

复合氮源对土曲霉洛伐他汀生物合成的影响

贾志华¹, 张小里², 曹学君³, 秦宝福¹, 刘建党¹

(1 西北农林科技大学 生命科学院, 陕西 杨凌 712100; 2 西北大学 化工学院, 陕西 西安 710069;

3 华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

【摘要】 【目的】研究不同复合氮源对土曲霉生物合成洛伐他汀的影响。【方法】以酵母粉、蛋白胨、花生粉、燕麦粉、玉米浆和黄豆粉分别为复合氮源,通过摇瓶培养检测培养过程中洛伐他汀产量及其关键中间代谢物 2-甲基丁酸盐和 monacolin J 的积累量。【结果】以蛋白胨为氮源时,土曲霉细胞比生长速率最大,为 8.06 d^{-1} ;以花生粉为氮源时,洛伐他汀比产物合成速率最大,为 $1.44 \text{ mg}/(\text{g} \cdot \text{h})$,同时培养过程中 2-甲基丁酸盐和 monacolin J 对细胞得率明显高于其他氮源,均约为玉米浆的 4 倍;以酵母粉为氮源时,2-甲基丁酸盐的合成速率是 monacolin J 的 4 倍,其 monacolin J 转化率最高(92.0%),约是玉米浆的 1.6 倍。【结论】不同复合氮源不仅影响次级代谢的碳代谢流,还能通过调控洛伐他汀合成途径中的关键酶(LovD 或 LovF)影响其生产。

【关键词】 土曲霉;生物合成;复合氮源;洛伐他汀;代谢调控

【中图分类号】 TQ465

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)10-0159-06

Effect of complex nitrogen source on lovastatin biosynthesis from *Aspergillus terreus*

JIA Zhi-hua¹, ZHANG Xiao-li², CAO Xue-jun³, QIN Bao-fu¹, LIU Jian-dang¹

(1 College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 College of Chemical Engineering,

Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China; 3 State Key Laboratory of Bioreactor Engineering,

East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: 【Objective】Effects of various complex nitrogen sources on lovastatin biosynthesis from *Aspergillus terreus* were investigated. 【Method】The production of lovastatin and the accumulation of its key intermediate metabolites such as 2-methylbutyrate and monacolin J were determined in the cultures by shake flask cultivation when yeast extract powder, peptone, peanut meal, oat meal, corn steep liquor, and soybean meal were regarded as the complex nitrogen source, respectively. 【Result】The highest specific growth rate of 8.06 d^{-1} was produced when peptone was the sole nitrogen source. The highest specific lovastatin production rate of $1.44 \text{ mg}/(\text{g} \cdot \text{h})$ resulted from the culture in which peanut meal was the sole nitrogen source. Simultaneously, the yields of 2-methylbutyrate and monacolin J on biomass resulted from peanut meal were all approximate 4-fold to that obtained from corn steep liquor and were much higher than those obtained from other four investigated nitrogen sources. The formation rate of 2-methylbutyrate was 4-fold to that of monacolin J in the presence of yeast extract while the percent conversion of monacolin J (92.0%) was approximate 1.6-fold to that obtained from corn steep liquor. 【Conclusion】Different complex nitrogen sources probably affect both the carbon flux to secondary metabolism of *A. terreus* and the lo-

* [收稿日期] 2010-03-23

[基金项目] 陕西省教育厅重点科研项目(99JK08)

[作者简介] 贾志华(1973—),男,陕西眉县人,讲师,博士,主要从事微生物发酵与代谢调控研究。E-mail: jiazh@nwsuaf.edu.cn

[通信作者] 张小里(1962—),男,陕西澄城人,教授,博士,博士生导师,主要从事微生物发酵与生物催化研究。

E-mail: xlzhang@nwu.edu.cn

vastatin production by regulating its key enzymes (LovD or LovF) involved in the biosynthetic pathway.

