

С.М.НАСМЕТОВА, Д.М.РУЗИЕВА, Г.А.РАСУЛОВА, Ф.А.КАРИМОВА,
Р.С.САТТАРОВА, Т.Г.ГУЛЯМОВА

Институт микробиологии АН Узб., Ташкент

ПРОДУКЦИЯ СИМВАСТАТИНА МЕСТНЫМИ ШТАММАМИ *ASPERGILLUS TERREUS* В УСЛОВИЯХ ГЛУБИННОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ

Аннотация

При исследовании статинообразующей активности в местных штаммах *Aspergillus terreus* впервые обнаружено, что наряду с продукцией ловастатина, 2 штамма *A. terreus-4* и *A.terreus-20* способны синтезировать симвастатин.

Результаты по изучению влияния компонентного состава питательных сред на синтез симвастатина показали, что относительно высокий уровень продукции симвастатина в обоих штаммах наблюдается на лактосодержащей среде №3 и составляет в штамме *A.terreus -4* 0,490 мг/л среды, а в штамме *A.terreus -20* 1,290 мг/л среды.

Ключевые слова: симвастатин, штамм *Aspergillus terreus*, глубинная ферментация

Симвастатин (Zocor), полусинтетическое производное ловастатина, обладающее более сильным гипохолестеринемическим эффектом. Ежегодный доход от продаж симвастатина, составивший почти 12 млрд. USD\$ в 2005 году (1), имеет тенденцию к возрастанию. Молекулярное различие между ловастатином и симвастатином состоит в С-8 углеводе боковой цепи, где ловастатин имеет кольцо метилбутирата, а симвастатин - диметилбутирата. В настоящее время симвастатин получают полусинтетически прямым алкилированием ловастатина. Это многостадийный трудоемкий химический процесс, протекающий в очень жестких условиях, конечный продукт реакции трудно очищать, к тому же большого внимания в этом процессе требует охрана труда и окружающей среды, что, в конечном счете, ведет к многократному увеличению стоимости препарата по сравнению с ловастатином (2).

Для разработки эффективного биокаталитического метода проводятся интенсивные исследования, преследующие возможность прямого синтеза симвастатина ферментацией штамма-продуцента. С развитием исследований биосинтеза и генетики ловастатина все больше внимания стало уделяться возможности биотехнологического метода получения симвастатина с использованием ацилтрансфераз LovD и LovF, катализирующих реакции переноса метилбутирильной группы на монаколин J и ловастатин, соответственно. Согласно существующим представлениям, одним из таких подходов в его производству могло бы быть конструирование штамма *A. terreus*, способного синтезировать симвастатин в процессе прямой ферментации вместо ловастатина (3).

Таким образом, о наличии симвастатина в составе статинов в природных штаммах до настоящего времени не сообщалось. В данной работе впервые представлены данные, указывающие на возможность прямого синтеза симвастатина в природных штаммах *Aspergillus terreus*, и показана возможность повышения уровня его синтеза подбором оптимальных питательных сред.

Материалы и методы

Экстракты статинов микробицетов получали из мицелия, полученного после фильтрации культуральной жидкости. Мицелий промывали 0,05 М HCl (300 мл) при комнатной температуре в течение 1 часа, отфильтровывали и экстрагировали ацетонитрилом в соотношении (1:2). Оба экстракта подсушивали (Na₂SO₄) и концентрировали до конечного объема 2 мл.

Исследование влияния компонентного состава питательных сред на биосинтез симвастатина местными штаммами *Aspergillus terreus* проводили на средах:

Среда №1 (г/л): лактоза – 70; дрожжевой экстракт – 8; обезжиренная соевая мука – 0,5; полиэтиленгликоль 2000 – 0,5; KCl – 1; K₂HPO₄ – 1; pH – 6,5. (4)

Среда №2 (г/л) : лактоза – 20; дрожжевой экстракт – 4; KH₂PO₄ – 1,51; NaCl – 0,4; ZnSO₄*7H₂O – 1; Fe(NO₃)*9H₂O – 2. Биотин – 0,04 мг. Микроэлементы – 1 мл (раствор микроэлементов, мг/л): Na₂B₄O₇*10H₂O – 100; MnCl₂ – 50; Na₂MoO₄*2H₂O – 50; CuSO₄*5H₂O – 250; pH – 6,0. (5)

