

Biosynteza lowastatyny przez *Aspergillus terreus*

Marcin Bizukojć, Stanisław Ledakowicz

Katedra Inżynierii Bioprosesowej, Politechnika Łódzka, Łódź

Biosynthesis of lovastatin by *Aspergillus terreus*

Summary

In this paper, the review of the latest advances in the biosynthesis of statins, especially of lovastatin by *Aspergillus terreus* is presented. The following problems were discussed: the discovery of statins and isolation of the producing strains, the biochemical mechanism of lovastatin biosynthesis and the influence of medium composition on the lovastatin biosynthesis, and morphology of *Aspergillus terreus* hyphae.

Key words:

statins, lovastatin, mevinoinic acid, *Aspergillus terreus*.

1. Wstęp

Celem pracy jest dokonanie przeglądu dotychczasowej wiedzy na temat biosyntezy statyn przez grzyby strzępkowe ze szczególnym uwzględnieniem biosyntezy lowastatyny przez *Aspergillus terreus*.

Adres do korespondencji

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

2. Odkrycie statyn

Odkrycia statyn dokonano niezależnie w kilku zespołach naukowych w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku. Potrzeba poszukiwania tej grupy związków wyniknęła z odkrycia mechanizmu endogennej biosyntezy cholesterolu w organizmie człowieka (1). Istotne stało się zatem znalezienie sposobu inhibicji

tego procesu, poszukiwano potencjalnego inhibitora oraz miejsca jego działania. Wybrano jeden z pierwszych etapów endogennej biosyntezy cholesterolu katalizowany przez reduktazę 3-hydroksymetyloglutarylo-CoA (3-HMG-CoA).

Znalezienie inhibitora tego enzymu nie było przypadkiem. W japońskim zespole pod kierunkiem Akiry Endo w firmie Sankyo dokonano w latach 1971-1973 screeningu 2600 mikroorganizmów, głównie grzybów strzępkowych, w poszukiwaniu pożądanej substancji. W końcu u *Penicillium citrinum* odnaleziono substancję, której nadano roboczą nazwę ML236B. Jednocześnie na Uniwersytecie w Tokio wyizolowano z *Monascus ruber* M1005 grupę związków oznaczonych jako monakolina J, K i L.

W Stanach Zjednoczonych naukowcy z kilku uniwersytetów w stanie Nowy Jork, m.in. z Princeton, pod kierunkiem Alfreda Alberta i Richarda Monaghana oraz ich współpracownicy z firmy Merck odkryli u *Aspergillus terreus* ATCC 20541 i ATCC 20542 związek, który nazwali mewinoliną. Okazało się później, że monakolina K i mewinolina to ten sam związek.

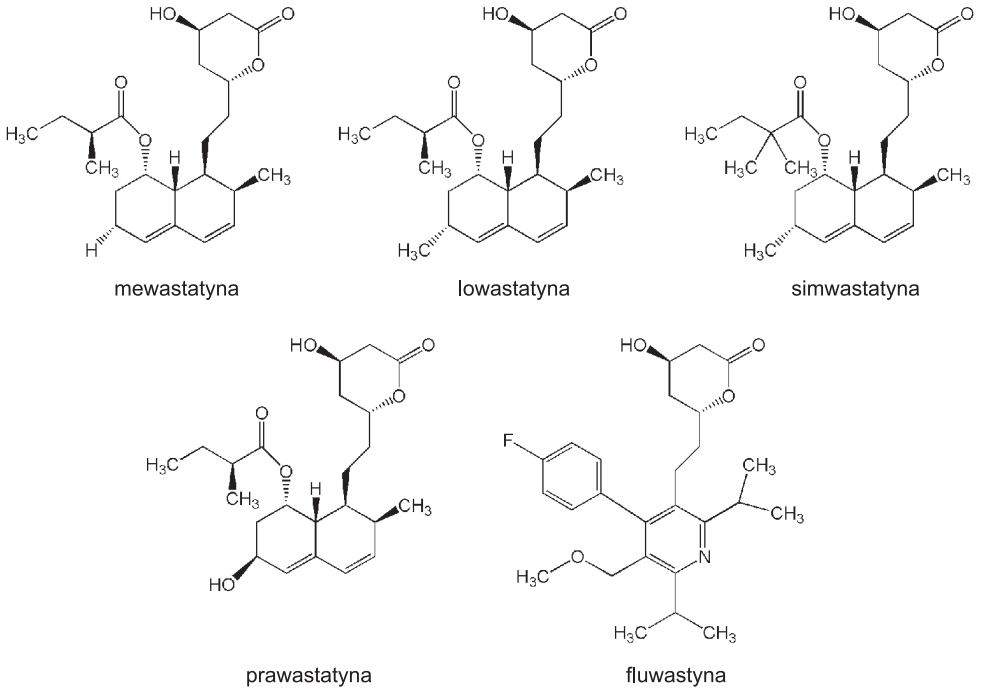
W 1980 r. w Stanach Zjednoczonych zgłoszono patent 4,231,938 zatytułowany „Hypocholesterolemic fermentation products and process of preparation” opisujący związek MSD803, czyli mewinolinę, nazwaną później lowastatyną (2). Od tego czasu rozpoczęły się badania kliniczne, zakończone w roku 1987 wprowadzeniem przez firmę Merck na rynek lowastatyny jako leku pod nazwą Mevacor®.

