نهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران

دانشگاه علم و صنعت ایران
۳-۵ آذر ماه ۱۳۸۳

بررسی تولید لواستاتین از سویه Aspergillus terreus جدا سازی شده از خاک

غلام خیاطی[۱] و حسین قنادزاده*[۲]

۱. گروه مهندسی شیمی - صنایع غذائی ، دانشکده فنی ، دانشگاه گیلان

۲. استادیار گروه مهندسی شیمی - صنایع غذائی ، دانشکده فنی ، دانشگاه گیلان

چکیده

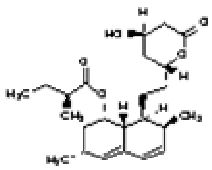
لواستاتین متابولیت ثانویه ای است که توسط قارچ آسپرژیلوس ترئوس تولید می شود برای تولید این محصول از محیطی با پایه معدنی استفاده و شرایط تولید از نقطه نظر درجه حرارت ، اثر منابع کربن و نیتروژن ، و محتوی لیپیدی محیط بهینه سازی شد . سویه های قارچی مورد استفاده در این تحقیق سویه جداسازی شده از خاک بود . نتایج نشان داد که درجه حرارت بهینه برای تولید لواستاتین توسط قارچ ۳۰ درجه سانتی گراد و همچنین بهترین منبع کربن و ازت بترتیب ترکیبی از گلوکز و لاکتوز ، گلوتامات سدیم بود. همچنین نتایج حاصله نشان داد که توانائی تولید لواستاتین در محیط کشت حاوی سویای بدون چربی بیشتر است .

کلمات کلیدی: لواستاتین ، آسپرژیلوس ترئوس ، تخمیر

مقدمه

استاتینها ترکیبات دارویی از خانواده لاکتونها هستند که خواص دارویی متفاوتی دارند و همگی توسط کبد متابولیزه می شوند (۱) . استاتینها اساساً متابولیتهای ثانویه قارچها هستند . از نظر تاریخچه مواستاتین اولین استاتینی بوده که کشف و در سال ۱۹۷۶ از کشت Penicillium citrinum و P . brevicompactum جداسازی شد و سپس در سال ۱۹۸۰ لواستاتین از کشت Aspergillus terreus و در سال ۱۹۸۶ از Monascus ruber تهیه شد (۲) . اما در واقع لواستاتین اولین استاتینی بود که تولید آن در مقیاس صنعتی گزارش شد (۳) .

آسپرژیلوس ترئوس اصلی ترین سویه قارچی مولد لواستاتین و در واقع یک تولید کننده منحصر بفرد متابولیتهای ثانویه محسوب می شود (۴) . لواستاتین داروی مهارکننده آنزیم هیدروکسی متیل گلوتاریل کوآنزیم A (CoA–HMG) ردوکتاز است که برای کاهش میزان کلسترول در انسان استفاده می شود (۵) . این دارو از یک بخش پلی کتیدی ، یک حلقه هیدروکسی - هگزا هیدرونفتالنی (که ساختار اصلی همه استاتینهاست) با یک زنجیره جانبی متیل بوتیریک و یک بتاهیدروکسی لاکتون در موقعیتهای C6 و C8 (که در فرم فعال به بتاهیدروکسی اسید تبدیل می شود) تشکیل شده است (شکل ۱) (۶) .



شکل ۱ - ساختمان شیمیائی لواستاتین

مواد و روشها

مواد و وسایل

الف) مواد و محلولهای مورد استفاده در این تحقیق شامل :

- محیطهای کشت میکروبی نظیر آگار ، پپتون ، عصاره مخمر ، عصاره مالت ، Corn Steep Liquor (CSL) ، Potato Dextr Agar (PDA) ، Soy been ، Tomato Past ،
- قندهای : گلوکز ، سوکروز ، لاکتوز
- اسیدهای آمینه : آرژینین ، هیستیدین ، گلیسین و سدیم گلوتامات
- مواد شیمیائی و نمکهای معدنی نظیر : گلیسرول ، اسید بوریک ، پتاس ، نیترات سدیم ، کلرید پتاسیم ، پتاسیم منوهیدروژن فسفات ، سولفات آهن ، سولفات منیزیم و ...

