

响应面法优化海洋镰刀腐皮菌产出 HMG-CoA 还原酶抑制剂的培养条件

周喻¹ 吴文惠^{2,3} 苏同伟¹ 包斌^{1,2*} 王小雨¹

(1. 上海海洋大学 食品学院 上海 201306)

(2. 上海水产品加工与贮藏工程技术研究中心 上海 201306)

(3. 上海海洋大学 海洋科学研究院 上海 201306)

摘要:【目的】采用响应面法对海洋微生物镰刀腐皮菌 FG319 发酵产生 MFS (Metabolite of *Fusarium solani* FG319) 培养条件进行优化。【方法】在单因素试验结果的基础上, 依据 Box-Behnken 中心组合原则设计诱导物添加量、培养时间、培养温度的 3 因素 3 水平响应面实验, 以 MFS 产出量为响应值优化镰刀腐皮菌 FG319 的培养条件。【结果】镰刀腐皮菌 FG319 最优培养条件为诱导物添加量 0.6%、培养时间 7 d、培养温度 22 °C, 在此培养条件下, MFS 最高产量达到 20.11 mg/L, 是优化前的 4 倍, 与理论预测的相对误差为 0.64%, 实测值与响应面预测值拟合良好。镰刀腐皮菌 FG319 代谢产物 MFS 在 HMG-CoA 还原酶和 NADPH 构筑的分子评价反应体系, 当 MFS 添加到 100 mg/L 时, 具有类似洛伐他汀抑制 HMG-CoA 还原酶的最大抑制率。【结论】响应面试验设计对镰刀腐皮菌 FG319 培养条件的优化是有效的, 其次生代谢产物 MFS 体外抑制 HMG-CoA 还原酶的效果也是明显的。

关键词: 响应面法, 培养条件, 海洋微生物, HMG-CoA 还原酶

Use of response surface methodology on the production of active compound MFS from *Fusarium solani* and its activity on HMG-CoA reductase

ZHOU Yu¹ WU Wen-Hui^{2,3} SU Tong-Wei¹ BAO Bin^{1,2*} WANG Xiao-Yu¹

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

(2. Shanghai Aquatic Products Processing and Storage Engineering Technology Research Center, Shanghai 201306, China)

(3. Institute of Marine Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: [Objective] In the present study, response surface methodology (RSM) was used to optimize the fermentation conditions of MFS (metabolite of *Fusarium solani* FG319) extracted from marine microorganism, *Fusarium solani*. [Methods] On the basis of single factor tests, Box-Behnken RSM was employed with three factors such as addition of L-ornithine hydrochloride at different

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2011AA09070109)

*通讯作者: Tel: 86-21-61900388; 信箱: bbao@shou.edu.cn

收稿日期: 2013-10-31; 接受日期: 2014-01-08; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-16

concentrations, culture time, and culture temperature on the yield of MFS. **[Results]** The optimum culture conditions were as follows: the L-ornithine hydrochloride addition was 0.6% (W/V), culture time was 7 d, culture temperature was 22 °C. Under these conditions the yield of MFS was 20.11 mg/L, which is 4 times increased than without any optimization and the relative error with the theoretical value was 0.64%. The inhibition rate of MFS on HMG-CoA reductase was achieved above 100 mg/L, and has a similar inhibition as Lovastatin. **[Conclusion]** The culture conditions obtained by response surface methodology were effective and reliable, and the effect of MFS on HMG-CoA reductase is obvious *in vitro*.

Keywords: Response surface methodology, Culture conditions, Marine microorganisms, HMG-CoA reductase

生活在贫营养、高盐、少光、低温海洋生态环境中的微生物具有耐饥、耐低温和耐盐等生物学特性,形成了海洋微生物独特的代谢机制和机体防御体系,产生着结构新颖和生物活性多样的次生代谢产物,因此,海洋微生物成为近年来研究生物活性化合物的重要资源^[1-3]。

到 2009 年止,从海洋分离得到的真菌主要有青霉属(*Penicillium*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、木霉属(*Trichoderma*)、氯霉属(*Cloridium*)、金孢属(*Chrysosporium*)等 321 属^[4-5],其次生代谢产物报道具有抗菌^[6]、抗病毒^[7]、抗肿瘤^[8]、抗心脑血管疾病^[9]等生物活性。

Jiang Z. 等^[10] 研究报道从海洋分离的镰刀腐皮菌 MOBCOF-1,其代谢产物 JM47 具有抗菌作用。本文通过构筑的体外抗动脉硬化评价反应,发现分离自东海舟山海域的海洋微生物镰刀腐皮菌 FG319 (*Fusarium solani* FG319)的次生代谢产物 MFS (Metabolite of *Fusarium solani* FG319)具有抑制 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA)还原酶的生物活性。MFS 是本实验室从海洋微生物镰刀腐皮菌 FG319 的次生代谢产物中分离得到的单一化合物,用 HPLC 检测纯度为 96.36%。