Key words: *Aspergillus terreus*; biosynthesis; complex nitrogen source; lovastatin; metabolic regulation

洛伐他汀(lovastatin)是经聚酮体合成途径由丝状真菌发酵产生的一类次级代谢产物,其是胆固醇生物合成途径限速步骤——3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMG-CoA 还原酶,EC 1. 1. 1. 34)的竞争性抑制剂,已广泛用于降胆固醇药物^[1-4]。目前,基础研究和工业生产大都采用土曲霉(*Aspergillus terreus*)作为洛伐他汀的生产菌。

洛伐他汀生物合成的前体物质是三羧酸循环产生的乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A,它们一方面在九酮体合成酶 LovB、烯醇还原酶 LovC 共同作用下多次迭代,再在 P450 氧化酶 LovA 作用下,经后 PKS 修饰形成洛伐他汀的直接前体 monacolin J;另一方面,同时在二酮体合成酶 LovF 作用下一次缩合直接形成 2-甲基丁酸盐侧链^[5]。monacolin J 和 2-甲基丁酸盐在酰基转移酶 LovD 作用下酯化最终形成洛伐他汀^[6-7]。任何导致上述合成酶失活的行为都将造成中间代谢物的积累,降低最终产物的产量^[8]。

微生物生长和代谢过程中,培养基成分显著影响次级代谢活动,它们或作为前体及能量的来源参与合成生物量构成骨架及目标代谢物生产的辅因子,或对目标代谢物合成过程中的关键酶进行调控。在洛伐他汀生产过程中,碳源不仅以分解代谢物阻遏、生长的信号途径或底物限制方式调控其生物合成^[9-10],还通过诱导菌体形态分化刺激次级代谢^[11],并对合成过程中的关键酶 LovD 或 LovF 有一定的调控作用^[12]。二价金属阳离子 Zn^{2+} 和 Fe^{2+} 也通过调控关键酶 LovD 和 LovF 活性显著促进洛伐他汀生物合成^[13]。由于洛伐他汀分子结构中不含氮原子,因此在土曲霉发酵生成洛伐他汀过程中,氮源仅用于生物量的构建,同时还参与产物生物合成中相关酶的组成。研究表明,谷氨酸和组氨酸是生产洛伐他汀最好的单一有机氮源^[9];酵母粉^[10,14]、黄豆粉^[15]、玉米浆^[15-16]、油菜籽粉^[17]等缓慢利用氮源则是最好的复合氮源。工业生产中采用的氮源大多为复合氮源,因其营养丰富、价格低廉且易得,已普遍用于抗生素生产中。但复合氮源成分复杂,很难对其的影响因素进行定量,因此对复合氮源在抗生素生物合成中的调控作用研究较少,有关氮源对洛伐他汀生物合成调控研究目前尚未见报道。

本试验研究了不同复合氮源种类对土曲霉发酵生产洛伐他汀过程中,细胞生长和洛伐他汀合成及

其关键中间代谢物积累的影响,分析了合成过程中参与目标产物洛伐他汀及其关键中间代谢物 2-甲基丁酸盐和 monacolin J 合成的碳转化率,探讨了不同复合氮源对洛伐他汀生物合成可能的调控机制,为进一步优化培养条件和提高最终目的产物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

土曲霉(*A. terreus*) LA414,西北大学化工学院生物催化实验室保藏。

1.2 培养基

斜面培养基:葡萄糖 20 g/L,麦芽汁 20 g/L,蛋白胨 1 g/L,琼脂 20 g/L。

种子培养基:番茄汁 40 g/L,燕麦粉 10 g/L,葡萄糖 10 g/L,玉米浆 5 g/L,微量元素 10 mL/L, pH 6. 8。微量元素组成为: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 1 g/L, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0. 025 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0. 1 g/L, H_3BO_3 0. 056 g/L, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 0. 01 g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0. 2 g/L。

发酵培养基:可溶性淀粉 67. 56 g/L, PEG2000 2. 5 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 1 g/L, pH 6. 5,复合氮源 10 g/L。

