

生物法生产 25-羟基维生素 D₃ 条件优化

付跃, 李连威, 张阳阳, 黄时海* (广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530005)

摘要 [目的]优化 25-羟基维生素 D₃[25(OH)VD₃]的转化条件,提高 25(OH)VD₃ 产量。[方法]通过单因素试验和正交试验对菌株 UV-FY-141 转化生产 25(OH)VD₃ 的条件进行优化。[结果]确定其最佳发酵培养基:葡萄糖 15.00 g,蛋白胨 20.00 g,NaCl 5.00 g,CaCO₃ 2.00 g,FeSO₄·7H₂O 0.01 g,去离子水 1 000 mL。优化后转化条件:发酵初始 pH 6.5,发酵温度为 28 ℃,发酵时摇床转速为 200 r/min,发酵时间为 72 h。在优化条件下,25(OH)VD₃ 产量由原来的 9.460 mg/L 提高到 13.130 mg/L,提高了 38.79%。[结论]采用优化后的转化条件,可显著提高 25(OH)VD₃ 的产量。

关键词 25-羟基维生素 D₃;优化;发酵

中图分类号 R914.5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)02-0007-04

Optimization of Culture Conditions for the Bioconversion of Vitamin D₃ to 25-Dihydroxyvitamin D₃

FU Yue, LI Lian-wei, ZHANG Yang-yang, HUANG Shi-hai* (College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005)

Abstract [Objective] The aim was to optimize the conversion efficiency of 25(OH)VD₃. [Method] We optimized fermentation conditions of strain UV-FY-141 by single factor and orthogonal experiment. [Result] The optimum fermentation conditions were determined as follows: glucose 15.00 g, peptone 20.00 g, NaCl 5.00 g, CaCO₃ 2.00 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, and deionized water 1 000 mL. Conversion conditions were determined as follows: initial pH 6.5, fermentation temperature 28 ℃, rotation speed 200 r/min, fermentation time 72 h. The production of 25(OH)VD₃ was improved by 38.79%, from 9.460 mg/L to 13.130 mg/L. [Conclusion] The optimized conditions can improve the yield of 25(OH)VD₃ significantly.

Key words 25(OH)VD₃; Optimization; Fermentation

维生素 D₃(VD₃)在人体内是没有活性的,只有转化成有活性的代谢产物才能发挥作用。维生素 D₃ 的活性衍生物主要有骨化二醇、骨化三醇等。维生素 D₃ 首先在肝脏转化成骨化二醇,然后在肾脏中转化成骨化三醇^[1],其中骨化二醇是血液中主要存在形式,骨化三醇是最有活性的代谢衍生物^[2]。25-羟基维生素 D₃[25(OH)VD₃],又称骨化二醇,是通过人体内的 VD₃ 羟化酶转化而来的^[3-4],对光、空气、热敏感,不溶于水,易溶于乙醇等极性有机溶剂^[5]。骨化二醇临床上用于治疗甲状腺功能衰退、骨质疏松、牛皮癣、慢性肾功能衰竭^[1]。骨化二醇能够化学合成,但是步骤复杂,成本高,相对于化学合成,生物转化具有明显优势。研究表明,一些微生物能够将维生素 D₃ 转化成骨化二醇和骨化三醇,步骤简单,成本低^[6]。生物转化速率不仅受微生物培养组分、培养过程的影响,而且受培养条件(pH、温度等)的影响^[7]。发酵条件的优化对生物转化生产 VD₃ 十分重要。笔者采用单因素试验和正交试验对生物法合成 25(OH)VD₃ 条件进行了优化,旨在为提高 VD₃ 的转化率提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种。放线菌 UV-FY-141:广西大学生命科学与技术学院食品与发酵研究所保存。

1.1.2 试验药剂。维生素 D₃(分析纯)、25-羟基维生素 D₃(分析纯),美国 Sigma 公司;氯化钠(分析纯),天津博迪化工有限公司。

1.1.3 培养基。斜面培养基:可溶性淀粉 20.00 g,硝酸钾

1.00 g, NaCl 0.50 g, 磷酸氢二钾 0.50 g, MgSO₄·7H₂O 0.50 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, 去离子水 1 000 mL。种子培养基:葡萄糖 15.00 g,蛋白胨 15.00 g,玉米浆干粉 5.00 g,NaCl 5.00 g,CaCO₃ 2.00 g,去离子水 1 000 mL,pH 7.0。发酵培养基:葡萄糖 15.00 g,植物用大豆蛋白胨 15.00 g,玉米浆干粉 5.00 g,NaCl 5.00 g,CaCO₃ 2.00 g,去离子水 1 000 mL,pH 7.0。