HMG-CoA 还原酶是胆固醇合成过程的关键酶,HMG-CoA 经 HMG-CoA 还原酶催化转化成羟甲戊酸,导致血浆中低密度脂蛋白胆固醇水平降低,而血浆中高浓度的低密度脂蛋白胆固醇是心血管疾病的一个危险因素^[11-12]。因此,抑制胆固醇合成过程的关键酶,将能有效降低血浆中胆固醇的水

平,能达到预防和治疗动脉硬化的作用^[13-14]。

响应面优化法通常是评估最少的实验数据,期望获得最优的实验条件^[15]。本实验在发现海洋镰刀腐皮菌 FG319 次生代谢产物具有抑制 HMG-CoA 还原酶生物活性作用的基础上,通过 Box-Behnken 响应面模型^[16-17],研究诱导物添加量、培养时间、培养温度对镰刀腐皮菌 FG319 次生代谢产物 HMG-CoA 还原酶抑制剂 MFS (Metabolite of *Fusarium solani* FG319)产量的影响,得到镰刀腐皮菌 FG319 产 MFS 的最优培养条件。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌株: 镰刀腐皮菌 FG319 (*Fusarium solani* FG319)分离于东海舟山海域,上海海洋大学实验研究中心保藏。

1.1.2 培养基种类和组成: 种子液培养基(g/L): 葡萄糖 35,可溶性淀粉 10,脱脂大豆粉 20,细菌学蛋白胨 5,牛肉浸膏 5,酵母提取物 3,氯化钠 2,磷酸氢二钾 0.5,硫酸镁 0.05,调整 pH 值为 5.8, 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。

发酵培养基(g/L): 硝酸钠 2,磷酸氢二钾 1,氯化钾 0.5,硫酸镁 0.5,硫酸亚铁 0.01,蔗糖 30, L-鸟氨酸盐酸盐, pH 自然, 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。

1.1.3 主要试剂及仪器: 用于配制培养基的葡萄糖、磷酸氢二钾、硝酸钠等试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;细菌学蛋白胨、酵母提取物、脱脂大豆粉,购自 Sigma 公司。用于高效液相色谱仪的甲醇、乙腈、三氟乙酸(Trifluoroacetic

acid, TFA)均为色谱纯。

酶标仪(CORONA SH-1000), 日本; 全温培养摇床(华美 QZ-98A), 江苏; 超净工作台(Airtech VD-650-U), 江苏; 冷冻干燥机(Labconco 2.5 Plus), 美国; 冷冻高速离心机(Hitachi CR 21G), 日本; 高效液相色谱仪(Hitachi L-2000), 日本; 高压蒸汽灭菌锅(Sanyo MLS-3750), 日本。

1.2 实验方法

1.2.1 HMG-CoA 还原酶抑制作用评价方法: 于96孔平板孔内注入2.5 mmol/L HMG-CoA、2–8 U/mg HMG-CoA 还原酶、10 mmol/L NADPH 和待测样品, 构成50 μ L 的反应体系。在37 $^{\circ}$ C 于337 nm 处每隔4 min 连续测定80 min, 通过NADPH 吸光度的变化以评定镰刀腐皮菌 FG319 次生代谢产物 (Metabolite of *Fusarium solani* FG319, MFS) 对 HMG-CoA 还原酶的抑制作用^[18], 从而评价对内源性胆固醇合成的抑制活性^[19]。

计算公式为:

$$R = \frac{K_i - K_C}{K_C} \times 100\%$$

式中, R 为抑制率(%); K_i 和 K_C 分别为样品和对照的直线斜率。

1.2.2 色谱条件: 采用高效液相色谱法测定 MFS 的含量, 梯度分离条件为流动相 0.1% TFA 和乙腈 (30 min 内乙腈从 40% 增加到 85%), 检测波长 271 nm, 流速 1 mL/min, 柱温 40 $^{\circ}$ C。

精确称取精制后的 MFS 配制成甲醇标准液, 并梯度稀释为 500、200、100、50、10、1 mg/L 的标准样品, 用 HPLC 进行检测, 平行 3 次。以样品浓度为 X 轴, HPLC 响应峰面积为 Y 轴绘制 MFS