1.3 培养方法

将 28 ℃ 下活化 5 d 的土曲霉 LA414 斜面种子,用无菌水制成 5×10^7 mL⁻¹ 孢子悬液,按体积分数 10% 接种量接入装有 20 mL 种子培养基的 100 mL 三角瓶中,于 28 ℃、150 r/min 条件下振荡培养 24 h,再按体积分数 10% 接种量接入装有 20 mL 分别含 10 g/L 酵母粉(YE)、蛋白胨(Pep)、花生粉(Pea)、黄豆粉(SM)、玉米浆(CSL)、燕麦粉(Oat)发酵培养基的 100 mL 三角瓶中,于 28 ℃、220 r/min 条件下振荡培养 8 d。每 2 d 取 1 次样,每次取 2 个平行样。

1.4 测定项目及方法^[13]

细胞生物量采用干重法测定;残糖质量浓度采用 3,5-二硝基水杨酸比色定糖法测定;洛伐他汀、monacolin J 及 2-甲基丁酸盐含量采用 TLC 法和 HPLC 法测定;pH 采用 pH 计测定。

1.5 参数的计算

- 1) 2-甲基丁酸盐对细胞得率($Y_{MBA/X}$): $Y_{MBA/X} = (C_{M,lov} + C_{M,MBA})/\Delta C_X$;
- 2) monacolin J 对细胞得率($Y_{monJ/X}$): $Y_{monJ/X} = (C_{M,lov} + C_{M,monJ})/\Delta C_X$;
- 3) 2-甲基丁酸盐积累的碳转化率($x_{MBA/C}$):
 $x_{MBA/C} = \Delta C_{MBA}/\Delta C_C$;
- 4) monacolin J 积累的碳转化率($x_{monJ/C}$):
 $x_{monJ/C} = \Delta C_{monJ}/\Delta C_C$;
- 5) monacolin J 转化率(x_{monJ}): $x_{monJ} = C_{M,lov}/(C_{M,lov} + C_{M,monJ})$;
- 6) 洛伐他汀合成的碳转化率($x_{lov/C}$): $x_{lov/C} = \Delta C_{lov}/\Delta C_C$ 。

式中: $C_{M,lov}$ 、 $C_{M,monJ}$ 和 $C_{M,MBA}$ 分别表示合成洛伐他汀的物质的量、monacolin J 和 2-甲基丁酸盐积累的物质的量, ΔC_{monJ} 、 ΔC_{MBA} 和 ΔC_C 分别表示 monacolin J、2-甲基丁酸盐和碳原子浓度的变化量, ΔC_{lov} 和 ΔC_X 分别表示生物合成过程中洛伐他汀产量和生物

量浓度的变化量。

2 结果与分析

2.1 复合氮源对洛伐他汀生产的影响

酵母粉、蛋白胨、花生粉、燕麦粉、玉米浆和黄豆粉等 6 种复合氮源,对土曲霉液体深层培养过程中细胞生长和洛伐他汀生产的影响见图 1 和表 1。图 1 和表 1 显示,以花生粉为氮源时获得的细胞生物量较低,且发酵终了时培养基中含 7 g/L 残糖;随着发酵过程的进行,pH 逐渐减小,尽管其比生长速率较低,但其洛伐他汀对糖得率、洛伐他汀对细胞得率及比产物合成速率均最高,表明花生粉最有利于洛伐他汀合成,发酵 8 d 后洛伐他汀含量为(883.2±19.5) mg/L。以蛋白胨为氮源时,比生长速率最高,但发酵 8 d 后洛伐他汀含量较低((278.9±14.7) mg/L),其比产物合成速率仅为花生粉的 1/13。

