



Wpływ czynników środowiska na wzrost grzybni oraz biosyntezę lowastatyny przez *Aspergillus terreus*

Marcin Bizukojć, Stanisław Ledakowicz

Katedra Inżynierii Bioprosesowej, Politechnika Łódzka, Łódź

The influence of environmental factors on mycelial growth and biosynthesis of lovastatin by *Aspergillus terreus*

Summary

In this paper, the results concerning the influence of environmental factor on biomass growth and mevinolinic acid (lovastatin) production by *Aspergillus terreus* ATCC20542 were presented. Three aspects of lovastatin biosynthesis were thoroughly investigated. Firstly, the optimum carbon and nitrogen source were searched for. Secondly, the influence of B-group vitamins supplementation on lovastatin biosynthesis was tested. Finally, the influence of a type of nitrogen source on elemental composition of biomass and mycelial growth and pellet formation kinetics was determined. The best yield of mevinolinic acid was obtained for nitrogen deficient medium of high C/N > 100 ratio, supplemented with B-group vitamin and with lactose and yeast extract as carbon and nitrogen sources applied.

Key words:

lovastatin, mevinolinic acid, *Aspergillus terreus*, medium composition, fungal morphology, elemental composition.

Adres do korespondencji

Marcin Bizukojć,
Katedra Inżynierii
Bioprosesowej,
Politechnika Łódzka,
ul. Wólczańska 213/215,
93-005 Łódź;
e-mail:
marcinbz@p.lodz.pl

1. Wstęp

Lowastatyna jest metabolitem wtórnym wytwarzanym przez grzyby strzępkowe, znajdującym szerokie zastosowanie w medycynie jako środek obniżający poziom endogennego cholesterolu w organizmie człowieka. Grzyby strzępkowe wytwarzają ten metabolit w postaci rozpuszczalnego w wodzie aktywnego

biologicznie β -hydroksykwasu kwasu mewinolinowego. Dopiero w czasie wydzielania tego metabolitu z podłoża hodowlanego następuje jego laktonizacja do lowastatyny. Właśnie nierozpuszczalna w wodzie forma laktonu jest składnikiem tabletek. Najczęściej wykorzystywanym szczepem do wytwarzania tego metabolitu jest *Aspergillus terreus* ATCC20542, wyizolowany przez firmę Merck oraz mutanty tego szczepu. Szczegółowy przegląd literatury na temat historii odkrycia, mechanizmu biosyntezy tego związku oraz warunków hodowli grzybni autorzy tej pracy przedstawili w (1).

Celem pracy jest przedstawienie wyników badań dotyczących wpływu składu podłoża, a w szczególności rodzaju i stężenia źródła węgla i azotu oraz stężenia witamin z grupy B na biosyntezę kwasu mewinolinowego (lowastatyny) przez *Aspergillus terreus*. Ponadto postanowiono zbadać kinetykę kiełkowania spor i peletyzacji grzyba oraz skład pierwiastkowy biomasy grzybni w zależności od zastosowanego źródła węgla i azotu.

2. Materiały i metody

2.1. Szczep i skład podłoży hodowlanych

W badaniach użyto oryginalnego szczepu firmy Merck *Aspergillus terreus* ATCC 205-42. Hodowla prowadzona była w warunkach hodowli wstrząsanej w kolbach kulistych o objętości roboczej 150 ml. Szczepienie podłoża hodowlanego wykonywano 24-godzinnym inokulum. Podłoże inokulacyjne zawierało mniej glukozy lub laktozy (10 g l^{-1}) niż każde z badanych podłoży hodowlanych. Jako źródło węgla w podłożach hodowlanych stosowana była laktoza oraz glukoza. Jako źródło azotu użyto ekstraktu drożdżowego, peptonu kazeinowego lub glutaminianu sodu. Fosfor wprowadzano jako wodorofosforany wg Hajjaj i wsp. (2) lub Casas-Lopez i wsp. (3). W wybranych eksperymentach podłoże wzbogacono w kompleks witamin z grupy B. Wspólnym elementem wszystkich podłoży był zestaw pierwiastków śladowych. Zawierały one następujące pierwiastki: żelazo, mangan, cynk, magnez, wapń, miedź, bor i molibden i były skomponowane według (2) lub (3). W podłożach wg Casas Lopez i wsp. była dodatkowo dodawana biotyna (2). Dla wszystkich podłoży ustalono pH na poziomie 6,5.

Dokładne wartości stężeń źródeł węgla i azotu zostały umieszczone przy odpowiednich wykresach i w tabelach.

2.2. Metody analityczne

Laktoza, glukoza, etanol i glicerol były oznaczane za pomocą HPLC (Waters, USA) na kolumnie Shodex SH1011. Jako eluent stosowano 0,01 N kwas siarkowy. Detekcję prowadzono za pomocą detektora indeksu refraktometrycznego. Elucja

składników następowała w następującej kolejności (większa cząsteczka wypływa wcześniej) laktoza, glukoza, glicerol, etanol.