标准曲线, 得线性方程为 $Y=8\ 199.8X+11\ 385$, $R^2=0.999\ 8$, 线性相关优良。

1.3 单因素实验设计

1.3.1 诱导物添加量对 MFS 产量的影响: 基础发酵培养基为不添加诱导物的培养基, 分别添加 0.1%、0.5%、0.9%、1.5% 和 2.0% 的诱导物。取活化的种子液按 1% 的接种量接种到发酵培养基, 郭江等^[20]研究表明, 海洋真菌的最佳培养温度一般在 24 $^{\circ}$ C 左右。考虑到大多数海洋微生物的生长要求较低的温度, 因此本实验设定培养温度为 22 $^{\circ}$ C, 摇床转速 160 r/min, 连续检测 4–8 d 发酵液中 MFS 的产量, 诱导物添加量各水平组中 MFS 均在第 7 天达到最高值, 以该培养时间的 MFS 产量确定最优的诱导物添加量。

1.3.2 培养时间对 MFS 产量的影响: 取活化的种子液按 1% 接种量接种到最优诱导物添加量的发酵培养基中, 培养温度 25 $^{\circ}$ C, 摇床转速 160 r/min, 分别在第 1、3、5、7、10、12、15 天取发酵液进行 MFS 产量的检测, 以确定最优发酵时间。

1.3.3 培养温度对 MFS 产量的影响: 取活化的种子液按 1% 接种量接种到最优诱导物添加量的发酵培养基, 设定培养温度为 15、19、22、25、28 $^{\circ}$ C, 摇床转速 160 r/min, 在最优的培养时间取发酵液对 MFS 产量进行检测, 以确定最优培养温度。

1.4 响应面实验设计

根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理^[21], 综合单因素实验结果, 选取诱导物添加量、培养时间、培养温度 3 个因素, 在单因素实验的基础上采用 3 因素 3 水平的响应面分析方法, 实验因素与水平设计见表 1。

表 1 响应面分析因素与水平
Table 1 Analytical factors and levels for RSA

因素 Factors	水平 Levels		
	-1	0	+1
诱导物添加量 The addition of inducer	0.1	0.5	0.9
培养时间 Incubation time (d)	4	7	10
培养温度 Temperature ($^{\circ}$ C)	19	22	25

2 结果与分析

2.1 镰刀腐皮菌 FG319 次生代谢产物的 HMG-CoA 还原酶抑制作用

以发现 HMG-CoA 还原酶抑制剂为目标,从东海舟山海域筛选得到的一株海洋微生物被鉴定为镰刀腐皮菌 FG319 (*Fusarium solani* FG319),其抑制 HMG-CoA 还原酶的次生代谢产物经 HPLC 纯化为 MFS (Metabolite of *Fusarium solani* FG319)。其 HPLC 图谱如图 1 所示。

从图 1 MFS 的 HPLC 色谱图可知, MFS 为主要的峰,其含量高达 96.36%,可用于 HMG-CoA 还原酶抑制活性的测定。

将 MFS 添加到 HMG-CoA 还原酶抑制作用评价反应体系,不同浓度 MFS 抑制 HMG-CoA 还原酶的作用如图 2 所示。

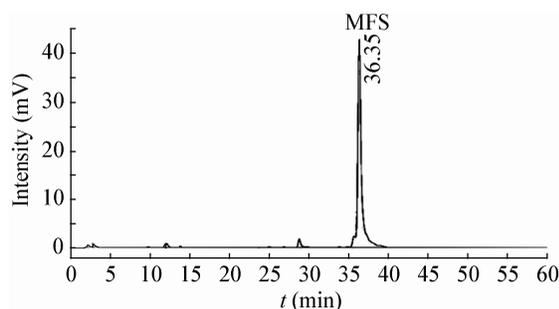


图 1 纯化后 MFS 的 HPLC 图谱

Figure 1 HPLC chromatogram of purified MFS

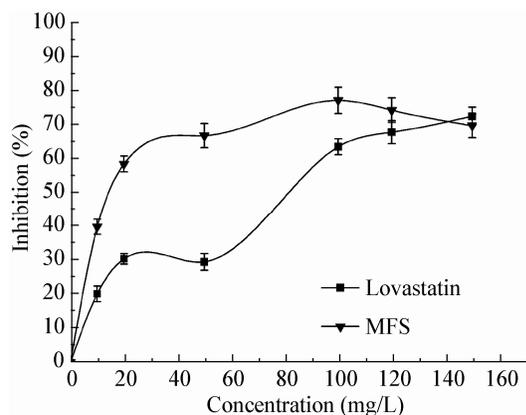


图 2 次生代谢产物 MFS 对 HMG-CoA 还原酶的影响
Figure 2 The effect of secondary metabolite MFS on HMG-CoA reductase