ب) وسایل : تجهیزات مورد استفاده عبارتند از :

HPLC ، سانتریفوژ ، میکروسکوپ ، اتوکلاو ، انکوباتور ، بن ماری ، pH متر و لوازم و وسایل شیشه ای نظیر لوله آزمایش ، قیف جداکننده ، پلیت و ....

روشها

میکروارگانیسمها

جهت بررسی تولید لواستاتین از دو سویه آسپرژیلوس ترئوس تهیه شده از کلکسیون میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران و سویه دیگر ، آسپرژیلوس ترئوس جداسازی شده از خاک استفاده گردید .

نگهداری میکروارگانیسمها

بمنظور حفظ و نگهداری سویه های قارچی برای مدت طولانی از محیط کشت potato dextrose agar استفاده شد . پس از آماده سازی محیط و استریل سازی آن در ۱۲۱ درجه سانتیگراد بمدت ۱۵ دقیقه ، لوله های حاوی محیط کشت در موقعیت شیبدار (اسلنت) قرار داده و سرد شدند . پس از کشت سویه های قارچی در محیط کشت PDA ، لوله ها بمدت ۷ تا ۱۰ روز در درجه حرارت ۳۰ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند.

میکروازگانیسم ها در محیط PDA و در دمای یخچال نگهداری شدند و ماهانه یکبار جهت تجدید کشت پاساژ داده شدند (۷) .

تهیه پیش کشت (precultuer)

بمنظور اجرای بهتر فرایند تولید ، لازم است که میکروارگانیسمها در مرحله لگاریتمی فاز رشد قرار داشته باشند . بدین منظور ابتدا پیش کشتی تهیه گردید تا مرحله تاخیری فاز رشد در آن سپری و پس از تکثیر اولیه ، میکروارگانیسمها در مرحله رشد به محیط کشت اصلی منتقل شوند .

جدول شماره ۱ اجزا محیط پیش کشت را نشان می دهد (۸) .

جدول ۱ - اجزا محیط پیش کشت

ماده	مقدار (گرم بر لیتر)
Glucose	۱۰
Corn steep liquor	۵
Tomato past	۴۰

به محیط فوق ۱۰ میلی لیتر محلول عناصر کمیاب با فرمولاسیون زیر[1] اضافه گردید :

1) این نمکها جداگانه در آب مقطر حل و با یکدیگر مخلوط شده و نهایتاً حجم محلول نهائی باآب مقطر به یک لیتررسانده شد .

جدول ۲ - اجزا محلول عناصر کمیاب

ماده	مقدار (گرم بر لیتر)
$FeSO_4 . 7H_2O$	۱
$MnSO_4 . 4H_2O$	۱
$ZnSO_4 . 7H_2O$	۰/۲
$CaCl_2 . 2H_2O$	۰/۱
H_3BO_3	۰/۰۵۶
$CuCl_2\ 2H_2O$	۰/۰۲۵
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} . 2H_2O$	۰/۰۱۹

pH محیط با استفاده از اسید کلریدریک و پتاس دو نرمال در ۸/ ۶ تنظیم گردید .

۵۰ میلی لیتر از محیط کشت پیش کشت درارلنهای بافلدار ۵۰۰ میلی لیتری در دمای ۱۲۱ درجه بمدت ۱۵ دقیقه استریل شد . پس از سرد شدن محیط ها عمل تلقیح سویه های قارچی انجام شد . بدین منظور اسپورهای قارچی از اسلنت ها به سرم فیزلوژی استریل حاوی ۰۵ / ۰ درصد توئین ۸۰ منتقل و پس از دوبار شستشو با بافراستریل فسفات ، شمارش گردیدند . تعداد 10^6 اسپور از سویه های قارچی (به ازای هر میلی لیتر محیط کشت) در شرایط عاری از آلودگی به ارلنهای ۵۰۰ میلی لیترئی حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط پیش کشت ، منتقل شدند (۹) .