3. Statyny jako związki chemiczne

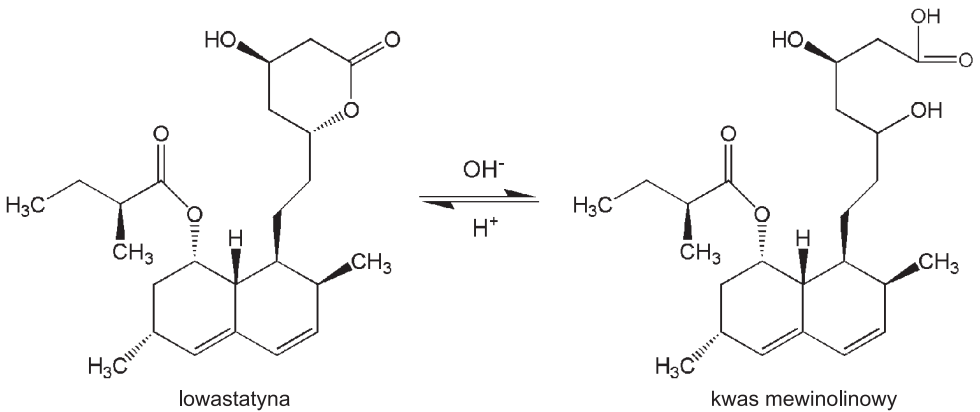
Statyny stosowane w medycynie jako leki przeciwcholesterolowe są związkami pochodzenia naturalnego. Niektóre z nich zostały zmodyfikowane na drodze chemicznej w celu wzmocnienia ich efektu działania. Do składników czynnych tych leków należą m.in. atorwastatyna (Lipitor® firmy Parke-Davies), ceriowastatyna (Baycol® firmy Bayer) fluwastatyna (Lescol® firmy Novartis), prawastatyna (Pravachol® firmy Sankyo), lowastatyna (Mevacor® firmy Merck) oraz simwastatyna (Zocor® firmy Merck).

Wzory strukturalne różnych statyn przedstawiono na rys. 1.

W tym miejscu należy wspomnieć, na przykładzie lowastatyny, o istnieniu dwóch form statyn: nierozpuszczalnej w wodzie formy laktonu, która jest składnikiem wymienionych leków przeciwcholesterolowych oraz rozpuszczalnej w wodzie formy β -hydroksykwasu, która jest formą aktywną (rys. 2). Grzyby strzępkowe ze zrozumiałych względów syntezują formę β -hydroksykwasową – kwas mewinolinowy. W czasie jej wydzielania z podłoży fermentacyjnych następuje jej laktonizacja, czyli utworzenie lowastatyny.



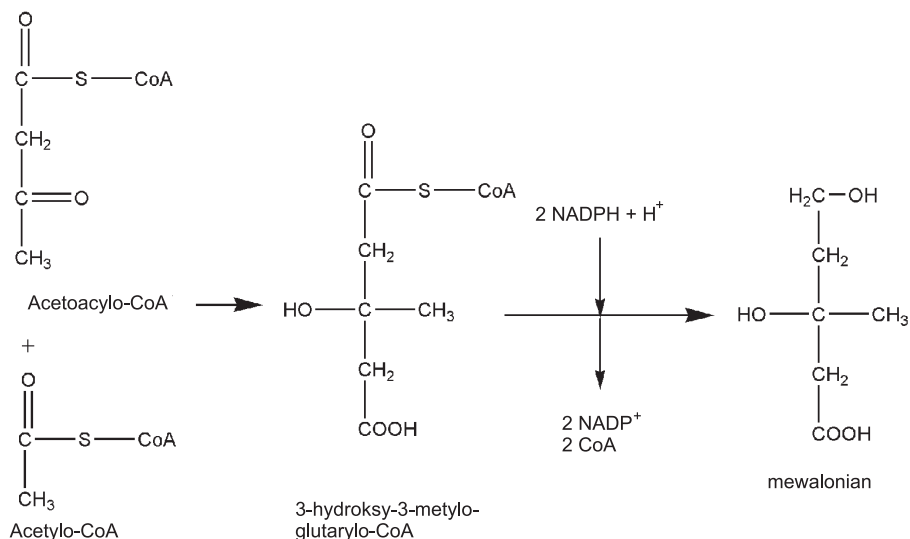
Rys. 1. Naturalne (mewastatyna i lowastatyna) i półsyntetyczne statyny w formie laktonów.



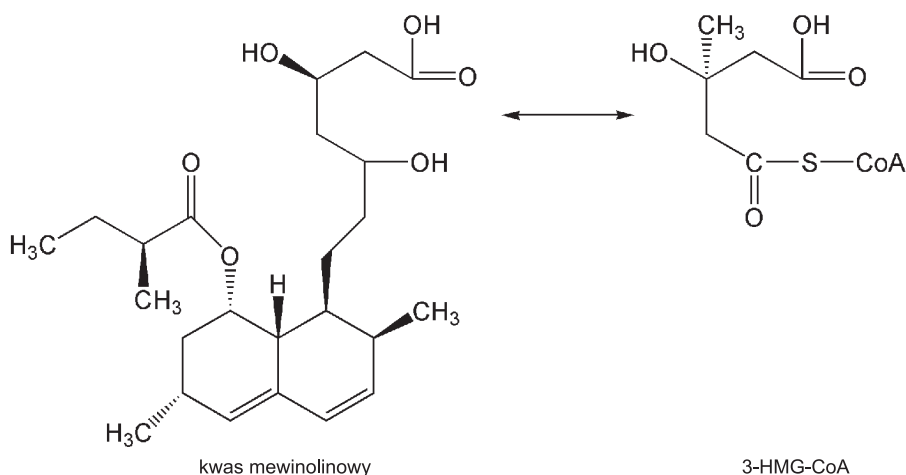
Rys. 2. Lowastatyna jako lakton i β -hydrokys kwas.