图 2 显示,添加 MFS 的浓度为 10、20、50、100、120、150 mg/L, HMG-CoA 还原酶的抑制率分别 39.9%、58.7%、67.1%、77.5%、74.6%和 70.0%。反应体系中随着 MFS 添加浓度的升高,其对 HMG-CoA 还原酶的抑制率增大,当 MFS 的浓度为 100 mg/L 时,抑制率最高达到 77.5%,半数抑制浓度为 9.6 mg/L。当 MFS 的添加量超过 100 mg/L 时, HMG-CoA 还原酶抑制率呈现下降趋势。

实验中以洛伐他汀为阳性对照,浓度为 150 mg/L 时,抑制率最高达到 72.8%,半数抑制浓度为 64.5 mg/L。从实验数据得知,海洋真菌镰刀腐皮菌 FG319 的次生代谢产物 MFS 具有强烈抑制 HMG-CoA 还原酶的活性。

2.2 单因素实验结果

2.2.1 诱导物添加量对 MFS 产量的影响: 固定发酵培养时间为 7 d, 培养温度为 25 °C, 研究不同诱导物添加量对镰刀腐皮菌 FG319 产 MFS 产量的影响,其结果如图 3 所示。

影响微生物次生代谢产物产量的因素有许多,如碳代谢物的调节、磷酸盐的调节、酶的诱导调节等。目前,底物的诱导机理虽然并不完全清楚,但这些诱导物确实能提高次生代谢产物的产量^[22]。Chhaya U.和 Gupte A.^[23]研究各种不同氨基酸及其盐类,如 L-鸟氨酸盐酸盐、D-丝氨酸、L-甘氨酸等对 *Fusarium incarnatum* LD-3 真菌发酵产漆酶的影响。

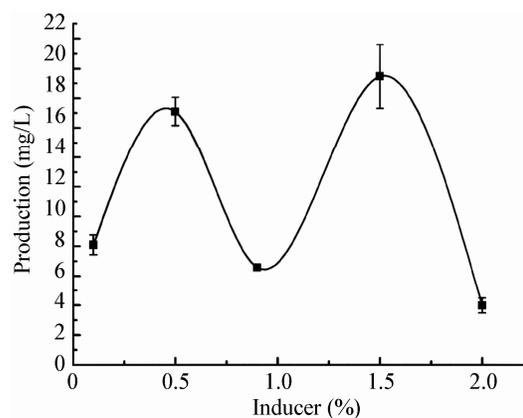


图 3 诱导物添加量对 MFS 产量的影响
Figure 3 Effect of added amount of inducer on MFS yield

影响,发现多数氨基酸及其盐类对漆酶的产量是有促进作用的。从图 3 可见,随着诱导物(L-鸟氨酸盐酸盐)添加量的增加,MFS 产量先是逐渐增加,当诱导物添加量为 0.5%时 MFS 产量达到极大值,随后出现下降趋势,但是随着诱导物添加量增加至 1.5%时,MFS 的产量达到最大值 20.80 mg/L,诱导物的添加浓度导致 MFS 产量波状变化,其可能原因是由于 L-鸟氨酸盐酸盐与诱导产 MFS 物质的结合是按比例的,其真正的机理有待进一步的研究。考虑到今后工业化的生产,本实验确定最优诱导物添加量为 0.5%。

2.2.2 培养时间对 MFS 产量的影响: 固定发酵培养温度为 25 °C,诱导物添加量为 0.5%,研究不同培养时间对镰刀腐皮菌 FG319 产 MFS 产量的影响,其结果如图 4 所示。

由图 4 可知,培养时间对 HMG-CoA 还原酶抑制剂产量的影响较为显著,当发酵天数为 3 d 时出现一个极大值,其产量为 14.11 mg/L。随着发酵天数的增加,HMG-CoA 还原酶抑制剂产量出现先下降后上升的趋势,并在第 7 天达到最大值 17.59 mg/L。因此,本实验确定最优培养天数为 7 d。

2.2.3 培养温度对 MFS 产量的影响: 固定诱导物添加量为 0.5%,培养时间为 7 d,考察不同发酵温度对 MFS 产量的影响,其结果如图 5 所示。

由图 5 可知,在 15–22 °C 范围内镰刀腐皮菌 FG319 发酵产 HMG-CoA 还原酶抑制剂的产量随

温度升高而升高,当发酵温度高于 22 °C 以后,再升高温度 MFS 的产量开始逐渐下降。其最优发酵温度为 22 °C,发酵产量为 19.38 mg/L。

单因素实验表明,镰刀腐皮菌 FG319 发酵产 MFS 的最优诱导物添加量为 0.5%,最优发酵时间为 7 d,最优培养温度为 22 °C。

2.3 MFS 产量的响应面优化

2.3.1 模型的建立及显著性检验: 以诱导物添加量(A)、培养时间(B)、培养温度(C)为实验因素,MFS 产量为响应值,进行 3 因素 3 水平响应面分析实验,实验设计与结果见表 2。

