

茶多酚对真菌合成洛伐他汀能力的影响

赵振军^{1,2}, 刘勤晋³, 黎星辉²

(1. 长江大学园艺园林学院, 湖北荆州 434023) (2. 南京农业大学园艺学院, 江苏南京 210095)

(3. 西南大学食品科学学院, 重庆 400716)

摘要: 将从普洱茶中分离的具有合成洛伐他汀能力的真菌, 培养在含不同浓度茶多酚的察氏培养基中, 采用液相色谱法分析培养基中洛伐他汀的含量变化, 探索茶多酚对真菌合成洛伐他汀能力的影响。结果显示: 菌株 *Aspergillus fumigatus* 在 0-10 d、菌株 *Penicillium chrysogenum* 和 *Aspergillus wentii* 在 0-5 d 的培养过程中, 茶多酚对其合成洛伐他汀的能力具有显著抑制作用; 菌株 *Aspergillus wentii* 在 5-15 d 菌株 *Aspergillus fumigatus* 和 *Penicillium chrysogenum* 在 10-15 d 培养过程中, 茶多酚对其合成洛伐他汀的能力具有显著促进作用, 产量较对照最大提高 22.79% (*Aspergillus wentii* 在茶多酚含量为 10% 的培养基上, 培养 10 d)。茶多酚对 *Aspergillus tubingensis* 合成洛伐他汀能力具有促进作用, 在茶多酚含量为 30% 的培养基上培养 10 d, 较对照产量最大提高 17.69%。

关键词: 茶多酚; 真菌; 洛伐他汀

文章编号: 1673-9078(2014)2-124-128

Effect of Tea Polyphenols on the Ability of Fungi to Produce Lovastatin

ZHAO Zhen-jun^{1,2}, LIU Qin-jin³, LI Xing-hui²

(1. College of Horticulture and Landscape Architecture, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China)

(2. College of horticulture, Nanjin Agricultural University, Jiangsu Nanjing 210095, China) (3. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: The pure lovastatin-producing strains isolated from Pu-erh tea such as *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus wentii* and *Aspergillus tubingensis*, were inoculated individually in CYA medium with different tea polyphenol concentrations. The contents of lovastatin in the medium were assayed by HPLC. Results showed that tea polyphenol had the obvious inhibitory effects on *Aspergillus fumigatus* (10-day incubation), *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus wentii* (both incubated for 5 days) to produce lovastatin. And during the rest incubating period of 5 to 15 days for *Aspergillus wentii*, and 10 to 15 days for *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus fumigatus*, tea polyphenol presented improved effects significantly on them to produce lovastatin compared to the control, and the maximum yield increased by 22.79% (*Aspergillus wentii* incubated on the medium with 10% tea polyphenol for 10 days). Moreover, when *Aspergillus tubingensis* was cultured on the medium with 30% tea polyphenol for 10 days, tea polyphenol promoted it to produce lovastatin with the maximum yield improved by 17.69%.

Key words: tea polyphenol; fungi; lovastatin

洛伐他汀 (lovastatin) 是一种内酯化合物, 对胆固醇合成过程中的限速酶 (HMG-COA 还原酶) 具有很强的竞争性抑制作用, 在降低总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇等方面效果显著, 因而在临床上常被用作降脂药物^[1-2]。

普洱茶是由云南大叶种晒青毛茶经后发酵茶制作

收稿日期: 2013-09-21

基金项目: 湖北省教育厅科学技术研究项目 (Q20121208); 云南省普洱茶关键技术研究 (2007YNCXB-01-01)

作者简介: 赵振军 (1976-), 男, 讲师, 在站博士后, 研究方向为茶叶的安全与功能

通讯作者: 黎星辉 (1963-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为茶叶生物技术

而成的一种特种茶类^[3], 其中含有一定量洛伐他汀, Yang 等研究表明普洱茶中洛伐他汀的含量含量为 20.61 ng/g dw~226.38 ng/g dw^[4-5], Zhao 等的进一步研究表明, 普洱茶中洛伐他汀可以由曲霉 (*Aspergillus spp.*)、青霉 (*Penicillium spp.*) 等属的真菌如塔宾曲霉 (*A. tubingensis*)、温特曲霉 (*A. wentii*)、烟曲霉 (*A. fumigatus*)、产黄青霉 (*P. chrysogenum*) 等真菌产生^[6]。