Среда №3 (г/л): лактоза – 114,2; соевая мука – 5,41; KH₂PO₄ – 0,8; NaCl -0,4; ZnSO₄*5H₂O – 0,2; Fe(NO₃)*9H₂O – 24; MgSO₄*7H₂O – 0,52. Биотин – 0,04 мг. Микроэлементы – 1 мл (раствор микроэлементов, мг/л): Na₂B₄O₇*10H₂O – 100; MnCl₂ – 50; Na₂MoO₄*2H₂O – 50; CuSO₄*5H₂O – 250; pH – 6,0. (6)

Динамику накопления симвастатина в отобранных штаммах исследовали ежедневно с 4-х по 24-е сутки роста культур. Для этого мицелий отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 6 тыс.об/мин в течение 20 минут, проводили экстракцию статинов ацетонитрилом в биомассе и определяли содержание симвастатина методом ВЭЖХ-анализа.

Количественный состав симвастатина определяли методом ВЭЖХ в системе 0,1% фосфорная кислота: ацетонитрил (30:70) на колонке Zorbax Eclipse XDB C-18 (3,0x100 мм) при длине волны 238 нм со скоростью потока 1,5 мл/мин. В качестве стандартов использовали фармацевтический препарат «Ловастатин» (Гедеон Рихтер, Польша) и «Симвастатин» (Индия). Качественный состав статинов определяли методом ТСХ на хроматографических пластинках НРТLC фирмы Merk. Проявитель: серная кислота в метаноле (200г/л).

Результаты и их обсуждение

При исследовании статинообразующей активности в местных штаммах *Aspergillus terreus* обнаружено, что наряду с продукцией ловастатина, *Aspergillus terreus-4* и *Aspergillus terreus-20* способны синтезировать вещество, соответствующее по времени удерживания стандартному препарату симвастатина (рис.1).