以 MFS 产量为响应值,利用 Design Expert 软件对表 2 进行二次多元回归拟合^[24],得到 MFS 产量对诱导物添加量(A)、培养时间(B)、培养温度(C)的二次多项回归方程:

$$Y=19.84+3.19A-1.41B+0.75C-0.99AB+0.052A^2C-1.11BC-8.77A^2-7.54B^2-6.57C^2。$$

回归模型方差分析(表 3)表明,对 MFS 产量所建立的回归模型极显著($P<0.0001$),失拟项 P 值为 0.2424,大于 0.05,这表明实验数据与模型拟合良好。回归诊断表明模型复相关系数 $R^2=0.9994$,调整后 $R^2=0.9987$,精密度(Adequate precision)为 92.862,这表明方程的拟合度和可信度均较高。

通过对 P 值检验可以看出诱导物添加量、培养时间、培养温度以及他们的二次项对 MFS 产量的影响都是显著的。且诱导物与培养时间的交互作用以及培养时间与培养温度的交互作用对 MFS 产量的影响同样是显著的。从上述数据可以看出,

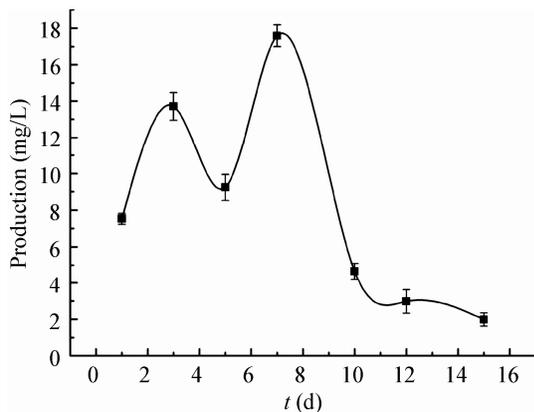


图 4 培养时间对 MFS 产量的影响

Figure 4 Effect of culture time on MFS yield

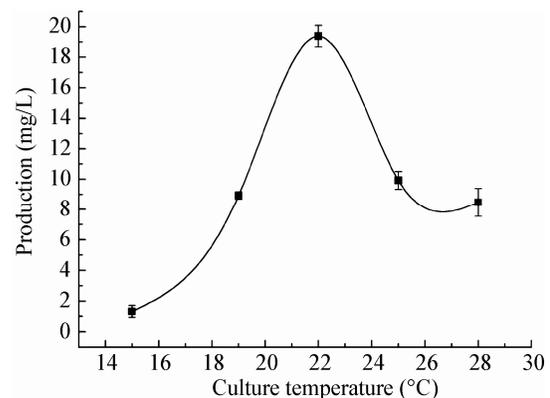


图 5 培养温度对 MFS 产量的影响

Figure 5 Effect of culture temperature on MFS yield

表 2 Box-Behnken 响应面实验设计及各实验的 MFS 产出量
Table 2 The Box-Behnken design and experimental results of response surface methodology

编号 No.	诱导物 A-Inducer (%)	时间 B-Time (d)	温度 C-Temperature (°C)	产量 Y-Production (mg/L)
1	0.50	4.00	19.00	5.46
2	0.90	7.00	25.00	8.74
3	0.10	4.00	22.00	0.83
4	0.50	7.00	22.00	19.77
5	0.50	10.00	19.00	4.69
6	0.50	7.00	22.00	19.72
7	0.50	4.00	25.00	8.98
8	0.90	7.00	19.00	6.93
9	0.10	7.00	19.00	0.35
10	0.50	7.00	22.00	19.62
11	0.90	10.00	22.00	4.25
12	0.90	4.00	22.00	8.87
13	0.50	7.00	22.00	20.22
14	0.10	7.00	25.00	1.95
15	0.10	10.00	22.00	0.17
16	0.50	7.00	22.00	19.85
17	0.50	10.00	25.00	3.78

表 3 回归方差分析结果
Table 3 ANOVA for response surface quadratic model

方差来源 Source	调整平方和 SS	自由度 df	调整均方 MS	F 值 F value	P 值 P value
Model	941.21	9	104.58	1 338.44	<0.000 1
A	81.22	1	81.22	1 039.45	<0.000 1
B	15.82	1	15.82	202.47	<0.000 1
C	4.53	1	4.53	57.98	0.000 1
AB	3.92	1	3.92	50.17	0.000 2
AC	0.011	1	0.011	0.14	0.718 3
BC	4.91	1	4.91	62.79	<0.000 1
A ²	323.88	1	323.88	4 145.14	<0.000 1
B ²	239.09	1	239.09	3 059.95	<0.000 1
C ²	181.91	1	181.91	2 328.19	<0.000 1
Residual	0.55	7	0.078		
Lack of fit	0.33	3	0.11	2.10	0.242 4
Pure error	0.21	4	0.053		
Cor total	941.76	16			