茶多酚是一种强抗氧化剂, 具有较强的抑菌作用, 能显著抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌等的生长, 对真菌如毛霉、青霉、黑曲霉、黄曲霉和酵母等的抑制作用不显著^[7]。James 等 (1995)^[8]通过在杂色曲霉培养基中添加绿茶成分, 结果显示绿茶成分

具有影响杂色曲霉产生代谢产物的能力。普洱茶因采用云南大叶种制成,其发酵过程中茶多酚含量较高,高茶多酚含量是否会对洛伐他汀产生菌的生长及合成洛伐他汀的能力产生影响,目前未见任何文章报导。

本文以前期研究筛选出具有合成洛伐他汀能力的真菌为研究对象,通过往培养基中添加不同浓度茶多酚,探讨茶多酚对真菌生长及其产生洛伐他汀能力的影响,为深入了解普洱茶中洛伐他汀的来源及量化控制提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试菌株为具有合成洛伐他汀能力的4株真菌:*Aspergillus fumigatus*、*Penicillium chrysogenum*、*Aspergillus wentii*、*Aspergillus tubingensis*,由西南大学茶叶研究所提供,分离自普洱茶样品,经分子鉴定与合成洛伐他汀能力分析(结果见文献^{[4][7]})。

CYA(察氏)培养基组成:硝酸钠3g、磷酸氢二钾1g、硫酸镁0.5g、氯化钾0.5g、硫酸亚铁0.01g、蔗糖30g、琼脂20g、蒸馏水1000mL。甲醇、乙腈等为色谱纯,购自天津四友公司。

茶多酚纯品(纯度98.9%),购自巨邦植物原料有限公司;洛伐他汀标准品购自Sigma公司。其他萃取试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

FA2004A 电子天平,上海精天电子仪器有限公司;旋转蒸发器,上海青浦沪西仪器厂;超净工作台,苏州净化设备有限公司;DNP-9052 型电热恒温培养箱,上海精宏实验设备有限公司;BS-IE 振荡培养箱,金坛市富华仪器有限公司;2010 型液相色谱仪,岛津公司;Agilent HC-C18 液相色谱柱(5 μ m,4.6 \times 250 mm, made in USA)。

1.3 培养基的配制

在超净工作台上,称取一定量的茶多酚纯品,用超纯水溶解,0.22 μ m 微孔滤膜过滤,加入经高压灭菌、冷却至40 $^{\circ}$ C后的CYA培养基中,配成含茶多酚浓度分别为10%、20%、30%、35%的培养基,对照为等体积无菌水。

1.4 菌株培养与取样

将真菌三点式接种至装有15mL培养基(CYA)的培养皿中。培养箱中28 $^{\circ}$ C恒温培养,5、10、15d

后以菌落生长点为中心,从里向外分取6个直径6mm的琼脂块,供真菌计数与洛伐他汀萃取用。

1.5 真菌的计数

培养基样品中真菌的计数应用平板稀释法^[10],将1.4所取琼脂块加入90mL 0.1%的蛋白胍水溶液中,摇床上振荡约15min,取悬浮液分别用无菌水按10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶作梯度稀释,取稀释后的悬浮液0.1mL,均匀地涂布在培养基表面(培养基选用察氏培养基、孟加拉红DRBC培养基)。平板在25 $^{\circ}$ C培养,5~7d后开始计数。

1.6 培养基中洛伐他汀的萃取和检测

洛伐他汀的萃取与检测方法参照^[6],具体如下:准确量取15mL融化的培养基,在凝固之前加入100 μ L 乙腈、水和乙酸的混合液(70:30:0.5)(内含不同质量的洛伐他汀标准品),倒入55mm的培养皿中,静置过夜,取3个直径6mm的琼脂块,称重后装入小瓶中,加入900 μ L 乙酸乙酯,震荡90min后静置,并用0.45 μ m的滤膜过滤,滤液挥干后溶解在0.5mL甲醇中,贮藏在4 $^{\circ}$ C,直至色谱分析,每个浓度重复三次。检测条件: Hypersil ODS2 色谱柱,5 μ m,4.6 \times 200mm;流动相为乙腈:水:乙酸(70:30:0.5);流速0.5mL/min;检测波长238nm;进样量10 μ L。