1.1.4 仪器。EBA21 型高速离心机, Hettich zentrifugen 公司;YP1200 型电子天平,上海精科实业有限公司;岛津 10-AT 高效液相色谱仪,日本岛津有限公司;UV1601 紫外分光光度计,日本 Shimadzu 公司;依利特 Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.60 mm×250.00 mm,5 μm),美国热电公司。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化。从 -80 ℃ 冰箱中取出甘油保藏的菌种 UV-FY-141,接种到装液量为 50.00 mL 的 250.00 mL 三角瓶中,28 ℃、180 r/min 培养 7~15 d;细菌活化好后梯度稀释,涂平板,在 28 ℃ 生化培养箱中培养 7 d;用接种环挑取单菌落,接种到斜面培养基;在 28 ℃ 生化培养箱中培养 7 d,-20 ℃ 冰箱保存。

1.2.2 孢子溶液的制备。从 -20 ℃ 冰箱中取出斜面,灭菌 15~20 min,用 5.00 mL 移液枪向斜面加灭菌去离子水 10.00 mL,用接种环轻轻刮下孢子,用移液枪反复吹打后转移到装有玻璃珠的 50.00 mL 三角瓶中,28 ℃、180 r/min 振荡 30 min,打散孢子,然后 4 层纱布过滤,制备孢子悬液。

1.2.3 发酵。用移液枪吸取 1.00 mL 孢子悬液接种到种子培养基中,28 ℃、180 r/min 培养 48 h,吸取 1.00 mL 种子液接种到发酵培养基中,48 h 后向发酵培养基中加入用无菌滤膜过滤的反应底物,相同条件下继续培养 72 h。

1.2.4 发酵条件优化。为了提高 25(OH)VD₃ 的产量,对发

作者简介 付跃(1990—),男,河北保定人,硕士研究生,研究方向:微生物发酵。*通讯作者,教授,博士,硕士生导师,从事微生物研究。

收稿日期 2016-11-09

醇条件进行优化,主要优化碳源、氮源、无机盐离子、初始pH、温度和转速。控制其他条件不变,只改变其中1个条件逐步优化。优化完成后,选择对发酵影响显著的单因素进行正交试验,选择最优条件。

1.2.5 供试品的制备。采用 Bligh - Dyer 法^[8]制备供试品。发酵结束后取 1.00 mL 发酵液于离心管中,每个样品中加入 3.75 mL 氯仿和甲醇的混合溶液(1:2, V/V),振荡混匀后再向其中加入 1.25 mL 氯仿溶液,振荡混匀,此时会看到大量絮状沉淀,然后加入 1.25 mL 纯水,振荡混匀,此时会看到溶液分层;6 000 r/min 离心 5 min。取 1.00 mL 下层溶液于离心管中,旋转蒸发仪干燥。检测时用乙腈溶解,并用无菌滤膜过滤。

1.2.6 标准溶液的制备。称 25(OH)VD₃ 标准品 1 mg,溶于 10.00 mL 无水乙醇中,配制成 100 μg/mL 母液。稀释母液为 20、40、60、80、100 μg/mL 梯度浓度标准液。

1.2.7 检测条件。采用依利特 Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.60 mm × 250.00 mm, 5 μm),流动相为乙腈 - 水(80:20, V/V),流速为 1 mL/min,柱温设为 50 °C,检测波长为 265 nm。

2 结果与分析

2.1 碳源对 25(OH)VD₃ 产量的影响 碳源是一类能够提供碳化合物的营养物质,能够为微生物新陈代谢提供生命活动所需的能量,提供细胞或合成产物的物质基础。选择可溶性淀粉、葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖 5 种碳源按 2% 的添加量加入到培养基中进行单因素试验。由图 1 可知,以葡萄糖为碳源时,25(OH)VD₃ 的产量最高,所以选择葡萄糖作为发酵过程中的碳源。