3.1. Mechanizm inhibicji biosyntezy cholesterolu u człowieka przez statyny

Statyny są współzawodniczymi inhibitorami reduktazy 3-HMG-CoA. Wspomniało już, że początkowym etapem biosyntezy cholesterolu w organizmie człowieka jest utworzenie 3-HMG-CoA z acetoacetylo-CoA i acetylo-CoA. Kolejny etap polega na redukcji 3-HMG-CoA do mewanolianu (rys. 3) i jest on katalizowany przez reduktazę 3-HMG-CoA.



Rys. 3. Początkowe etapy biosyntezy cholesterolu w organizmie człowieka.

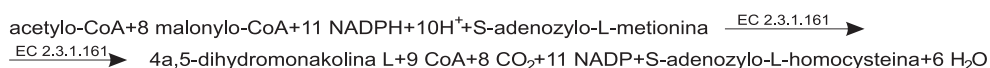


Rys. 4. Analogia w strukturze między kwasem mewanolinowym i 3-HMG-CoA (3).

Dzięki podobieństwu struktury 3-HMG-CoA i β -hydroksykwasowej formy statyn następuje inhibicja reduktazy 3-HMG-CoA (3). Zostało to przedstawione na rysunku 4 na przykładzie lowastatyny (kwasu mewinolinowego).

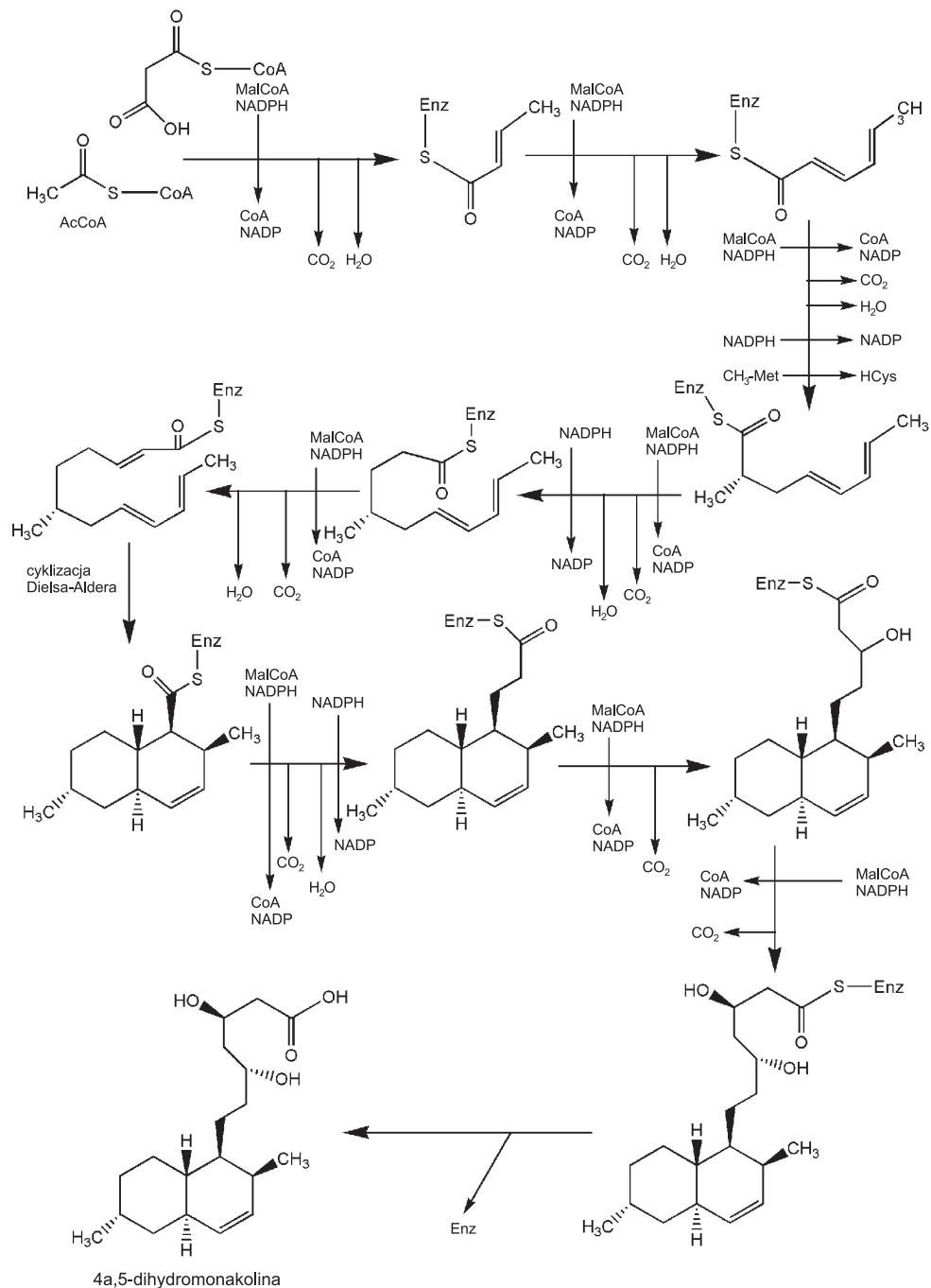
3.2. Mechanizm biosyntezy kwasu mewinolinowego (lowastatyny)