1.7 含35%茶多酚的CYA培养基中洛伐他汀

的回收率分析

在配制好的35%茶多酚的CYA培养基中加入洛伐他汀,配成分别含上述四种物质的浓度为1、10、50ng/g的培养基。按上述方法萃取检测,并计算回收率。

1.8 统计分析

所有数据均采用Microsoft Excel 2007分析。

2 结果与分析

2.1 线性范围与检出限

将洛伐他汀标准品配制成系列质量浓度,在1.4所述的色谱条件下进行测定,以峰面积对相应浓度进行线性回归分析。结果显示洛伐他汀在浓度为1~20ng/mL时,回归方程为 $y=3.542\times 10^{-5}x+0.060$,回归系数 $R^2=0.9986$ 。采用紫外检测器检测洛伐他汀时,当信噪比(S/N)为3时,仪器最低检出限约为0.1ng/g。

2.2 添加回收率实验

往含 35% 茶多酚的 CYA 培养基中添加洛伐他汀标准品, 使质量浓度分别为 1、10、50 ng/g, 按照上述方法萃取和检测, 计算回收率, 结果见表 1。洛伐他汀在含 35% 的茶多酚 CYA 培养基中的回收率在 85.94~92.81% 之间。RSD<9%。

表 1 洛伐他汀在含 35% 茶多酚的 CYA 培养基中的回收率

Table 1 Recovery of lovastatin in CYA media with 35% tea

polyphenol			
浓度/(ng/g)	1	10	50
回收率/%	92.81	85.94	86.72

2.3 茶多酚对真菌生长的影响

将 4 株具有合成洛伐他汀能力的真菌培养在含不

表 2 含不同浓度茶多酚的培养基中真菌种群数量的变化

Table 2 Total number of fungi in CYA media with different concentrations of tea polyphenol

Total number of fungi (CFU/g, ×10 ⁵)	Incubation time /d	Concentrations of tea polyphenol/%				
		0	10	20	30	35
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5	11.30±0.74	10.11±0.33	10.97±0.41	10.41±0.28	10.26±0.92
	10	26.38±0.36	28.20±0.55	29.14±0.29	37.60±0.71	26.30±0.59
	15	137.21±0.51	145.72±0.33	160.09±0.37	171.06±0.50	147.40±0.01
<i>Penicillium chrysogenum</i>	5	6.33±0.22	6.21±0.51	6.14±0.01	6.42±0.11	5.96±0.70
	10	17.41±0.48	18.91±0.24	20.73±0.51	37.60±0.60	27.60±0.13
	15	87.62±0.28	94.40±0.32	97.80±0.65	109.54±0.18	101.80±0.44
<i>Aspergillus wenti</i>	5	2.31±0.73	2.24±0.29	2.27±0.31	2.39±0.01	2.39±0.37
	10	10.33±0.19	12.06±0.11	13.77±0.34	13.18±0.26	12.60±0.21
	15	18.30±0.71	22.39±0.50	36.66±0.19	40.60±0.33	21.80±0.26
<i>Aspergillus tubingensis</i>	5	7.43±0.09	6.91±0.06	5.90±0.17	5.58±0.21	5.72±0.40
	10	16.90±0.31	17.61±0.18	20.43±0.09	22.60±0.06	21.52±0.15
	15	172.50±0.03	172.81±0.08	173.66±0.11	208.70±0.20	183.22±0.40

茶多酚是茶叶中所含有的多羟基类化合物的总称。研究表明茶多酚除了具有抗癌、降脂、抗氧化等^[11-13]功能外, 还对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌等常见致病菌的生长具有较强的抑制作用, 但对毛霉、青霉、黑曲霉、黄曲霉和酵母等真菌的生长没有抑制效果^[7]。本研究中 4 株真菌培养在含不同浓度茶多酚的 CYA 培养基上, 茶多酚对其生长具有一定的抑制作用, 受浓度与培养时间的影响较大。

2.4 茶多酚对真菌产生洛伐他汀能力的影响

通过对从普洱茶中分离到的真菌进行合成洛伐他汀能力分析, 筛选出 4 株具有较强合成洛伐他汀能力的真菌, 培养在含不同浓度茶多酚的 CYA 培养基上, 分别在培养的第 5、10、15 d 时取样检测其合成洛伐