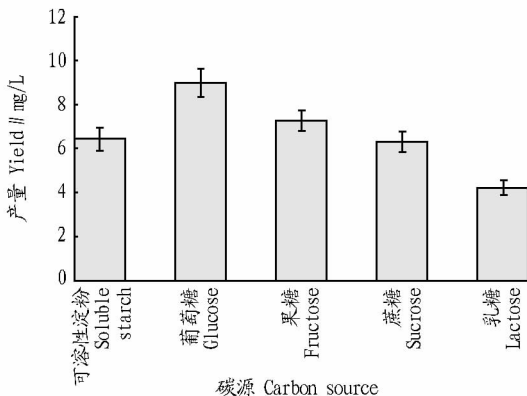


图 1 不同碳源对 25(OH)VD₃ 产量的影响

Fig. 1 Effect of different carbon sources on 25(OH)VD₃ production

选择合适的碳源浓度进行试验。由图 2 可知,在一定浓度范围内 25(OH)VD₃ 的产量随着葡萄糖浓度升高而升高,超过一定浓度后产量下降,当葡萄糖浓度为 2% 时 25(OH)VD₃ 产量最高,所以发酵浓度选择 2%。

2.2 氮源对 25(OH)VD₃ 产量的影响 氮源也是微生物生长和合成产物的重要物质。选择酵母膏、蛋白胨、玉米浆干粉、KNO₃、NH₄Cl 进行试验,添加量为 2%。由图 3 可知,蛋白胨对发酵影响显著。因此,对蛋白胨的浓度进行优化。由