Kwas mewinolinowy był oznaczany za pomocą HPLC (Waters, USA) na kolumnie Novapak C₁₈. Elucję prowadzono mieszaniną acetonitrylu i 0,1% H₃PO₄ w stosunku 60:40. Maksimum absorpcji kwasu mewinolinowego przy długości fali $\lambda = 238$ nm umożliwiło jego detekcję w ultrafiolecie. Roztwór standardowy kwasu mewinolinowego przygotowano wg (2). Azot organiczny w podłożu oznaczano metodą Kjeldahla (Büchi, Szwajcaria). Stężenie biomasy oznaczano jako suchą masę.

Analizę pierwiastkową biomasy (CHONS) wykonano za pomocą analizatora NA2500 (CE Instruments, Włochy). Wielkość peletek grzybni mierzona była na podstawie obrazów mikroskopowych (Olympus Optical, Japonia) wykonanych w powiększeniach od 1000, poprzez 400, 200, 100 do 40 razy, zależnie od fazy wzrostu strzępki i stopnia aglomeracji peletki. Pomiar powierzchni rzutu peletki wykonano za pomocą programu do cyfrowej analizy obrazu MicroImage 4.0 (Media Cybernetics, USA dla Olympus Optical).

3. Omówienie wyników i dyskusja

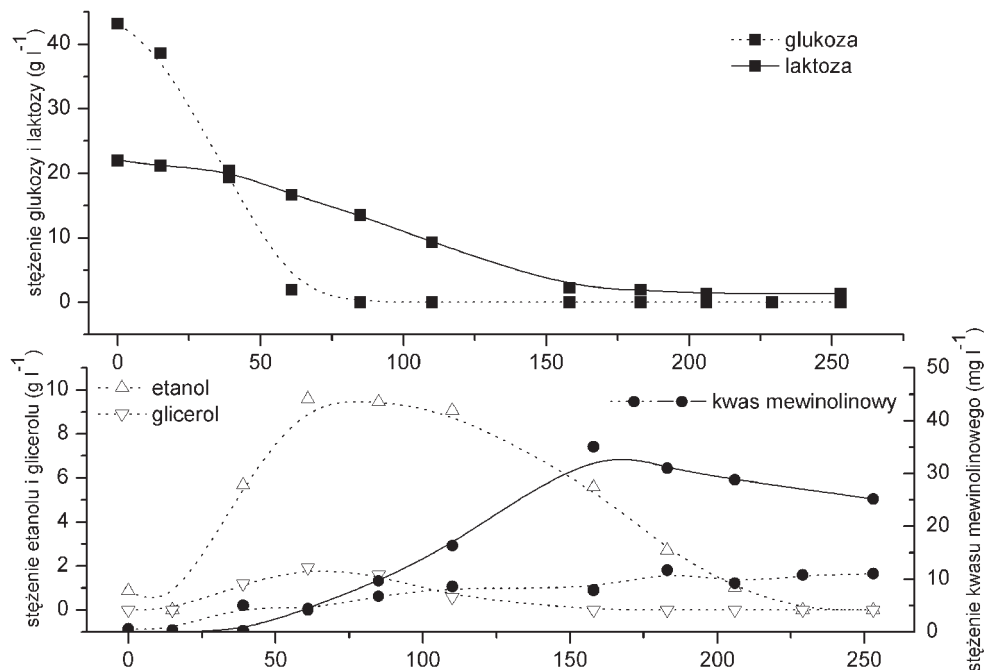
3.1. Wpływ składu podłoża na biosyntezę kwasu mewinolinowego przez *Aspergillus terreus*

Wiedza na temat mechanizmów biosyntezy kwasu mewinolinowego przez *Aspergillus terreus* oraz czynników wpływających na nią jest stosunkową młodą, stąd nadal trwają badania prowadzące do optymalnego składu podłoża hodowlanego i najwłaściwszych sposobów prowadzenia hodowli.

3.1.1. Wpływ rodzaju i stężenia źródła węgla i azotu na biosyntezę kwasu mewinolinowego

Kwas mewinolinowy (lowastatyna) jest związkiem składającym się jedynie z atomów węgla, wodoru i tlenu, co może sugerować na pierwszy rzut oka, że wybór rodzaju źródła węgla jest najistotniejszy ze względu na optymalizację biosyntezy kwasu mewinolinowego.

Wielu autorów stosowało najprostsze i najczęściej wykorzystywane w mikrobiologii źródło węgla, czyli glukozę (4-6). Jednakże uzyskiwane wyniki skłaniały do dalszych poszukiwań i stąd sprawdzano przydatność glicerolu, laktozy, fruktozy (3,7,8). Z tych badań wynikał jeden ogólny wniosek, że im wolniej przyswajane jest źródło węgla, tym lepszą wydajność biosyntezy kwasu mewinolinowego można uzyskać (3), a przykładem wolno przyswajalnych źródeł węgla są glicerol i laktoza.



