doi:10.3969/j.issn.1001-4616.2018.02.017

冠突散囊菌利用不同原料产洛伐他汀的条件优化

尹慧慧,陈育如,赵文文

(南京师范大学生命科学学院,江苏省微生物资源产业化工程技术研究中心,江苏省微生物与基因组学重点实验室,江苏省生物多样性与生物技术重点实验室,江苏 南京 210023)

[**摘要**]　本研究以甜菜粉、甜菜粕、甜叶菊、甘草渣及麸皮为原料用冠突散囊菌发酵产洛伐他汀,分别考察了这些原料和不同因素对洛伐他汀产量的影响. 甜菜粉作为培养基时洛伐他汀的含量最高为 95 mg/kg. 添加 0.15% 维生素 B_2 以甜菜粉为原料产洛伐他汀的量最高(134 mg/kg),与不添加维生素 B_2 相比产量提高了 41%,以添加量(A)、发酵温度(B)、发酵时间(C)及接种量(D)4 个因素进行正交试验. 结果表明,各因素对洛伐他汀产量的影响大小依次为:添加量(A)>接种量(D)>发酵时间(C)>发酵温度(B). 最优组合为 $A_2B_3C_1D_2$,在此条件下洛伐他汀产量为 146.4 mg/kg.

[**关键词**]　冠突散囊菌,洛伐他汀,维生素 B_2,甜菜粉,甜叶菊

[**中图分类号**]Q935　[**文献标志码**]A　[**文章编号**]1001-4616(2018)02-0093-06

Optimization of Producing Lovastatin by *Eurotium cristatum* with Different Materials

Yin Huihui,Chen Yuru,Zhao Wenwen

(School of Life Sciences,Nanjing Normal University,Jiangsu Engineering and Technology Research Centre for Microbiology Resource, Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology,Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomic,Nanjing 210023,China)

Abstract:In this work,it is studied on the production of lovastatin by *Eurotium cristatum* from beet powder,beet pulp, stvia rebaudiana,glycyrrhiza residue and wheat bran as raw materials,and the effects of these materials and different factors on the yield of lovastatin were investigated. *Eurotium cristatum* which cultivated by beet powder had the highest lovastatin level(95 mg/kg). Vitamin B_2(with a addition of 0.15%)could make the production of lovastatin significantly raise 41%(134 mg/kg)compared with no precursors. Choose 4 factors to conduct orthogonal test,the results showed the influence order of all factors are,precursors concentration(A)>inoculum concentration(D)>fermentation time(C)> fermentation temperature(B). The optimum extraction technology is $A_2B_3C_1D_2$,and the production of lovastatin could reach 146.4 mg/kg.

Key words:*Eurotium cristatum*,lovastatin,vitamin B_2,beet power,stevia rebaudiana

冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)是茯砖茶发花过程中的优势菌,因为其呈金黄色俗称金花菌[1]. 对冠突散囊菌黑茶发酵液的研究表明,冠突散囊菌黑茶发酵液对 α-淀粉酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶活力都有很好的促进作用,对脂肪酶有较强的抑制作用[2-3].

甜菜粉是甜菜经过烘干脱水后经机器加工打粉后制作而成的干粉料,其中含有丰富的蛋白、糖类、维生素及矿物质元素,营养成分十分丰富[4]. 甜菜粕是甜菜制糖过程中的甜菜块根经切丝浸提后剩余的残渣,是糖厂中产量最大的中间产物,其中含有较多的维生素、氨基酸及微量元素,但主要成分是纤维素类[5]. 甜叶菊是菊科多年生草本植物,其中含有甜菊糖苷、酚酸类、黄酮类、维生素、蛋白质、脂肪及微量元素等,甜菊糖苷是甜叶菊的主要甜味成分,因其是无热量的甜味剂,已广泛地应用于饮料、食品、药品及日用化妆品等行业.