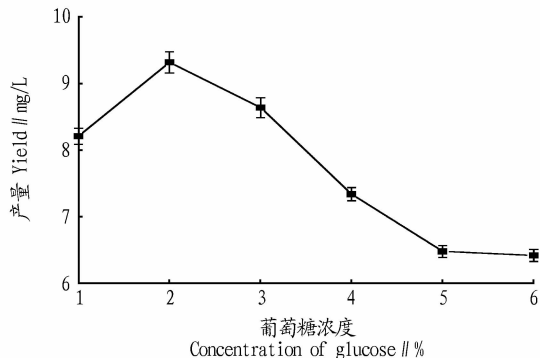


图 2 不同浓度葡萄糖对 25(OH)VD₃ 产量的影响

Fig. 2 Effect of ratio of glucose on 25(OH)VD₃ production

图 4 可知,25(OH)VD₃ 产量随蛋白胨浓度的增加先升高后降低,在蛋白胨浓度为 3% 时达到最大值。因此,发酵培养基中蛋白胨浓度选择 3%。

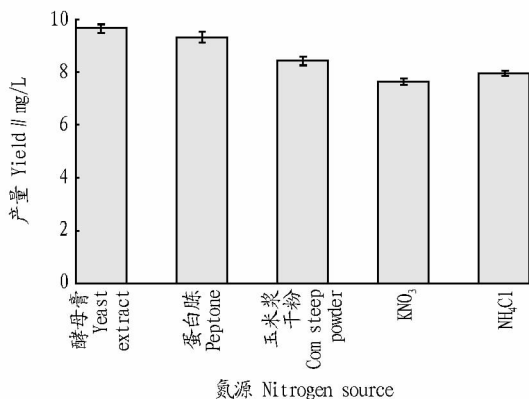


图 3 不同氮源对 25(OH)VD₃ 产量的影响

Fig. 3 Effect of different nitrogen sources on 25(OH)VD₃ production

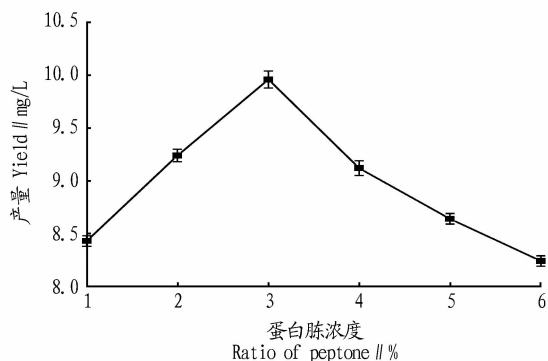


图 4 不同浓度蛋白胨对 25(OH)VD₃ 产量的影响

Fig. 4 Effect of ratio of peptone and corn steep powder on 25(OH)VD₃ production

2.3 无机盐离子对 25(OH)VD₃ 产量的影响 无机盐离子对微生物生长和产物合成也十分重要。它们或者是酶活性中心组成成分,或者参与维持大分子和细胞结构的稳定性,调节渗透压平衡,控制细胞的氧化还原电位,或者作为微生物生长的能源物质。微生物生产代谢所需要的无机盐一般包括磷酸盐、硫酸盐、氯化物及含有钠、钾、钙、镁、铁等金属元素的化合物。研究 CaCO₃、MeSO₄ · 7H₂O、NaCl、K₂HPO₄、

CaCl₂ 对 25(OH)VD₃ 产量的影响。由图 5 可知,NaCl、CaCO₃ 对发酵影响显著。因此,对该 2 种无机盐离子的浓度进行研究。由图 6 可知,25(OH)VD₃ 的产量随着 CaCO₃ 浓度的升高先升高后降低,当 CaCO₃ 浓度为 0.2% 时 25(OH)VD₃ 产量最高;当 NaCl 浓度为 0.5% 时 25(OH)VD₃ 产量最高。因此,2 种无机盐离子及其浓度分别选择 0.5% NaCl 和 0.2% CaCO₃。

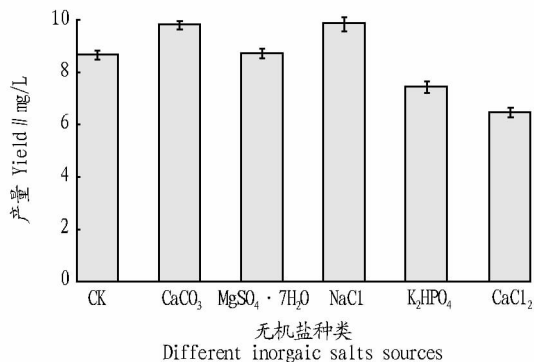


图 5 不同无机盐对 25(OH)VD₃ 产量的影响

Fig. 5 Effect of different inorganic ions on 25(OH)VD₃ production

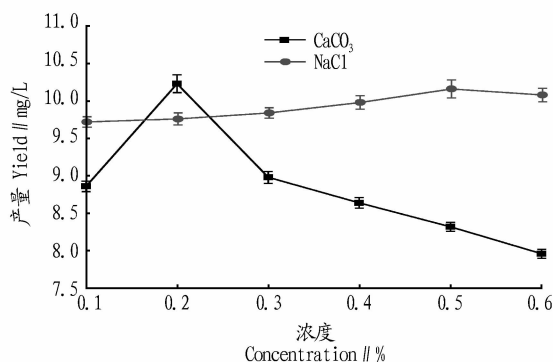


图 6 不同浓度无机盐离子对 25(OH)VD₃ 产量的影响

Fig. 6 Effect of ratio of NaCl and CaCO₃ on 25(OH)VD₃ production

2.4 发酵培养基组分的正交试验结果 通过单因素试验发现,葡萄糖、蛋白胨和 CaCO₃ 的浓度对 25(OH)VD₃ 产量影响显著,因此,选择这 3 个单因素进行 L₉(3⁴) 正交试验,每组试验设 3 个平行(表 1)。

表 1 培养基正交试验因素与水平

Table 1 Factors and level of orthogonal test for fermentation medium

水平 Level	葡萄糖(A) Glucose // %	蛋白胨(B) Peptone // %	CaCO ₃ (C) // %
1	1.50	2.50	0.15
2	2.00	3.00	0.20
3	2.50	3.50	0.25

由表 2 可知,在试验 2 的条件下,25(OH)VD₃ 的产量最高,为 11.130 mg/L,此时发酵培养基中营养成分的配比为葡萄糖 1.50%、蛋白胨 3.00%、CaCO₃ 0.20%。在上述条件下重复试验,试验结果与试验 2 结果基本一致,所以培养基的最佳配比为 A₁B₂C₂。极差值 R_A > R_B > R_C,所以 3 个因素对