پس از تلقیح ، ارلنها در ۳۰ درجه بمدت ۲۴ ساعت در rpm ۲۰۰ گرمخانه گذاری شدند .

کشت اصلی (main culture)

جهت تولید لواستاتین از کشت بسته (batch culture) استفاده گردید به منظور دستیابی به محیط کشت مناسب و بررسی تاثیر برخی عوامل بر میزان تولید ، محیط های کشت با فرمولاسیونهای متفاوت طبق جدول ۳ مورد آزمون قرار گرفتند (۱۰- ۹ ، ۷).

جدول ۳ - اجزا محیط کشت اصلی (گرم بر لیتر)

اجزا	محیط شماره ۱	محیط شماره ۲	محیط شماره ۳
گلوکز	۴۰	۴۰	۴۰
CSL	۲/۵	۵	
Soy bean meal	۲		
KH_2Po_4	۱		۵
$MgSo_4 .7H_2O$	۱		۰/۱
پپتون		۲۵	۱۰
کلرید آمونیوم		۵	
محلول عناصر کمیاب (ml)	۱۰	۱۰	۱۰

۱۰۰میلی لیتر از محیط های فوق در ارلنهای بافلدار ۷۵۰ میلی

لیتری ریخته و در ۱۲۱ درجه بمدت ۱۵ دقیقه استریل شدند . پس از سرد شدن ارلنها ، از محیط پیش کشت حاوی کدورت لازم استفاده شد . بدین منظور ۳ درصد از محیط پیش کشت درشرایط عاری از آلودگی بعنوان ماده تلقیح به ارلنها منتقل شد و پس از ۱۴ روز گرمخانه گذاری در ۳۰ درجه و در ۲۰۰ rpm ، میزان لواستاتین تولیدی در آنها مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفت .

بهینه سازی کشت

بمنظور تعیین مناسبترین شرایط کشت و دستیابی به بهترین میزان تولید لواستاتین آزمایشاتی انجام شد که طی آنها دمای مطلوب رشد وتولید ، مناسبترین منبع کربن ، تاثیر افزودن اسیدهای آمینه به محیط کشت و نیز محتوی لیپیدی محیط کشت مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت . پس از تعیین مناسبترین مقدار برای هر پارامتر ، این مقادیر برای آزمایشات بعدی و تعیین پارامتر دیگر مورد استفاده قرار گرفت . معیار اصلی جهت انتخاب مناسبترین مقادیر هر پارامتر ، حصول مقادیر بالاترمیزان تولید بود (۹ ، ۷ ،۲) .

- اثر دما

بمنظور تعیین دمای مناسب و دامنه نوسان درجه حرارت قابل تحمل برای آسپرژیلوس ترئوس می بایست آزمایشاتی جهت اثر دما بر میزان تولید انجام شود . لذا برای حصول به بهترین درجه حرارت کشت تاثیر دماهای ۲۵ ، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر میزان تولید مورد بررسی قرار گرفت .

- تاثیر منبع کربن

با توجه به نقش منبع کربن در مسیرهای متابولیکی ، تاثیر منابع مختلف کربن نظیر لاکتوز ، گلوکز و گلیسرول و نیز غلظتهای متفاوت گلوکز بر میزان تولید در محیط شماره ۱ مورد بررسی قرار گرفت . دلیل اهمیت منبع کربن و ازت در تولید لوستاتین آن است که بنظر می رسد هر دوی این عوامل در تنظیم بیان ژنها و فعالیتهای آنزیماتیک موثر در تولید محصول ، اثرات پیچیده ای اعمال می کنند (۹) .

- نقش اسیدهای آمینه

تاثیر افزودن چندین اسید آمینه نظیر سدیم گلوتامات ، آرژینین ، هیستیدین و گلیسین بر میزان تولید در محیط شماره ۱ حاوی ۴۰ گرم بر لیتراز گلوکز و لاکتوز به نسبت مساوی بعنوان منبع کربن پس از ۱۴ روز انکوباسیون در ۳۰ درجه مورد ارزیابی قرار گرفت .