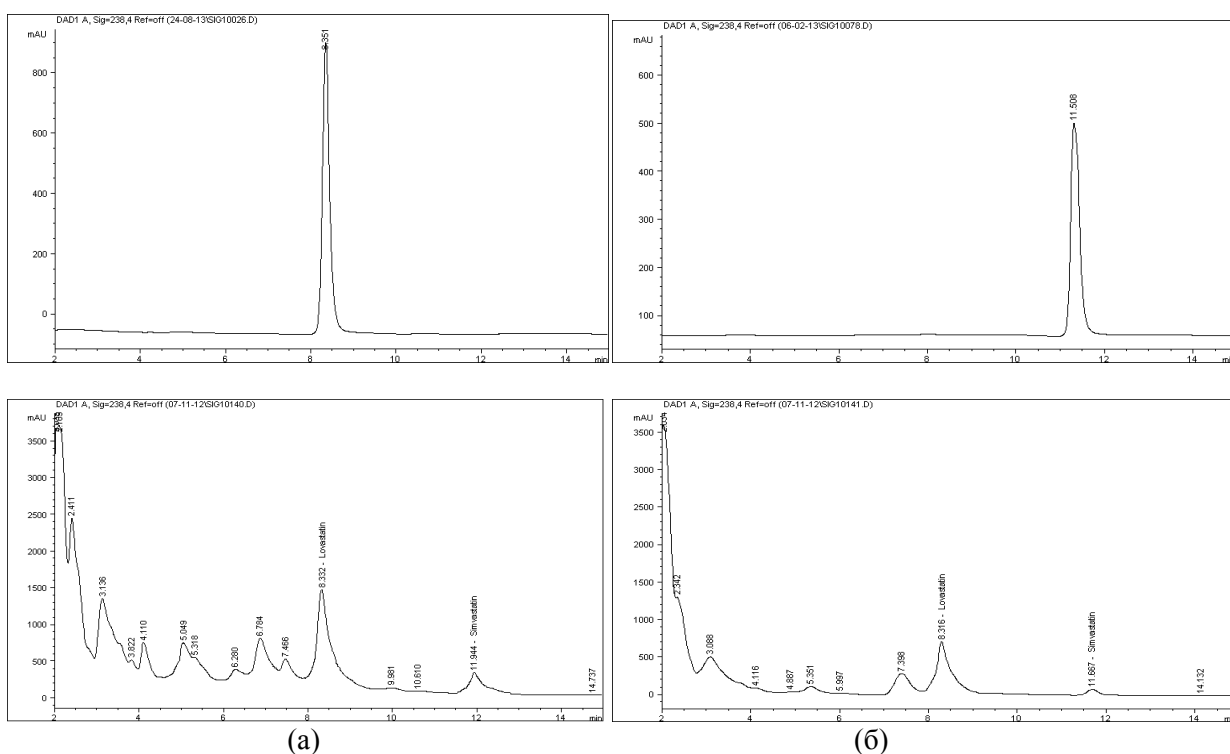


Рисунок 1 - Хроматографическое разделение экстрактов из биомассы штаммов *A.terreus -4* (а), и *A.terreus -20* (б).

Тот факт, что местные штаммы аспергилл способны синтезировать симвастатин, является важным, поскольку предполагает наличие в клетках этих штаммов предшественника боковой цепи симвастатина - диметилбутирата (ДМБ). Согласно существующим представлениям, в *A.terreus* это соединение обычно не синтезируется (2). Обнаружение симвастатина в экстрактах *A.terreus* также подтверждено анализом ТСХ. Так, на рисунке 2 представлены основные компоненты экстрактов биомассы и культуральной жидкости штамма *A.terreus-20*, которые по Rf значению, цвету, подвижности, соответствует стандартным образцам различных форм статинов. Как видно из данных, в экстрактах присутствует симвастатин, ловастатин, в лактонной и кислотной форме, монаколин J и 2-метилбутират. Однако, в отличие от биомассы, в культуральной жидкости отсутствует монаколин J и кислотная форма ловастатина.

1 2 3 4 5 6



-2-метил бутират (Rf=0.8)

- симвастатин

- ловастатин (lactone)

- ловастатин(acid)

- монаколин-J (Rf=0.25)

1-симвастатин; 2,3-ловастатин (лактон); 4-ловастатин (кисл.форма); 5-экстракт биомассы *A.terreus-20* ; 6- экстракт к.ж. *A.terreus-20*.

Рисунок 2 - Анализ экстрактов методом ТСХ из штаммов *A.terreus -4* и *A.terreus -20*.

История получения ловастатина показывает, что главным регуляторным фактором оптимального биосинтеза является тщательный подбор питательных сред и условий ферментации (5-8). Согласно этому, для изучения способности культур продуцировать симвастатин были использованы питательные среды с различным композиционным составом, отличающиеся по содержанию основным источнику углеродного и азотного питания.

Выбраны три питательные среды, содержащие различное соотношение лактозы, дрожжевого экстракта и соевой муки и использовавшиеся ранее рядом авторов при изучении продукции ловастатина ферментацией *A.terreus* ATCC 20524 (4).

В таблице 1 представлены данные по продукции симвастатина в динамике роста штаммов *A.terreus -4* и *A.terreus -20* на трех лактозосодержащих средах, отличающихся содержанием источников углерода и азота.

Таблица 1 – Продукция симвастатина в динамике роста штаммов

Штаммы	Среды, №	Ссимвастатин мг/л среды
<i>Asp.terreus-4</i>	1	0,015
	2	0,110
	3	0,490
<i>Asp.terreus-20</i>	1	0,030
	2	0,092
	3	1,290

Из результатов полученных данных следует, что штаммы *A.terreus- 4* и *A. terreus-20* наряду с ловастатином обладают способностью синтезировать симвастатин, уровень продукции которого существенно зависит от условий культивирования. Относительно высокий синтез симвастатина наблюдается в обоих штаммах на среде №3 и составляет в штамме *A.terreus -4* - 0,490 мг/л среды на 10-е сутки роста, а в штамме *A.terreus -20* - 1,290 мг/л среды на 22-е сутки роста.

Как уже упоминалось выше, получение симвастатина осуществляется в настоящее время биотрансформацией экзогенного ловастатина в культурах, синтезирующих ДМБ (3). Полученные данные показывают существование в местных штаммах *A. terreus- 4* и *A.terreus-20* биохимических механизмов биотрансформации, позволяющих продуцировать симвастатин в культуре как конечный продукт ферментации. Хотя пути биосинтеза симвастатина в этих штаммах пока не изучены, очевидно, что они способны синтезировать ДМБ как предшественник боковой цепи симвастатина.