收稿日期:2017-07-10.
基金项目:江苏省高校自然科学研究重大项目(15KJA210002)、省“六大人才高峰”高层次人才选拔培养项目(NY-011-2015).
通讯联系人:陈育如,教授,博士,研究方向:天然产物与药物研究. E-mail:chenyuru@ njnu.edu.cn

洛伐他汀是高效降血脂的他汀类药物,是多种真菌的次级代谢产物[6-7],可显著降低血糖中低密度脂蛋白和胆固醇水平,具有良好的降血脂作用[8-11],易溶于甲醇、乙醇、三氯甲烷、苯、碱性水溶液等. 研究表明,以花生粉为氮源时培养液的 pH 值在整个发酵过程中逐渐降低而洛伐他汀产量快速增加,推测是糖代谢的过程中三羧酸循环中间代谢物如 α-酮戊二酸、柠檬酸钠和丙酮酸等有机酸大量积累阻断了循环继续进行促使碳代谢更多地流向次级代谢[12]. 目前对产洛伐他汀的研究主要是土曲霉、红曲霉和青霉等,对用冠突散囊菌少有研究[13],本文对不同原料培养冠突散囊菌产洛伐他汀进行了研究,同时考察了维生素 B_2、复合维生素、柠檬酸三钠、柠檬酸铁 4 种前体物质对洛伐他汀含量的影响.

1　材料、设备与方法

1.1　材料与试剂

1.1.1　菌种与培养基

冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*),本实验室分离保藏.

斜面保藏培养基:PDA 培养基;甜菜粉固体培养基:甜菜粉 20 g,水 5 mL;甜菜粕固体培养基:甜菜粕 20 g,水 5 mL;甜叶菊固体培养基:甜叶菊 20 g,水 5 mL;甘草渣固体培养基:甘草渣 20 g,水 5 mL;麸皮固体培养基:麸皮 20 g,水 5 mL.

1.1.2　试剂

乙醇(AR,国药集团化学试剂有限公司),甲醇(HPLC 级,TOE SCIENTIFIG INC 公司),洛伐他汀标品(上海永叶生物科技有限公司),柠檬酸三钠(AR,国药集团化学试剂有限公司),维生素 B_2(广东仙乐制药有限公司),甜菜粉(兴化市联富食品有限公司),甜菜粕(山东汉高生物工程有限公司),麸皮、甜叶菊(市购),甘草渣(南京天晟药业).

1.2　设备

RE-52C 旋转蒸发器(巩义市予华仪器有限责任公司),SHB-Ⅲ循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司),高效液相色谱仪(Agilent1100,Agilent 公司),数控超声波清洗器(KQ-3200DE,昆山市超声仪器有限公司),BSA124S 电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司),SX-500 高压蒸汽灭菌锅(TOMY,Japan),Milli-Q 超纯水处理系统(美国 Millpore 公司),GNP-9080 隔水式恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司).

1.3　方法

1.3.1　发酵及样品制备

固体发酵:取出活化后长满菌落的 PDA 平板,在无菌操作条件下,倒入 5 mL 无菌水,用接种环刮下孢子,即为孢子悬液. 在无菌的操作条件下,分别取制备好的孢子悬液 2 mL 依次接种到甜菜粉固体培养基、甜叶菊固体培养基、甘草渣固体培养基、甜菜粕固体培养基和麸皮固体培养基中,30 ℃恒温培养 6 d.

1.3.2　色谱条件

Ultimate AQ-C18(250 mm×4.6 mm,5 μm)色谱柱;流动相 A:超纯水,流动相 B:甲醇(A∶B=20∶80);流速:0.6 mL/min;检测波长:238 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μL,等梯度洗脱.

1.3.3　产洛伐他汀的单因素实验

在不同的原料、添加物、温度、发酵时间及接种量的条件下发酵冠突散囊菌,称取冠突散囊菌固体发酵物 0.5 g,按 1∶5(g/mL)加入 2.5 mL 100%甲醇,50 ℃超声提取 30 min,过滤,重复上述操作 2 次,合并滤液. 0.22 μm 的有机滤膜过滤后待用.

洛伐他汀标准曲线:$y=48\ 592x+176.96$,其中 $R^2=0.999\ 8$,线性关系良好. (y 为洛伐他汀质量浓度($mg\cdot mL^{-1}$),x 为平均峰面积(mAU * s)).

1.3.4　正交实验法

在单因素实验的基础上,选择维生素 B_2 添加量、温度、时间、接种量 4 个因素,设计四因素三水平的正交试验,各因素及水平见表 1 所示.