Rys. 1. Zmiany stężenia źródła węgla, kwasu mewinolinowego oraz produktów ubocznych w czasie w zależności od zastosowanego źródła węgla – linie przerywane: eksperyment z glukozą (45 g l^{-1}) oraz ekstraktem drożdżowym ($12,5 \text{ g l}^{-1}$), pozostałe składniki (2), linie ciągłe: eksperyment z laktozą 20 g l^{-1} oraz ekstraktem drożdżowym (8 g l^{-1}), pozostałe składniki (3).

W przeprowadzonych przez nas badaniach całkowicie potwierdzono przydatność laktozy jako źródła węgla. Zaobserwowano, że w przypadku stosowania glukozy jej wyczerpanie następowało szybciej i już około 50. godziny procesu podłoże hodowlane nie zawierało cukru. Laktoza zaś pozostawała wykrywalna aż do 160. godziny procesu. Dodatkowo stwierdzono, że w podłożu z glukozą pojawiał się etanol oraz glicerol jako produkt uboczny, a wydajność kwasu mewinolinowego pozostawała niewysoka (rys. 1).

Wyczerpanie źródła węgla w obu przypadkach powodowało zahamowanie biosyntezy kwasu mewinolinowego, niezależnie czy to była glukoza, czy też laktoza. Etanol i glicerol, choć występujące w niewielkich ilościach, mogły być użyte jako źródło węgla i z pewnością były, ale raczej na przemianę podstawową. Ani glicerol ani etanol nie sprzyjały biosyntezie kwasu mewinolinowego. Należy również dodać, że etanol i glicerol nie były jedynymi produktami ubocznymi. Zapach podłoża wskazywał na występowanie lotnych estrów i innych związków aromatycznych. Zwiększenie stężenia źródła węgla nie pozwalało na zwiększenie wydajności pożądanego metabolitu, co zostało już wcześniej wykazane poprzez analizę współczynników wydajności (9). Pojawianie się glicerolu i etanolu może być wyjaśnione przez analizę

mechanizmu biochemicznego biosyntezy kwasu mewinolinowego. Wysoki potencjał redukcyjny w komórkach jest warunkiem koniecznym do biosyntezy kwasu mewinolinowego (10,11). Biosynteza glicerolu i etanolu wymaga również NADP. To sprawia, że być może konkurują one z kwasem mewinolinowym o ten dinukleotyd.

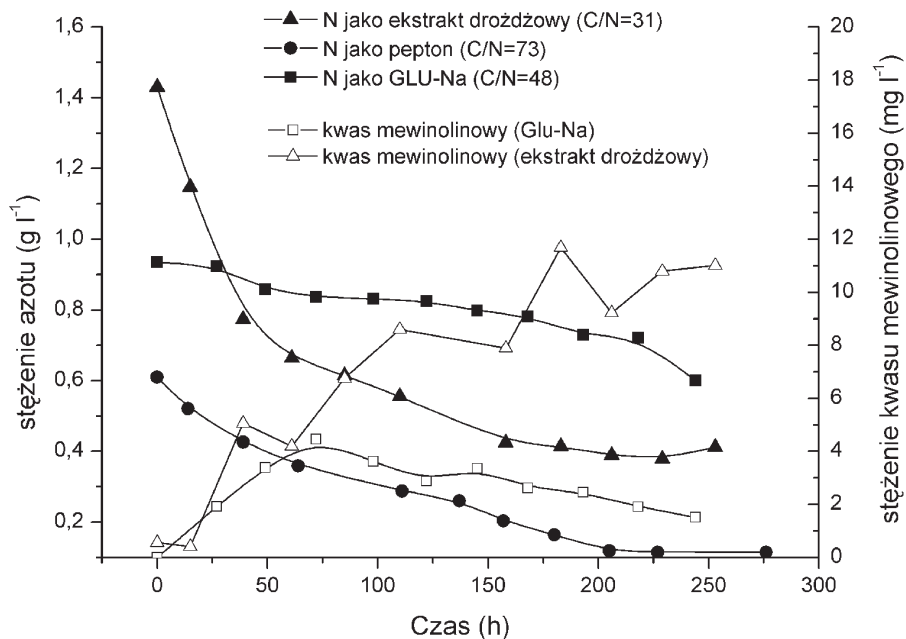
Badając wpływ źródła azotu niesposób jest analizować go w oderwaniu od źródła węgla i odwrotnie. Wszystkie zespoły badawcze, zajmując się wpływem źródła węgla jednocześnie analizowały wpływ rodzaju i stężenia źródła azotu na biosyntezę kwasu mewinolinowego (3,12). Jednak ze względu na to, że w przypadku źródeł azotu wybór odpowiedniego składnika jest znacznie szerszy, stwarza to bardziej skomplikowaną sytuację przy optymalizacji procesu. Co więcej, znacznie trudniejsze jest określenie dokładnego składu chemicznego zastosowanej substancji, szczególnie w przypadku złożonych źródeł azotu. W literaturze można znaleźć tak różnorodne złożone źródła azotu, jak mąka sojowa, pasta pomidorowa, pepton kazeinowy, mąka owsiana, namok kukurydziany, odtłuszczone mleko, ekstrakt drożdżowy, czy glutaminian sodu.