Совокупность полученных данных позволяет заключить, что местные штаммы *A.terreus-4* и *A.terreus-20* могут служить альтернативой описанному в литературе процессу биотрансформации (2).

Литература:

- 1 Alberts A.W., J. Chen, G. Kuron, V. Hunt, J. Huff, C. Hoffman, J. Rothrock, M. Lopez, H. Joshua, E. Harris, A. Patchett, R. Monaghan, S. Currie, E. Stapley, G. Albers-Schonberg, O. Hensens, J. Hirshfield, K. Hoogsteen, J. Liesch, Springer J. (1980) Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc.Natl.Acad Sci USA* 77:3957-3961.
- 2 Barrios-Gonzales J., Miranda R.U., 2010. Biotechnological production and applications of statins *Applied Microbiology and Biotechnology*. -1985.- P. 869-883.
- 3 Manzoni M., Rollini M., Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*.-2002 58:555-564.
- 4 Endo, A., The origin of statins. *Int.Congr. Ser.* -2004.- 1262.- P.3-8.
- 5 Kidd J (2006) Life after statin patent expiries. *Nature revs/Drug Discovery* 5: 813-814.
- 6 Gulyamova T.G., Ruzieva D.M., Nasmetova S.M., Sattarova R.S., Lobanova K.V., Abdulmyanova L.A, Rasulova G.A. Lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid state and submerged fermentations // *International Journal of Engin, Science and Technol.* -2013. - Vol.5.-P.19-24
- 7 Lai LST, Pan CC, Tzeng BK The influence of medium design on lovastatin production and pellet formation with a high producing mutant of *Aspergillus terreus* in submerger cultures // *Process Biochem.* - 2003.- P. 1317-1326.
- 8 Casas Lopez J.L., Sanchez Perez J.A., Fernandez Sevilla J.M., Rodriguez Porcel E.M., Chisti Y. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effect of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production // *Enzyme Microb Technol.*- 2003.- №33. -P. 270-277.
- 9 Casas Lopez J.L., Sanchez Perez J.A., Fernandez Sevilla J.M., Rodriguez Porcel E.M., Chisti Y. Fermentation optimization for the production of lovastatin by of *Aspergillus terreus* : use of response surface methodology // *Chem Technol Biotechnol.* - 2004.-№79.- P.1119-1126.
- 10 Casas Lopez J.L., Sanchez Perez J.A., Fernandez Sevilla J.M., Rodriguez Porcel E.M., Chisti Y. Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus* // *Biotechnology*. -2005. - Vol.116. - P. 61-67
- 11 Manzoni M., Rollini M., Bergomi S., Cavazzoni V. Production and purification of statins from *Aspergillus terreus* strains // *Biotechnology Techniques.* – 1998. - Vol.12, №7.- P.529-532.
- 12 International Patent WO 2007147801 Method for the production of simvastatin. A1 H. Hajjaj, Peter Niederberger. Lovastatin Biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a Chemically Defined Medium Van den Berg et al. (2007). // *Appl. And Environmental Microbiol.* - 2001. - Vol.67, № 6.- P. 2596-2602.
- 13 Zhihua Jia, Xiaoli Zhang, Yaling Zhao, Xuejun Cao *Appl Biochem Biotechnol* (2010) 160: 2014-2025 DOI 10. 1007/s 12010-009-8762-1

Түйін

НАСМЕТОВА С.М., РУЗИЕВА Д.М., РАСУЛОВА Г.А., КАРИМОВА Ф.А.,
САТТАРОВА Р.С., ГУЛЯМОВА Т.Г.

Микробиология институты Ўзбекистан ҒА, Тошкент

ТЕРЕҢДЕТІЛГЕН ФЕРМЕНТАЦИЯ ЖАҒДАЙЛАРЫНДА ЖЕРГІЛІКТІ ASPERGILLUS TERREUS ШТАММДАРЫНАН СИМВАСТАТИН ӨНІМІН АЛУ

Статин түзетін белсенділікті зерттеу барысында, жергілікті *Aspergillus terreus* штамдарынан алғаш рет ловастатин өнімімен қатар, *A. terreus*-4 және *A. terreus*-20 екі штамдары симвастатинді синтездей алатындығы анықталды.