Biosynteza kwasu mewinolinowego u *Aspergillus terreus* przebiega w dwóch etapach. Pierwszy etap, tzw. etap PKS, jest związany z działaniem syntazy nonaketydowej 2.3.1.161, należącej do grupy enzymów zwanych syntazami poliketydowymi (PKS). Sumaryczny zapis reakcji przedstawia się następująco:

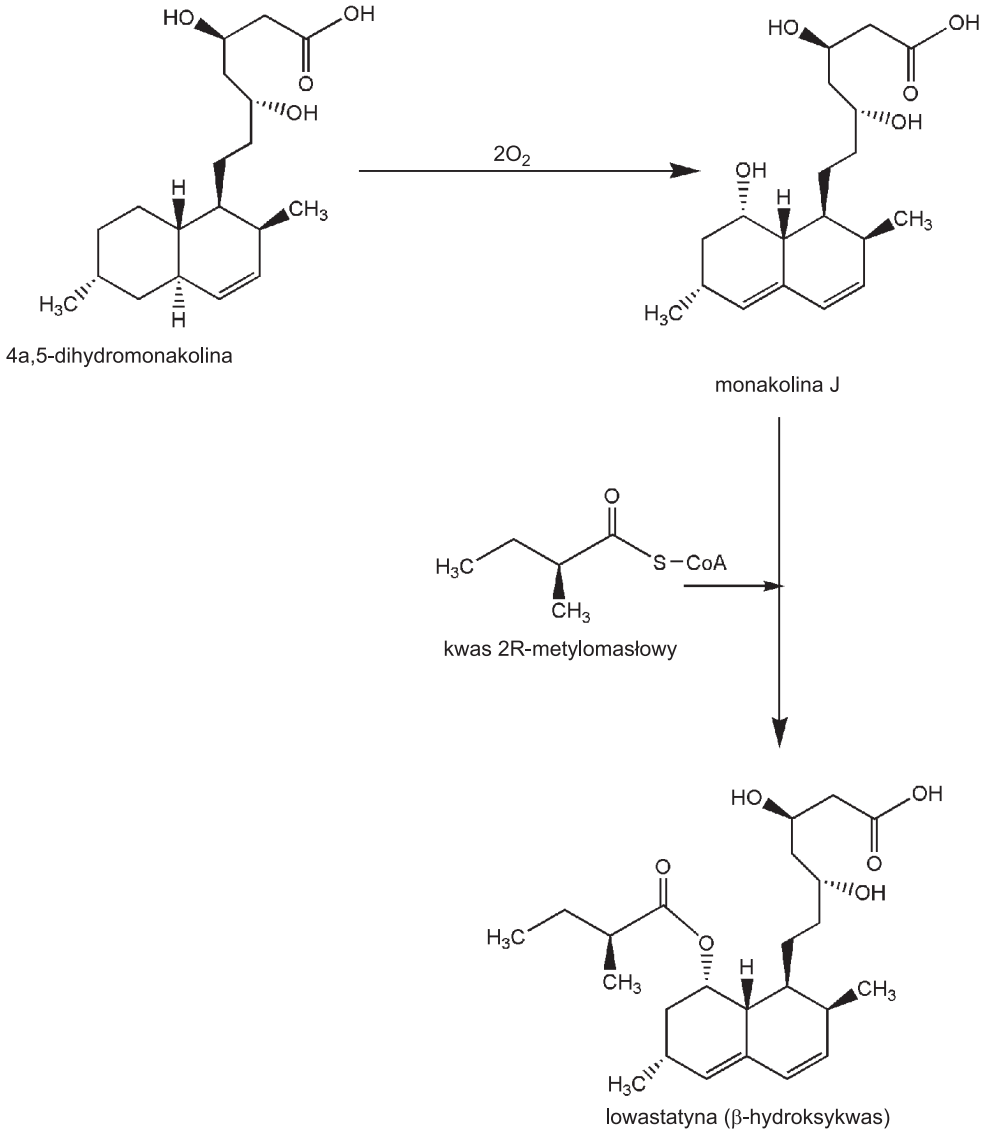


Jednak w rzeczywistości mamy tu do czynienia z dziewięcioma etapami wydłużania łańcucha węglowego oraz tworzenia pierścieni dekalinowych w wyniku kondensacji Dielsa-Aldera. Każdy z tych etapów może się składać z kilku podetapów (4). Przedstawione to zostało na rysunku 5.