Analizując jednoczesny wpływ źródła węgla i azotu na biosyntezę kwasu mewinolinowego, można stwierdzić, że duża zawartość węgla i deficyt azotu w podłożu są optymalnym układem dla wzrostu grzybni w biosyntezie kwasu mewinolinowego przez *Aspergillus terreus*. Casas Lopez i wsp. uważają, że stosunek C/N w podłożu powinien przekraczać 40 (3).

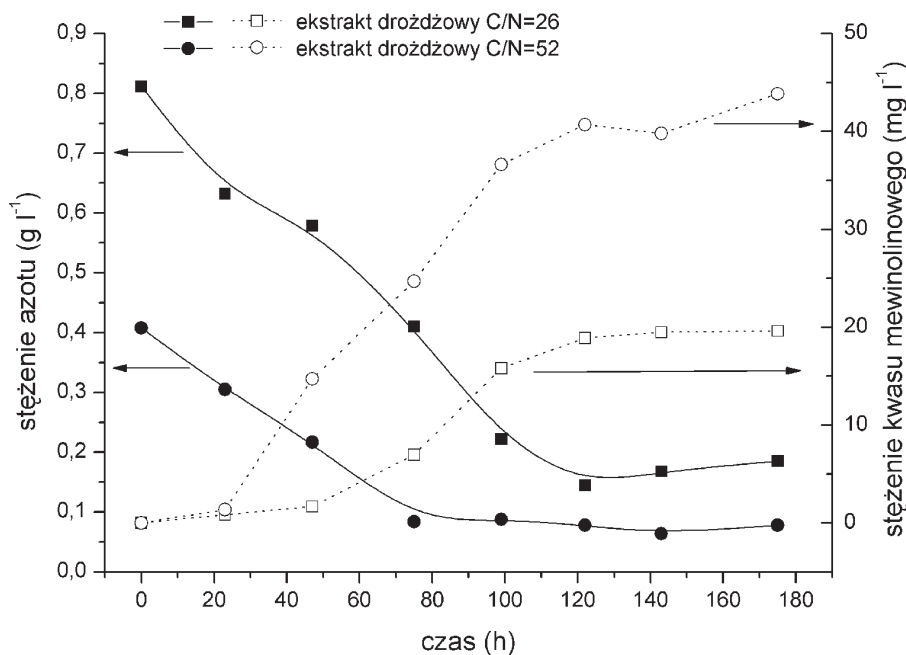
W badaniach własnych autorów potwierdzono tylko częściowo dotychczasowe dane literaturowe. Na rysunku 2 przedstawione zostały krzywe kinetyczne biosyntezy kwasu mewinolinowego uzyskane przy zastosowaniu różnych źródeł azotu.

Na podstawie wyników przedstawionych na wykresie (rys. 2) można stwierdzić, że raczej rodzaj źródła azotu niż stosunek C/N ma istotniejszy wpływ na biosyntezę kwasu mewinolinowego. Należy zauważyć, że w przypadku zastosowania peptonu kazeinowego nie stwierdzono znaczących ilości pożądanego metabolitu w podłożu, pomimo bardzo wysokiego stosunku C/N równego 73. Natomiast ekstrakt drożdżowy (C/N = 31) zastosowany jako źródło azotu pozwolił na uzyskanie najwyższych stężeń kwasu mewinolinowego.