25(OH)VD₃ 产量影响大小排序为葡萄糖、蛋白胨、CaCO₃。

方差分析表明, F_A > F_B > F_{0.95(2,2)} > F_C,表明葡萄糖和蛋白胨对 25(OH)VD₃ 产量影响显著,CaCO₃ 影响不显著。

表 2 培养基正交试验设计方案与结果

Table 2 The design scheme and result of orthogonal test for fermentation medium

试验号 Test No.	因素 Factors				25(OH)VD ₃ 产量 Yield of 25(OH)VD ₃ mg/L
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	8.580
2	1	2	2	2	11.130
3	1	3	3	3	7.870
4	2	1	2	3	10.200
5	2	2	2	1	10.970
6	2	3	3	2	9.570
7	3	1	3	2	7.230
8	3	2	1	3	9.010
9	3	3	2	1	8.230
k ₁	9.193	8.670	9.053	9.260	
k ₂	10.247	10.370	9.853	9.310	
k ₃	8.157	8.557	8.690	9.027	
R	2.090	1.813	1.163	0.283	

2.5 初始 pH 对 25(OH)VD₃ 产量的影响 微生物生长需要适宜的环境,其中 pH 是一项重要的因素。pH 能够改变蛋白质、核酸等生物大分子所带电荷,可引起细胞膜的电荷变化,改变微生物细胞吸收和利用营养物质的能力。不同微生物对 pH 的要求各不相同,因此,选择合适的 pH 对微生物发酵具有重要意义。研究初始 pH 5、6、7、8、9 对 25(OH)VD₃ 产量的影响,由图 7 可知,25(OH)VD₃ 的产量随着初始 pH 的升高而先升高后降低,当 pH 为 7 时 25(OH)VD₃ 产量最高,所以发酵时选择 pH 7。

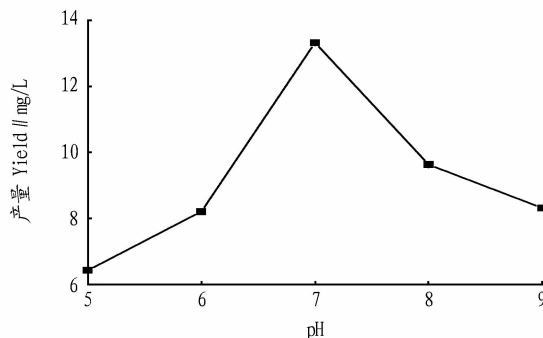


图 7 不同初始 pH 对 25(OH)VD₃ 产量的影响

Fig. 7 Effect of initial pH on 25(OH)VD₃ production

2.6 温度对 25(OH)VD₃ 产量的影响 温度是微生物生长的重要因素之一,不仅可以影响酶活性,改变酶的反应速率,还能够影响细胞膜的流动性,改变物质的运输能力,从而影响营养物质的吸收与代谢产物的分泌。研究发酵温度 26、28、30、32、34 °C 对 25(OH)VD₃ 产量的影响,由图 8 可知,在一定温度范围内,25(OH)VD₃ 的产量随温度的升高而升高,

超过一定范围,随温度的升高而降低。温度对产物产量的影响主要通过影响酶的活性来实现,同时温度的高低还会影响细胞膜的通透性,当温度适合时细胞膜的通透性增强,可以使更多的反应底物通过细胞膜,当温度为 28 ℃ 时 25(OH)VD₃ 的产量最高,确定发酵温度为 28 ℃。