W pierwszym etapie tworzy się diketyd z acetylo-CoA (AcCoA) i malonylo-CoA (Mal-CoA). Przyłączanie Mal-CoA jest katalizowane przez ketoreduktazę. Dodatkowo następuje dekarboksylacja uzyskanego produktu pośredniego przy udziale NADPH z wydzielaniem dwutlenku węgla. Jednocześnie tworzy się podwójne wiązanie i wydzielana jest woda (dehydrataza). W następnym etapie łańcuch wydłużany jest o kolejne atomy węgla, należące do cząsteczki Mal-CoA (ketoreduktaza i dehydrataza) i uzyskuje się triketyd. Dalsza synteza prowadząca do tetraketydu jest bardziej złożona. Oprócz przyłączania Mal-CoA (ketoreduktaza) i dehydratacji (dehydrataza) przyłączana jest do tetraketydu grupa metylowa z S-adenozyl-L-metioniny ($\text{CH}_3\text{-Met}$) z wydzielaniem homocysteiny (HCys). Ta reakcja katalizowana jest przez metylotransferazę. Następnie występuje jeszcze dodatkowa redukcja tetraketydu (przyłączenie wodoru pochodzącego z kolejnej cząsteczki NADPH) katalizowana przez enoiloreduktazę. Przekształcenie tetraketydu do pentaketydu związane jest z działaniem ketoreduktazy, dehydratazy i ponownie enoiloreduktazy. Tworzenie heksaketydu to tylko działanie ketoreduktazy i dehydratazy. Heksaketyd podlega następnie enzymatycznej cyklizacji Dielsa-Aldera. Tworzą się wtedy pierścienie dekalinowe. Do tego związku pośredniego przyłącza się kolejny Mal-CoA w reakcjach katalizowanych przez ketoreduktazę, dehydratazę i po raz trzeci przez enoiloreduktazę. Dwa ostatnie etapy aż do utworzenia nonaketydu, to tylko przyłączanie kolejnych dwóch następnych cząsteczek Mal-CoA bez dehydratacji. Wreszcie od nonaketydu odłącza się syntaza nonaketydowa (Enz) i uzyskujemy w ten sposób 4a,5-dihydromonakolinę. Sprawdzając bilans reakcji, stwierdzić można, że do jednej cząsteczki AcCoA przyłącza się osiem cząsteczek Mal-CoA, co wiąże się ze zużyciem ośmiu cząsteczek NADPH i wydzielaniem ośmiu cząsteczek dwutlenku węgla. Pozostałe trzy cząsteczki NADPH biorą udział w reakcjach katalizowanych przez ketoreduktazę, dehydratazę i enoiloreduktazę.



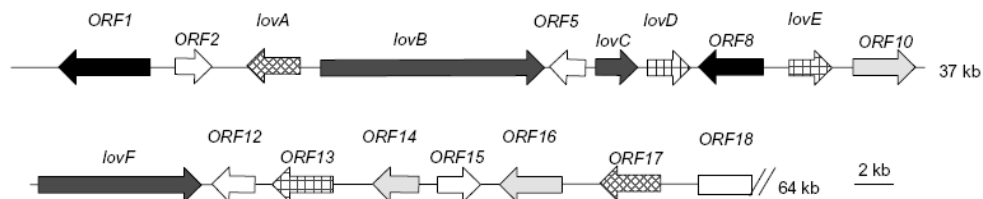
Rys. 5. Biosynteza 4a,5-dihydromonakoliny przy udziale syntazy nonaketydowej – szczegółowe objaśnienia w tekście (4).



Rys. 6. Etap post-PKS biosyntezy lowastatyny (4).

lizowanych przez enoiloreduktazę. Sześć etapów dehydratacji daje w rezultacie sześć cząsteczek wody. Na każdą pojedynczą cząsteczkę 4a,5-dihydromonakoliny mamy do czynienia z przeniesieniem jednej grupy metylowej (4).

Drugi etap biosyntezy lowastatyny, tzw. etap post-PKS, to utlenianie 4a,5-dihydromonakoliny i wreszcie transestryfikacja z kwasem 2R-metylomalowym, który jest z punktu widzenia jego struktury chemicznej diketydem (4). Przedstawione to zostało na rysunku 6.



Rys. 7. Sekwencja genów kodujących biosyntezę lowastatyny (4,6,7,8): *ORF1*, *ORF8* – geny oporności; *LovD* – transesteraza; *ORF2*, *ORF5*, *ORF12*, *ORF15*, *ORF18* – funkcja nieznana, *ORF10*, *ORF14*, *ORF16* – transporter; *LovA*, *ORF17* – cytochrom P₄₅₀; *LovE*, *ORF13* – regulacja; *LovB*, *LovC*, *LovF* – syntaza nonaketydowa.

Syntaza poliketydowa, a ściślej mówiąc syntaza nonaketydowa, odpowiedzialna za biosyntezę lowastatyny, należy do syntaz poliketydowych typu pierwszego. Gen kodujący to białko został odkryty przez Hendricksona i wsp. w 1999 r. (5). Gen ten koduje polipeptyd o masie około 300 kDa. Zawiera on sekwencje kodujące ketosyntazę (KS), acylotransferazę (AT), dehydratazę (DH), enoiloreduktazę (ER), ketoreduktazę (KR) oraz białkowy nośnik grup acylowych (ACP). Polipeptyd ten jest podobny do innych wielofunkcyjnych syntaz poliketydowych z jednym wyjątkiem. Zawiera on dodatkową sekwencję metylotransferazy (MeT) (5).

Na podstawie przeprowadzonych kolejnych badań stwierdzono, że cały system odpowiadający za biosyntezę lowastatyny składa się z następujących elementów opisanych w tym artykule. Geny *lovB* i *lovF* zawierają sekwencje kodujące sześć charakterystycznych domen syntaz poliketydowych, czyli wspomnianych KS, AT, DH, ER, KR, i ACP oraz domenę MeT. Dodatkowo gen *lovF* koduje informacje o syntazie diketydowej odpowiedzialnej za biosyntezę kwasu 2R-metylomasłowego. Gen *lovD* jest zaś odpowiedzialny za ekspresję enzymu końcowego etapu tworzenia lowastatyny, czyli transestryfikację monakoliny J z kwasem 2R-metylomasłowym. Mutanty pozbawione tego genu tworzyły tylko monakolinę J. Geny *lovE* i *ORF13* są odpowiedzialne za kodowanie białek regulujących biosyntezę kwasu mewinolinowego. Ich działanie jest ściśle związane z obecnością jonów cynku Zn²⁺. Wprowadzenie dodatkowych kopii tego genu prowadzi do zwiększenia produkcji lowastatyny (6). Kolejne dwa geny *lovA* i *ORF17* są odpowiedzialne prawdopodobnie za kontrolę etapów utleniania w fazie post-PKS i są związane z genami cytochromu P₄₅₀, natomiast geny *ORF1* i *ORF8* zapewniają mikroorganizmom odporność na lowastatynę (4). Sekwencję genów odpowiedzialnych za biosyntezę lowastatyny przedstawiono na rysunku 7.

