



洛伐他汀发酵培养基优化的研究

卜光明, 郑庆宝

(浙江瑞邦药业有限公司, 温州 325027)

摘要: 选用生物氮素和蛋白粉代替原配方中的蛋白胨和豆粕粉, 对洛伐他汀发酵培养基进行了优化. 采用正交试验设计方法, 确定了最佳发酵培养基配方, 经 30 t 发酵罐连续 10 批验证, 平均产量达到 10 790 mg/L, 比原配方提高了 13.5%, 原材料消耗成本可降低 10% 以上, 特别是减少了发酵泡沫, 发酵装料系数也有较大提高.

关键词: 洛伐他汀; 发酵; 培养基优化

中图分类号: TQ92

文献标识码: A

文章编号: 1672-6510 (2007) 03-0015-04

A Modified Medium Composition for Lovastatin Fermentation

BU Guang-ming, ZHENG Qing-bao

(Zhejiang Ruibang Laboratories, Wenzhou 325027, China)

Abstract: The medium for lovastatin fermentation was optimized by replacing the initial compositions of peptone and bean cake with the bio-nitrogen and protein-powder. Then the optimal medium composition was determined by orthogonal experiment. After ten times of continuous fermentation in a 30-ton fermentor, the average fermentation value reached 10790 mg/L with an improvement of 13.5%. Meanwhile, the cost of material consumption dropped more than 10%, and especially, the foam generated during the fermentation procedure was reduced, and the charge coefficient was improved remarkably. A better economical benefit could be achieved by this method.

Keywords: lovastatin; fermentation; medium optimization

洛伐他汀 (lovastatin) 是目前临床上重要的降血脂药物, 为一种 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶的抑制剂, 主要是真菌的次生代谢产物. 1979 年由 Endo 等^[1] 从桔青霉 (*Penicillium citrinum*) 的发酵液中发现此物质, 1980 年 Alberts 等^[2] 也报道了土曲霉 (*Aspergillus terreus*) 中也产生该物质. 目前, 以微生物发酵生产洛伐他汀的研究取得了长足的进步, 生产洛伐他汀所采用的真菌主要有青霉菌、红曲霉和土曲霉三大类, 其中土曲霉是工业生产中最常用的菌种^[3-8].

目前洛伐他汀发酵生产中培养基主要采用蛋白胨和豆粕粉作为氮源^[9]. 此培养基中蛋白胨、豆粕粉、葡萄糖和豆油的消耗成本占 80% 以上. 为了降低生产成本, 本研究选用生物氮素和蛋白粉代替蛋白胨和豆粕粉, 采用正交设计试验方法, 确定了一种新的发酵培养基配方, 经 30 t 发酵罐连续 10 批验证, 发酵产量有较大提高.

1 材料与方法

1.1 菌种

本公司生产洛伐他汀的生产菌 *Aspergillus terreus* WY9308VS.

1.2 培养基

(1) 斜面培养基 (g/L): 葡萄糖 15, 豆粕粉 10, 蛋白胨 5, 氯化钠 2, 磷酸二氢钾 0.5, 硫酸镁 0.5, 琼脂 15, pH 5.9~6.1.

(2) 种子培养基 (g/L): 葡萄糖 50, 豆粕粉 10, 蛋白胨 5, 氯化钠 2, 磷酸二氢钾 0.5, 硫酸镁 0.5, pH 5.9~6.1.

(3) 发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 220, 蛋白粉 40, 生物氮素 15, 氯化钠 2, 硝酸钠 2, 磷酸二氢钾 0.5, 硫酸镁 0.5, 豆油 7, pH 5.9~6.1. 100 kPa, 灭菌 20 min.

所用试剂均为国产分析纯和生化试剂.

收稿日期: 2006-09-25; 修回日期: 2007-04-09

作者简介: 卜光明 (1967—), 男, 温州人, 工程师, 主要从事微生物来源新药的发酵和提取等研究工作.

1.3 培养方法

1.3.1 摇瓶发酵培养

冻干管取种接于斜面, 26℃培养 9 d 得母斜面; 从母斜面转接, 26℃培养 9 d 后得到子斜面; 挑取菌落接种于种子培养基, 转速 220 r/min, 26℃培养 78 h; 以 10% 的接种量接入发酵培养基, 转速 220 r/min, 26℃培养 240 h 后取样检测洛伐他汀产生量。

1.3.2 发酵罐培养

取上述子斜面试种于种子罐, 一级种子罐 26℃, 转速 220~240 r/min, 通气量: 0.5~1.0 L/min, 培养 40~48 h; 二级种子罐 26℃, 转速 200~220 r/min, 通气量: 0.5~1.0 L/min, 培养 20~24 h; 发酵罐 26℃, 转速 160~180 r/min, 通气量: 0.6~0.8 L/min, 培养 220~240 h。放罐, 经分离, 纯化得成品。

