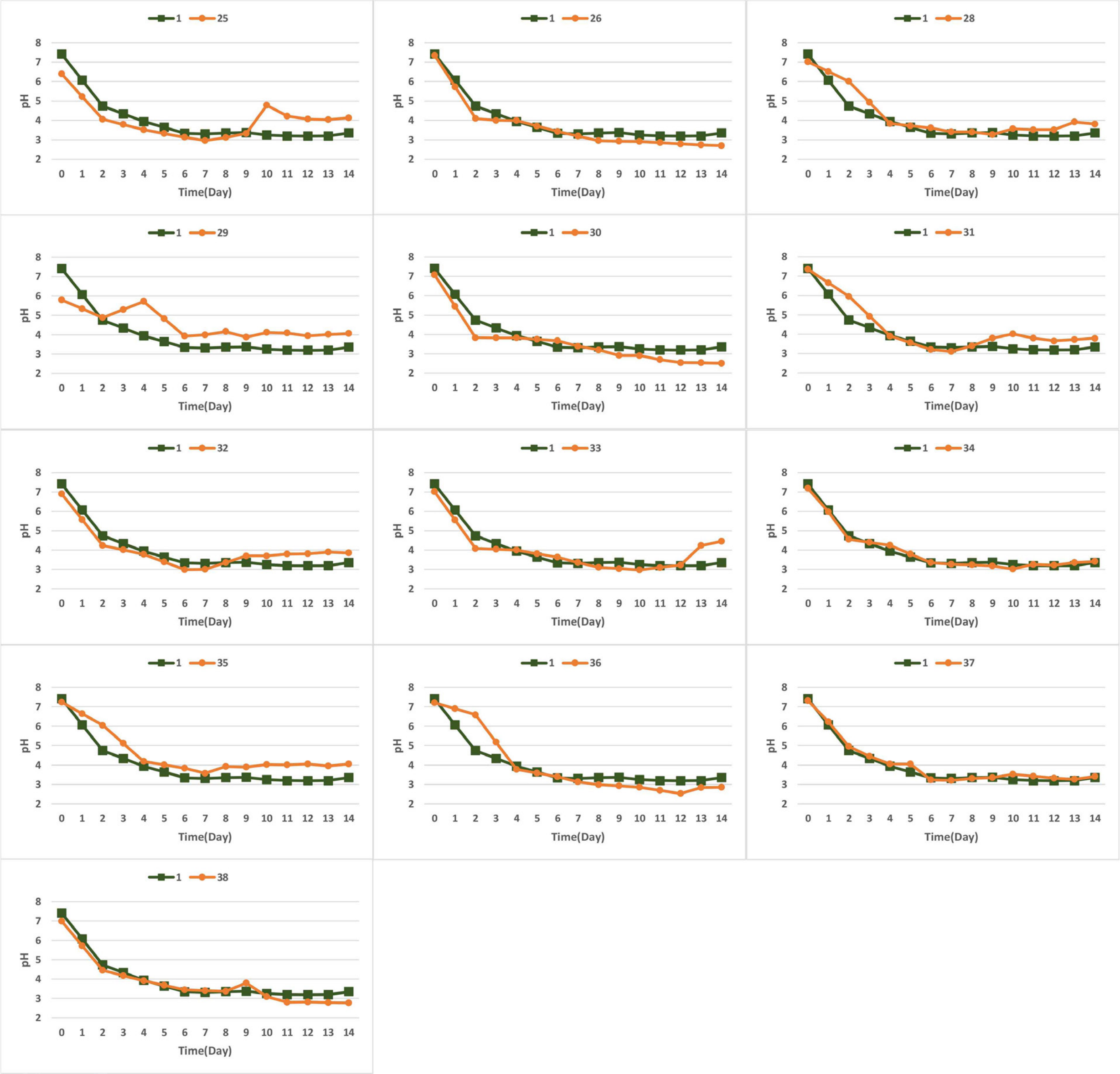
۳-۳-۱ اثر مواد تنظیمی بر رشد

در اولین مرحله از کشت‌ها، بالا رفتن pH بسیاری از آن‌ها پس از چند روز از شروع رشد مشاهده شد که دلالت بر مطلوب‌نبودن غلظت گزارش شده در پایگاه‌های داده برای شرایط invivo بود. به همین دلیل در مراحل بعد، غلظت مواد تنظیمی با حساسیت بیشتری به محیط افزوده شد. مواد تنظیمی در بعضی موارد فاز تأخیر را بسیار طولانی یا حتی رشد را با مشکل مواجه کردند. به‌عنوان مثال رشد قارچ در محیط کشت دارای بازدارنده آلفا کتوگلوتارات و آسپارتات با تأخیر ۶ روزه آغاز شد (کشت ۱۱ و ۱۲). این کشت با تنظیم‌کننده آلفاکتوگلوتارات به‌صورت تنها و با غلظت‌های متفاوت نیز انجام شد و مشاهده شد که همچنان این ماده می‌تواند خاصیت بازدارندگی بر روی رشد داشته باشد. شکل ۲ مربوط به pH موادی است که مورد بررسی قرار گرفتند. در همه کشت‌های حاوی مواد موثر یعنی کشت‌های شماره ۸، ۱۴، ۱۷، ۲۶، ۳۰ و ۳۶ مشاهده شد که pH این کشت‌ها پایین‌تر از حالت کنترل یعنی کشت شماره ۱ است که نشان می‌دهد این مواد با غلظت مذکور علاوه بر اینکه خاصیت بازدارندگی روی رشد ندارند، می‌توانند سبب تولید بیشتر اسید شده که pH توانسته به اعداد پایین‌تری برسد یا توانسته‌اند سبب انتشار پروتون به محیط شوند تا pH به مقادیر بهینه تولید سیتریک‌اسید برسد و مقدار آن افزایش یابد. کشت کنترل که بدون ماده تنظیمی بود، در محدوده بهینه برای تولید اگزالیک‌اسید یعنی مقادیر بالای ۳ باقی ماند. نکته اینکه شماره کشت‌های گزارش شده در شکل ۲ بر اساس کشت‌های گزارش شده در جدول ۲ است. در مورد کشت‌های حاوی ساکارز همان‌طور که گفته شد می‌توانند به‌عنوان منبع کربن مطلوب‌تری برای تولید سیتریک عمل کنند. همان‌طور که مشخص است توانسته‌اند pH را به محدوده‌های پایین‌تری برسانند.