4. Mikroorganizmy zdolne do biosyntezy statyn

Grzyby strzępkowe należące do trzech rodzajów *Penicillium*, *Monascus* i *Aspergillus*, uważane są za najlepszych producentów statyn. Najwcześniej wykorzystywany był gatunek *Penicillium citrinum*. Su i wsp. (2003) przebadali 16 szczepów *Monascus* pod

względem ich przydatności do biosyntezy kwasu γ -aminomasłowego oraz monakoliny K, czyli lowastatyny na podłożu stałym (9). Obecnie jednak w praktyce najczęściej wykorzystywany jest *Aspergillus terreus* i jego mutanty. Manzoni i wsp. (1999), badając czternaście szczepów z rodzaju *Monascus* i siedem z rodzaju *Aspergillus*, wykazały, że grzyby z rodzaju *Aspergillus* charakteryzują się znacznie lepszą wydajnością biosyntezy kwasu mewinolinowego (10).

Oprócz szczepów naturalnych próbuje się stosować mutanty o wyższej aktywności statynotwórczej niż szczep wyjściowy *Aspergillus terreus* ATCC 20542 oraz takie, które nie będą wytwarzały produktów ubocznych. Najczęściej spotykaną dotychczas w literaturze metodą uzyskiwania nowych, aktywnych szczepów jest zastosowanie fizykochemicznych czynników mutagennych. Vilches Ferron i wsp. (2005) zaproponowali użycie estru etylowego kwasu metanosulfonowego w różnych stężeniach oraz przy różnym czasie ekspozycji. Jako organizm wskaźnikowy ułatwiający wyizolowanie najbardziej aktywnych szczepów używali oni drożdży *Candida albicans*, których wzrost jest silnie hamowany przez lowastatynę (11). Lai i wsp. (2003) uzyskiwali nowe mutanty stosując inhibitor syntezy kwasów tłuszczowych ceruleninę (12). Natomiast Kumar i wsp. (2000) zastosowali chemiczne i fizyczne czynniki mutagenne i dokonali screeningu najbardziej aktywnych szczepów za pomocą wrażliwego na kwas mewinolinowy szczepu *Neurospora crassa* (13).

Jednym z produktów ubocznych szlaków poliketydowych u niektórych szczepów *Aspergillus terreus* może być sulochryna. Związek ten jest mykotoksyną i zanieczyszcza podłoża hodowlane, utrudniając odzysk pożądaných metabolitów. Couch i Gaucher (2004) wyeliminowali problem tego metabolitu ubocznego na drodze genetycznej, usuwając gen odpowiedzialny za syntazę poliketydową antronowej pochodnej emodyny, prekursora sulochryny (14).

5. Czynniki wpływające na biosyntezę lowastatyny przez *Aspergillus terreus*

Znalezienie optymalnego składu podłoża hodowlanego nie jest łatwym zadaniem, o czym świadczą wciąż publikowane artykuły dotyczące *sensu stricto* systematycznej optymalizacji podłoży hodowlanych. Wynika to z faktu, że lowastatyna jest metabolitem wtórnym o względnie skomplikowanym szlaku biosyntezy oraz z powodu ryzyka powstawania produktów ubocznych. Najszerszym opracowaniem tego typu jest publikacja Casas Lopez i wsp. (2004), w której autorzy zbadali wpływ źródła węgla, azotu, fosforu, stężenia tlenu w fazie gazowej oraz czasu fermentacji na biosyntezę lowastatyny (15).

5.1. Optymalne źródło węgla

Monaghan i wsp. (1980) w swoim patencie (2) proponowali użycie glukozy, laktozy lub sacharozy jako źródeł węgla. W jednej z pierwszych publikacji w czasopiśmie naukowych poruszającej ten temat (16) Alberts i wsp. (1980) zaproponowali zastosowanie dwóch podłoży: pierwszego zawierającego mąkę owsianą, które było podłożem inokulacyjnym oraz drugiego hodowlanego zawierającego sacharozę o stężeniu 45 g l^{-1} . Badali oni podstawowy szczep *Aspergillus terreus* ATCC20542. Inne podłoże zaproponowali Greenspan i Yudkowitz (1985), pracując z tym samym szczepem. Używali oni glukozy o stężeniu 10 g l^{-1} w inokulum i 45 g l^{-1} w podłożu hodowlanym (17). W badaniach pojawia się również glukoza w podłożach fermentacyjnych, czego przykładem jest praca Lai i wsp. z roku 2003 (12) oraz Hajjaj i wsp. z roku 2001 (18). Jednak w nowszych badaniach podważono przydatność glukozy jako źródła węgla dla *Aspergillus terreus*. Powodem tego jest szybkie przyswajanie glukozy i jej szybkie wyczerpywanie. Powoduje to deficyt źródła węgla w idiofazie. Casas Lopez i wsp. (2003) przebadali przydatność laktozy, fruktozy i glicerolu, jako źródła węgla, uzyskując w każdym przypadku porównywalną wydajność biosyntezy kwasu mewinolinowego (nieco słabszą w przypadku glicerolu). Sformułowali oni wniosek, że generalnie wolno przyswajalne węglowodany są najlepszym źródłem węgla (19).