他汀的产量。检测结果如图 1~4 所示, 结果表明茶多酚对真菌合成与代谢洛伐他汀的能力具有一定的影响。图 1 显示, *Aspergillus fumigatus* 合成洛伐他汀的量, 随培养时间的增加呈先增加后减少趋势, 在培养时间分别为 5、10、15 d 时, *Aspergillus fumigatus* 合成洛伐他汀量的大小顺序为 10 d>15 d>5 d。*Aspergillus fumigatus* 合成洛伐他汀的能力受培养基中茶多酚浓度的影响, 总体来说, 在培养第 5 d 和 10 d, 在添加过茶多酚的培养基中生长的 *Aspergillus fumigatus* 合成洛伐他汀的产量低于对照 (未添加茶多酚的 CYA 培养基), 培养至第 15 d, 在含茶多酚的培养基中生长的 *Aspergillus fumigatus* 合成洛伐他汀的产量略高于对照, 茶多酚含量为 10% 与 20% 的培养基上

洛伐他汀产量接近, 均高于茶多酚含量为 30% 与 35% 的培养基上洛伐他汀产量。

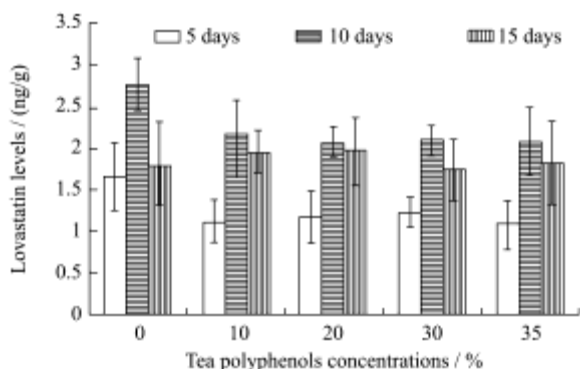


图 1 在 CYA 培养基上不同浓度茶多酚对 *Aspergillus fumigatus* 产生洛伐他汀的影响

Fig.1 Lovastatin levels (ng/g) produced by *Aspergillus fumigatus* on CYA media with different tea polyphenol concentrations

注: 每个处理重复 3 次, 取平均值。

图 2 显示, 菌株 *Penicillium chrysogenum* 在培养第 5 d, 含茶多酚的培养基上真菌合成洛伐他汀的产量总体上说低于对照 (未添加茶多酚的 CYA 培养基), 在第 10 d, 除含 10% 茶多酚培养基上菌株合成洛伐他汀的产量高于对照之外, 含 20、30、35% 茶多酚的培养基上, 洛伐他汀的量均低于对照。而培养 10~15 d, 含茶多酚的培养基上菌株合成洛伐他汀能力相比对照表现出提高的趋势, 其中仍以含 10% 茶多酚的培养基上合成量最高。

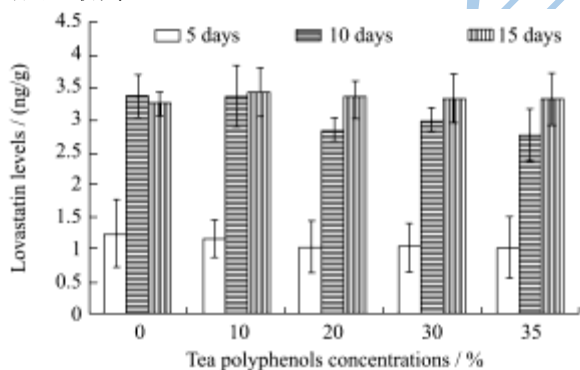


图 2 在 CYA 培养基上不同浓度茶多酚对 *Penicillium chrysogenum* 产生洛伐他汀的影响

Fig.2 Lovastatin levels (ng/g) produced by *Penicillium chrysogenum* on CYA media with different tea polyphenol concentrations

注: 每个处理重复 3 次, 取平均值。

图 3 显示菌株 *Aspergillus wentii* 生长在 CYA 上, 合成洛伐他汀的量随培养基上茶多酚含量变化的关系。培养 0~5 d, *Aspergillus wentii* 在含茶多酚的培养基上合成洛伐他汀的量均低于对照; 培养 5~15 d, *Aspergillus wentii* 在含茶多酚的培养基上合成洛伐他汀

汀的量均高于对照, 且随茶多酚浓度增加, 洛伐他汀产量成降低趋势, 培养第 10、15 d, *Aspergillus wentii* 在含不同浓度茶多酚 CYA 的培养基上洛伐他汀产量大小顺序为 10% > 30% > 20% > 35%。