۳-۳-۲ اثر مواد تنظیمی بر تولید محصول

پس از بررسی pH به‌عنوان معیاری برای رشد و تولید محصول، در روزهای پایانی رشد ۱۴ روزه قارچ از هر ارلن نمونه گرفته شد تا با تیتراسیون سود به همراه شناساگر فنل‌فتالئین، غلظت حدودی اسید کل موجود در کشت اندازه‌گیری شود. نتایج این تیتراسیون در نمودار شکل ۳ برای مواد تنظیمی آورده شده است. دلیل بررسی غلظت اسید کل، اطمینان از تولید محصول و رشد مناسب بود. ضمن اطمینان از عدم خاصیت بازدارندگی مواد تنظیمی در رشد و تولید محصول، می‌توان از مقادیر اسید موجود در مقایسه آن‌ها با اندازه‌گیری اگزالیک‌اسید به‌عنوان محصول جانبی با روش رسوب‌دهی اطمینان حاصل کرد که با اینکه اگزالیک‌اسید کاهش پیدا کرده است اما اسید کل تولیدی توسط قارچ کاهش نداشته و محصول جانبی به سمت تولید محصول مطلوب ما یعنی سیتریک‌اسید رفته است. بررسی نتایج تیتراسیون نشان داد در مراحل اولیه کشت که غلظت مواد تنظیمی زیاد بود، همان‌طور که نمودار pH نشان می‌داد غلظت اسید تولیدی نیز کمتر از حالت کنترل بود. تیتراسیون برای مواد مؤثر نشان داد در اکثر موارد میزان سود مصرفی در مقایسه با نمونه کنترل افزایش داشته است. این افزایش می‌تواند به‌دلیل تولید اسید آلی بیشتر، تغییر نوع اسید آلی یا انتشار پروتون به محیط باشد چرا که روش تیتراسیون با سود میزان پروتون موجود در محیط را می‌سنجد و توانایی تشخیص نوع اسید را ندارد، اگرچه می‌توان گفت در اثر تولید بیشتر