Niezależnie Lai i wsp. potwierdzili, że znacznie lepszym źródłem węgla niż glukoza dla *Aspergillus terreus* jest laktoza (12). Wnioski swoje wyciągnęli z eksperymentu optymalizacyjnego podłoża wg schematu Placketta-Burmana, testując glukozę i laktozę oraz wg eksperymentu optymalizacyjnego wg planu czynnikowego 2^{6-3} , testując laktozę i glicerol.

Ostatecznie co do przydatności laktozy przekonali się Casas Lopez i wsp. stosując laktozę o stężeniu powyżej 100 g l^{-1} (20) lub 48 g l^{-1} (15).

Nieco odmiennego zdania co do źródła węgla pozostają Manzoni i wsp. (21), używając glicerolu jako źródła węgla. Należy tu jednak pamiętać, że zespół ten nie używa szczepu *Aspergillus terreus* ATCC 20542, ale własny wyizolowany szczep.

5.2. Optymalne źródło azotu

Wybór źródła azotu jest zawsze znacznie szerszy niż w przypadku źródła węgla. Już Monaghan i wsp. w swoim patencie pokazali przydatność namoku kukurydzianego, mąki owsianej, kukurydzianej i pasty pomidorowej zarówno w podłożach inokulacyjnych, jak i hodowlanych (2). Używali także ekstraktu drożdżowego oraz odtłuszczonego mleka. Za optymalne źródło azotu uznali oni jednak mleko odtłuszczone w połączeniu z ekstraktem drożdżowym dla podłoża hodowlanego i mąkę owsianą, namok kukurydziany oraz pastę pomidorową dla podłoża inokulacyjnego (2,16). Greenspan i Yudkowitz nie wprowadzali żadnych znaczących zmian co do

doboru źródła azotu (17). Szakacs i wsp. stosowali namok kukurydziany i mąkę sojową (22). Natomiast Lai i wsp. optymalizowali podłoża ze względu na źródło azotu, stosując ekstrakt drożdżowy, mąkę sojową oraz namok kukurydziany (12). Casas-Lopez i wsp. założyli, że nie sam typ źródła azotu, ale stosunek C:N w podłożu jest ważniejszy. Jako źródła azotu używali oni ekstraktu drożdżowego, mąki sojowej oraz namoku kukurydzianego (19). Najważniejszym wnioskiem z ich badań było to, że wysoki stosunek C:N powyżej 40 sprzyja biosyntezie kwasu mewinolinowego, co świadczy o pozytywnym wpływie deficytu azotu. Ciekawostką były próby użycia prostego źródła azotu jak glutaminian sodu przez Hajjaj i wsp. Stwierdzili oni również, że nie ma możliwości w tym procesie używania jonów amonowych, ze względu na zakwaszenie podłoża (18).

5.3. Wpływ śladowych składników podłoża, witamin i mikroelementów

Każde podłoże hodowlane dla różnych szczepów *Aspergillus terreus* zawiera w przybliżeniu podobny zestaw mikroelementów. Są to zazwyczaj żelazo, miedź, wapń, bor, cynk, magnez, molibden, mangan. Do tej pory nie powstało żadne opracowanie na ten temat. Oczywiście dodaje się witaminy do podłoży w mniej lub bardziej zamierzony sposób. Jeżeli źródłem azotu jest ekstrakt drożdżowy, mąka sojowa, pasta pomidorowa, to jest oczywiste, że te substancje zawierają pewien zestaw witamin. Natomiast niektórzy autorzy wzbogacają podłoża w biotynę (19), jednak nie badając wpływu tego składnika na biosyntezę lowastatyny. Analizując, mechanizm biochemiczny biosyntezy lowastatyny (rozdz. 1.4) można przypuszczać, że witaminy z grupy B, np. nikotynamid, mogą odgrywać istotną rolę w procesie biosyntezy lowastatyny.

5.4. Biosynteza lowastatyny a morfologia grzybni

W przypadku biosyntezy metabolitów wtórnych morfologia strzępek grzybni odgrywa zazwyczaj istotną rolę w biosyntezie produktu. Związek ten został wykazany dla wielu antybiotyków (23). W przypadku biosyntezy kwasu mewinolinowego taki związek najprawdopodobniej również występuje, jednak niewielu autorów podjęło takie badania. Ogólnie rzecz biorąc większość szczepów *Aspergillus terreus* rośnie w formie peletek. Lai i wsp. próbowali uzależnić rozkład wielkości peletek od składu podłoża (12). Opierali się oni na eksperymentach optymalizacyjnych, które już zostały wcześniej wspomniane w podrozdziale 5.1 i 5.2. Natomiast Casas-Lopez i wsp. powiązali morfologię grzybni z właściwościami reologicznymi medium fermentacyjnego (20). Lai i wsp. (2005) kontynuują zainteresowanie morfologią grzybni *Aspergillus terreus* i zbadali ostatnio wpływ zmian temperatury hodowli na morfologię peletek (24).

Do tej pory jednak nikt nie zbadał kinetyki wzrostu grzybnicy z punktu widzenia jej morfologii. Pierwsze takie próby podjęli autorzy tej pracy (25).

5.5. Warunki prowadzenia hodowli a biosynteza kwasu mewinolinowego

W większości cytowanych prac naukowych dotyczących biosyntezy kwasu mewinolinowego badania prowadzono w bioreaktorze o działaniu okresowym. W rozważaniach pomijano kwestię wielkości bioreaktora. Jednak wiele czynników wskazuje, że zastosowanie bioreaktora dolewowego może okazać się bardziej wydajne. Niektórzy autorzy proponują dodawanie pewnych prekursorów w różnych czasach hodowli, np. L,D-metioninę (12), inni zasilanie źródłem węgla, np. laktozą, maltodekstryną, glukozą w przypadku deficytu substratu (12,26,27). Zatem ustalenie strategii zasilania układu dolewowego w biosyntezie kwasu mewinolinowego pozostaje nadal kwestią otwartą.