Қоректік орталардың жинақтық құрамының симвастатин синтезіне әсер етуін зерттеу нәтижелері бойынша, екі штамда симвастатин өнімінің салыстырмалы жоғары деңгейде бар екендігі байқалады және №3 құрамында лактозасы бар ортада *A. terreus*-4 0,490 мг/л, ал *A. terreus* - 20 штаммында 1,290 мг/л көрсетілді.

NASMETOVA S.M., RUZIEVA D.M., RASULOVA G.A., KARIMOVA F.A.,
SATTAROVA R.S., GULYAMOVA T.G.

Institute of Microbiology, Tashkent

DETERMINATION OF SIMVASTATIN BY INDIGENOUS STRAINS OF ASPERGILLUS TERREUS BY SUBMERGED FERMENTATION

Summary

Statins are a group of extremely successful drugs that lower cholesterol levels in blood; decreasing the risk of heart attack or stroke (1, 2). In recent years, statins have also been reported to have pleiotropic biological activities and numerous potential therapeutic uses. Lovastatin and compactin are natural statins, while pravastatin is derived from the latter by biotransformation (2, 3).

Simvastatin, the second leading statin in the market, is a lovastatin semisynthetic derivative, and is the second-best-selling drug in the USA, with annual sales in 2005 tipping USD\$ 12 billion (4). The difference in molecular structure between these two polyketides resides in the C-8 carbon position of the side chain, where lovastatin carries a 2-methylbutyrate moiety, while simvastatin - a 2,2-dimethylbutyrate (DMB) moiety. By now commercially simvastatin is prepared by direct alkylation of lovastatin. The multistep chemical process is laborious, conditions of reaction are very rigid, and purification of the final product is difficult, these contributing to simvastatin being more expensive than lovastatin (2,5).

Because DMB is not normally produced by *Aspergillus terreus* this fungus considered not to be able to synthesize simvastatin (2). In previous studies we established good lovastatin yields by indigenous strains *A. terreus* - 4 and - 20, both in SmF and SSF (6). In this study new data presented indicating that simvastatin could be produced by wild strains of - 4 and *A. terreus* - 20 as a final product of fermentation.

Key words: Simvastatin, strains of *aspergillus terreus*, submerged fermentation

Materials and Methods

Microorganisms and inoculum preparation .

A. terreus - 4 and *A. terreus* - 20 were isolated from soils of Navoi region, Uzbekistan. Isolates were grown on Chapek-Dox agar slants at 28°C for until complete sporulation. Conidiospores were harvested from slants with 5 ml of sterile solution of 0,85% NaCl, 0,2% Tween80 and transferred into a 250 ml Erlenmeyer flask, containing 50 ml of medium g/L: 10 g glucose, 10g oatmeal, 10g corn steep liquor, 0,2 g polypropylen-glycole, and 10 ml of trace elements – 100 mg of Na₂B₄O₇ x 10H₂O, 50 mg of MnCl₂, 50 mg of Na₂MoO₄x5H₂O, 250 mg of CuSO₄ x 5H₂O- per liter of solution (7). The flask with medium was inoculated by 3x10⁷

conidiospores, held on rotary shaker at 160 rpm for 2 days at 28-30°C and then was used as inoculum.

Submerged fermentation. 10 ml of conidiospores of each culture was inoculated in 500 ml Erlenmeyer flasks, containing 100 ml of following lactose-based media (g/l):

LB1. lactose – 70, yeast extract – 8, defatted soybean meal – 0,5, polyethyleneglycole 2000 – 0,5, KCl – 1, K₂HPO₄ – 1, pH 6,5. [8]

LB2. lactose – 20; yeast extract – 4; KH₂PO₄ – 1,51; NaCl – 0,4; ZnSO₄*7H₂O – 1; Fe(NO₃)*9H₂O – 2; biotin – 0,04 mg, trace elements – 1 ml, pH 6,0 [9]

LB3. lactose – 114,2; soybean meal – 5,41; KH₂PO₄ – 0,8; NaCl – 0,4; ZnSO₄*5H₂O – 0,2; Fe(NO₃)*9H₂O – 24; MgSO₄*7H₂O – 0,52; biotin – 0,04, trace elements – 1 ml, pH 6,0 [10]

Fermentation carried out at 28°C in flasks held on rotary platform shaker, 160 rpm. Time course of simvastatin fermentation was studied within 24 days.