1 2
1 3
1 4
1 8
1 9
1 10
1 11
1 12
1 13
1 14
1 15
1 16
1 17
1 18
1 19
1 20
1 21
1 22
pH
2 3 4 5 6 7 8
Time(Day)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

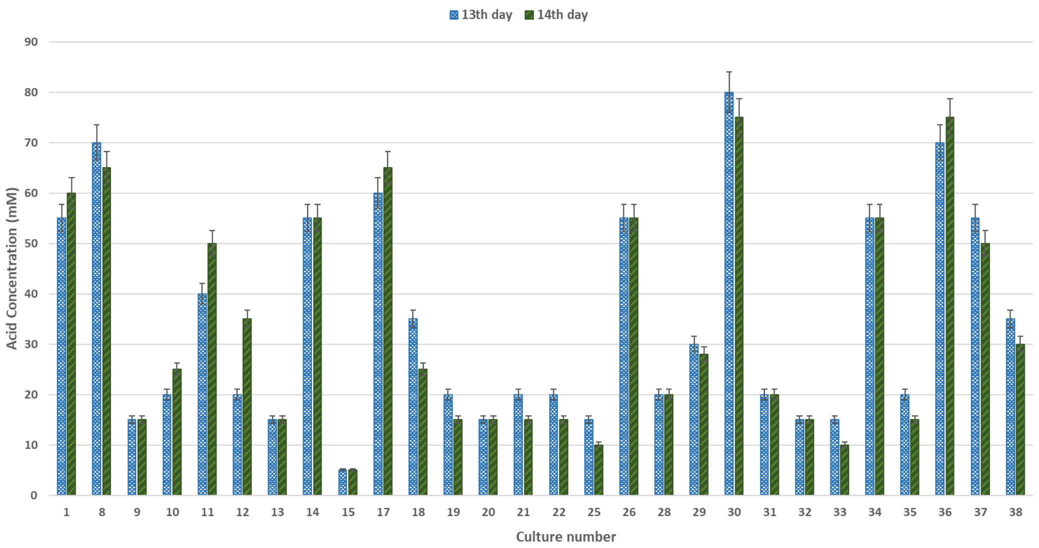


شکل ۲ تغییرات pH مواد آزمایش شده در رشد ۱۴ روزه قارچ بر اساس شماره کشت‌های جدول ۲
Figure 2 pH of regulatory medium within 14 days of fungus culture based on table 2