此模型可良好的用于预测 MFS 的产量。

2.3.2 响应面交互作用分析与优化: 等高线的形状反映出交互效应的强弱大小, 椭圆形表示两因素交互作用显著, 圆形则表示两因素交互作用不显著^[25-26]。从图 6-8 的等高线可以直观地看出, 培养温度和培养时间轴向等高线变化稀疏, 而诱导物

添加量轴向等高线变化密集, 故培养温度和培养时间比诱导物添加量对响应值峰值影响较大。培养时间和诱导物添加量以及培养时间和培养温度的等高线形状趋于椭圆形, 表明其交互作用显著, 而培养温度与诱导物添加量的等高线形状趋于圆形, 说明其二者的交互作用对响应值影响不大。

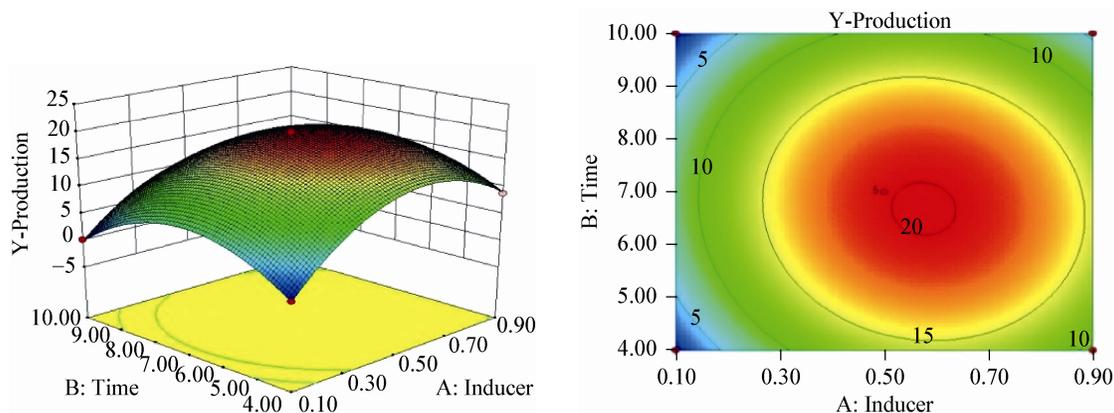


图 6 培养时间和诱导物添加量交互作用对 MFS 产量影响

Figure 6 Interaction effect of culture time and added amount of inducer on MFS yield

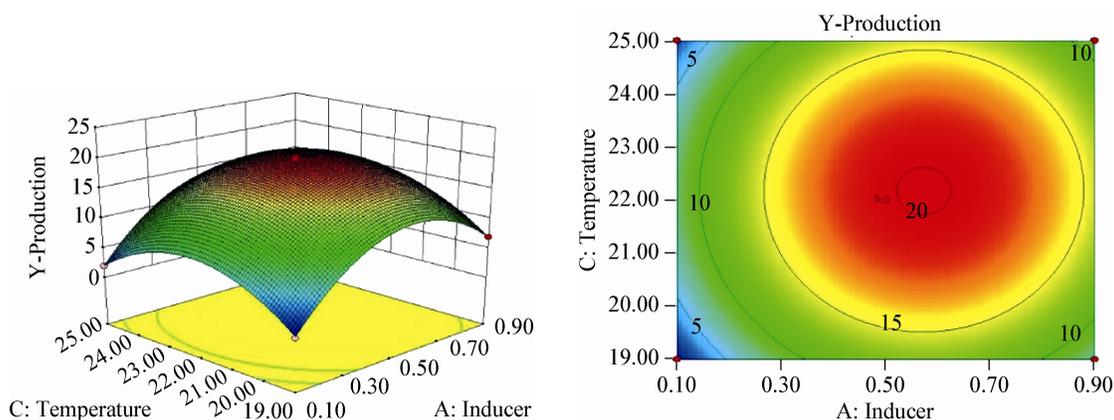


图 7 培养温度和诱导物添加量交互作用对 MFS 产量影响

Figure 7 Interaction effect of culture temperature and added amount of inducer on MFS yield