Statins extraction. Extracts of total statins were obtained from biomass after centrifugation of whole cultural suspension at 6000 rpm for 20 min. 1g of mycelium was washed by 0,05M HCL and extracted with 20 ml of acetonitrile in rotary shaker for 60 min at 160 rpm. Extracts were dried with Na₂SO₄, concentrated up to 2ml by vacuum evaporation and used for simvastatin and lovastatin estimation (11).

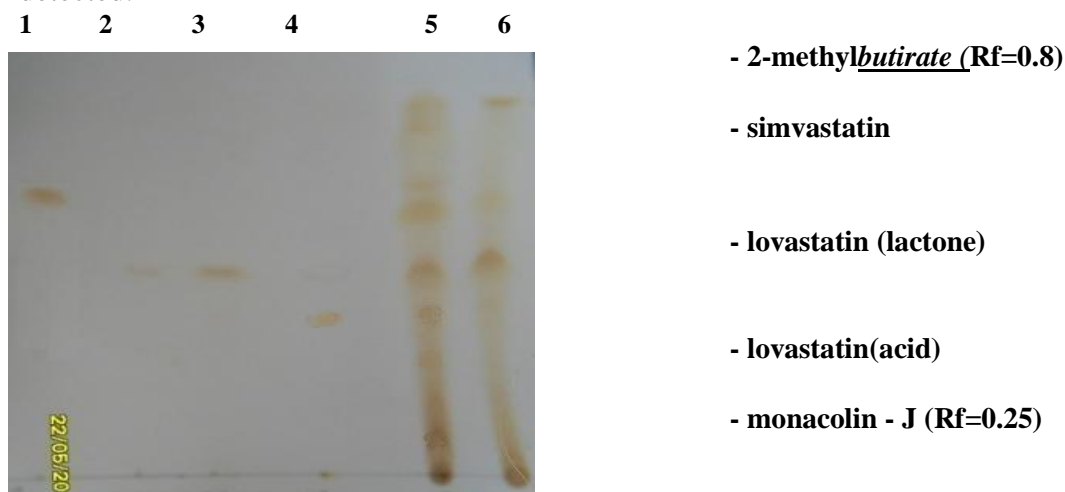
HPLC analysis of statins. HPLC analysis was carried out in a reverse phased Zorbax Eclipse XDB-C18. (4,6*150 mm, 5 µm) column and a mixture of acetonitrile and 0.1 per cent phosphoric acid (60:40 v/v) as eluent. The sample injection volume was 20 µl. The eluent flow rate was 1.5 ml min⁻¹ and the detection wavelength 238 nm. The identity of the compounds was confirmed with the commercial samples of lovastatin and simvastatin as standards [12].

Thin-layer chromatography. TLC was carried out on HPTLC plates (Merck) using dichloromethane/acetic acid (85:15, v/v) as developing solvent (12).

Results of study and discussion

In previous studies it was established that two aborigenic strains *A. terreus* - 4 and *A. terreus* - 20 produce sufficiently high amounts of lovastatin both SmF and SSF (6).

In this work statins composition in extracts from *A. terreus* - 20 cultural broth and biomass were carried out by using TLC. As it is shown in Figure 1, TLC profile of extracts of biomass revealed the presence of metabolite corresponding by R_f to simvastatin along with lovastatin lactone and lovastatin hydroxyl acid, monacolin J и 2-methylbutyrate. Simvastatin was observed in extracts of cultural broth also, while no monacolin J and hydroxy-form of lovastatin were detected.



1-simvastatin; 2,3-lovastatin (lactone); 4- lovastatin (acid form);
5-extract biomass *A. terreus*-20; 6- extract culture liquid *A. terreus*-20.

Figure 1 - TLC analysis of extracts from *A. terreus* -4 (a), и *A. terreus* -20.

To verify the presence of simvastatin in extracts of *A. terreus* - 4 and *A. terreus* - 20 the HPLC analysis carried out in the presence of two standards – lovastatin and simvastatin. HPLC profile showed the UV-positive metabolites with retention times of simvastatin as well as lovastatin in the biomasses of both strains (fig.2).