- تاثیر لیپید موجود در اجزا محیط کشت

جهت بررسی تاثیر لیپید موجود در محیط بر تولید از دو ترکیب آرد سویای کامل و آرد سویای عاری از چربی استفاده شد .

- مدت زمان انکوباسیون

جهت تعیین مدت زمان لازم برای تولید لواستاتین پس از تعیین غلظتهای مناسب منبع کربن و ازت در محیط بهینه ، سرعت تولید طی روزهای مختلف بین ۷ تا ۱۴ روز مورد بررسی قرار گرفت .

استخراج محصول

پس از اتمام فرایند تخمیر ، کشتها فیلتر شد و میسلیومهای قارچی از آبگوشت تخمیر جدا شدند (۲) . سپس pH آبگوشت با اسید فسفریک دو نرمال در حدود ۰/۱ ± ۳ تنظیم و سپس هم حجم آن اتیل استات اضافه شد . استخراج با عمل همزنی در ۱۰۰ rpm بمدت ۲ ساعت در درجه حرارت اتاق انجام شد . سپس نمونه ها در ۱۵۰۰ g بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و فاز آلی جهت مراحل بعدی آنالیز مورد استفاده قرار گرفت . لازم به ذکر است که استفاده از اتیل استات بر خلاف روشهای قبلی که در آنها از اتانل برای استخراج استفاده می شد سبب حلالیت بالای لواستاتین و تغلیظ مواد آلی حل شونده می شود که این امر به نوبه خود حساسیت آشکارسازی لواستاتین را بالا می برد . در صورتی که اگر از متانل به این منظور استفاده شود مقدار قابل ملاحظه ای از لواستاتین به شکل هیدروکسی اسید باقی می ماند (۵) .

آنالیز

میزان تولید لواستاتین با دستگاه HPLC بررسی شد . جهت آماده سازی نمونه مورد تزریق به دستگاه ، ابتدا ml ۲ از محلول فاز آلی مرحله قبل انتخاب و پس از تبخیر حلال آلی (اتیل استات) ، باقیمانده در ۱/۵ میلی لیتر استونیتریل حل شد . قبل از تزریق آن به دستگاه نمونه با صافی ۰/۴۵ میکرون فیلتر شد (۵) .

- مشخصات و شرایط کار دستگاه

دستگاه HPLC مدل waters با ستونهای (4 * 250) Novapak C18 با اندازه ذرات ۵ میکرون و دتکتور از نوع photodiode بود .

فاز متحرک شامل دو محلول A (استونیتریل با ۰/۰۲ درصد تری فلوئورواستیک اسید)و محلول B (حاوی ۰/۰۲ درصد تری فلوئورواستیک اسید در آب) بود . بعد از تزریق ۱۰ میکرولیتر از نمونه مخلوط فاز متحرک شامل ۳۵ درصد از محلول A و ۶۵ درصد از محلول B بود سپس طی ۳ دقیقه با یک شیب خطی این نسبت به ۶۵ درصد برای محلول A و ۳۵ درصد برای محلول B رسانده شد . در این شرایط عملیات بمدت ۴ دقیقه ادامه پیدا کرد . سرعت فاز متحرک ۱/۵ میلی لیتر بر دقیقه بود . جذب در طول موج ۲۳۸ نانومتر اندازه گیری شد (۱۱) .

نتایج و بحث

انتخاب محیط کشت مناسب

از آنجائیکه نیازهای رشد قارچ آسپرژیلوس ترئوس محدود است برای رشد آن از محیطی با ترکیب شیمیائی مشخص استفاده شد . محیط کشتهای متفاوتی برای تولید لواستاتین پیشنهاد شده است (۱۰- ۹ ، ۷) که در این تحقیق مناسبترین محیط کشت براساس فرمولاسیون های جدول ۳ انتخاب شد . در این بررسی هدف دستیابی به محیط کشتی بود که با استفاده از آن بیشترین تولید حاصل شود. انتخاب این محیط با توجه به نتایج حاصل از کشت دو سویه قارچ آسپرژیلوس ترئوس از نظر میزان تولید لواستاتین (جدول ۴) انجام شد .