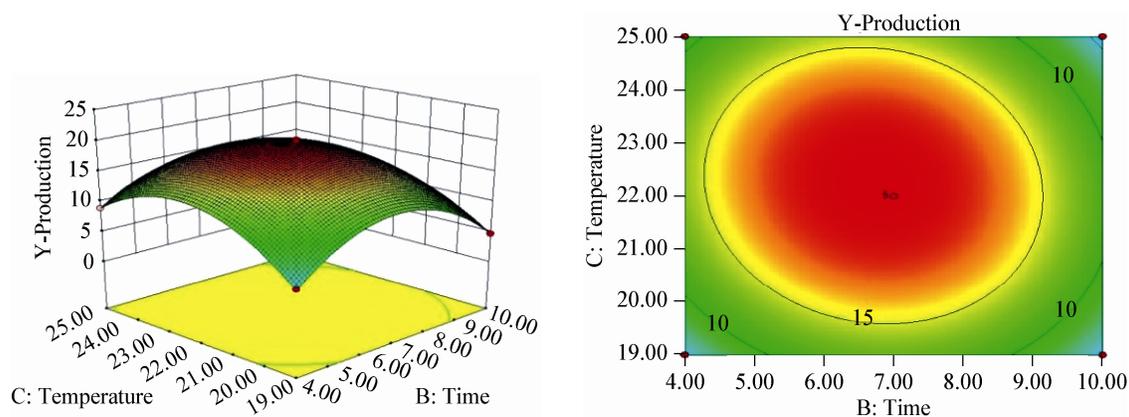


图 8 培养时间和培养温度交互作用对 MFS 产量影响

Figure 8 Interaction effect of culture time and culture temperature on MFS yield

通过 Design Expert 8.06 软件计算并分析得到的各因素的最优条件为: 诱导物添加量为 0.58%, 培养时间为 6.67 d, 培养温度为 22.2 °C, 此模型下 MFS 的理论产量为 20.24 mg/L。考虑到实际情况, 进行调整后的最优发酵条件为: 诱导物添加量为 0.6%, 培养时间 7 d, 培养温度 22 °C。

2.4 培养条件验证试验

为了验证本模型的准确性, 在诱导物添加量为 0.6%, 培养时间 7 d, 培养温度 22 °C 的条件下, 进行 3 次平行验证试验, MFS 产量平均值为 20.11 mg/L, 与模型预测值一致(相对误差 0.64%)。说明实验结果与模型预测拟合良好, 利用 Box-Behnken 响应面模型优化镰刀腐皮菌 FG319 发酵产 MFS 的培养条件具有可行性。

3 结论与讨论

本实验通过建立体外抑制 HMG-CoA 还原酶模型, 以洛伐他汀作为阳性对照, 从实验数据得知, 海洋真菌镰刀腐皮菌 FG319 的次生代谢产物 MFS 具有强烈抑制 HMG-CoA 还原酶的活性。

本文在单因素实验的基础上, 利用响应面分析法 Box-Behnken 模型对镰刀腐皮菌 FG319 发酵产生 MFS 的培养条件进行优化。结果表明最佳培养条件为: 诱导物添加量 0.6%, 培养时间 7 d, 培养温度 22 °C。且方差分析表明模型拟合度良好, MFS 的产量达到 20.11 mg/L, 是优化前的 4 倍。

HMG-CoA 还原酶抑制剂, 作为一种降血脂药物, 可有效预防和治疗动脉粥样硬化疾病。巨噬细胞的浸润可能是不稳定动脉硬化综合症的原因之一, 因为这些细胞分泌的蛋白水解酶降解病变处的纤维帽, 造成斑块破裂和血栓形成, 这是动脉硬化发生急性缺血性事件的主要原因^[27]。Bustos C. 等^[28]研究发现, HMG-CoA 还原酶抑制剂能同时降低单核细胞趋化因子 1 (Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 的表达和核因子 κ B (Nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 的活性, 而 MCP-1 是病变巨噬细胞的主要趋化因子。Barnes P. J. 等^[29]报道指出, 许多趋化因子的基因、粘附分子和其他炎症相

关的蛋白质具备 NF- κ B 的识别位点, 因此减缓 NF- κ B 的活化是控制动脉粥样硬化斑块破裂的一个关键控制点。因此, HMG-CoA 还原酶抑制剂可以延缓冠状动脉粥样硬化, 减少局部缺血事件的发生率。

镰刀腐皮菌 FG319 是一株分离自东海海域的海洋真菌, 其生物学特性尚未完全明确, 有待于进一步的研究。通过响应面分析, 优化了其产 MFS 代谢产物的培养条件, 但发酵产量仍不理想, 因此可从培养基碳氮比、pH 等方面入手进一步提高产量。