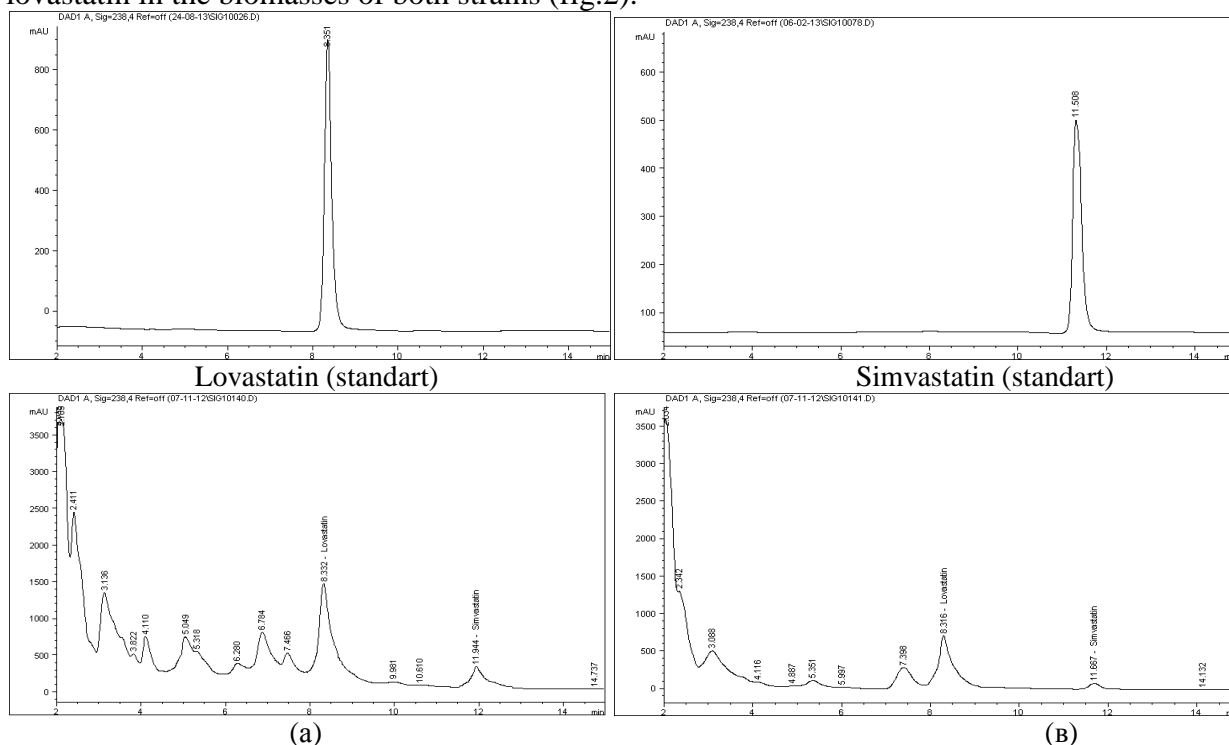


Figure 2 - HPLC profile of *A.terreus* -4 (a), и *A.terreus* -20 (б) extracts

The presence of simvastatin in extracts was quite unexpected because normally *Aspergillus terreus* considered not to be able to synthesize simvastatin due by lack of DMB synthesis in this fungus (2). It has to be noted that for the last years advances in the biochemistry and genetics of lovastatin have allowed the development of the new biotechnological processes for obtaining of simvastatin. One biotechnological approach to its production would be the enzymatic synthesis of simvastatin from monacolin J (MCJ), with the acyltransferase LovD (11). Using combinatorial biocatalytic approach it has been engineered *A.terreus* strain with hybrid polyketide synthase enable to in vivo synthesize DMB as side chain of simvastatin. The transformed strain of *A.terreus* can produce simvastatin instead of lovastatin by direct fermentation (12).

Determination of simvastatin in extracts indicates on enability of *A.terreus* -4 and *A.terreus*-20 to synthesize DMB as precursor of side chain of simvastatin's molecule, therefore these strains can produce simvastatin as a final product by direct fermentation.

Comparative analysis of simvastatin production by SF were studied on three media containing different ratio of lactose, yeast extract and soybean flour used previously at fermentation of *A.terreus* ATCC 20524 (7-10).