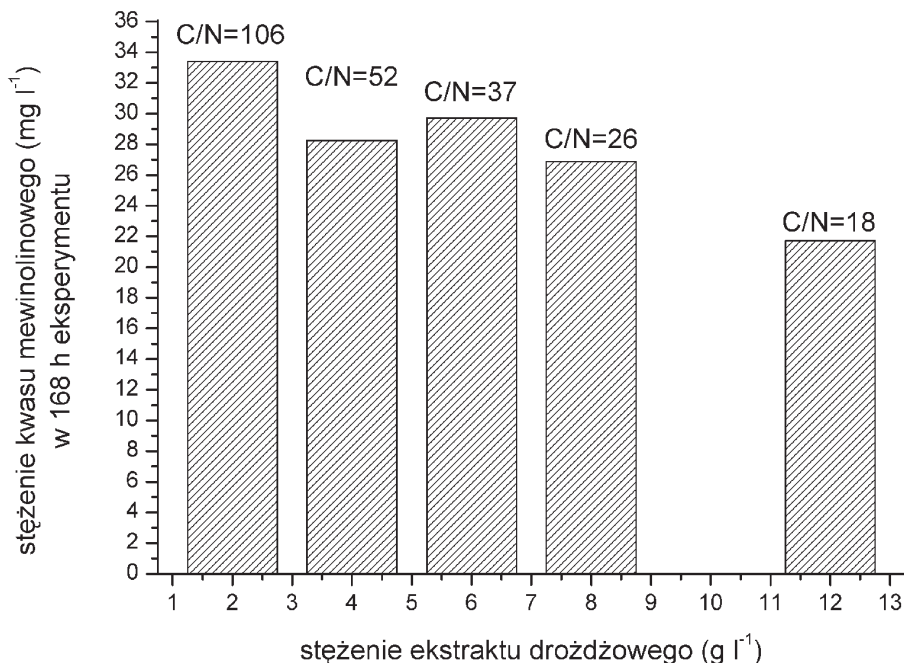
W celu potwierdzenia wpływu stężenia źródła azotu na biosyntezę kwasu mewinolinowego przeprowadzono eksperyment na podłożu zawierającym laktozę jako źródła węgla i ekstrakt drożdżowy jako źródła azotu. Na rysunku 3 przedstawiono wyniki dwóch kinetycznych eksperymentów. Dwukrotne podwyższenie stosunku C/N spowodowało znaczący, około dwukrotny wzrost stężenia kwasu mewinolinowego w podłożu. Co więcej, kwas mewinolinowy zaczął pojawiać się znacznie szybciej już we wczesnej trofofazie, około 20. godziny hodowli. Na rysunku 4 przedstawione są wyniki innej serii eksperymentów prowadzonych w jeszcze szerszym zakresie stężeń ekstraktu drożdżowego. Zależność, że im mniej azotu, tym więcej kwasu mewinolinowego, została tu wyraźnie potwierdzona. Niestety przy obniżonym stężeniu źródła azotu pojawia się w podłożu w znacznych ilościach nierozpoznany produkt uboczny, co jest widoczne na chromatogramie (rys. 5).



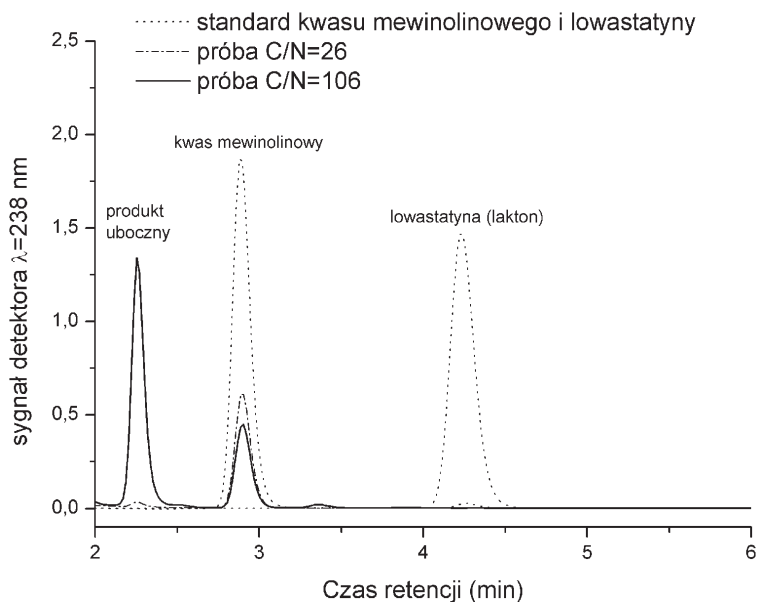
Rys. 2. Wpływ rodzaju źródła azotu na biosyntezę kwasu miewinolinowego. Źródłem węgla była glukoza (45 g l⁻¹), pozostałe składniki podłoża wg (2).



Rys. 3. Wpływ deficytu źródła azotu (ekstrakt drożdżowy) na biosyntezę kwasu miewinolinowego; źródło węgla laktoza, 20 g l⁻¹, pozostałe składniki (3).



Rys. 4. Wpływ stężenia źródła azotu (ekstraktu drożdżowego) na stężenie kwasu mewinolinowego w 168 h eksperymentu; źródło węgla laktoza 20 g l⁻¹, pozostałe składniki (3).



Rys. 5. Wpływ stężenia źródła azotu (ekstraktu drożdżowego) na powstawanie produktów ubocznych biosyntezy kwasu mewinolinowego; stężenie laktozy 20 g l⁻¹, pozostałe składniki wg (3).

3.1.2. Skład podłoża a skład pierwiastkowy uzyskanej biomasy

Do tej pory nie został zbadany wpływ rodzaju źródła węgla i azotu na skład pierwiastkowy biomasy grzybni *Aspergillus terreus*. W tabeli przedstawione zostały wyniki analizy pierwiastkowej biomasy. Skład pierwiastkowy biomasy określono jako średnią z prób pobranych w idiofazie (między 120. a 200. godziną procesu).