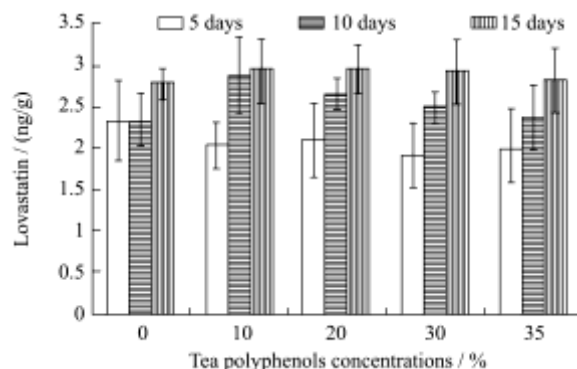


图 3 在 CYA 培养基上不同浓度茶多酚对 *Aspergillus wentii* 产生洛伐他汀的影响

Fig.3 Lovastatin levels (ng/g) produced by *Aspergillus wentii* on CYA media with different tea polyphenol concentrations

注: 每个处理重复 3 次, 取平均值。

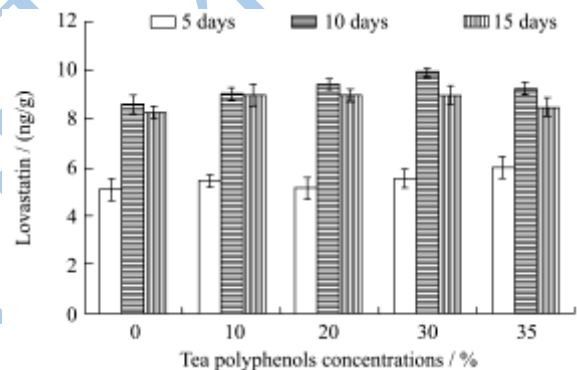


图 4 在 CYA 培养基上不同浓度茶多酚对 *Aspergillus tubingensis* 产生洛伐他汀的影响

Fig.4 Lovastatin levels (ng/g) produced by *Aspergillus tubingensis* on CYA media with different tea polyphenol concentrations

注: 每个处理重复 3 次, 取平均值。

图 4 所示菌株 *Aspergillus tubingensis* 在含茶多酚的培养基上合成洛伐他汀的产量均高于对照, 培养至第 10 d, 培养基中茶多酚浓度从 10% 增加至 30%, 洛伐他汀产量逐渐增高, 较对照产量提高 15.38%, 而培养基茶多酚浓度为 35% 时, 菌株合成洛伐他汀能力呈下降趋势。培养至 15 d, 菌株合成洛伐他汀的量低于 10 d 时洛伐他汀的产量, 且合成量受培养基上茶多酚含量的影响较显著, 随茶多酚浓度增加, 洛伐他汀产量成降低趋势, 第 15 d, 菌株在不同茶多酚含量的培养基上, 洛伐他汀产量高低顺序为 10% > 20% > 30% > 35%。

菌株 *Aspergillus fumigatus* 和 *Penicillium*

chrysogenum 在 0~10 d、菌株 *Aspergillus wenti* 在 0~5 d 的培养过程中, 在含茶多酚的培养基中合成洛伐他汀的产量低于对照, 说明茶多酚对真菌合成洛伐他汀的能力具有抑制作用, 但抑制作用持续的时间因真菌种类不同存在差异。在至第 15 d, 在含茶多酚的培养基中真菌合成洛伐他汀的产量高于对照, 表明茶多酚对真菌合成洛伐他汀的能力转化为促进作用, 可能与茶多酚在真菌培养过程中发生组分或结构等的转变有关。而菌株 *Aspergillus tubingensis* 在含茶多酚的培养基上合成洛伐他汀的产量均高于对照, 说明茶多酚对 *Aspergillus tubingensis* 合成洛伐他汀能力的影响始终表现为促进作用。

洛伐他汀通常具有内酯结构 (lactone) 和羧基酸结构 (hydroxy acid) 两种单体形式, 一般情况下非常稳定, 但近期研究结果表明 *Beauveria bassiana* 等微生物具有降解或转化洛伐他汀的能力, 形成结构相似的多衍生物^[4]。研究表明, 在真菌生长过程中, 菌株 *Aspergillus fumigatus* 和 *Aspergillus tubingensis* 合成洛伐他汀量在第 10 d 显著高于第 15 d, 说明洛伐他汀在前期被真菌合成之后, 可能存在洛伐他汀的降解或转化导致洛伐他汀含量下降。