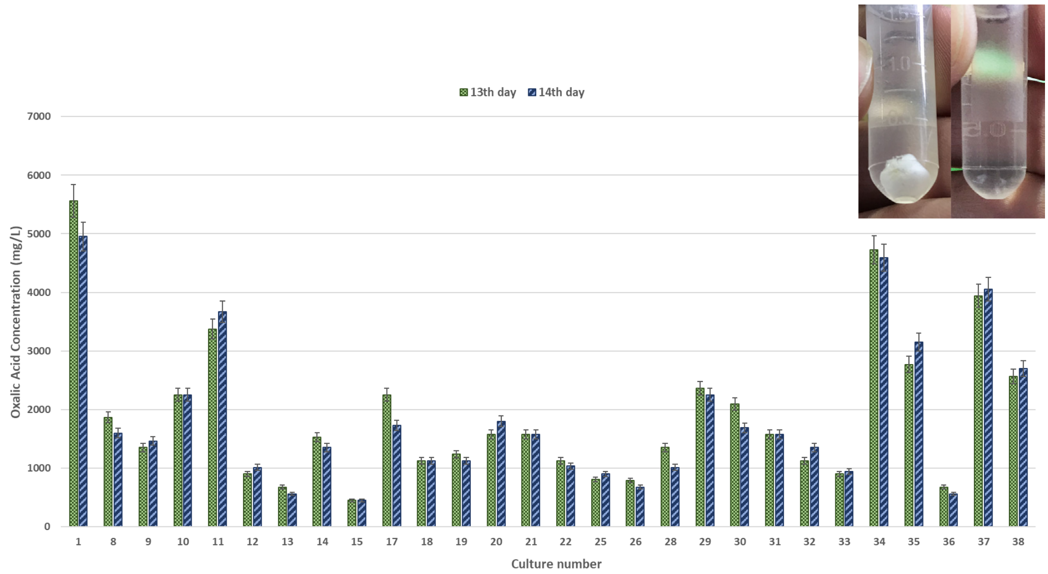
اسیدهای آلی همچون سیتریک که می‌توانند ۳ پروتون آزاد کنند عدد تیتراسیون نیز می‌تواند مقادیر بیشتری نشان دهد.

پس از اندازه‌گیری میزان اسید کل، غلظت اگزالیک‌اسید تولیدی با روش رسوب‌دهی به‌دست آمد. رسوب کلسیم‌اگزالات، در نمونه‌های گرفته شده از کشت‌ها به وضوح قابل مشاهده است. به‌عنوان مثال در شکل ۴ دو نمونه که شامل ماده مؤثر تنظیمی و دیگری کشت کنترل بدون ماده افزودنی است، قابل مشاهده است. نتایج غلظت اگزالیک‌اسید موجود در نمونه‌ها پس از تیتراسیون در شکل ۴ آورده شده است. بررسی نتایج تیتراسیون برای اندازه‌گیری میزان اگزالیک‌اسید نشان داد کاهش قابل‌توجهی در میزان این اسید آلی در مقایسه با نمونه کنترل وجود دارد. اثر ۳ ماده از مواد مؤثر به‌دست آمده از مرحله غربالگری در نهایت با سوانگاری مایع با بازدهی بالا بررسی شد تا میزان دقیق تولید محصولات به‌دست آید.

همه مواد مؤثر به‌دست آمده از غربالگری دارای اثر یکسان بودند؛ اما رسیدن به این هدف با سازوکارهای متفاوت انجام شد. به‌عنوان مثال نمک‌های آمونیومی اثرات متفاوتی در کشت قارچ آسپرژیلوس نایجر دارند. گزارش شده این قارچ با مصرف آمونیوم به‌عنوان منبع نیتروژن می‌تواند پروتون به محیط آزاد کند که این امر می‌تواند pH را کاهش داده و به مقادیر بهینه برای تولید سیتریک‌اسید برساند [۱۸]. همین‌طور غلظت بالای این نمک می‌تواند سبب کاهش تولید آلفاکتوگلوتارات دهیدروژناز شده که به‌عنوان عامل تجزیه‌کننده سیترات شناخته می‌شود. اثر دیگر اینکه این نمک می‌تواند نقش بازدارندگی سیترات روی آنزیم PFK را کاهش دهد و شار گلیکولیز را افزایش دهد و به



شکل ۳ اسید تولیدی برای کشت‌های جدول ۲ در روز سیزدهم و چهاردهم (mM)
Figure 3 Acid concentration in 13th and 14th day based on table 2 (mM)



شکل ۴ اگزالیک‌اسید تولیدی برای کشت‌های جدول ۲ در روز سیزدهم و چهاردهم اندازه‌گیری‌شده با روش رسوب‌دهی با کلسیم‌کلرید (mg/L)
Figure 4 Oxalic acid concentration in 13th and 14th day based on table 2 measured by precipitation with CaCl2 (mg/L)