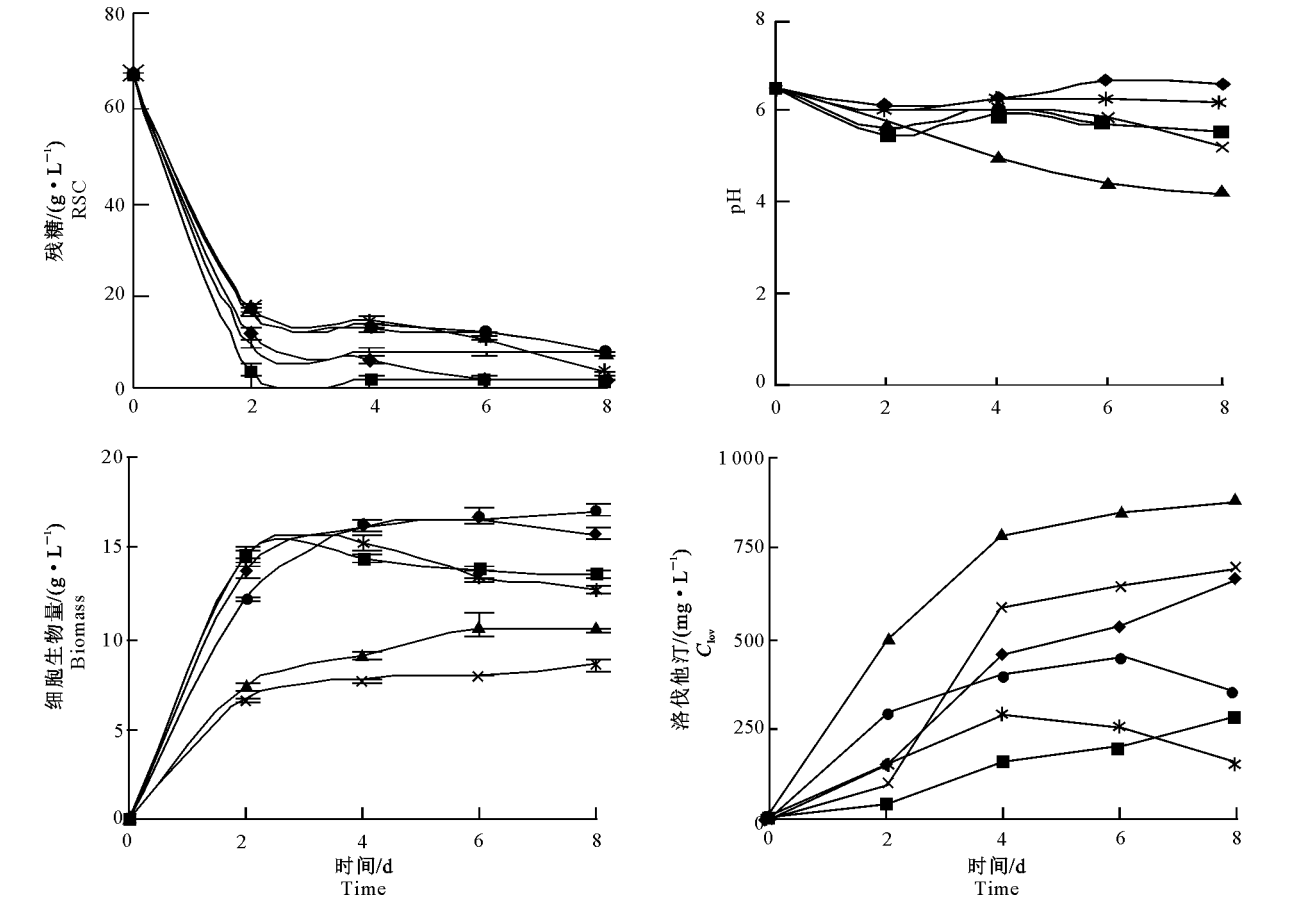


图 1 不同复合氮源对土曲霉发酵过程的影响

—◆—, 酵母粉; —■—, 蛋白胨; —▲—, 花生粉; —●—, 黄豆粉; —*—, 玉米浆; —×—, 燕麦粉

Fig. 1 Effects of various complex nitrogen sources on the submerged fermentation in submerged cultivation of *A. terreus*

—◆—, Yeast extract; —■—, Peptone meal; —▲—, Peanut meal; —●—, Soybean meal; —*—, Corn steep liquor; —×—, Oat meal

表 1 不同复合氮源对土曲霉细胞生长和洛伐他汀生产中参数的影响

Table 1 Effects of various complex nitrogen sources on parameters related to cell growth and lovastatin production by *A. terreus*