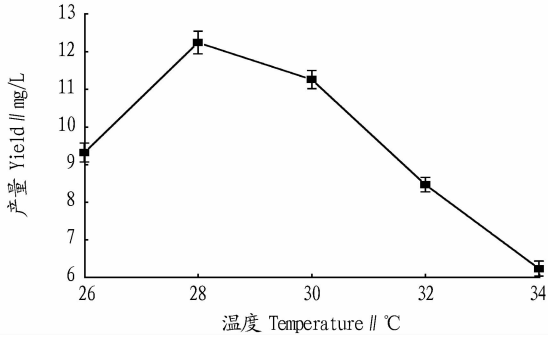


图 8 不同温度对 25(OH)VD₃ 产量的影响

Fig. 8 Effect of temperature on 25(OH)VD₃ production

2.7 摇床转速对 25(OH)VD₃ 产量的影响 摇床转速与三角瓶中的溶氧量有直接关系,主要通过溶氧量来影响发酵,转速较慢时,发酵液中的溶氧量少,不利于细菌发酵,如果过快则对细菌损伤大,也不利于发酵。研究转速 140、160、180、200、220 r/min 对 25(OH)VD₃ 产量的影响,由图 9 可知,当摇床转速为 200 r/min 时,25(OH)VD₃ 的产量最高。分析原因,当摇床转速为 200 r/min 时,摇瓶中的溶氧量充足,机械碰撞对菌体的损伤相对较小,两者达到平衡,有利于产物的合成。因此,选择 200 r/min 为发酵时的摇床转速。

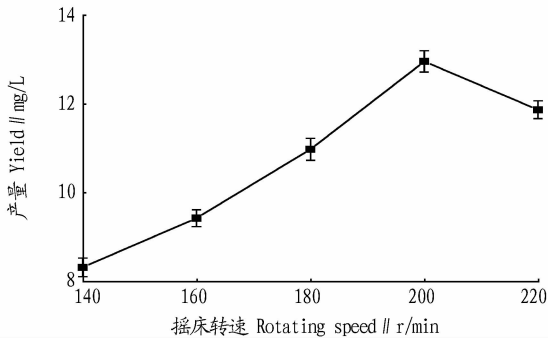


图 9 不同摇床转速对 25(OH)VD₃ 产量的影响

Fig. 9 Effect of shaking speed on 25(OH)VD₃ production

2.8 发酵时间对 25(OH)VD₃ 产量的影响 发酵时间对产物合成的影响也十分显著,因为随着发酵时间的延长,菌体的状态、培养基组分、pH 等都会发生变化,因此,对发酵时间进行优化十分必要。加入底物后,每隔 12 h 测 1 次产量,记录 12、24、36、48、60、72、84、96 h 的产量。由图 10 可知,加入反应底物后,25(OH)VD₃ 的产量开始升高,60 h 后产量基本稳定,所以确定发酵时间为 60 h,与原来发酵时间相比,发酵时间缩短了 12 h。

2.9 转化条件正交试验结果 经过单因素试验发现,初始 pH、发酵温度和摇床转速 3 个因素对 25(OH)VD₃ 的产量影响显著,因此,选择这 3 个单因素进行 L₉(3⁴) 正交试验,每组

试验设 3 个平行(表 3)。

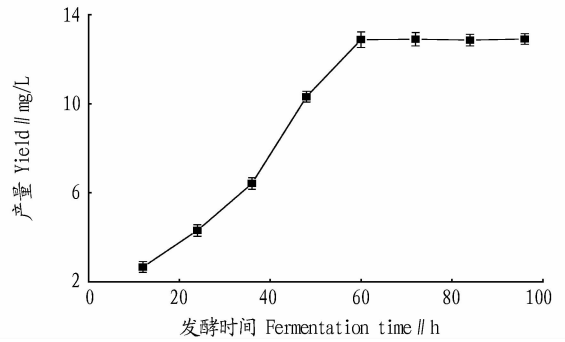


图 10 不同发酵时间对 25(OH)VD₃ 产量的影响

Fig. 10 Effect of cultivation time on 25(OH)VD₃ production

表 3 转化条件正交试验因素与水平

Table 3 Factors and level of orthogonal test for conversion conditions

水平 Level	初始 pH(A) Initial pH	发酵温度(B) Temperature / °C	摇床转速(C) Shaking speed / r/min
1	6.5	27	190
2	7.0	28	200
3	7.5	29	210

由表 4 可知,在试验 2 的条件下,25(OH)VD₃ 的产量最高,为 13.130 mg/L 左右,此时转化条件的 3 个因素为: pH 6.5,发酵温度为 28 ℃,转速为 200 r/min。在上述条件下重复试验,试验结果与试验 2 结果基本一致,所以培养基的最佳配比为 A₁B₂C₂。极差值 R_A > R_B > R_C,所以 3 个因素对 25(OH)VD₃ 产量影响大小排序为 pH、发酵温度、摇床转速。