جدول ۴ - مقدار لواستاتین (میلی گرم بر لیتر) تولیدی در سه محیط مختلف توسط سویه های مورد آزمایش (۱۴ روز انکوباسیون در ۳۰ درجه سانتی گراد و ۲۰۰ rpm)

	محیط شماره ۱	محیط شماره ۲	محیط شماره ۳
سویه جداسازی شده	۷۱	۶۱	۶۷
سویه سازمان پژوهشها	۴۱	۵۵	۴۵

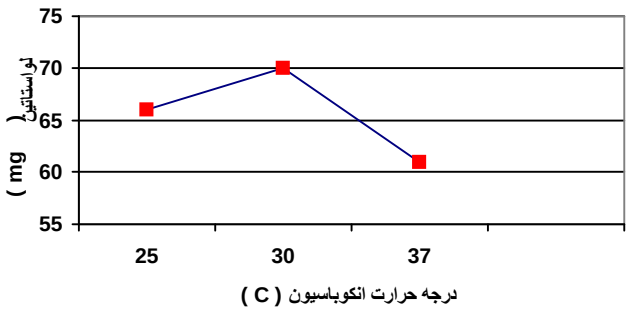
بررسی دوسویه در کشت غوطه ور از نظر تولید لواستاتین منجربه انتخاب محیط کشت شماره یک گردید . باتوجه به اینکه سویه جداسازی شده از خاک مقدار بیشتری لواستاتین در محیط شماره یک تولید کرد لذا جهت مطالعات بعدی انتخاب گردید . میزان تولید این سویه در محیط شماره یک mg/L ۷۱ بود .

بهینه سازی کشت

اصولاً بهینه سازی فرایند کشت تخمیری از عوامل اصلی در دستیابی به میزان بالای تولید است .

- اثر دما

شکل ۲ تاثیر درجه حرارتهای مختلف بر میزان تولید توسط سویه جداسازی شده در محیط شماره یک را نشان می دهد .



شکل ۲ - تاثیر درجه حرارت انکوباسیون بر میزان تولید لواستاتین (۱۴ روز انکوباسیون در محیط کشت شماره یک در ۲۰۰ rpm)

نتایج نشان می دهد که میزان تولید در ۲۵ درجه کم است اما با افزایش درجه حرارت تا ۳۰ درجه سانتی گراد ، میزان تولید افزایش می یابد و با افزایش درجه حرارت تا ۳۷ درجه مجدداً از میزان آن کاسته می شود . احتمالاً این کاهش به دلیل تجزیه محصول در دمای بالای ۳۰ درجه است . لذا درجه حرارت ۳۰ درجه سانتیگراد دمای بهینه برای تولید لواستاتین توسط سویه فوق در این محیط محسوب می شود .

- اثر منبع کربن

منابع کربن و ازت بعنوان پیش ساز و کوفاکتور در سنتز واحدهای ساختمانی بیومس و تولید لواستاتین نقش مهمی را ایفا می کنند . بعلاوه منابع کربن ممکن است در تنظیم بیان ژنها و فعالیت آنزیمهای پلی کتیدسنتتاز تاثیر داشته باشند (۹) . در این تحقیق برای بهینه سازی تولید لواستاتین از گلوکز ، لاکتوز و گلیسرول بعنوان تنها منابع کربن و یا بطور ترکیبی با یکدیگر در محیط کشت شماره یک استفاده شد (جدول شماره ۵) .

جدول ۵ - اثر منبع کربن و میزان آن بر مقدار تولید محصول (۱۴ روز انکوباسیون در ۳۰ درجه سانتی گراد در محیط شماره یک)

منبع کربن	غلظت اولیه در محیط کشت (g/L)	میزان تولید (mg/L)
گلوکز	۲۰	۶۰
گلوکز	۴۵	۶۸
گلوکز	۷۰	۲۵
لاکتوز	۴۵	۴۸
گلیسرول	۲۰	۲۹
گلوکز با لاکتوز	۲۰+۲۰	۷۷

افزایش توده بیومس قارچی در دوره انکوباسیون بیانگر آن بود که تمام منابع کربن منفرد و ترکیبی توسط سویه آسپرژیلوس ترئوس قابل جذب می باشند . اما بیشترین میزان تولید لواستاتین با گلوکز به همراه لاکتوز به نسبت مساوی ۲۰ گرم بر لیتر بدست آمد .