Tabela

Wpływ rodzaju źródła węgla i azotu na skład pierwiastkowy biomasy *Aspergillus terreus*

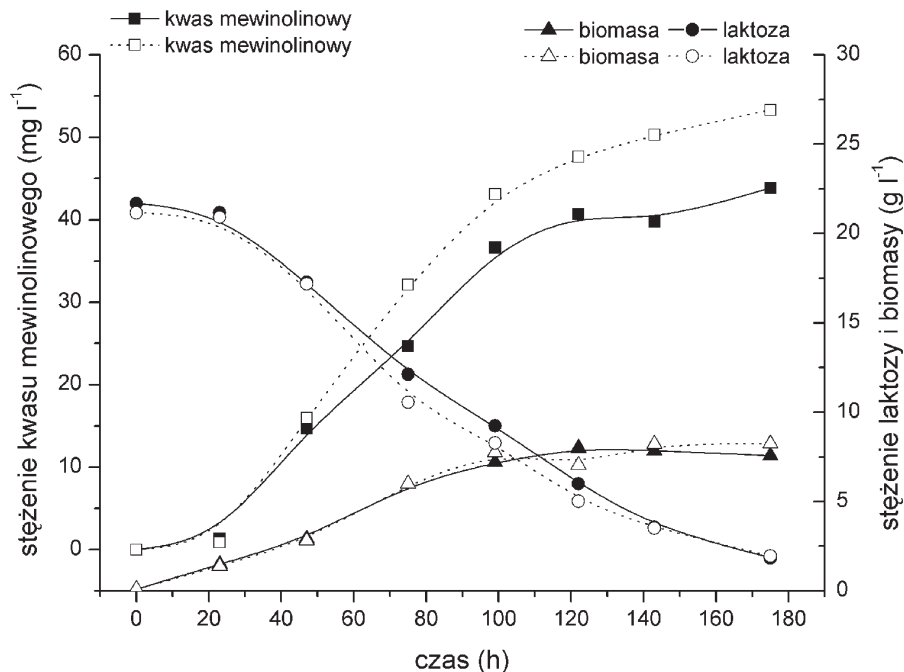
Źródło węgla	Źródło azotu	Skład pierwiastkowy	Maksymalne stężenie kwasu mewinolinowego (mg l ⁻¹)
glukoza (45 g l ⁻¹)	glutaminian sodu (0,935 g N l ⁻¹)	CH _{1,774} O _{0,725} N _{0,0761} S _{0,0016}	3,357
glukoza (45 g l ⁻¹)	pepton kazeinowy (0,610 g N l ⁻¹)	CH _{1,796} O _{0,758} N _{0,0875} S _{0,0022}	<1
glukoza (45 g l ⁻¹)	ekstrakt drożdżowy (1,43 g N l ⁻¹)	CH _{1,756} O _{0,772} N _{0,112} S _{0,0021}	11,684
laktoza (20 g l ⁻¹)	ekstrakt drożdżowy (0,701 g N l ⁻¹)	CH _{1,812} O _{0,763} N _{0,107} S _{0,0018}	35,073

Analizując dane w tabeli, można przyjąć, że generalnie skład pierwiastkowy biomasy nieznacznie zależy od składu podłoża, z wyjątkiem zawartości azotu. Wydaje się, że zależy ona od rodzaju użytego źródła azotu. Potwierdza się zatem, że rodzaj źródła azotu odgrywają istotną rolę w procesie biosyntezy kwasu mewinolinowego przez *Aspergillus terreus*, aczkolwiek trudno tu poszukiwać bezpośredniej zależności. Większa zawartość azotu w biomacie wcale nie musi się korelować z lepszą wydajnością biosyntezy kwasu mewinolinowego, co jest widoczne przy porównaniu obu procesów prowadzonych na ekstrakcie drożdżowym jako źródle azotu.

3.1.3. Wpływ stężenia substancji śladowych i witamin

Do tej pory w literaturze brakuje jakichkolwiek szczegółowych danych na temat kompozycji roztworu pierwiastków śladowych i jej związku z biosyntezą kwasu mewinolinowego. Większość autorów stosuje kompozycję podaną przez Monaghana i wsp. (4) z niewielkimi modyfikacjami.

Szlak biochemiczny syntezy kwasu mewinolinowego wskazuje, że w komórkach *Aspergillus terreus* pojawia się wyjątkowo duże zapotrzebowanie na zredukowane nukleotydy nikotynoamidoadeninowe (10,11). Stąd autorzy tej pracy postawili hipotezę, że dodatek prekursorów tychże nukleotydów, a szczególnie nikotynamidu (witaminy PP) może wpłynąć na biosyntezę kwasu mewinolinowego.