表 1　正交实验因素水平表

Table 1　Factors and levels of orthogonal test

水平	维生素 B_2 添加量 A/%	温度 B/℃	时间 C/d	接种量 D/%
1	0.10	30→30	5	12
2	0.15	32→28	6	16
3	0.18	32→30	7	20

2　结果与讨论

2.1　不同原料和添加物对洛伐他汀产量的影响

以甜菜粉、甜菜粕、甜叶菊、甘草渣及麸皮为原料接入冠突散囊菌孢子悬液进行固体发酵，30 ℃恒温培养 6 d，甲醇提取培养物测定洛伐他汀量. 结果如图 1 所示，在分别用甜菜粉、甜菜粕、甜叶菊、甘草渣及麸皮为原料接入冠突散囊菌孢子菌悬液进行固体发酵时，甜菜粉固体发酵物中洛伐他汀的含量为 95 mg/kg，是甜菜粕固体发酵中洛伐他汀含量的 2.4 倍(39 mg/kg)；是甜叶菊固体发酵中洛伐他汀含量的 5.7 倍(16.7 mg/kg)；是麸皮固体发酵中洛伐他汀的 6.3 倍(15 mg/kg)；是甘草渣固体发酵中洛伐他汀的 55.9 倍(1.7 mg/kg). 甜菜粉中具有丰富的碳源、氮源以及微量元素，更适合冠突散囊菌的生长且利于产生代谢产物.

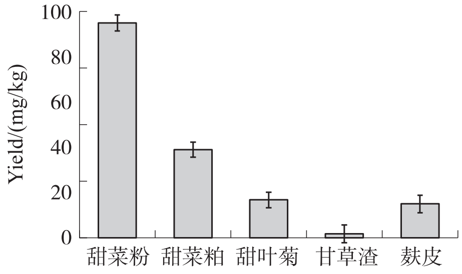

图 1　不同原料对洛伐他汀产量的比较

Fig. 1　Content of Lovastatin from beet powder medium with different materials

2.2　不同前体物质对洛伐他汀含量的影响

D-泛酸钙、VB_6 和烟酸等已被证实分别是洛伐他汀生物合成所需的能量供体 NADP、FAD 和 CoA 的前体物质，在培养基中增加这些物质可促进洛伐他汀的合成[14-15]. 本研究采用添加维生素 B_2、复合维生素、柠檬酸三钠、柠檬酸铁[16]等物质考虑其对洛伐他汀产量的影响，结果如图 2 所示，添加维生素 B_2(0.1%)的甜菜粉发酵曲中洛伐他汀的 HPLC 分析图如图 3 所示.

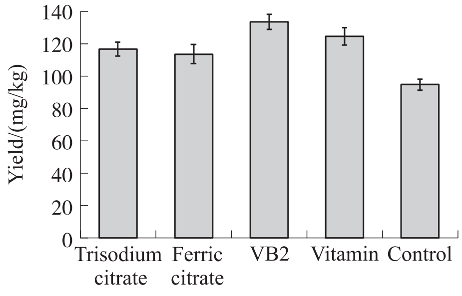

图 2　不同添加物对洛伐他汀产量的影响比较

Fig. 2　Content of Lovastatin from beet powder koji with added substanc

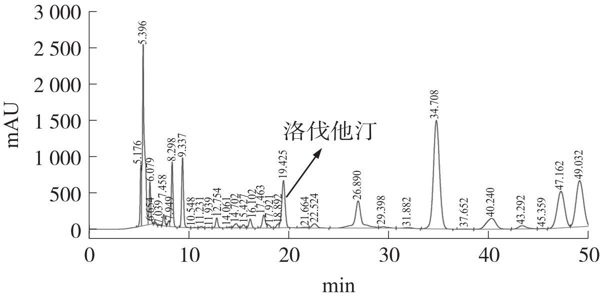

图 3　添加维生素 B_2(0.1%)的甜菜粉发酵曲中洛伐他汀含量的分析

Fig. 3　HPLC of Lovastatin from beet powder koji added with Vitamin B_2(0.1%)

由图 2 可见，添加维生素 B_2 可使洛伐他汀含量显著提高(达到 134 mg/kg)，与不添加前的洛伐他汀含量相比，提高了 41%，而添加复合维生素 B 的固体发酵物中洛伐他汀的量为 124 mg/kg，提高 30%，B 族维生素是洛伐他汀生物合成所必需的能量供体 NADP、FAD 和 CoA 的前体物质，增加这些物质可有效促进洛伐他汀的生物合成[17]. 柠檬酸三钠和柠檬酸铁添加后其发酵物中的洛伐他汀含量分别增加 23%和 20%，这些添加物中以维生素 B_2 的作用最好.

2.3　添加量对洛伐他汀产量的影响

由图 4 可见，发酵培养基中的维生素 B_2 从 0%增加到 0.10%时，洛伐他汀产量持续上升，当维生素 B_2 持续增加到 0.15%时，洛伐他汀产量开始趋于稳定，继续增加维生素 B_2 浓度，洛伐他汀产量开始减少. 分

析其原因是因为高浓度的维生素 B_2 对洛伐他汀的合成有抑制作用,导致了产量的降低,因此维生素 B_2 的适宜添加量为 0.15%.