参考文献

- [1] Blunt JW, Copp BR, Wu WP, et al. Marine natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2009, 26(2): 170-244.
- [2] Satpute SK, Banat IM, Dhakephalkar PK, et al. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(4): 436-450.
- [3] Yasuhara-Bell J, Lu Y. Marine compounds and their antiviral activities[J]. *Antiviral Research*, 2010, 86(3): 231-240.
- [4] Jones EBG, Sakayaroj J, Suetrong S, et al. Classification of Marine Ascomycota, Anamorphic Taxa and Basidiomycota[M]. Chiang Mai: Fungal Diversity Press, 2009, 35(1): 1-187.
- [5] 冯春辉. 黄海, 长江口沉积物中真菌属种多样性初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2012.
- [6] Shigemori H, Wakuri S, Yazawa K, et al. Fellutamides A and B, cytotoxic peptides from a marine fish-possessing Fungus *Penicillium fellutanum*[J]. *Tetrahedron*, 1991, 47(40): 8529-8534.
- [7] Nakashima H, Kido Y, Kobayashi N, et al. Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor, sulfated polysaccharides extracted from sea algae[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1987, 31(10): 1524-1528.
- [8] Wei H, Itoh T, Kinoshita M, et al. Cytotoxic sesterterpenes, 6-epi-ophiobolin G and 6-epi-ophiobolin N, from marine derived fungus *Emericella varicolor* GF10[J]. *Tetrahedron*, 2004, 60(28): 6015-6019.
- [9] Shin HJ, Kim TS, Lee HS, et al. Streptopyrrolidine, an angiogenesis inhibitor from a marine-derived *Streptomyces* sp. KORDI-3973[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(12): 2363-2366.
- [10] Jiang Z, Barret MO, Boyd KG, et al. JM47, a cyclic tetrapeptide HC-toxin analogue from a marine *Fusarium* species[J]. *Phytochemistry*, 2002, 60(1): 33-38.
- [11] Shitara Y, Sugiyama Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic

- enzyme functions[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2006, 112(1): 71-105.
- [12] Tobert JA. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003, 2(7): 517-526.
- [13] Alberts AW, Chen J, Kuron G, et al. Mevinolin: A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1980, 77(7): 3957-3961.
- [14] Kiener PA, Davis PM, Murray JL, et al. Stimulation of inflammatory responses *in vitro* and *in vivo* by lipophilic HMG-CoA reductase inhibitors[J]. *International Immunopharmacology*, 2001, 1(1): 105-118.
- [15] Lizotte DJ, Greiner R, Schuurmans D. An experimental methodology for response surface optimization methods[J]. *Journal of Global Optimization*, 2012, 53(4): 699-736.
- [16] Kousha M, Daneshvar E, Dopeikar H, et al. Box-Behnken design optimization of Acid Black 1 dye biosorption by different brown macroalgae[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2012, 179(1): 158-168.
- [17] Fang YW, Ahmed S, Liu S, et al. Optimization of antioxidant exopolysaccharides production by *Bacillus licheniformis* in solid state fermentation[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 98(2): 1377-1382.
- [18] 于刚, 曹晓刚, 叶小利, 等. 高效液相色谱法测定3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶抑制剂的活性[J]. *分析化学*, 2009, 37(1): 87-90.
- [19] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长发. *生物化学*[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 284-291.
- [20] 郭江, 祖国仁, 孔繁东, 等. 一株海洋真菌菌株 M-401 产抑菌物质发酵条件研究[J]. *微生物学杂志*, 2007, 27(1): 76-79.
- [21] Ferreira SLC, Bruns RE, Ferreira HS, et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 597(2): 179-186.
- [22] 甘建红, 周培根. *海洋天然物质化学*[M]. 上海: 上海大学出版社, 2006: 120-131.
- [23] Chhaya U, Gupte A. Effect of different cultivation conditions and inducers on the production of laccase by the litter-dwelling fungal isolate *Fusarium incarnatum* LD-3 under solid substrate fermentation[J]. *Annals of Microbiology*, 2013, 63(1): 215-223.
- [24] 苏同伟, 包斌, 严婷, 等. 响应面法优化海洋微生物发酵产生纤溶化合物的培养条件[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(6): 857-861.
- [25] Farooq AM, Imran T, Khaled AS. Response surface methodology: A neural network approach[J]. *European Journal of Operational Research*, 1997, 101(1): 65-73.
- [26] Chen W, Wang WP, Zhang HS, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from *Boletus edulis* mycelia using response surface methodology[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87(1): 614-619.
- [27] Moreno PR, Falk E, Palacios I, et al. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes: implication for plaque rupture[J]. *Circulation*, 1994, 90(2): 775-778.
- [28] Bustos C, Hernández-Presa MA, Ortego M, et al. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 1998, 32(7): 2057-2064.
- [29] Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases[J]. *The New England Journal of Medicine*, 1997, 336(15): 1066-1071.