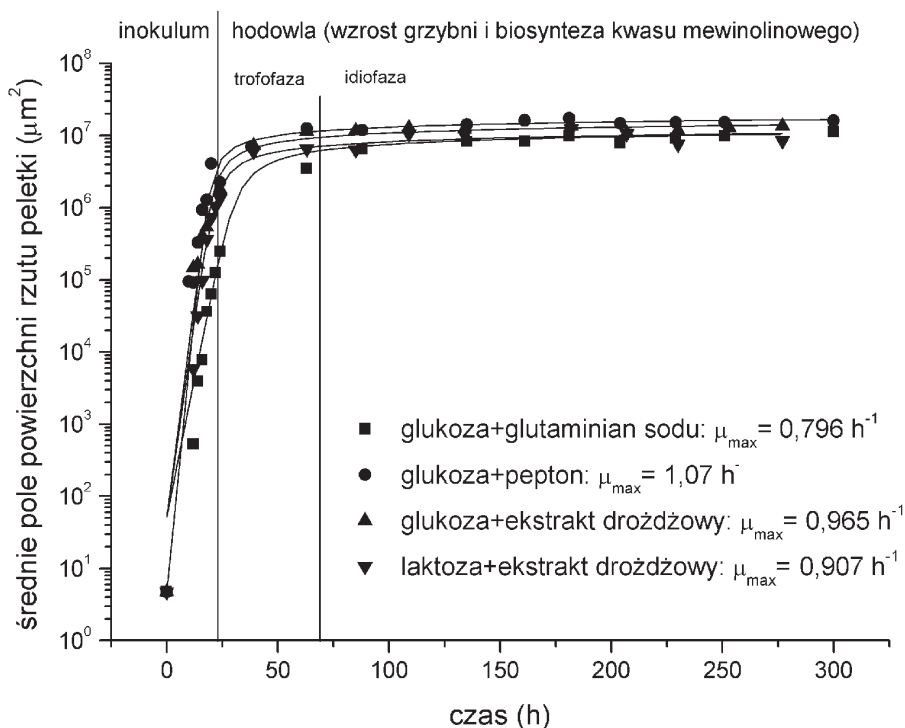
Rys. 6. Wpływ dodatku kompleksu witamin B na biosyntezę kwasu mewinolinowego. Liniją przerywaną i otwartymi symbolami zaznaczono krzywe w układzie, gdy do podłoża z laktozą (3) i ekstraktem drożdżowym przy deficycie azotu (C/N = 52) dodano (na liter podłoża) 5,31 mg nikotynamidu, 0,04 mg tiaminy, oraz po 0,664 mg ryboflawiny, pirydoksyny i pantotenianu sodu, zaś liniją ciągłą i pełnymi symbolami układ bez dodatku witamin z grupy B.

Dlatego przeprowadzone zostały eksperymenty z podłożem wzbogaconym w kompleks witamin B. Uzyskane wyniki okazały się zachęcające. Zaobserwowano wzrost końcowego stężenia kwasu mewinolinowego o około 20%. Interesujące okazało się, że dodatek witamin z grupy B nie wpłynął na szybkość zużywania substratów ani na wzrost biomasy.

Przykładowy przebieg krzywych kinetycznych przedstawiono na rysunku 6.

3.1.5. Morfologia grzybni a biosynteza kwasu mewinolinowego

Zależność pomiędzy biosyntezą metabolitów wtórnych a morfologią grzybni została udowodniona i szczegółowo opisana na przykładzie biosyntezy penicyliny przez *Penicillium chrysogenum* (13). Stąd pojawia się przypuszczenie, że podobna sytuacja może nastąpić przy biosyntezie kwasu mewinolinowego. W literaturze przedmiotu znajdują się tylko nieliczne dane na ten temat (12,14) i dotyczą one głównie wpływu wybranego czynnika środowiska na postać speletyzowanej grzyb-



Rys. 7. Kinetyka kiełkowania spor i aglomeracji peletek na różnych podłożach (15).

ni. Nie podjęto żadnej analizy ani ilościowej, ani kinetycznej, ani też morfologii strzępek.

W pierwszej, wstępnej fazie tej części badań zaproponowano prosty model nie-strukturalny opisujący kinetykę kiełkowania spor oraz aglomeracji strzępek aż do utworzenia makroskopowych peletek (15). Model ten zakłada wykładniczy wzrost wielkości peletki w czasie hodowli w podłożu inokulacyjnym, a następnie wyhamowanie tego wzrostu ze względu na inhibicję wielkością peletki. Inhibicja ta wynika z limitacji dostępu substratu do całej grzybni. W przeprowadzonych badaniach wykorzystano cyfrową analizę obrazu, mierząc średnie pole powierzchni rzutu peletki.

Zmiany wielkości peletek w czasie wraz z wartościami wyznaczonych maksymalnych właściwych szybkości ich wzrostu przedstawiono na rysunku 7.

Skład podłoża miał znaczący wpływ na szybkość wzrostu grzybni *Aspergillus terreus* w jej początkowych stadiach rozwoju. Najwolniejszy wzrost peletek obserwowano na podłożu z glutaminianem sodu jako źródłem azotu, najszybszy zaś na podłożu z peptonem. Niestety trudno było znaleźć zależność między właściwą szybkością wzrostu peletek i biosyntezą kwasu mewinolinowego. Z jednej strony na podłożu zawierającym pepton stężenie kwasu mewinolinowego wynosiło poniżej 1 mg l^{-1} ,

choć biomasa bardzo szybko rosła, a z drugiej najlepszą wydajność pożądanego metabolitu na poziomie $35,073 \text{ mg l}^{-1}$ uzyskano, gdy peletki rosły z pośrednią szybkością $0,907 \text{ h}^{-1}$. Analizując dane można stwierdzić, że jednak inne czynniki odgrywają ważniejszą rolę z punktu widzenia biosyntezy kwasu mewinolinowego, niż szybkość wzrostu peletek. Można przypuszczać, że dopiero zbadanie wewnętrznej struktury peletek pozwoliłoby na znalezienie jakiegoś związku między morfologią i fizjologią grzybni a biosyntezą kwasu mewinolinowego.