W najnowszej publikacji Lai i wsp. (2005) podają jeszcze dodatkowe informacje na temat warunków hodowli *Aspergillus terreus* ATCC20542. Badania były prowadzone w bioreaktorze o działaniu okresowym. Badano wpływ nasycenia podłoża tlenem na biosyntezę lowastatyny, zmiany pH podłoża, stężenie biomasy oraz laktozy (24). Okazało się, że największe stężenie lowastatyny uzyskano tylko przy nasyceniu podłoża w tlen na poziomie 20%. Zarówno nadmiar, jak i niedobór tlenu w podłożu nie sprzyjał produkcji tego metabolitu.

6. Podsumowanie

Podsumowując rozważania dotyczące biosyntezy kwasu mewinolinowego przez *Aspergillus terreus*, należy jeszcze przedstawić przeciętne stężenia tego metabolitu w podłożu hodowlanym uzyskiwane przez różnych badaczy. W większości publikacji podawane są wartości od kilkudziesięciu (17,19,20,22) do kilkuset (10,12, 18,24) mg kwasu mewinolinowego w litrze podłoża. Ciekawostką, jest natomiast fakt, że fińska firma Metkinen OY podaje, na swojej stronie internetowej (28), że osiąga nawet 16 g kwasu mewinolinowego na litr podłoża, z tym, że używa ona własnych mutantów szczepu *Aspergillus terreus* ATCC20542. To porównanie wskazuje, że istnieje jeszcze wiele możliwości modyfikacji podłoży i optymalizacji warunków hodowli w celu maksymalizacji wydajności lowastatyny.

Literatura

1. Endo A., (2004), Int. Congr. Ser., 1262, 3-8.
2. Monaghan R. L., Alberts A. W., Hoffman C. H., Albers-Schonberg G., (1980), US Patent 4231938.
3. Manzoni M., Rollini M., (2002), Appl. Microbiol. Biotechnol., 58, 555-564.

4. Sutherland A., Auclair K., Vederas J. C., (2001), *Curr. Opin. Drug Discov. Develop.*, 4, 229-236.
5. 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.
6. Kennedy J., Auclair K., Kendrew S. G., Park C., Vederas J. C., Hutchinson C. R., (1999), *Science*, 284, 1368-1372.
7. Auclair K., Kennedy J., Hutchinson C. R., Vederas J. C., (2001), *Bioorg. Med. Chem Lett.*, 11, 1527-1531.
8. Hutchinson C. R., Kennedy J., Park C., Kendrew S., Auclair K., Vederas J. C., (2000), *Antonie van Leeuwenhoek*, 78, 287-295.
9. Su Y.-C., Wang J.-J., Lin T.-T., Pan T.-M., (2003), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 41-46.
10. Manzoni M., Bergomi S., Rollini M., Cavazzoni V., (1999), *Biotechnol. Lett.*, 21, 253-257.
11. Vilches Ferron M. A., Casas Lopez J. L., Sanchez Perez J. A., Fernandez Sevilla J. M., Chisti Y., (2005), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 123-125.
12. Lai L.-S., Pan C.-C., Tzeng B.-K., (2003), *Proc. Biochem.*, 38, 1317-1326.
13. Kumar M. S., Kumar P. M., Sarnaik H. M., Sadhukhan A. K., (2000), *J. Microbiol. Meth.*, 40, 99-104.
14. Couch R. D., Gaucher G. M., (2004), *J. Biotechnol.*, 108, 171-178.
15. Casas Lopez J. L., Sanchez Perez J. A., Fernandez Sevilla J. M., Acien Fernandez F. G., Molina Grima E., Chisti Y., (2004), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 79, 1119-1126.
16. 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.
17. Greenspan M. D., Yudkowitz J. B., (1985), *J. Bacteriol.*, 162, 704-707.
18. Hajjaj H., Niederberger P., Luboc P., (2001), *Appl. Env. Microbiol.*, 67, 2596-2602.
19. 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.
20. Casas Lopez J. L., Sanchez Perez J. R., Fernandez Sevilla J., Rodriguez Porcel E. M., Chisti Y., (2005), *J. Biotechnol.*, 116, 61-77.
21. Manzoni M., Bergomi S., Rollini M., Cavazzoni V., (1998), *Biotechnol. Techn.*, 12, 529-532.
22. Szakacs G., Morovjan G., Tengerdy R. P., (1998), *Biotechnol. Lett.*, 20, 411-415.
23. Nielsen J., (1992), *Adv. Biochem. Eng.*, 46, 187-223.
24. Lai L.-S. T., Tsai T.-H., Wang T. C., Cheng T.-Y., (2005), *Enz. Microb. Technol.*, 36, 737-748.
25. Bizukojć M., Ledakowicz S., Sencio B., (2004), *Proceedings of 5th European Symposium on Biochemical Engineering Science*, Stuttgart.
26. Kumar M. S., Jana S. K., Senthil V., Shanks V., Vijay-Kumar S., Sadhukhan A. K., (2000), *Proc. Biochem.*, 36, 363-368.
27. Novak N., Gerdin S., Berovic M., (1997), *Biotechnol. Lett.*, 19, 947-948.
28. http://www.metkinen.fi/products/fermentation_technologies/statins/