复合氮源 Complex nitrogen source	比生长速率/(d ⁻¹) Specific growth rate	细胞对糖得率/ (g·g ⁻¹) Cell yield on sugar	洛伐他汀对细胞得率/ (mg·g ⁻¹) Lovastatin yield on cell	洛伐他汀对糖得率/ (mg·g ⁻¹) Lovastatin yield on sugar	比产物合成速率/ (mg·g ⁻¹ ·h ⁻¹) Specific product formation rate
酵母粉 Yeast extract	3.05	0.26	42.1	10.06	0.29
蛋白胨 Peptone	8.06	0.23	20.6	4.25	0.11
花生粉 Peanut meal	1.92	0.19	84.5	14.73	1.44
燕麦粉 Oat meal	1.13	0.15	80.4	11.77	0.79
玉米浆 Corn steep liquor	4.22	0.29	19.0	4.60	0.21
黄豆粉 Soybean meal	2.37	0.30	26.8	8.03	0.51

2.2 复合氮源对洛伐他汀合成关键中间代谢物积累的影响

在洛伐他汀生物合成途径中,2-甲基丁酸盐和 monacolin J 等 2 个关键中间代谢物,通过由 *lovD* 基因编码的转酯酶 LovD 蛋白直接酯化形成洛伐他汀^[5]。因此,在培养过程中分别检测了培养液中这

2 个中间代谢物的积累量,结果见图 2。图 2 表明,以花生粉为氮源时,在培养结束时(8 d),2-甲基丁酸盐积累量较高,为(641.5±22.7) mg/L;以燕麦粉为氮源时,培养的第 4 天 monacolin J 积累量最大,为(186.2±15.7) mg/L。

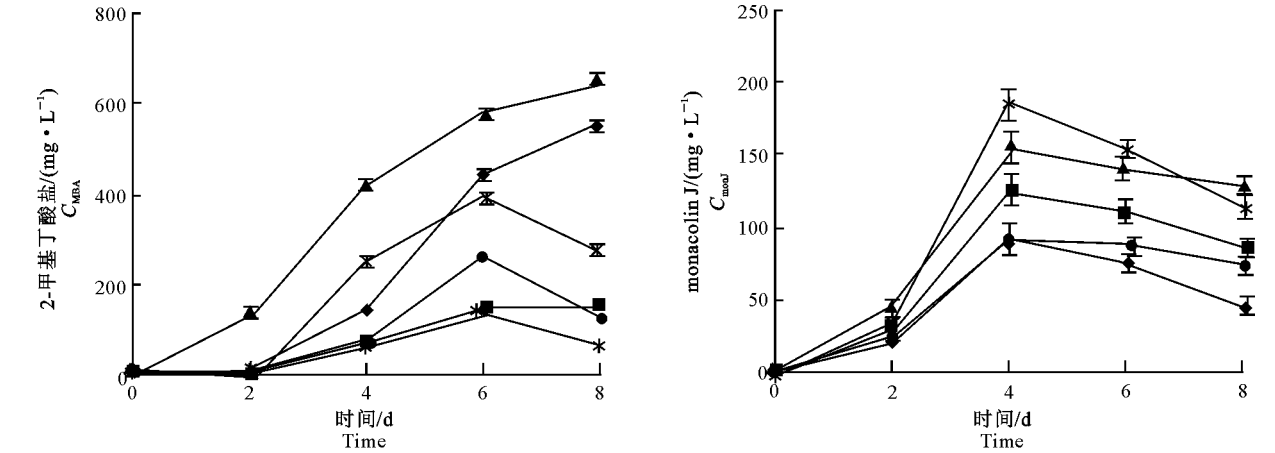


图 2 不同复合氮源对 2-甲基丁酸盐和 monacolin J 积累的影响

—◆—, 酵母粉; —■—, 蛋白胨; —▲—, 花生粉; —●—, 黄豆粉; —*—, 玉米浆; —×—, 燕麦粉

Fig. 2 Effects of various complex nitrogen sources on accumulations of 2-methylbutyrate and monacolin J