As it is shown on Table1, yields of simvastatin was depended sufficiently on media used. From three media used the detectable product accumulation in both strains was observed on media 3 containing and was as high as 0.490 mg/l in *A.terreus* - 4, and 1.29 mg/l in *A.terreus* - 20. Although the level of simvastatin in not significant yet obtained results allow to assume that productivity of these strains could be improved by screening of fermentation conditions.

Table 1 - yields of simvastatin depended sufficiently on media used

Strain	Medium, №	Simvastatin, mg/l medium
<i>Asp.terreus-4</i>	1	0,015
	2	0,110
	3	0,490
<i>Asp.terreus-20</i>	1	0,030
	2	0,092
	3	1,290

Obtained results suppose the existence in *A.terreus* - 4 and *A.terreus* - 20 of biochemical mechanisms allowing formation and accumulation of simvastatin in the culture as a final fermentation product. Although the particular pathway of simvastatin formation was not studied, very probably this strains is able to synthesize DMB as side chain precursor.

On the basis of obtained data we conclude that indigenous strains *A.terreus* - 4 and *A.terreus* - 20 could be an alternative of the existing biotransformation processes of simvastatin production(2, 12).

References:

- 1 Alberts A.W., J. Chen, G. Kuron, V. Hunt, J. Huff, C. Hoffman, J. Rothrock, M. Lopez, H. Joshua, E. Harris, A. Patchett, R. Monaghan, S. Currie, E. Stapley, G. Albers-Schonberg, O. Hensens, J. Hirshfield, K. Hoogsteen, J. Liesch, Springer J. (1980) Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc.Natl.Acad Sci USA* 77:3957-3961.
- 2 Barrios-Gonzales J., Miranda R.U., 2010. Biotechnological production and applications of statins *Applied Microbiology and Biotechnology*. -1985.- P. 869-883.
- 3 Manzoni M., Rollini M., Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*.- 2002 58:555-564.
- 4 Endo, A., The origin of statins. *Int.Congr. Ser.* -2004.- 1262.- P.3-8.
- 5 Kidd J (2006) Life after statin patent expiries. *Nature revs/Drug Discovery* 5: 813-814.
- 6 Gulyamova T.G., Ruzieva D.M., Nasmetova S.M., Sattarova R.S., Lobanova K.V., Abdulmyanova L.A, Rasulova G.A. Lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid state and submerged fermentations // *International Journal of Engin, Science and Technol.* -2013. - Vol.5.-P.19-24
- 7 Lai LST, Pan CC, Tzeng BK The influence of medium design on lovastatin production and pellet formation with a high producing mutant of *Aspergillus terreus* in submerger cultures // *Process Biochem.* - 2003.- P. 1317-1326.
- 8 Casas Lopez J.L., Sanchez Perez J.A., Fernandez Sevilla J.M., Rodriguez Porcel E.M., Chisti Y. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effect of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production // *Enzyme Microb Technol.*- 2003.- №33. -P. 270-277.
- 9 Casas Lopez J.L., Sanchez Perez J.A., Fernandez Sevilla J.M., Rodriguez Porcel E.M., Chisti Y. Fermentation optimization for the production of lovastatin by of *Aspergillus terreus* : use of response surface methodology // *Chem Technol Biotechnol.* - 2004.-№79.- P.1119-1126.
- 10 Casas Lopez J.L., Sanchez Perez J.A., Fernandez Sevilla J.M., Rodriguez Porcel E.M., Chisti Y. Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus* // *Biotechnology*. -2005. - Vol.116. - P. 61-67
- 11 Manzoni M., Rollini M., Bergomi S., Cavazzoni V. Production and purification of statins from *Aspergillus terreus* strains // *Biotechnology Techniques.* – 1998. - Vol.12, №7.- P.529-532.
- 12 International Patent WO 2007147801 Method for the production of simvastatin. Al H. Hajjaj, Peter Niederberger. Lovastatin Biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a Chemically Defined Medium Van den Berg et al. (2007). // *Appl. And Environmental Microbiol.* - 2001. - Vol.67, № 6.- P. 2596-2602.
- 13 Zhihua Jia, Xiaoli Zhang, Yaling Zhao, Xuejun Cao *Appl Biochem Biotechnol* (2010) 160: 2014-2025 DOI 10. 1007/s 12010-009-8762-1