2.4　温度对洛伐他汀产量的影响

由图 5 可见,发酵温度会对洛伐他汀的含量产生影响,在 5 种设定温度中,其中第二种培养方式最佳,即先将固体发酵物放在 32 ℃培养 3 d,然后将其转至 28 ℃培养使洛伐他汀产量提高 13.2%,第一种培养方式(32 ℃培养 3 d 然后转至 30 ℃培养)洛伐他汀产量提高了 8.4%,而第三种培养方式(32 ℃恒温培养)和第四种培养方式(28 ℃恒温培养)产量分别降低了 6.1%和 2.3%. 因此洛伐他汀的最佳发酵温度为前 3 d 32 ℃后转至 28 ℃培养. 分析其原因,培养前期为菌落生长阶段,32 ℃培养可以使菌落得到快速生长,培养中后期则为洛伐他汀的产量积累阶段.

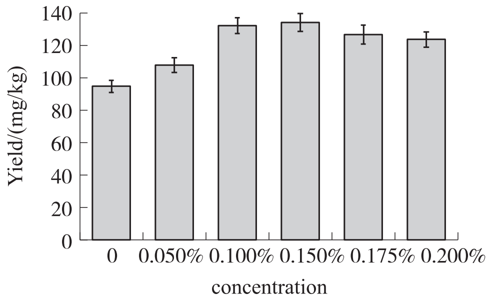

图 4　前体添加量对洛伐他汀产量的影响

Fig. 4　The effect of precursor concentration on the yield of Lovastatin

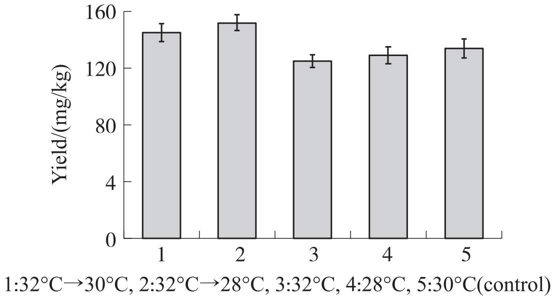

图 5　温度对洛伐他汀产量的影响

Fig. 5　The effect of fermentation temperature on the yield of Lovastatin

2.5　发酵时间对洛伐他汀产量的影响

由图 6 可见,在发酵前期 3 d~5 d,随着时间的延长,洛伐他汀的产量呈递增趋势;发酵中期随时间延长产量继续增长,但幅度逐渐减小;发酵后期 6 d~8 d,洛伐他汀的产量趋于稳定,产量不再升高,故应将发酵时间控制在 6 d 以获得最大产量的洛伐他汀[18].

2.6　接种量对洛伐他汀产量的影响

由图 7 可见,在一定范围内,随着接种量增大,洛伐他汀的产量增加,由于发酵初期,接种量越大,在同样发酵条件下营养基质相对孢子来说不会过剩,菌体在发酵初期因生长速率过快而且比较容易分散,从而提高洛伐他汀产量. 但当接种量超过 16%时,洛伐他汀产量不再明显增加,这是由于随着接种量增大营养基质被充分利用,再增大接种量反而会导致洛伐他汀产量降低. 因此,最适宜的固体接种量为 16%.

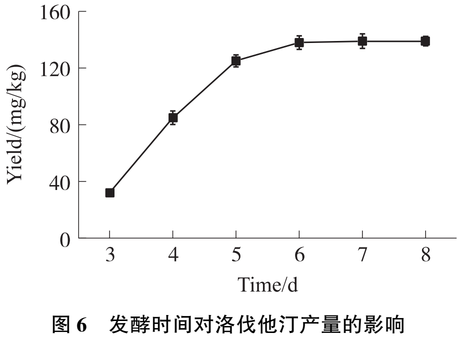

图 6　发酵时间对洛伐他汀产量的影响

Fig. 6　The effect of fermentation time on the yield of Lovastatin

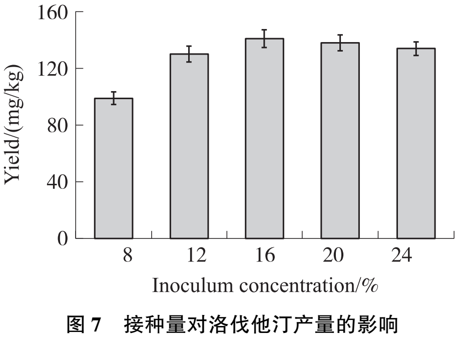

图 7　接种量对洛伐他汀产量的影响

Fig. 7　The effect of inoculum concentration on the yield of Lovastatin

2.7　正交试验结果

采用正交试验法优化洛伐他汀的发酵工艺,选择前体添加量(A)、发酵温度(B)、发酵时间(C)、接种量(D)4 个因素,设计四因素三水平共 9 组试验,试验设计方案及结果见表 2.