—◆—, Yeast extract; —■—, Peptone meal; —▲—, Peanut meal; —●—, Soybean meal; —*—, Corn steep liquor; —×—, Oat meal

各类复合氮源存在时,培养过程中合成的 2-甲基丁酸盐和 monacolin J 对细胞得率见表 2。

表 2 不同复合氮源对土曲霉洛伐他汀生产中 2-甲基丁酸盐和 monacolin J 积累的影响

Table 2 Effects of various complex nitrogen sources on accumulations of 2-methylbutyrate and monacolin J in lovastatin production by *A. terreus*

参数 Parameter	酵母粉 Yeast extract	蛋白胨 Peptone	花生粉 Peanut meal	燕麦粉 Oat meal	玉米浆 Corn steep liquor	黄豆粉 Soybean meal
2-甲基丁酸盐对细胞得率/ (mmol·g ⁻¹)Y _{MBA/X}	0.45	0.17	0.81	0.68	0.14	0.22
Monacolin J 对细胞得率/ (mmol·g ⁻¹)Y _{monJ/X}	0.11	0.07	0.27	0.26	0.07	0.08
Monacolin J 转化率/% Percent conversion of monacolin J	92.0	71.5	84.5	82.1	58.6	78.7

表 2 表明,以花生粉和燕麦粉为氮源时,培养过程中 2-甲基丁酸盐和 monacolin J 对细胞得率明显高于其他氮源,均约为蛋白胨或玉米浆的 4 倍;以酵

母粉为氮源时,2-甲基丁酸盐对细胞得率是 monacolin J 的 4 倍,而其他氮源均仅为 2~3 倍。由此可知,monacolin J 的合成是限制洛伐他汀生产的关键

因素,当以玉米浆为氮源时,monacolin J 转化率仅为 58.6%,其他氮源均明显提高了 monacolin J 转化率,其中以酵母粉为氮源时 monacolin J 转化率最高,为 92.0%。

2.3 复合氮源对洛伐他汀合成关键中间代谢物碳转化率的影响

图 3 表明,以玉米浆为氮源时,合成洛伐他汀及其直接前体 2-甲基丁酸盐和 monacolin J 的碳转化率均较低,分别为 0.39%,0.52%和 0.61%,其中后

2 者的碳转化率分别为参与各自积累的碳转化率与参与合成洛伐他汀所消耗的碳转化率之和。与玉米浆相比,以酵母粉、燕麦粉、花生粉为氮源时,合成洛伐他汀及其直接前体 2-甲基丁酸盐、monacolin J 的碳转化率增幅均较大。表明花生粉、燕麦粉和酵母粉更有利于碳代谢流向目标产物及其中间物的合成,进一步说明其对土曲霉的次级代谢活动有促进作用。

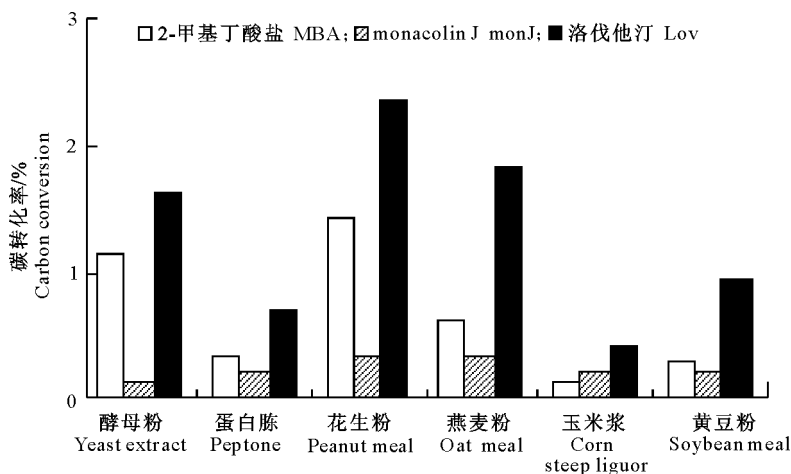


图 3 不同复合氮源对洛伐他汀生物合成过程中碳转化率的影响

Fig. 3 Effects of various complex nitrogen sources on carbon conversion in lovastatin biosynthesis