4. Wnioski

Podsumowując wyniki przeprowadzonych badań można sformułować następujące wnioski:

- Biosynteza lowastatyny przez *Aspergillus terreus* jest ściśle uzależniona od rodzaju zastosowanego źródła azotu. W przeprowadzonych badaniach jednoznacznie potwierdzono przydatność ekstraktu drożdżowego.

- Deficyt źródła azotu (wysoki stosunek C/N) sprzyja biosyntezie lowastatyny, niemniej jednak powstawanie produktów ubocznych może stanowić problem w późniejszym odzysku lowastatyny z podłoża.

- Biosynteza lowastatyny rozpoczyna się już w trofofazie, jednak niezbędnym warunkiem do dobrej wydajności tego metabolitu jest zapewnienie odpowiedniego stężenia źródła węgla również w idiofazie. Dlatego szybko metabolizowana glukoza raczej nie jest zalecana jako substrat węglowy dla biosyntezy lowastatyny.

- Otwarta pozostaje sprawa dodatku substancji śladowych, takich jak pierwiastków śladowych i witamin. Niemniej jednak istnieją przesłanki, że dodatek witamin z grupy B pozytywnie wpływa na biosyntezę lowastatyny.

- Rodzaj źródła azotu wpływa na skład pierwiastkowy biomasy, co może mieć pośredni związek z biosyntezą lowastatyny.

- Badania kinetyki wzrostu grzybni za pomocą technik analizy obrazu tylko na poziomie morfologii peletek nie pozwalają na znalezienie związku pomiędzy formą morfologiczną grzybni a biosyntezą kwasu mewinolinowego. Jednakże niewykluczone jest, że zbadanie wewnętrznej struktury peletek pozwoli na określenie takiej zależności.

Praca ta była częściowo sfinansowana ze środków budżetowych na naukę w latach 2005-2007 jako projekt badawczy nr 3 T09C 013 28.

Autorzy dziękują pani mgr Ewie Stelmach za wykonanie analizy pierwiastkowej biomasy.

Literatura

1. Bizukojć M., Ledakowicz S., (2005), *Biotechnologia – Monografie*, 2, 2, 55-67.
2. Hajjaj H., Niederberger P., Luboc P., (2001), *Appl. Env. Microbiol.*, 67, 2596-2602.
3. Casas Lopez J. L., Sanchez Perez J. A., Fernandez Sevilla J. M., Acien Fernandez F. G., Molina Grima E., Chisti Y., (2003), *Enz. Microb. Technol.*, 33, 270-277.
4. Monaghan R. L., Alberts A. W., Hoffman C. H., Albers-Schonberg G., (1980), US Patent 4231938.
5. Alberts A. W., Chen J. Kuron G., Hunt V., Huff J., Hoffman C., Rothrock J., Lopez M., Joshua H., Harris E., Patchett A., Monaghan R., Currie S., Stapley E., Albers-Schonberg G., Hensens O., Hirshfield J., Hoogsteen K., Liesch J., Springer J., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77, 3957-3961.
6. Greenspan M. D., Yudkowitz J. B., (1985), *J. Bacteriol.*, 162, 704-707.
7. Casas Lopez J. L., Sanchez Perez J. R., Fernandez Sevilla J., Rodriguez Porcel E. M., Chisti Y., (2005), *J. Biotechnol.*, 116, 61-77.
8. Manzoni M., Bergomi S., Rollini M., Cavazzoni V., (1998), *Biotechnol. Technol.*, 12, 529-532.
9. Bizukojć M., Ledakowicz S., (2005), *Inż. Ap. Chem.*, 44, 36, 9-10.
10. Sutherland A., Auclair K., Vederas J. C., (2001), *Curr. Opin. Drug Discov. Develop.*, 4, 229-236.
11. Hendrickson L., Davis C. R., Roach C., Nguyen D. K. Aldrich T., McAda P. C., Reeves C. D., (1999), *Chemistry and Biology*, 6, 429-439.
12. Lai L.-S., Pan C.-C., Tzeng B.-K., (2003), *Proc. Biochem.*, 38, 1317-1326.
13. Nielsen J., (1992), *Adv. Biochem. Eng.*, 46, 187-223.
14. Lai L.-S. T., Tsai T.-H., Wang T. C., Cheng T.-Y., (2005), *Enz. Microb. Technol.*, 36, 737-748.
15. Bizukojć M., Ledakowicz S., Sencio B., (2004), *Proceedings of 5th European Symposium on Biochemical Engineering Science*, Stuttgart.