通过对表 2 的直观分析,前体添加量的极差最大,各因素对洛伐他汀产量的影响大小依次为:前体添加量(A)>接种量(D)>发酵时间(C)>发酵温度(B). 最佳提取工艺为 $A_2B_3C_1D_2$,即当前体添加量为 0.15%、接种量为 16%时,在 32 ℃~30 ℃下发酵 5 d,此时洛伐他汀产量达到 146.4 mg/kg,吕嘉枥用麸皮

作为天然培养基培养冠突散囊菌,测得洛伐他汀含量仅为 0.049 mg/kg,含量较低[19].

由表 3 的方差分析结果可见,前体添加量和接种量对洛伐他汀产量的影响显著($P<0.05$),而发酵温度和发酵时间为不显著影响因素. 因此,在进行冠突散囊菌固体发酵时,应该严格控制前体添加量和接种量,从而可以大幅度提高洛伐他汀的产量.

表 2 $L_9(3^4)$正交试验设计方案及结果

Table 2 Designment and results of orthogonal experiment

实验编号	因素				产量/(mg/kg)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	133.5
2	1	2	2	2	140.7
3	1	3	3	3	134.4
4	2	1	2	3	143.8
5	2	2	3	1	138.7
6	2	3	1	2	146.4
7	3	1	3	2	137.2
8	3	2	1	3	138.3
9	3	3	2	1	135.2
k_1	136.20	138.17	139.40	135.80	
k_2	142.97	139.23	139.90	141.43	
k_3	136.90	138.67	136.77	138.83	
R	6.77	1.06	3.13	5.63	

表 3 方差分析结果

Table 3 ANOVA analysis of L9(34) orthogonal experiment

方差来源	SS	f	F	显著性
A	83.082	2	48.614	*
B	1.709	2	1.000	
C	17.002	2	9.949	
D	47.696	2	27.909	*
误差	1.710	2		

3 结论

(1)研究了以甜菜粉、甜菜粕、甜叶菊、甘草渣和麸皮作为固体培养基发酵产洛伐他汀的方法,洛伐他汀产量分别为 95 mg/kg、39 mg/kg、25 mg/kg、16.7 mg/kg 和 1.7 mg/kg,在用甜菜粉为原料时,洛代他汀产量最高(95 mg/kg).

(2)添加物的加入对冠突散囊菌固体发酵产洛伐他汀有很大影响. 添加 0.15%维生素 B_2 后,洛伐他汀产量为 134 mg/kg,比不添加时提高了 41%.

(3)在单因素实验基础上,选取添加物量(A)、发酵温度(B)、发酵时间(C)及接种量(D)4 个因素进行正交试验优化. 最优条件为 $A_2B_3C_1D_2$,在此条件下,洛伐他汀产量达 146.4 mg/kg.

[参考文献]

[1] 杨抚林,邓放明,赵玲燕,等. 茯砖茶发花过程中优势菌的研究发展[J]. 茶叶科学技术,2005(1):4-7.

[2] DU F Y,LI X M,LI C S,et al. ChemInform abstract:cristatumins A-D,new indole alkaloids from the marine-derived endophytic fungus *Eurotium cristatum* EN-220[J]. Bioorganic and medicinal chemistry letters,2012,43(46):4650-4653.

[3] XU A,WANG Y,WEN J,et al. Fungal community associated with fermentation and storage of Fuzhuan brick-tea[J]. International journal of food microbiology,2011,146(1):14-22.

[4] IEVA R,AUDRIUS P,PETRAS R V,et al. Effects of beetroot(Beta vulgaris)preparations on the Maillard reaction products in milk and meat-protein model systems[J]. Food research international,2015,70:31-39.