3 讨论

由于复合氮源成分复杂,不同氮源种类所含营养成分差异较大,其对微生物的次级代谢调控作用很难定量描述。各种复合有机氮源对细胞生长和洛伐他汀产量的影响差异显著,表明氮源不仅参与细胞生长,而且促进洛伐他汀的生物合成,尽管洛伐他汀分子结构中不包含氮原子。

本研究分析了不同复合氮源存在时,土曲霉培养过程中代谢终产物合成及其关键中间代谢物积累的碳流量变化,结果显示,玉米浆或蛋白胨等抑制了参与洛伐他汀合成的碳流量,此时可能存在氮分解代谢物阻遏;解除这种阻遏需要一个由 *areA* 基因编码的转录激活子 AreA 蛋白,它通过一个单 GATA 锌指域结合到氮响应基因的启动子上,通过 *areA* mRNA 转录和稳定性的变化,以及与负责细胞氮变化的反作用 NmrA 蛋白相互作用,调整 AreA 蛋白的合成与活性^[18]。尽管玉米浆为氮源时,微生物形成了有利于洛伐他汀合成的菌体形态,但其最终产量并不高,而且培养过程的糖代谢也较慢,发酵液 pH 也未下降,这说明玉米浆可能通过对洛伐他汀

生物合成途径中相关酶的抑制来影响其合成,而并不影响碳代谢流的走向。有研究表明,阻断 LovD 蛋白可导致 2-甲基丁酸盐或 monacolin J 的积累^[8]。本研究中,玉米浆为氮源时,获得的 monacolin J 转化率最低,表明其不仅通过氮分解代谢物阻遏抑制土曲霉的次级代谢活动,而且也明显对 LovD 蛋白起到了负调控,部分抑制了酶活性,降低了最终产物生成。

本研究中,花生粉或酵母粉为氮源时,2-甲基丁酸盐对细胞得率远大于 monacolin J,明显促进了合成前者的 LovF 蛋白活性,其原因可能是这 2 种复合氮源中含有丰富的 B 族维生素,如 D-泛酸钙、V_{B6}、烟酸等,它们已被证实分别是洛伐他汀生物合成所必需的能量供体 NAD(P)、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^[19]。以花生粉为氮源时,培养液 pH 在整个发酵过程中逐渐降低,而洛伐他汀产量快速增加,这一方面可能是,糖代谢中三羧酸循环中间代谢物(α -酮戊二酸、柠檬酸和丙二酸等有机酸)大量积累^[20],阻断了循环继续进行,促使碳代谢更多的流向次级代谢,其碳转化率是其它氮源的 2~4 倍,表现为细胞

生物量较低,糖代谢不彻底,造成乙酰 CoA 和丙二酰 CoA 大量积累,从而为洛伐他汀生物合成提供足够的前体;另一方面,三羧酸循环流量的增加有助于合成土曲霉的另一次级代谢物衣康酸,后者的大量合成对洛伐他汀生成不利^[21],也会降低培养液 pH,同时抑制衣康酸合成也会促使有机酸的大量积累,同样导致 pH 的降低,很明显花生粉也可能抑制衣康酸的合成,促进了洛伐他汀的生成。表明选择对衣康酸合成不利的营养源有益于洛伐他汀的合成,如葡萄糖有利于合成衣康酸,但对洛伐他汀合成不利,而乳糖则恰好相反^[22];氮源的选择也同样如此,这可作为提高洛伐他汀产量的一种思路。

[参考文献]