نوعی فعال‌کننده این آنزیم باشد که در این پژوهش نیز با همین هدف مورد انتخاب قرار گرفت. دو ماده اثرگذار بعدی اسیدآمینه‌های لوسین و سیستئین بودند. انتخاب لوسین از پایگاه برندا برای خاصیت بازدارندگی تجزیه سیترات به استیل‌کوآنزیم‌آ و اگزالواستات صورت گرفت [۳۵]. انتخاب سیستئین نیز برای نقش فعال‌کنندگی آنزیم مالات دهیدروژناز برای تولید بیشتر پیش‌ساز تولید سیتریک یعنی اگزالواستات بود [۳۶].

اسیدهای آمینه به‌دلیل نقش پیش‌سازی که در رشد و سوخت‌وساز سلولی دارند به‌عنوان تنظیم‌کننده انتخاب مناسبی نیستند به خصوص که غلظت مؤثر این مواد مقداری برابر با اجزای محیط کشت دارد. با توجه به قیمت بالای این مواد و غلظت بالای مورد نیاز، هزینه زیادی برای رسیدن به هدف مدنظر نیاز است. به همین دلیل موادی که نقش تنظیمی داشتند و غلظت پایین‌تری از آن‌ها مورد نیاز بود مورد سنجش دقیق میزان محصولات با سوانگاری مایع با عملکرد بالا قرار گرفتند. از بین موادی که نقش تنظیمی داشتند با بررسی نتایج سوانگاری مشخص شد متفورمین مؤثرترین ماده به‌عنوان بازدارنده در تولید اگزالیک‌اسید است که مقدار این اسید از ۷۷۸۳ به ۱۲۲ mg/L رسید. این ماده همان‌طور که در مطالعه قبل مورد بررسی قرار گرفت، بازدارنده آنزیم اگزالواستات هیدرولاز است که می‌تواند با جلوگیری از تجزیه اگزالواستات، ضمن کاهش تولید اگزالیک‌اسید، سوبسترای بیشتری برای تولید سیتریک‌اسید مهیا کند [۱۷]. ماده مهم بعدی گلوتاتیون است که با خاصیت بازدارندگی روی آنزیم ایزوسیترات‌دهیدروژناز، سبب کاهش تجزیه سیتریک‌اسید و افزایش تولید آن شده است [۳۷]. ماده تأثیرگذار بعدی سدیم‌فلورید است

که با کاهش فعالیت آنزیم آکونیتاز، تجزیه سیترات را کاهش می‌دهد و منجر به افزایش تجمع آن می‌شود [۳۸]. محل اثر هر یک از مواد تنظیمی توضیح‌داده‌شده در شکل ۱ آمده است که مواد بازدانده به رنگ قرمز و مواد فعال‌کننده به رنگ سبز روی آنزیم مورد نظر نمایش داده شده‌اند. نکته قابل توجه که در سوخت‌وساز سلولی باید به آن اشاره داشت، این است که با بازدارندگی آنزیم اگزالواستات‌هیدرولاز یا تجمع بیشتر اگزالواستات، امکان افزایش میزان مالیک‌اسید در سوخت‌وساز سلولی وجود دارد. به‌عنوان مثال در مورد گلوتاتیون در مطالعه‌ای این ماده به‌عنوان فعال‌کننده آنزیم مالات‌دهیدروژناز گزارش شده که می‌تواند شار را از سمت اگزالواستات به سمت تولید مالات ببرد و سبب تولید بیشتر مالیک‌اسید شود. به‌طور خلاصه می‌توان گفت میزان اگزالیک‌اسید تولیدی در کشت‌های حاوی مواد موثر تنظیمی آمونیوم، لوسین، سدیم آزید، گلوتاتیون، سیستئین و متفورمین به‌ترتیب با شماره کشت‌های ۸، ۱۴، ۱۷، ۲۶، ۳۰ و ۳۶ با روش رسوب‌دهی به‌ترتیب با مقدار ۱۸۶۸، ۱۵۳۰، ۲۲۵۰، ۷۸۷، ۲۰۹۳ و ۶۷۵ mg/L در مقایسه با مقدار کشت کنترل که ۵۵۶۰ mg/L بود، به‌دست آمد. این مقادیر برای سه ماده سدیم آزید، گلوتاتیون و متفورمین از واکاوی سوانگاری مقدار ۲۷۱۱، ۵۳۳ و ۱۲۲ mg/L در مقایسه با کنترل که ۷۷۸۳ mg/L بود، گزارش شد. همین‌طور مقدار سیتریک‌اسید تولیدی توسط محیط کشت شامل این مواد نیز توسط سوانگاری برابر با ۲۱۷۵، ۵۳۹۰ و ۸۱۰۰ mg/L گزارش شد.