方差分析表明, F_A > F_{0.95(2,2)} > F_B > F_C。因此, pH 对 25(OH)VD₃ 产量影响显著,温度和转速影响不显著。

表 4 转化条件正交试验设计方案与结果

Table 4 The design scheme and result of orthogon test for conversion conditions

试验号 Test No.	因素 Factors				25(OH)VD ₃ 产量 Yield of 25(OH)VD ₃ / mg/L
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	10.580
2	1	2	2	2	13.130
3	1	3	3	3	8.870
4	2	1	2	3	12.200
5	2	2	3	1	12.970
6	2	3	1	2	11.570
7	3	1	3	2	8.230
8	3	2	1	3	10.010
9	3	3	2	1	9.230
k ₁	10.860	10.337	10.720	10.927	
k ₂	12.247	12.037	11.520	10.977	
k ₃	9.157	9.890	10.023	10.360	
R	3.090	2.147	1.497	0.617	

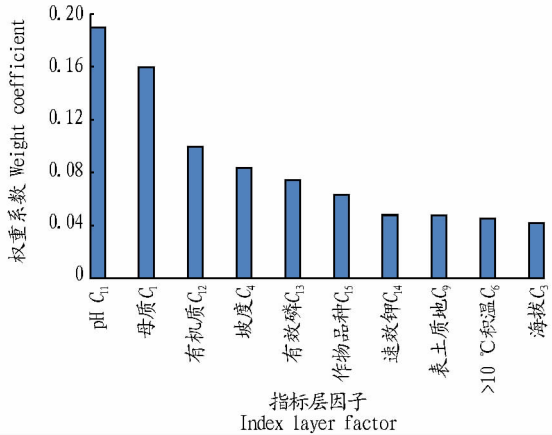


图 10 地质背景因子组合权重

Fig. 10 Combinational weight histogram of agro-geological background

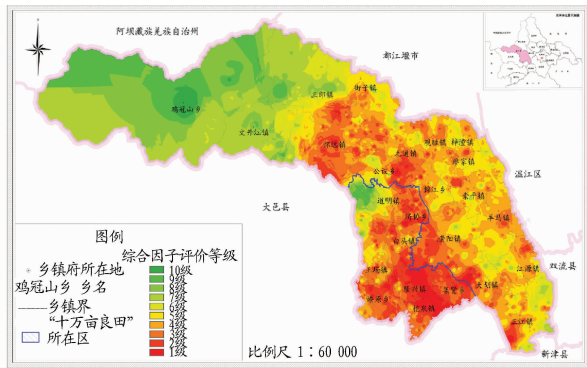


图 11 崇州市农业地质背景适宜性评价的等级划分

Fig. 11 Grade distribution of suitability evaluation on agro-geological background of Chongzhou

的崇州市西南部地质背景适宜性评价等级最高,最适宜主导农作物的种植和生长;中部和中北部适宜性评价较高,可作为示范基地扩展建设区域;中部和东部地区具有发展种植主

(上接第 10 页)

3 结论

通过单因素试验和正交试验对发酵培养基和转化条件进行优化,确定发酵培养基的组成:葡萄糖 15.00 g,蛋白胨 20.00 g,NaCl 5.00 g,CaCO₃ 2.00 g,FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g,去离子水 1 000 mL。优化后转化条件:发酵初始 pH 为 6.5,发酵温度为 28 °C,摇床转速为 200 r/min,发酵时间为 72 h。优化后,25(OH)VD₃ 产量由原来的 9.46 mg/L 提高到 13.13 mg/L,提高了 38.79%。

参考文献

[1] SASAKI J,MIYAZAKI A,SAITO M,et al. Transformation of vitamin D₃ to 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ via 25-hydroxyvitamin D₃ using *Amycolata* sp. strains[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*,1992,38(2):152-157.

[2] 曾志刚,罗红兵,翟龙飞,等.放线菌 SIIA243 对维生素 D₃ 的羟基化研究[J]. *中国抗生素*,2014,39(2):114-117.

导农作物的潜力。

参考文献

[1] 毕坤,王尚彦,李跃荣,等.农业生态地质环境与贵州优质农产品[M].北京:地质出版社,2002.

[2] 周俊,邹德炜,朱江,等.关于农业地质背景及其开发利用[J]. *安徽地质*,2002,10(2):155-160.