3 结论

本文通过在具有合成洛伐他汀能力的真菌培养基中添加不同浓度的茶多酚, 研究茶多酚对真菌生长与合成洛伐他汀能力的影响。研究发现: 茶多酚对真菌其生长具有一定的抑制作用, 受浓度与培养时间的影响较大。其次, 茶多酚对真菌合成洛伐他汀能力的影响因菌株与培养时间不同而异, 菌株 *Aspergillus fumigatus* 在 0~10 d、*Penicillium chrysogenum* 和 *Aspergillus wenti* 在 0~5 d 的培养过程中, 茶多酚对其合成洛伐他汀的能力表现为抑制作用, 而对 *Aspergillus tubingensis* 合成洛伐他汀能力未见抑制影响; 菌株 *Aspergillus wenti* 在 5~15 d, *Aspergillus fumigatus*、*Penicillium chrysogenum* 在 10~15 d, 及 *Aspergillus tubingensis* 的培养过程中, 茶多酚对其合成洛伐他汀的影响表现为显著促进作用, 再次, 茶多酚浓度影响真菌合成洛伐他汀的能力, 茶多酚含量为 10% 的培养基上, 真菌合成洛伐他汀的量最高。茶多酚影响真菌合成洛伐他汀的机理还有待进一步研究。

参考文献

[1] Endo A, Tanzawa K, Kuroda M. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236 A and ML-236 B, fungal metabolites, having

hypcholesterolemic activity [J]. *Febs Letters*, 1976, 72: 323-326

[2] Hebert P R, Gaziano J M, Chan K S, et al. Cholesterol lowering with statin drugs, risk of stroke, and total mortality [J]. *Journal American Medical Association*, 1997, 278: 313-321

[3] 刘勤晋. 中国普洱茶的科学读本[M]. 中国广东旅游出版社, 2005

Liu Q J. Scientific knowledge chrestomathy of Chinese Pu-erh tea [M]. Chinese Guangdong Travel & Tourism Press, Guangzhou, 2005

[4] Yang D J, Hwang L S. Study on the conversion of three natural stains from lactone forms to their corresponding hydroxy acid forms and their determination in Pu-Erh tea [J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1119: 277-284

[5] Zhao Z J, Pan Y Z, Liu Q J, et al. Exposure assessment of lovastatin in Pu-erh tea [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 164: 26-31

[6] 赵振军, 童华荣, 周黎, 等. 普洱茶中真菌合成洛伐他汀的能力分析[J]. *食品科学*, 2012, 12: 173-176

Zhao Z J, Tong H R, Zhou L, et al. Analysis of lovastatin-producing ability of fungi in Pu-erh tea [J]. *Food Science*, 2012, 33(12): 173-176

[7] 潘素君. 不同类型茶多酚抗氧化作用及其抑菌效果研究[D]. 湖南农业大学硕士论文, 2001

Pan S J. Study on antioxidative activity and antimicrobial effect of different type of tea polyphenols [D]. Master Dissertation in Hunan Agricultural University, Changsha, 2001

[8] James H C, Janet M N, John N B, et al. Study on fungi and its toxinogenic potential isolated from green tea, fermented tea and post-fermented tea [J]. *Report of Tea Research*, 1994, 79, 31-36

[9] 赵振军, 童华荣, 周黎, 等. 普洱茶中真菌种群的分离与分子鉴定[J]. *茶叶科学*, 2009, 29(6): 436-442

Zhao Z J, Tong H R, Zhou L, et al. Isolation and molecular identification of fungal colonization of Pu-erh tea [J]. *Journal of Tea Science*, 2009, 29(6): 436-442

[10] Pitt J I, Hocking A. D. *Fungi and Food Spoilage* (2nd ed.) [M]. Blackie Academic & Professional, London, 1997

[11] Higdon J V, Frei B. Tea catechins and polyphenols: Health effects, metabolism, and antioxidant functions [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2003, 43, 89-143

[12] Wu L Y, Juan C C, Ho L T, et al. Effect of green tea supplementation on insulin sensitivity in Sprague-Dawley

- rats [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52, 643-648
- [13] Maeda K, Kuzuya M, Cheng X W. et al . Green tea catechins inhibit the cultured smooth muscle cell invasion through the basement barrier [J]. Atherosclerosis, 2003, 166 (1): 23-30
- [14] Qiao L R, Xie D, Liu Q, et al. Microbial transformation of lovastatin by *Beauveria bassiana* [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2012, 2(3):300-305

现代食品科技