۴ نتیجه‌گیری

در این پژوهش ابتدا مطالعه کامل بر سوخت‌وساز مرکزی قارچ آسپرژیلوس نایجر انجام شد تا بتوان به شناخت مناسبی از واکنش‌های مهم و نقش تنظیمی مواد درون‌سلولی بر شار این مسیرها رسید. در ادامه با هدف از بین بردن محصول جانبی سیتریک‌اسید یعنی اگزالیک‌اسید از مواد تنظیمی در محیط کشت به‌منظور تنظیم درون‌سلولی همان واکنش‌های هدف استفاده شد. این مهم با این هدف انجام شد تا بتوان سیتریک‌اسید زیستی با مقدار قند کم ۳۰ گرم بر لیتر را تولید کرد چرا که در این شرایط سویه وحشی آسپرژیلوس نایجر قادر به این امر نیست. مواد تنظیمی با دقت از پایگاه داده برندا با بررسی تشابه آنزیمی انتخاب شدند سپس در مرحله بعد با بررسی این مواد، آمونیوم، اسیدآمینه‌های لوسین و سیستئین، گلوتاتیون، سدیم‌آزید و متفورمین موثر تشخیص داده شدند و توانستند سبب انتقال شار از اگزالیک‌اسید به سیتریک‌اسید شوند. سویه وحشی اگزالیک‌اسید با مقدار ۷۷۸۳ mg/L تولید می‌کرد که این مقدار پس از افزودن مواد اضافه‌شده به‌ترتیب به مقدار ۱۸۶۸، ۱۵۳۰، ۲۰۹۳، ۷۸۷، ۲۲۵۰ و ۶۷۵ mg/L رسید.

قدردانی

این پژوهش توسط دانشگاه تربیت مدرس [با شماره گرنت IG-۳۹۷۰۱] حمایت مالی شد.

مراجع

[1] Yang L., Lübeck M. and Lübeck P.S., Aspergillus as a Versatile Cell Factory for Organic Acid Production, Fungal Biology Reviews, 31(1), 33-49, 2017.

[2] Knuf C. and Nielsen J., Aspergilli: Systems Biology and Industrial Applications, Biotechnology Journal, 7(9), 1147-55, 2012.

[3] Dhillon G.S., Brar S.K., Verma M. and Tyagi R.D., Recent Advances in Citric Acid Bio-production and Recovery, Food and Bioprocess Technology, 4(4), 505-529, 2011.

[4] Meyer V., Fiedler M., Nitsche B. and King R., The Cell Factory Aspergillus Enters the Big Data Era: Opportunities and Challenges for Optimising Product Formation, Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, 149, 91-132, 2015.

[5] Kumar S., Panwar P., Sehrawat N., Upadhyay S., Sharma A., Singh M. and Yadav M., Oxalic acid: recent developments for cost-effective microbial production, Physical Sciences Reviews, 2024.