- [1] Alberts A W, Chen J, Kuron G, et al. Mevinolin: A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and cholesterol-lowering agent [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 3957-3961.
- [2] Endo A. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1980, 33: 334-336.
- [3] Chan J K, Moore R N, Vederas J C. Biosynthesis of mevinolin: Spectral assignment by double-quantum coherence NMR after high carbon-13 incorporation [J]. *J Am Chem Soc*, 1983, 105: 3334-3336.
- [4] Yoshizawa Y, Witter D J, Liu Y, et al. Revision of the biosynthetic origin of oxygens in mevinolin (lovastatin), a hypocholesterolemic drug from *Aspergillus terreus* MF 4845 [J]. *J Am Chem Soc*, 1994, 116: 2693-2694.
- [5] Kennedy J, Auclair K, Kendrew S G, et al. Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis [J]. *Science*, 1999, 284: 1368-1372.
- [6] Hendrickson L, Davis C R, Roach C, et al. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: Characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene [J]. *Chem Biol*, 1999, 6: 429-439.
- [7] Hutchinson C R, Kennedy J, Park C, et al. Aspects of biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2000, 78: 287-295.
- [8] Xie X K, Watanabe K, Wojcicki W, et al. Biosynthesis of lovastatin analogs with a broadly specific acyltransferase [J]. *Chem Biol*, 2006, 13: 1161-1169.
- [9] Hajjaj H, Niederberger P, Duboc P. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 2596-2602.
- [10] Casas Lo'pez J L, Sa'nchez Pe'rez J A, Fern'andez Sevilla J M, et al. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of C : N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2003, 33: 270-277.
- [11] Jia Z H, Zhang X L, Cao X J. Effects of carbon sources on fungal morphology and lovastatin biosynthesis by submerged cultivation of *Aspergillus terreus* [J]. *Asia-Pac J Chem Eng*, 2009, 4(5): 672-677.
- [12] 贾志华, 张小里, 曹学君. 碳源对土曲霉洛伐他汀生物合成的影响 [J]. *化学工程*, 2008, 36(5): 51-54.
Jia Z H, Zhang X L, Cao X J. Effect of carbon source on lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus* [J]. *Chem Eng*, 2008, 36(5): 51-54. (in Chinese)
- [13] Jia Z H, Zhang X L, Zhao Y L, et al. Effects of divalent metal cations on lovastatin biosynthesis from *Aspergillus terreus* in chemically defined medium [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2009, 25: 1235-1241.
- [14] Lai L S T, Tsai T H, Wang T C, et al. The influence of culturing environments on lovastatin production by *Aspergillus terreus* in submerged cultures [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2005, 36: 737-748.
- [15] Lai L S T, Pan C C, Tzeng B K. The influence of medium design on lovastatin production and pellet formation with a high-producing mutant of *Aspergillus terreus* in submerged cultures [J]. *Process Biochem*, 2003, 38: 1317-1326.
- [16] Kumar M S, Jana S K, Senthil V, et al. Repeated fed-batch process for improving lovastatin production [J]. *Process Biochem*, 2000, 36: 363-368.
- [17] Szakacs G, Morovjan G, Tengerdy R P. Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus* [J]. *Biotechnol Lett*, 1998, 20(4): 411-415.
- [18] Margelis S, D'Souza C, Small A J, et al. Role of glutamine synthetase in nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans* [J]. *J Bacteriol*, 2001, 183: 5826-5833.
- [19] Bizukoje 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.
- [20] 吴波, 陈长华, 张琪. 土曲霉发酵过程中菌形和有机酸积累对产物合成的影响 [J]. *华东理工大学学报: 自然科学版*, 2008, 34(2): 189-192.
Wu B, Chen C H, Zhang Q. Effect of cell morphology and organic acid accumulation to lovastatin production by *Aspergillus terreus* [J]. *J East China Univ Sci Technol: Nat Sci Ed*, 2008, 34(2): 189-192. (in Chinese)
- [21] Bonnarme P, Gillet B, Sepulchre A M, et al. Itaconate biosynthesis in *Aspergillus terreus* [J]. *J Bacteriol*, 1995, 177(12): 3573-3578.
- [22] Lai L S T, Hung C S, Lo C C. Effects of lactose and glucose on production of itaconic acid and lovastatin by *Aspergillus terreus* ATCC 20542 [J]. *J Biosci Bioeng*, 2007, 104(1): 9-13.