1.4 分析方法

1.4.1 HPLC 工作曲线的绘制

准确称取 12.50 mg 洛伐他汀标准品 (99.6%) 置于 50 mL 容量瓶中, 用无水乙醇溶解并定容, 分别取 12.50, 10.00, 7.50, 5.00, 2.50 mL 加入到 25 mL 容量瓶中用无水乙醇定容, 分别取 20 μL 进样。色谱条件: HPLC 4.6 mm×250 mm 柱, 填充剂 C₁₈ 3~5 μm, 流动相 V(乙酸): V(水): V(甲醇)=2.4: 400: 2 000, 柱温 25℃, 检测波长 238 nm, 流速 1.5 mL/min。

1.4.2 HPLC 法测定发酵液的效价

将发酵液搅拌均匀, 精密量取 10.0 mL 置于 250 mL 碘量瓶中, 加乙酸乙酯 50.0 mL, 塞紧瓶口, 振荡 4 h, 取上清液 1.00 mL 加无水乙醇适当稀释后作为待测溶液。

2 结果

2.1 洛伐他汀的 HPLC 标准曲线

HPLC 的实验结果显示, 洛伐他汀含量在 0.049 8~0.124 5 mg/mL 范围内, 其进样量与色谱峰面积呈线性关系, 如图 1 所示。

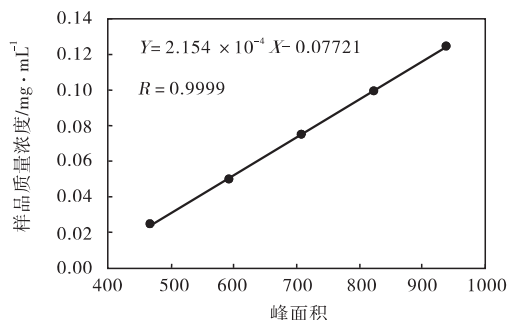


图 1 洛伐他汀的标准曲线

Fig. 1 Standard curve of lovastatin

2.2 培养基中各组分对洛伐他汀产量的影响

培养基中各组分对 *Aspergillus terreus* WY9308VS 产洛伐他汀有直接的影响, 尤其是作为营养因子的碳源和氮源影响更为关键。本研究以发酵培养基为基础, 对作为营养因子的生物氮素、蛋白粉、葡萄糖, 以及作为消泡剂的豆油等 4 个因素, 每个因素选取 5 个水平进行单因素考察。分别改变其中一种组分的含量, 通过摇瓶试验, 以确定其在发酵培养基中的最佳含量, 结果如表 1。

表 1 培养基中各组分含量对洛伐他汀产量的影响

Tab.1 The yield of lovastatin influenced by component concentration

生物氮素	生物氮素含量/g·L ⁻¹	30	35	40	45	50
	洛伐他汀产量/mg·L ⁻¹	9 150	9 430	9 570	8 860	7 890
葡萄糖	葡萄糖含量/g·L ⁻¹	180	200	220	240	260
	洛伐他汀产量/mg·L ⁻¹	8 750	9 230	9 570	8 960	5 860
蛋白粉	蛋白粉含量/g·L ⁻¹	0.0	3.0	6.0	9.0	12.0
	洛伐他汀产量/mg·L ⁻¹	4 910	8 520	8 790	8 240	7 730
豆油	豆油含量/g·L ⁻¹	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
	洛伐他汀产量/mg·L ⁻¹	9 250	9 310	9 380	8 710	6 800

2.3 正交设计试验

根据对生物氮素、蛋白粉、葡萄糖、豆油的单因素考察结果, 确定了 4 种物质在发酵培养基中的最佳含量范围。综合考虑这 4 种因素, 采用四因素三水平正交表 L(3⁴) (表 2) 设计试验, 对 4 种物质的最佳配

比进行考察。实验结果见表 3。

从表 3 分析可知, 影响洛伐他汀产量的因子主次顺序为葡萄糖>蛋白粉>生物氮素>豆油, 最佳配方为第 6 组配方 A₂B₃C₁D₂, 即生物氮素 40 g/L, 葡萄糖 240 g/L, 蛋白粉 3 g/L, 豆油 0.5 g/L。

表 2 L (3⁴) 水平设计表

Tab.2 L (3⁴) orthogonal design

因素	生物氮素 (A) /g · L ⁻¹	葡萄糖 (B) /g · L ⁻¹	蛋白胨 (C) /g · L ⁻¹	豆油 (D) /g · L ⁻¹
1	35	200	3	0.3
2	40	220	6	0.5
3	45	240	9	0.7