[6] Horeh N.B. and Mousavi S.M., Enhanced recovery of valuable metals from spent lithium-ion batteries through optimization of organic acids produced by Aspergillus niger, Waste Management, 60, 666-679, 2017.

[7] Tong Z., Zheng X., Tong Y., Shi Y.C. and Sun J., Systems metabolic engineering for citric acid production by Aspergillus niger in the post-genomic era, Microbial Cell Factories, 18(1), 28, 2019.

[8] Ruijter G.J.G., van de Vondervoort P.J.I. and Visser J., Oxalic acid production by Aspergillus niger: an oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH 5 and in the presence of manganese, Microbiology, 145(Pt 9), 2569-2576, 1999.

[9] Capuder M., Solar T., Bencina M. and Legisa M., Highly active, citrate inhibition resistant form of Aspergillus niger 6-phosphofructo-1-kinase encoded by a modified pfkA gene, Journal of Biotechnology, 144(1), 51-7, 2009.

[10] Hou L., Liu L., Zhang H., Zhang L., Zhang L., Zhang J., Gao Q. and Wang D., Functional analysis of the mitochondrial alternative oxidase gene (aox1) from Aspergillus niger CGMCC 10142 and its effects on citric acid production, Applied Microbiology and Biotechnology, 102(18), 7981-7995, 2018.

[11] Wang L., Zhang J., Cao Z., Wang Y., Gao Q., Zhang J. and Wang D., Inhibition of oxidative phosphorylation for enhancing citric acid production by Aspergillus niger, Microbial Cell Factories, 14, 7, 2015.

[12] de Jongh J. and Nielsen J., Enhanced citrate production through gene insertion in Aspergillus niger, Metabolic Engineering, 10(2), 87-96, 2008.

[13] de Moreno de LeBlanc A., del Carmen S., Chatel J.M., Miyoshi A., Azevedo V., Langella P., Bermúdez-Humarán L.G. and LeBlanc J.G., Current Review of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria for the Prevention and Treatment of Colitis Using Murine Models, Gastroenterology Research and Practice, 2015.

[14] Motamedian E., Sarmadi M. and Derakhshan E., Development of a regulatory defined medium using a system-oriented strategy to reduce the intracellular constraints, Process Biochemistry, 2019.

[15] Firoozabadi H., Mardanpour M.M. and Motamedian E., A system-oriented strategy to enhance electron production of Synechocystis sp. PCC6803 in bio-photovoltaic devices: experimental and modeling insights, Scientific Reports, 11(1), 12294, 2021.

[16] Aminian-Dehkordi J., Mousavi S.M., Marashi S.A., Jafari A. and Mijakovic I., A Systems-Based Approach for Cyanide Overproduction by Bacillus megaterium for Gold Bioleaching Enhancement, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 8, 2020.

[17] Naderi A., Vakilchap F., Motamedian E. and Mousavi S.M., Regulatory-systemic approach in Aspergillus niger for bioleaching improvement by controlling precipitation. Applied Microbiology and Biotechnology, 107, 7331–7346, 2023.

[18] Papagianni M., Advances in citric acid fermentation by Aspergillus niger: biochemical aspects, membrane transport and modeling, Biotechnology Advances, 25(3), 244-63, 2007.

[19] Tong Z., Tong Y., Wang D. and Shi, Y.C., Whole Maize Flour and Isolated Maize Starch for Production of Citric Acid by Aspergillus niger: A Review, Starch, 2023.

[20] Chen H., He X., Geng H. and Liu H., Phys-

iological characterization of ATP-citrate lyase in Aspergillus niger, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 41(4), 721-31, 2014.

[21] Kubicek-Pranz E.M., Mozelt M., Rohr M. and Kubicek C.P., Changes in the concentration of fructose 2,6-bisphosphate in Aspergillus niger during stimulation of acidogenesis by elevated sucrose concentration, Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 1033(3), 250-5, 1990.