[3] 曾其国.广西桂北峰丛岩溶生态区罗汉果的农业地质研究[D].成都:成都理工大学,2012:98-113.

[4] 吴春发.农业地质信息在农业地质研究与区划中的应用[J]. *江苏地质*,2004,28(4):214-217.

[5] 王瑞霞,彭培好.攀枝花农业地质背景与发展生态农业的思考[J]. *山西农业科学*,2009,37(8):47-50.

[6] 曾昭华.农业生态与土壤中化学元素关系的研究[J]. *中国生态农业学报*,2002,10(1):41-43.

[7] 周国华,秦绪文,董岩翔.土壤环境质量标准的制定原则与方法[J]. *地质通报*,2005,24(8):721-727.

[8] 高琳,龙怀玉,刘鸣达,等.农业地质背景与特色农作物品质相关性研究进展[J]. *土壤通报*,2011,42(5):1263-1267.

[9] 刘杨,孙志梅,王小敏.农业地质及其与名特优农产品的相关性研究进展[J]. *安徽农业科学*,2010,38(7):3736-3738,3747.

[10] 李正积.试论农业地质背景系统的作用[J]. *山西地质*,1991,6(4):369-380.

[11] 李正积.农业地质背景系统概念及其应用[J]. *四川地质学报*,1991,11(1):63-68.

[12] 俞义,王深法,倪文良,等.水网平原地区土地农业环境质量评价指标体系及其可行性研究[J]. *农业环境科学学报*,2004,23(4):657-663.

[13] 陈美君.农业地质环境调查、分析与评价:以浙江省上虞市为例[D].上海:上海师范大学,2006:28-33.

[14] 叶娇珑,柳芳,赵利.崇州市土壤有机质分布特征研究[J]. *现代农业科技*,2015(9):217-218,225.

[15] 王数,东野光亮.地质学与地貌学教程[M].北京:中国农业大学出版社,2004:269-282.

[16] 温丹.京东板栗农业地质环境适宜性评价研究[D].保定:河北农业大学,2007:5-43.

[17] 刘朝亮.层次分析法在农业系统中的应用研究[J]. *广东农业科学*,2013,40(13):228-232.

[18] 储敏.层次分析法中判断矩阵的构造问题[D].南京:南京理工大学,2005:14-35.

[19] 任玉辉,肖羽堂.层次分析法在校园火灾危险性分析中的应用[J]. *安全与环境工程*,2008,15(1):85-88.

[20] 邓雪,李家铭,曾浩健,等.层次分析法权重计算方法分析及其应用研究[J]. *数学的实践与认识*,2012,42(7):93-100.

[21] 任云,关欣,李巧云.农业地质因素对农用地分等定级的影响:以湖南省为例[J]. *江苏农业科学*,2014,42(5):266-270.

[22] 秦子晗. GIS 技术在农业地质环境评价中的应用:浙江省农业地质环境信息系统评价子系统的设计与实现[D].成都:成都理工大学,2005:22-39.

[3] DELUCA H F,SCHNOES H K. Vitamin D;Recent advances[J]. *Annu Rev Biochem*,1983,52(1):411-439.

[4] MADHOK T C,DELUCA H F. Characteristics of the rat liver microsomal enzyme system converting cholecalciferol into 25-hydroxycholecalciferol. Evidence for the participation of cytochrome P-450[J]. *Biochem J*,1979,184(3):491-499.

[5] EDQM. EP8.0[S]. Strasbourg:European Directorate for the Quality of Medicines,2013:1721.

[6] TAKEDA K,ASOU T,MATSUDA A,et al. Application of cyclodextrin to microbial transformation of vitamin D₃ to 25-hydroxyvitamin D₃ and 1α,25-dihydroxyvitamin D₃[J]. *Journal of fermentation and bioengineering*,1994,78(5):380-382.

[7] KANG D J,LEE H S,PARK J T,et al. Optimization of culture conditions for the bioconversion of vitamin D₃ to 1α,25-dihydroxyvitamin D₃ using *Pseudonocardia autotrophica* ID9302[J]. *Biotechnology and bioprocess engineering*,2006,11(5):408-413.

[8] BLIGH E G,DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. *Canadian journal of biochemistry and physiology*,1959,37(8):911-917.