表 3 L(3⁴)正交设计结果

Tab.3 Result of L (3⁴) orthogonal design

实验号	列号 (水平)				产量/mg · L ⁻¹
	A(1)	B(2)	C(3)	D(4)	
1	1	1	1	1	4 900.0
2	1	2	2	2	5 640.0
3	1	3	3	3	6 050.0
4	2	1	2	3	5 220.0
5	2	2	3	1	5 420.0
6	2	3	1	2	10 610.0
7	3	1	3	2	5 300.0
8	3	2	1	3	7 620.0
9	3	3	2	1	8 360.0
T1	5 530.0	5 140.0	7 710.0	6 226.6	
T2	7 083.3	6 226.6	6 406.6	7 183.3	
T3	7 093.3	8 340.0	5 590.0	6 296.6	
R	1 563.3	3 200.0	2 120.0	956.6	

2.4 重复改良试验

考虑到豆油的影响最小,为了进一步降低成本,减少了豆油的用量,又选用 A₂B₃C₁D₁ 与 A₂B₃C₁D₂ 做了对比试验,(每组 10 个摇瓶取平均),结果如表 4 所示,发酵产量无明显差异 (P>0.05)。

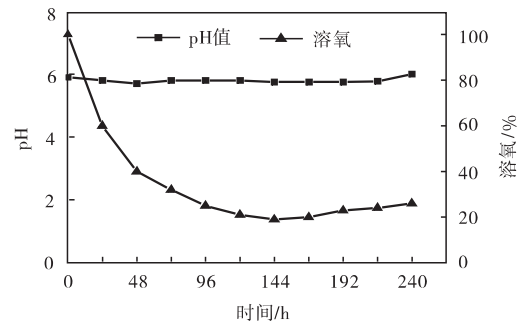
表 4 A₂B₃C₁D₁与 A₂B₃C₁D₂配方的条件比较

Tab.4 Comparison between A₂B₃C₁D₁ and A₂B₃C₁D₂

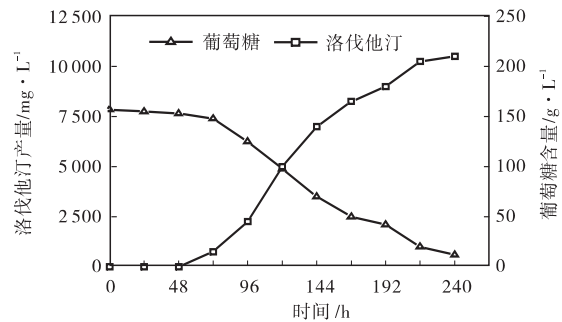
组别	A ₂ B ₃ C ₁ D ₁	A ₂ B ₃ C ₁ D ₂	原配方对照
产量/mg · L ⁻¹	11 380	11 520	9 509

2.5 批量验证试验

选择优化配方 A₂B₃C₁D₁ 在 30 t 大罐上进行了连续 10 批发酵验证,其发酵动力学曲线见图 2,其验证结果见表 5. 由表 5 数据可见,洛伐他汀平均产量为 10 790 mg/L,比使用原培养基发酵的平均产量 9 509 mg/L,提高 13.5%。



(a) 溶氧及 pH 的变化



(b) 葡萄糖含量及洛伐他汀产量的变化

图 2 采用优化培养基配方在 30 t 罐上的发酵动力学曲线

Fig.2 Kinetics parameter in 30 t fermentor by optimal medium composition.

表 5 A₂B₃C₁D₁ 在 30 t 发酵罐验证结果

Tab.5 Confirmed result of A₂B₃C₁D₁ in 30 t fermentor

批次	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均
产量/mg · L ⁻¹	11 610	11 130	10 420	10 630	11 130	10 710	11 730	10 960	9 750	9 820	10 790

3 讨论

随着他汀类药物在临床上的广泛应用,其降脂作用和降脂外的疗效在很大程度上减少了心血管事件发生的风险.作为内源性胆固醇合成酶 HMG-CoA 抑制剂,洛伐他汀能有效地调节血脂,降低血清胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG),低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 及肝脏 TC 浓度,升高高密度脂蛋

白胆固醇 (HDL-C)^[10]. 近年来国内外对洛伐他汀的发酵条件的研究结果显示,其发酵水平仍停留在 572~2 000 mg/L 水平^[3,8,11,12]. 本研究通过对培养基和发酵条件的考察,发现采用生物氮素和蛋白粉可以代替原配方中的蛋白胨和豆粕粉,适当减少豆油的用量对发酵是可行的.在洛伐他汀的发酵过程中,菌丝形态,发酵液黏度和生化指标与原工艺相比均无明显差异.但由于使用了生物氮素和蛋白粉,在发酵前期产

生的泡沫较少,提高了发酵装料系数,适当控制搅拌和通气量,发酵过程较为平稳,发酵水平有较大提高(13.5%),平均发酵单位达到10 790 mg/L,且原材料消耗成本可降低10%以上,具有较高的经济效益。

参 考 文 献:

- [1] Endo A, Monacolin K. A new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species [J]. *J Antibiot*, 1979, 32: 852—854.
- [2] Alberts AW, Chen J, Kuron G, et al. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl 2coenzyme A reductase and a cholesterol lowering agent [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 3957—3961.
- [3] 田歌, 林永彬, 张德明. 土曲霉洛伐他汀发酵的研究进展[J]. *沈阳药科大学学报*, 2005, 22(4): 310—314.
- [4] Timothy G Schimmei, Allen D Coffman, Sarah J Parsons. Effect of butyrolactone I on the producing fungus, *Aspergillus terreus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 3707—3712.
- [5] Hassan Hajjaj, Peter Niederberger, Philippe Duboc. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium[J]. *Applied and Environ-*

mental Microbiology, 2001, 67(6): 2596—2602.

- [6] 沈平, 伍军, 李浩然, 等. 红曲固态发酵生产洛伐他汀的实验条件优化[J]. *北京农学院学报*, 2005, 20(3): 47—51.
- [7] 王开进. 红曲霉固态发酵生产Lovastatin 培养条件的探索[J]. *农业与技术*, 2004, 24(6): 86—89.
- [8] 莱晶晶, 李季伦. 土曲霉(*Aspergillus terreus*)产生洛伐他汀(lovastatin)的研究[J]. *微生物学杂志*, 2000, 20(4): 1—4.
- [9] 周兴挺, 徐会根, 罗定军. 洛伐他汀发酵培养基配方的均匀设计优选[J]. *中国抗生素杂志*, 1999, 24(1): 22—23.
- [10] 张文斌, 宋筱筱, 傅国胜, 等. 他汀类药物临床研究进展[J]. *心血管病学进展*, 2006, 27(1): 79—82.
- [11] L-S Lai, T-H Tsai, TC Wang, et al. The influence of culturing environments on lovastatin production by *Aspergillus terreus* in submerged culture[J]. *Enzyme Microbial Technol.*, 2005, 36: 737—748.
- [12] L-S Lai, C-C Pan, B-K Tzeng. The influence of medium design on lovastatin production and pellet formation with a high-producing mutant of *Aspergillus terreus* in submerged cultures[J]. *Proc Biochem*, 2003, 38: 1317—1326.

(上接第8页)

发酵酸性 α -淀粉酶的酶活基本稳定在315~343 U/mL, 转接7代酶活下降不超过8%, 说明该菌株遗传稳定性较好。

3 结 论

(1) 采用低能 N^+ 注入中温中性 α -淀粉酶产生菌BF7658以选育产耐酸性 α -淀粉酶的突变株, 实验发现BF7658的存活率与 N^+ 注入剂量间呈现典型的“马鞍型”曲线, 且“马鞍区”对应剂量下所产生的突变率较高, 说明 N^+ 离子束这种诱变因子不同于紫外线或 γ 射线的诱变机制, 且对枯草芽孢杆菌BF7658有明显的诱变效应。

(2) 采用最佳注入剂量(100×10^{14} ions/cm²)的 N^+ 对BF7658进行诱变处理, 最终获得一株高产耐酸性 α -淀粉酶的突变株, 编号TUST743. 该突变株产 α -淀粉酶的最适作用pH为5.0, 较出发菌株BF7658偏低一个单位, 其产耐酸性 α -淀粉酶的酶活为343 U/mL, 且传代性质稳定. 说明 N^+ 离子注入技术能够应用于耐酸性 α -淀粉酶产生菌的诱变育种中。

参 考 文 献:

- [1] 陈恒雷, 吕杰, 曾宪贤. 离子束诱变育种研究及应用进展[J]. *种子*, 2005, 24(6): 45—47.
- [2] Yu Zengliang. The role of radiation in the cringing and evolution of Life[M]. Japan: Kyoto University Press, 2000: 175.
- [3] 高崎义幸. 日本开发耐热耐酸性 α -淀粉酶[J]. *日本食品工业*, 1994, 6(30): 44—50.
- [4] 张丽苹, 徐岩, 金建中. 酸性 α -淀粉酶的研究与应用[J]. *酿酒*, 2002, 29(3): 19—23.
- [5] 杜连祥, 路福平, 王昌禄, 等. 工业微生物学实验技术[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1992.
- [6] QB/T1803-93 中国食品工业标准汇编(饮料酒)[S].
- [7] 陈宇, 林梓鑫, 张峰, 等. 离子注入微生物的生物效应研究[J]. *中国抗生素杂志*, 1998, 23(6): 415—419.
- [8] 余增亮. 离子束生物技术引论[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1998: 241—246.
- [9] Song Daojun, Yao Jianming, Shao Chunlin. A possible mechanism of dose related survival of microorganism implanted by N^+ ions [J]. *High Technology Letters*, 1999, 22(3): 129—232.