[22] Habison A., Kubicek C.P. and Röhr M., Partial purification and regulatory properties of phosphofructokinase from Aspergillus niger, Biochemical Journal, 209(3), 669-76, 1983.

[23] Kubicek C.P., The role of the citric acid cycle in fungal organic acid fermentations, Biochemical Society Symposia, 54, 113-26, 1987.

[24] Odoni D.I., Vazquez-Vilar M., van Gaal M.P., Schonewille T., Martins Dos Santos V.A.P., Tamayo-Ramos J.A., Suarez-Diez M. and Schaap P.J., Aspergillus niger citrate exporter revealed by comparison of two alternative citrate producing conditions, FEMS Microbiology Letters, 366(7), 2019.

[25] Röhr M. and Kubicek C.P., Regulatory aspects of citric acid fermentation by Aspergillus niger, Process Biochemistry, 16, 34-7, 1981.

[26] Wei Z., Xu Y., Xu Q., Cao W., Huang H. and Liu H., Microbial Biosynthesis of L-Malic Acid and Related Metabolic Engineering Strategies: Advances and Prospects, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 9, 2021.

[27] Joosten H.J., Han Y., Niu W., Vervoort J., Dunaway-Mariano D. and Schaap P.J., Identification of fungal oxaloacetate hydrolyase within the isocitrate lyase/PEP mutase enzyme superfamily using a sequence marker-based method, Proteins, 2008.

[28] Andersen M.R., Lehmann L. and Nielsen J., Systemic analysis of the response of Aspergillus niger to ambient pH, Genome Biology, 10(5), R47, 2009.

[29] Yoshioka I., Kobayashi K. and Kirimura K., Overexpression of the gene encoding alternative oxidase for enhanced glucose consumption in oxalic acid producing Aspergillus niger expressing oxaloacetate hydrolase gene, Journal of Bioscience and Bioengineering, 129(2), 172-176, 2020.

[30] Yin X., Shin H., Li J., Du G. and Liu L., Comparative genomics and transcriptome analysis of Aspergillus niger and metabolic engineering for citrate production, Scientific Reports, 7(1), 41040, 2017.

[31] Xie H., Ma Q., Wei D.Z. and Wang F.Q., Transcriptomic analysis of Aspergillus niger strains reveals the mechanism underlying high citric acid productivity, Bioresources and Bioprocessing, 5(1), 21, 2018.

[32] Zheng X., Yu J., Cairns T.C., Zhang L., Zhang Z., Zhang Q., Zheng P., Sun J. and Ma Y., Comprehensive Improvement of Sample Preparation Methodologies Facilitates Dynamic Metabolomics of Aspergillus niger, Biotechnology Journal, 14(3), e1800315, 2019.

[33] Xu D.B., Madrid C.P., Röhr M. and Kubicek C.P., The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by Aspergillus niger, Applied Microbiology and Biotechnology, 30(6), 553-558, 1989.

[34] Nikfar S., Parsa A., Horeh N.B. and Mousavi S.M., Enhanced bioleaching of Cr and Ni from a chromium-rich electroplating sludge using the filtrated culture of Aspergillus niger, Journal of Cleaner Production, 264, 121622, 2020.

[35] Adams I.P., Dack S., Dickinson F.M. and Ratledge C., The distinctiveness of ATP:citrate lyase from Aspergillus nidulans, Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 1597(1), 36-41, 2002.

[36] Tyagi A.K., Siddiqui F.A. and Venkitasubramanian T.A., Studies on the purification and characterization of malate dehydrogenase from Mycobacterium phlei, Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 485(2), 255-67, 1977.

[37] Kil I.S. and Park J.W., Regulation of mitochondrial NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase activity by glutathionylation, Journal of Biological Chemistry, 280(11), 10846-54, 2005.

[38] Agrawal P.K., Bhatt C.S. and Viswanathan L., Studies on some enzymes relevant to citric acid accumulation by Aspergillus niger, Enzyme and Microbial Technology, 5(5), 1983.