[5] WANG L F,BELTRANENA E,ZIJLSTRA R T. Diet nutrient digestibility and growth performance of weaned pigs fed suger

beet pulp[J]. Animal feed science and technology,2016,211:145-152.
[6] ERGIN A,TUTKUN T,BAHADIR O,et al. Comparison of lovastatin and hyaluronic acid/carboxymethyl cellulose on experimental created peritoneal adhesion model in rats[J]. International journal of surgery,2013,12(2):120-124.
[7] 苟连平,吕湛,胡厚祥,等. 洛伐他汀对 THP-1 细胞分化成泡沫细胞过程中清道夫受体 A 表达及 MCP-1、TNF-α 水平的影响[J]. 中国老年学杂志,2011(13):2475-2477.
[8] ZHAO Z J,PAN Y Z,LIU Q J,et al. Exposure assessment of lovastatin in Puerh tea[J]. International journal of food microbiology,2013,164(1):26-31.
[9] RAVI L I,LI L,WONG P S,et al. Lovastatin treatment mitigates the pro-inflammatory cytokine response in respiratory syncytial virus infected macrophage cells[J]. Antiviral research,2013,98(2):332-343.
[10] XING F,GAO S H U,NA L I,et al. Effects of lovastatin,clomazone and methyl jasmonate treatment on the accumulation of purpurin and mollugin in cell suspension cultures of Rubia cordifolia[J]. Chinese journal of natural medicines,2013,11(4):396-400.
[11] ATLI B,YAMAÇ M,YILDIZ Z,et al. Enhanced production of lovastatin by Omphalotus olearius(DC.) Singer in solid state fermentation[J]. Revista iberoamericana de micología,2015,32(4):247-251.
[12] CHENG S M,LAI J H,YANG S P,et al. Modulation of human T cells signaling transduction by lovastatin[J]. International journal of cardiology,2010,140(1):24-33.
[13] 吕嘉枥,王珊,王柳. 高效液相色谱法检测金花菌固态发酵中他汀类物质[J]. 陕西科技大学学报(自然科学版),2014(1):114-118.
[14] 贾志华,张小里,曹学君,等. 复合氮源对土曲霉洛伐他汀生物合成的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2010(10):159-164.
[15] BIZUKOJC M,PAWLOWSKA B,LEDAKOWICZ S.Supplementation of the cultivation media with B-group vitamins enhances lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus*[J]. J Biotechnol,2007,127:258-268.
[16] PAWLAK M,BIZUKOJC M. Feeding profile is not the sole factor influencing lovastatin production by *Aspergillus terreus* ATCC20542 in a continuous fed-batch stirred tank bioreactor[J]. Biochemical engineering journal,2013,81(50):80-89.
[17] 张育杰,胡海峰,朱宝泉. 前体对洛伐他汀生物合成的影响[J]. 中国抗生素杂志,2006,31(9):529-531.
[18] 路秀玲. 红曲霉固态发酵生产生理活性物质 Monacolin K 的研究[D]. 天津:天津轻工业学院,2000.
[19] 吕嘉枥,王珊,王柳. 高效液相色谱检测金花菌固体发酵中他汀类物质[J]. 陕西科技大学学报(自然科学版),2014(1):114-118.

[责任编辑:黄　敏]

(上接第 92 页)

[9] 罗冬梅,郑连斌,陆舜华,等. 怒族成人 Heath-Carter 法体型研究[J]. 天津师范大学学报(自然科学版),2007,27(4):11-15.
[10] 于会新,郑连斌,陆舜华,等. 佤族成人 Heath-Carter 法体型研究[J]. 天津师范大学学报(自然科学版),2008,28(2):18-22.
[11] 郑连斌,陆舜华,张兴华,等. 中国莽人、僜人、珞巴族与门巴族 Heath-Carter 法体型研究[J]. 人类学学报,2010,29(2):176-181.
[12] 黄世宁,浦洪琴,庞祖荫. 侗族成人 Heath-Carter 法体型研究[J]. 人类学学报,2004,23(1):73-78.
[13] 金利新. 山东汉族成人的 Heath-Carter 法体型研究[J]. 人类学学报,2003,22(1):37-44.
[14] 陆舜华,郑连斌,栗淑媛,等. 乌孜别克族成人的体型特点[J]. 人类学学报,2004,23(3):224-228.
[15] 索利娅. 俄罗斯族体质人类学研究[D]. 天津:天津师范大学,2005.
[16] 田金源,郑连斌,宇克莉,等. 大凉山彝族体型的 Heath-Carter 人体测量[J]. 解剖学杂志,2015,38(1):72-75.

[责任编辑:黄　敏]