افزایش غلظت گلوکز تا ۷۰ گرم بر لیتر منجربه کاهش شدید تولید گردید . با توجه به اینکه گلیسرول میزان تولید NADH را کاهش می دهد (۹) و نیز با توجه به ضرورت وجود NADH برای تولید پلی کتیدها ، در حضور گلیسرول بعنوان منبع کربن تولید لواستاتین کاهش یافت و درنتیجه گلیسرول سوبسترای فوق العاده ضعیفی برای تولید لواستاتین بشمار می رود . در تمامی این موارد به دلیل عدم فعالسازی ژنهای مربوط به تولید لواستاتین خصوصاً ژن CreAp لواستاتین تنها بعد از مصرف کامل این منابع کربن تولید می شود . لذا چنین بنظر می رسد که اگر سلولها در معرض کمبود منبع کربن قرار گیرند و بنوعی دچار محدودیت رشد شوند تولید متابولیتهای ثانویه تحریک می شود (۹) .

- نقش اسیدهای آمینه در تولید

تاثیر افزودن اسیدهای آمینه مختلف نظیر گلیسین ، هیستیدین ، سدیم گلوتامات و آرژینین بر میزان تولید در جدول ۶ آورده شده است .

جدول ۶ - اثر اسیدهای آمینه بر میزان تولید (محیط شماره یک با منبع کربن گلوکز و لاکتوز)

نوع اسید امینه	میزان تولید لواستاتین (میلی گرم بر لیتر)
گلیسین	۴۵
هیستیدین	۷۴
سدیم گلوتامات	۷۵
آرژینین	۲۹/۵

با توجه به اینکه یون آمونیوم در متابولیسم نیتروژن در قارچهای رشته ای نقش محوری دارد (۱۲) لذا رشد آسپرژیلوس ترئوس در حضور اسیدهای آمینه فوق نشان دهنده مصرف این اسیدهای آمینه توسط این قارچ است .

بعلاوه اسیدهای آمینه می توانند برای قارچهای رشته ای بعنوان منابع ازت نیز عمل نمایند (۹) . بیشترین میزان تولید لوستاتین با افزودن سدیم گلوتامات و هیستیدین به محیط کشت حاصل شد . نتایج نشان داد که گلیسین و آرژینین در افزایش تولید لواستاتین نقش چندانی ندارند .

- اثر محتوی لیپیدی محیط

جدول ۷ اثر محتوی لیپیدی موجود در محیط کشت را بر میزان تولید نشان می دهد .

جدول ۷ - بررسی تاثیر وجود یا عدم وجود لیپید در محیط بر تولید لواستاتین (محیط کشت شماره یک با منابع کربن گلوکز و لاکتوز و منبع ازت سدیم گلوتامات)

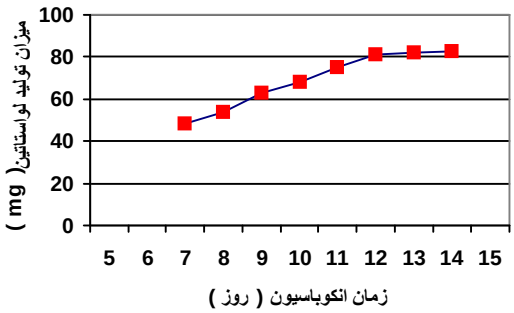
نوع آرد سویا	میزان تولید (میلی گرم بر لیتر)
آرد سویای کامل	۷۲
آرد سویای عاری از چربی	۷۸

با توجه به نتایج حاصله چنین استنباط می شود که استفاده از اجزا لیپیددار در محیط کشت بر بیوسنتز لواستاتین تاثیر می گذارد . توانائی تولید لواستاتین در محیط کشت حاوی سویای بدون چربی توسط سویه جداسازی شده بیشتر بود . احتمالاً در چنین محیطی ترکیبات اضافی تولید نمی گردد . در حالیکه اگر از محیط کامل سویا استفاده شود این ترکیبات در محیط تجمع یافته و در نتیجه میزان تولید لواستاتین کاهش می یابد (۲) .

بنظر می رسد که این تاثیر ناشی از تفاوت مسیرهای متابولیکی بیوسنتزی باشد . اگر این مسیرها درست شناخته شوند با توجه به اطلاعات حاصله می توان بگونه ای عمل کرد که فقط محصول مورد نظر (مثلاً لواستاتین) بعنوان محصول نهائی در محیط کشت تولید شود (۲) .

- سرعت تولید

سرعت تولید لواستاتین در محیط بهینه مورد بررسی قرار گرفت . شکل ۳ نتایج حاصل از بهینه سازی محیط را بر تولید محصول نشان می دهد .



شکل ۳ - میزان تولید لوستاتین طی روزهای مختلف کشت (محیط کشت شماره یک با منبع کربن گلوکز و لاکتوز ، منبع ازت سدیم گلوتامات با انکوباسیون در ۳۰ درجه سانتی گراد در ۲۰۰ rpm)

در این محیط میزان تولید طی ۱۲ روز به ۸۲/۵ میلی گرم بر لیتر رسید اما سرعت تولید بعد از این مدت تغییر چندانی نشان نداد .

تقدیر و تشکر

بدینوسیله مراتب قدردانی و سپاس خود را از ریاست محترم سازمان صنایع و معادن استان گیلان و کارشناسان محترم حوزه معاونت آموزش و برنامه ریزی خصوصاً جناب آقای مهندس صدفی که در پیشبرد مراحل اجرایی طرح همکاری صمیمانه مبذول داشته اند و نیز از مدیریت محترم شرکت داروسازی سبحان خصوصاً سرکار خانم دکتر گلشائی که با نظرات کارشناسانه خود ما را در انجام طرح یاری نمودند ، ابراز می داریم .

منابع و مراجع

1. Furberg C. D. (1999) Natrural Statins and Stroke Risk . American Heart Association , Inc.

2. Manzoni M. , S. Bergomi and etal. (1999) Production of statins by filamentous fungi . Biotechnology Letters 21 , 253 – 257

3. Manzoni M. , M. Rollini (2002) biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol – lowering drugs . Appl. Microbiol. Biotechnol. 58 , 555 – 564

4. Schimmel T. G. and etal. (1998) Effect of butyrolactone I on the production fungus , A. terreus . Applied and Environmental Microbiology 64 (10) , 3707 – 3712

5. Hendrickson L. , C. Ray Davis and etal. (1999) Lovastatin biosynthesis in A. terreus : Characterization of blocked mutants enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene . Chemistry & Biology 6 (7) , 429 – 439

6. web.mit.edu/clcgroup/alex.html

7. Yuan-chi S. , W. Jyh-Jye and etal. (2003) Production of secondary metabolites γ – aminobutyric acid and monacolin K by Monascus . J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30 , 41 – 46

8. Novak N. , S. Gerdin and etal. (1997) Increased lovastatin formation by A. terreus using repeated fed- batch process . Biotechnology Letters 19 (10) , 947 – 948

9. Hajjaj H. , P. Niederberger and etal. (2001) Lovastatin biosynthesis by A. terreus in a chemically defined medium . Applied and Environmental Microbiology 67 (6) , 2596 – 2602

10. Szakacs G. , G. Morovjan and etal. (1998) Production of lovastatin by wild strain of A. terreus . Biotechnology Letters 20 (4) , 411 – 415

11. Samiee S. M. , N. Moazami and etal. (2003) Screening of lovastatin production by filamentous fungi . Iran. Biomed. J. 7 (1) , 29 - 33

12. Andrianopoulos A. , S. Kourambas and etal. (1998) Characterization of the A. nidulans nmrA gene involved in nitrogen metabolite repression . J. Bacteriol. 180 , 1973 – 1977